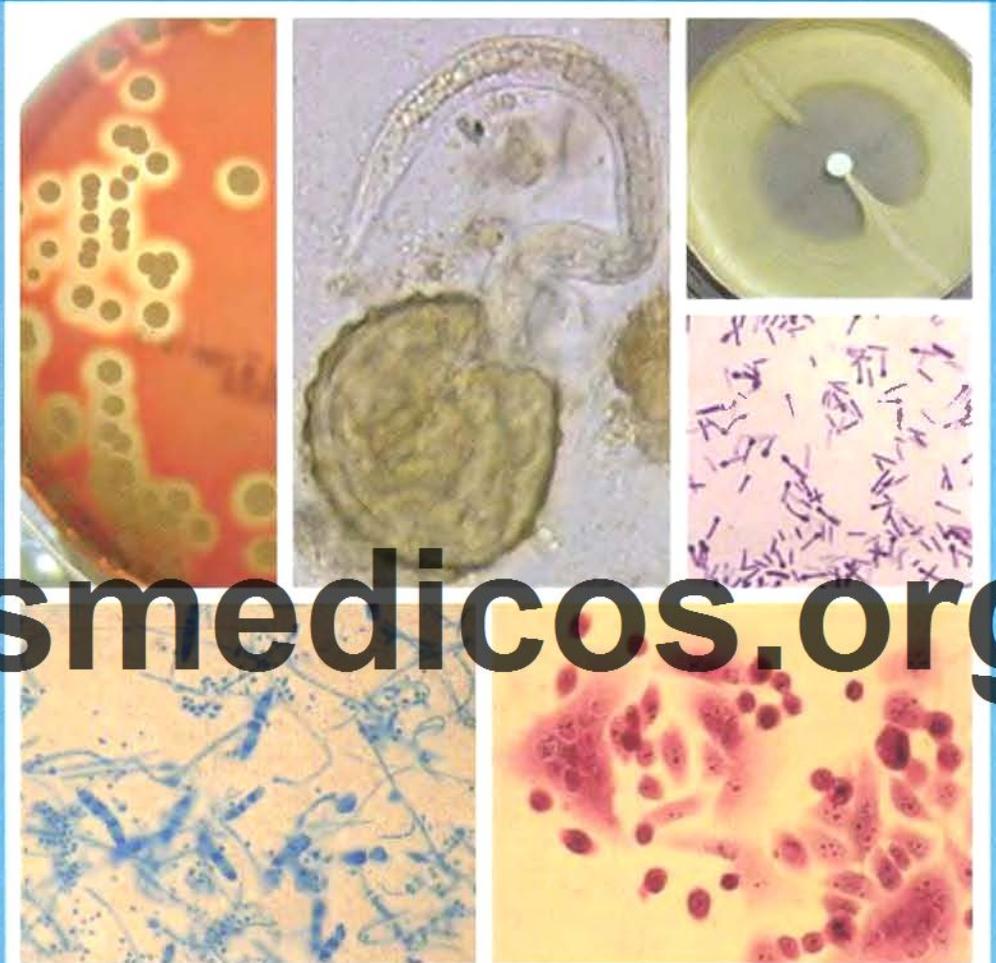


G. Prats

Microbiología Clínica



booksmedicos.org

EDITORIAL MEDICA
panamericana

Microbiología Clínica

Prof. GUILLEM PRATS

Catedrático de Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Barcelona



BUENOS AIRES - BOGOTÁ - CARACAS - MADRID - MÉXICO - PORTO ALEGRE

www.medicapanamericana.com

Catalogación en Publicación de la Biblioteca Nacional

Prats, Guillem

Microbiología clínica / Guillem Prats. — Buenos Aires ; Madrid : Médica Panamericana, [2005]

XII, 400 p. : il. col. ; 28 cm

ISBN 84-7903-971-X

I. Microbiología médica I. Título.

579.61

616-078

La medicina es una ciencia en permanente cambio. A medida que las nuevas investigaciones y la experiencia clínica amplían nuestro conocimiento, se requieren modificaciones en las modalidades terapéuticas y en los tratamientos farmacológicos. Los autores de esta obra han verificado toda la información con fuentes confiables para asegurarse que ésta sea completa y acorde con los estándares aceptados en el momento de la publicación. Sin embargo, en vista de la posibilidad de un error humano o cambios en las ciencias médicas, ni los autores, ni la editorial, o cualquier otra persona implicada en la preparación o la publicación de este trabajo, garantizan que la totalidad de la información aquí contenida sea exacta o completa y no se responsabilizan por errores u omisiones o por los resultados obtenidos del uso de esta información. Se aconseja a los lectores confirmarla con otras fuentes. Por ejemplo, y en particular, se recomienda a los lectores revisar el prospecto de cada fármaco que planean administrar para cerciorarse de que la información contenida en este libro sea correcta y que no se hayan producido cambios en las dosis sugeridas o en las contraindicaciones para su administración. Esta recomendación cobra especial importancia con respecto a fármacos nuevos o de uso infrecuente.

Los Editores han hecho todos los esfuerzos para localizar a los titulares del copyright del material fuente utilizado por el autor. Si por error u omisión, no se ha citado algún titular, se subsanará con la próxima reimpresión.

Gracias por comprar el original. Este libro es producto del esfuerzo de profesionales como usted, o de sus profesores, si usted es estudiante. Tenga en cuenta que fotocopiarlo es una falta de respeto hacia ellos y un robo de sus derechos intelectuales.



Visite nuestra página web:

<http://www.medicapanamericana.com>

ARGENTINA

Marcelo T. de Alvear 2.145 (C 1122 AAG) - Buenos Aires, Argentina
Tel.: (54-11) 4821/2066 / Fax: (54-11) 4821-1214
e-mail: info@medicapanamericana.com

COLOMBIA

Carrera 7a A N° 69-19 - Santa Fe de Bogotá DC - Colombia.
Tel.: (57-1) 235-4068 / Fax: (57-1) 345-0019
e-mail: infomp@medicapanamericana.com.co

ESPAÑA

Alberto Alcocer, 24 - 28036 Madrid, España
Tel.: (34-91) 1317800 / Fax: (34-91) 1317805
e-mail: info@medicapanamericana.es

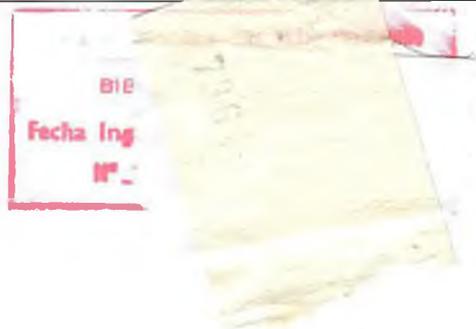
MÉXICO

Hegel 141, 2.º piso
Colonia Chapultepec Morales - Delegación Miguel Hidalgo - 11570 - México D.F. - México
Tel.: (52-55) 5250-0664/5203-0176 / Fax: (52-55) 5655-0381
e-mail: infomp@medicapanamericana.com.mx

VENEZUELA

Edificio Polar, Torre Oeste, Piso 6, Of. 6-C
Plaza Venezuela, Urbanización Los Caobos,
Parroquia El Recreo, Municipio Libertador - Caracas Depto. Capital - Venezuela
Tel.: (58-212) 793-2857/6906/5985/1666
Fax: (58-212) 793-5885
e-mail: info@medicapanamericana.com.ve

ISBN: 84-7903-971-X



Todos los derechos reservados. Este libro o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos ni archivados en sistemas recuperables, ni transmitidos en ninguna forma o por ningún medio, ya sean mecánicos, electrónicos, fotocopiadoras, grabaciones o cualquier otro, sin el permiso previo de Editorial Médica Panamericana, S. A.

© 2006, EDITORIAL MÉDICA PANAMERICANA, S. A.
Alberto Alcocer, 24 - 28036 Madrid

Depósito Legal: M. 36066 - 2005
Impreso en España

Índice

PRESENTACIÓN.....	VII
PREFACIO.....	IX
PARTE I. ENFERMEDADES INFECCIOSAS	
1. Los microbios y la enfermedad.....	1
Características de los seres vivos.....	1
Simbiosis y patogenicidad.....	5
Mecanismos de defensa.....	8
Infecciones oportunistas.....	9
Principales síndromes infecciosos.....	10
Diagnóstico y tratamiento.....	12
PARTE II. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS	
2. Bacteriología (i).....	17
Las bacterias. Concepto.....	17
El diagnóstico en bacteriología.....	17
El microscopio.....	21
El asa bacteriológica.....	22
Observación microscópica.....	22
Técnicas y medios de cultivo.....	24
Medios de cultivo. Descripción.....	29
3. Bacteriología (ii).....	33
Identificación de las bacterias.....	33
Medios y pruebas de identificación.....	45
Clasificación infraespecífica.....	48
Antibiograma.....	48
Otras técnicas diagnósticas.....	60
Medios de identificación. Descripción.....	68
4. Bacteriología (iii).....	69
Técnicas bacteriológicas específicas.....	69
Bacterias anaerobias.....	69
Micobacterias.....	74
5. Micología.....	83
Los hongos. Concepto y clasificación.....	83
Infecciones fúngicas.....	86
Técnicas en micología.....	90
Muestras clínicas.....	91
Examen microscópico.....	91
Cultivo e identificación de los hongos.....	93
Técnicas inmunológicas y moleculares.....	99
Sensibilidad a los antifúngicos (antifungigrama).....	99
Medios de cultivo. Descripción.....	105

6. Virología	109
Los virus. Concepto	109
Principales virus de interés en medicina.....	110
Técnicas de diagnóstico virológico	114
Técnicas de diagnóstico inmunológico y molecular	124
Diagnóstico serológico	125
Medios de cultivo. Descripción.....	125
7. Parasitología	127
Parásitos humanos. Concepto.....	127
Protozoos de interés en medicina	130
Helmintos de interés médico.....	136
Diagnóstico de las parasitosis	142
Examen microscópico	143
Técnicas de cultivo.....	149
Otras técnicas de diagnóstico	150
Artrópodos de interés médico	153
Medios de cultivo. Descripción.....	154
8. Pruebas inmunológicas	157
La respuesta inmunitaria.....	157
Detección de antígenos microbianos	157
Diagnóstico serológico	168
Detección de la respuesta celular	178
9. Técnicas genéticas	187
Introducción	187
Los ácidos nucleicos como elementos de análisis.....	188
Extracción del DNA/RNA	189
Técnicas de hibridación	190
Tecnología de los chips (<i>Arrays</i>)	192
Métodos de amplificación	193
Amplificación de la diana.....	194
Otras técnicas de amplificación	198
10. Epidemiología microbiana	203
Introducción	203
Marcadores fenotípicos	204
Electroforesis	209
Marcadores genotípicos.....	210
Análisis del DNA plasmídico.....	211
Análisis del DNA cromosómico	211
11. Seguridad biológica en los laboratorios de microbiología clínica	219
Introducción	219
Clasificación de los microorganismos	219
Medios de contención	221
Barreras primarias y secundarias	221
Normas y procedimientos estándar	224
Niveles de contención	225
Profilaxis de los accidentes.....	226
Gestión y tratamiento de los residuos.....	227

PARTE III. DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS

12. Diagnóstico etiológico	231
Introducción	231
Solicitud de análisis	231
Toma de muestras	232
Evaluación y procesamiento de las muestras	238
13. Infecciones urinarias	239
Concepto y etiología	239
Toma de muestras	239
Examen directo.....	240
Urinocultivo.....	242
Prostatitis, epididimitis y orquitis	243
La orina en la detección de antígeno	244
14. Enfermedades de transmisión sexual	245
Introducción	245
Etiología y clínica	245
Toma de muestras	247
Procesamiento de las muestras.....	248
Técnicas moleculares	250
Diagnóstico serológico	250
15. Enteritis	251
Concepto y etiología	251
Toma de muestras	252
Examen directo.....	253
Cultivo	254
Técnicas moleculares	257
Protocolo de estudio de las enteritis	259
Diagnóstico de las helmintosis intestinales	260
16. Infecciones del sistema nervioso	261
Meningitis. Concepto y etiología.....	261
Toma de muestras	262
Estudio biológico del LCR.....	263
Procesamiento microbiológico.....	264
Detección de antígeno.....	265
Pruebas de amplificación	265
Pruebas serológicas.....	265
Encefalitis	265
Absceso cerebral	266
17. Infecciones respiratorias	269
Infecciones de las vías respiratorias altas.....	269
Infecciones pulmonares.....	271
Toma de muestras	273
Procesamiento microbiológico.....	274
Detección de antígeno.....	276
Técnicas de amplificación.....	276
Diagnóstico serológico	277

18. Infecciones piógenas y necrotizantes	279
Introducción	279
Infecciones cutáneas	279
Osteomielitis y artritis	282
Infecciones por anaerobios	284
Tratamiento empírico.....	287
19. Septicemia: bacteriemia y fungemia	289
Concepto y etiología	289
Examen directo.....	290
Hemocultivo	290
Los catéteres endovasculares como foco de sepsis	294
Detección de antígeno y técnicas de amplificación en la sangre	295
20. Hepatitis	297
Concepto de hepatitis vírica.....	297
Virus de la hepatitis A.....	298
Virus de la hepatitis E.....	298
Virus de la hepatitis B.....	298
Virus de la hepatitis D	299
Virus de la hepatitis C.....	300
Virus de la hepatitis G	301
Técnicas de laboratorio.....	301
21. Infecciones oportunistas	303
Introducción	303
Mecanismos de defensa	303
Alteraciones de las barreras limitantes.....	304
Alteraciones de la fagocitosis.....	313
Déficit de la inmunidad	315
Infecciones en adictos a drogas por vía parenteral	318
22. Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida	321
Introducción	321
Estructura y replicación del HIV	321
Clínica del sida	322
Métodos de diagnóstico	324
Estrategia del diagnóstico	327
Diagnóstico de las infecciones oportunistas.....	327
PROTOCOLOS TÉCNICOS.....	331
BIBLIOGRAFÍA	361
ÍNDICE ANALÍTICO	363

PARTE

I

ENFERMEDADES INFECCIOSAS

CARACTERÍSTICAS DE LOS SERES VIVOS

Los hombres poseemos una idea intuitiva de los seres vivos, a los que reconocemos por su capacidad de crecer, reproducirse y morir, y los identificamos como vegetales o animales.

Los seres vivos están formados por células; algunos son pluricelulares, como las plantas y los animales, pero otros, como las bacterias o los protozoos, son unicelulares y, por tanto, invisibles, por lo que no pudieron ser observados hasta la introducción del microscopio en el siglo xvii.

Existen dos clases de células: las procariotas y las eucariotas. Las procariotas son evolutivamente más antiguas y no han sido capaces de asociarse para formar organismos pluricelulares, por lo que sólo se hallan en la naturaleza como seres unicelulares, constituyendo las bacterias. El resto de los organismos vivos, tanto los unicelulares como los pluricelulares, están formados por células eucariotas.

Células procariotas (las bacterias)

Están formadas por un citoplasma limitado por una membrana celular por fuera de la cual existe una pared rígida de composición química glicopeptídica característica; el citoplasma está repleto de ribosomas donde se efectúa la síntesis proteica; no posee estructuras membranosas y el material genético, formado por ácido desoxirribonucleico (DNA), se halla muy compactado y carece de membrana que delimite un núcleo (Fig. 1.1).

Aunque algunos grupos de células procariotas presentan diferencias estructurales entre sí, se tratan de diferencias relativamente pequeñas, de modo que las células procariotas —es decir, las bacterias— muestran una notable uniformidad de forma y de tamaño. Sin embargo, han desarrollado una gran variedad de vías metabólicas para la obtención de energía, que consiguen mediante la oxidación de sustratos inorgánicos u orgánicos o captando la energía solar, habiendo desarrollado también variados procesos de biosíntesis. Todo ello

les permite explotar y ocupar los hábitat más diversos de la Tierra.

Células eucariotas

Son estructuralmente más complejas que las procariotas. No se sabe cómo eran las células eucariotas primitivas (protoeucariotas), pero, sin duda, un hecho fundamental para su evolución fue la adquisición en su citoplasma de las mitocondrias y los cloroplastos. Las células protoeucariotas ancestrales se dotaron así de unas eficaces máquinas para la obtención de energía gracias a la respiración aerobia que desarrollan las mitocondrias y a la fotosíntesis propia de los cloroplastos¹.

Las células eucariotas que forman los protozoos, los hongos y los animales poseen mitocondrias, por lo que estos seres son organoheterótrofos, es decir, utilizan la materia orgánica como fuente de energía y de carbono, en tanto que las células que constituyen las algas y las plantas poseen mitocondrias y cloroplastos, por lo que son fotoautótrofas, utilizando la luz solar como fuente de energía y el CO₂ atmosférico como fuente de carbono para la biosíntesis.

Las células eucariotas actuales, dotadas de estos sistemas energéticos, presentan el DNA fragmentado en cromosomas rodeados por una membrana nuclear para formar el núcleo. En el citoplasma, además de las mitocondrias y de los cloroplastos, existen organelas membranosas, como el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico, junto a abundantes ribosomas y un endoesqueleto fibrilar. Algunas de estas células poseen por fuera de la membrana celular una pared rígida (células de algas, vegetales y hongos), y otras carecen de ella (células de protozoos y animales) (Fig. 1.1).

Actualmente, persisten células eucariotas individualizadas, formando seres unicelulares, como las algas unicelulares, las levaduras (que son hongos unicelulares) y los protozoos, entre los que existen grandes diferencias en su morfología y en sus ciclos vitales. Estas células también han formado seres pluricelulares, como las algas pluricelulares, los vegetales, los hongos filamentosos y los animales.

¹ Se considera que las mitocondrias y los cloroplastos son células procariotas que penetraron en células protoeucariotas ancestrales asociándose a ellas de modo estable y definitivo.

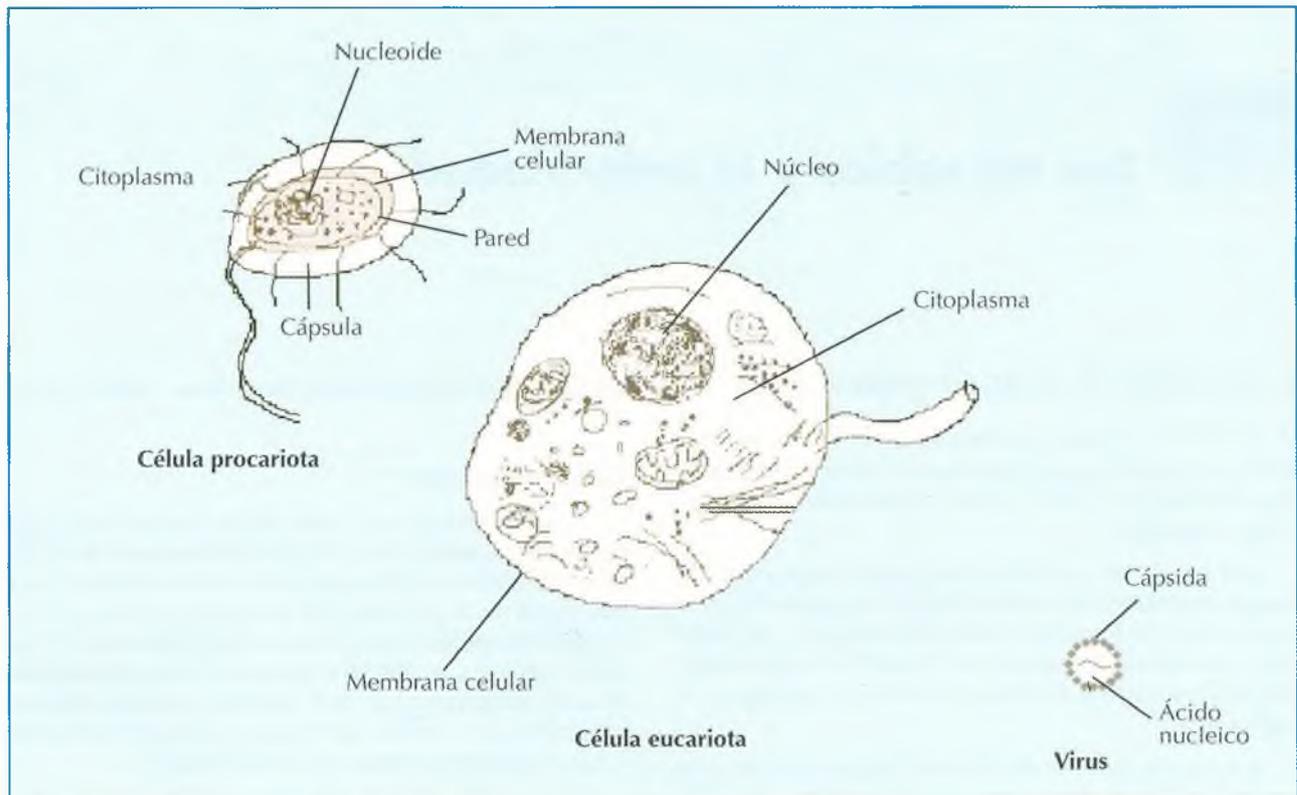


Figura 1.1. Esquema de la estructura de las células y los virus.

Las células procariotas (bacterias) están formadas por un citoplasma limitado por una membrana celular, por fuera de la cual existe una pared rígida de estructura glicopeptídica (peptidoglicano). En el citoplasma se halla el DNA y abundantes ribosomas. El DNA está compactado formando el nucleoide, carente de membrana. Las células procariotas pueden poseer apéndices filamentosos como los flagelos y las fimbrias y una envoltura polisacárida externa a la pared, denominada cápsula. El tamaño de estas células oscila entre 0,5 y 5 micras.

Las células eucariotas son de mayor tamaño, entre 5 y 30 micras. Poseen el DNA fragmentado formando cromosomas, rodeados por una membrana constituyendo el núcleo. En el citoplasma estas células tienen mitocondrias, cloroplastos y sistemas membranosos como el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico, al que se hallan adosados abundantes ribosomas. Están limitadas por una membrana celular por fuera de la cual puede haber una pared rígida o carecer de ella. Algunas presentan flagelos que son mucho más complejos que los de las células procariotas.

Los virus poseen un tamaño ultramicroscópico, entre 50 y 200 nanómetros; están formados por material genético (DNA o RNA) y una cubierta proteica denominada cápsida; algunos poseen una envoltura membranosa (virus envueltos), pero otros carecen de ella (virus desnudos).

Nota: un micrómetro (micra, μm) es una milésima de milímetro. Un nanómetro (nm) es una millonésima de milímetro. A título comparativo del tamaño medio, podría decirse que si un virus tuviera el tamaño de un grano de arroz, una bacteria sería como una pelota de ping-pong y una célula eucariota como una pelota de básquet.

Virus

Los virus están constituidos por un fragmento de ácido nucleico que se multiplica en las células procariotas o en las eucariotas. El ácido nucleico es característico de cada clase de virus; en unos es ácido desoxirribonucleico, y en otros ácido ribonucleico. Después de su replicación, los fragmentos de ácido nucleico formados se rodean de una cubierta proteica, denominada cápsida, que los protege, lo que les permite salir de la célula en la que se han replicado para penetrar en otra, en la que el ácido nucleico repite otro ciclo de multiplicación. Estos seres vivos carecen de estructura celular y de capacidad para obtener energía y efectuar la biosíntesis, por lo que para su multiplicación utilizan la reserva energé-

tica y la capacidad biosintética de las células que parasitan (Fig. 1.1).

Los virus que se multiplican en las bacterias se denominan bacteriófagos (abreviadamente, «fagos») y son diferentes de los que se multiplican en las células eucariotas (virus de animales, virus de vegetales, etcétera).

Clasificación de los seres vivos

Los seres vivos se han clasificado en diversos grupos en función de sus semejanzas y diferencias. El grupo natural lo constituye la especie, las especies semejantes forman un género, los géneros una familia, y así sucesivamente hasta constituir los cinco reinos de la naturaleza².

² Los grupos taxonómicos, de inferior a superior son: especie, género, familia, orden, clase, filo y reino.

Las células procariotas; es decir, las bacterias, se agrupan en el reino *Monera*³ (o *Prokaryotae*), un reino, por tanto, formado únicamente por seres unicelulares microscópicos.

El reino *Protoctista* agrupa a seres unicelulares eucariotas, como los protozoos, que son heterótrofos, o las algas unicelulares, que son fotosintetizadoras, todos ellos invisibles a simple vista. Algunos taxonomistas incluyen en este grupo a las algas pluricelulares, como las grandes algas marinas, a las que no clasifican entre las plantas por su carencia de tejidos organizados, aunque otros las incluyen entre éstas.

Los vegetales forman el reino *Plantae*, constituido por seres pluricelulares. Sus células son eucariotas, poseen una pared rígida de celulosa y son fotosintetizadoras. Las plantas forman tejidos organizados y característicos, por lo que poseen formas fácilmente reconocibles y son inmóviles.

Los hongos forman el reino *Fungi*; los hay unicelulares, y por tanto microscópicos, como las levaduras, y pluricelulares, como los mohos y las setas. Los mohos y las setas son hongos filamentosos, los primeros pueden observarse sobre las frutas podridas o el pan enmohecido; las setas son los hongos comestibles o venenosos que se hallan en el campo. Los hongos están formados por células eucariotas que poseen una pared de estructura característica (con quitina) y son órgano-heterótrofos, es decir, que se nutren de materia orgánica.

Los animales constituyen el reino *Animalia*, formado por seres pluricelulares, cuyas células (eucariotas) carecen de pared rígida y son órgano-heterótrofas, obteniendo la energía y el carbono para la biosíntesis a partir de la materia orgánica. Los animales poseen morfología muy variada en dos de los grandes linajes evolutivos: los invertebrados, entre los que destacan los helmintos carentes de esqueleto y los artrópodos, con un exoesqueleto quitinoso, y los vertebrados que poseen un endoesqueleto cartilaginoso u óseo. En ambos grupos sus tejidos altamente estructurados forman órganos muy complejos. Son móviles y poseen sistema nervioso central, por lo que desarrollan relaciones a veces muy elaboradas con la propia especie y con otras especies.

Entre los invertebrados, los artrópodos (insectos, arácnidos, etc.) poseen un gran éxito evolutivo, constatado por su abundancia en todo el planeta, en tanto que, entre los vertebrados, los mamíferos tienen una vida de relación muy compleja, poseyendo el hombre una clara conciencia de sí mismo y habilidad para manejar instrumentos y desarrollar conceptos abstractos.

Los virus no han sido incluidos en ninguno de los cinco reinos de la naturaleza. Es muy probable que se

hayan originado, a través de los tiempos, a partir de diferentes células en las que fragmentos de ácidos nucleicos (DNA o RNA) han adquirido capacidad de replicación independiente de la célula «madre»; pero dependen de las células para multiplicarse porque utilizan su maquinaria de biosíntesis (ribosomas) y su reserva energética.

En la figura 1.2 se señalan las posibles relaciones evolutivas entre los seres vivos que constituyen los cinco reinos de la naturaleza.

La nomenclatura en biología

Los seres vivos se clasifican por sus semejanzas y sus diferencias en diversos grupos taxonómicos. Los seres que pueden reproducirse sexualmente entre sí, cuya semejanza fenotípica suele ser muy evidente, forman las especies⁴. Un conjunto de especies semejantes forma un género, varios géneros, una familia, y así hasta constituir los cinco reinos de la naturaleza. A cada grupo se le atribuye un nombre científico. Los nombres científicos de los diferentes grupos (reino, filo, clase, orden, familia, género y especie) están formados por una palabra latina escrita en *cursiva* y con la inicial en mayúscula; por ejemplo, en las bacterias, en el orden *Enterobacteriales*, hay numerosas familias, entre ellas la familia *Enterobacteriaceae*, en la que se incluyen más de treinta géneros, uno de ellos es el género *Escherichia*. Un género incluye una o más especies, las especies se denominan mediante dos palabras, la del género al que pertenecen y la propia de la especie; por ejemplo: las especies del género *Escherichia* son *Escherichia coli*, *Escherichia vulneris*, *Escherichia hermannii* y otras. Como se ha indicado, el nombre del género (*Escherichia*) se escribe en cursiva y con la inicial en mayúscula, y el nombre específico de la especie (*coli*) también en cursiva, pero en minúscula. Al escribir en un texto por segunda vez el nombre de una especie, el del género puede abreviarse (por ejemplo: *E. coli* por *Escherichia coli*). Algunas especies se denominan en la lengua vernácula mediante nombres coloquiales o comunes que se escriben con caracteres convencionales (por ejemplo: *Escherichia coli*: colibacilo; *Pseudomonas aeruginosa*: bacilo piocianico; *Neisseria meningitidis*: meningococo; *Mycobacterium tuberculosis*: bacilo de Koch, etcétera). Estos criterios de nomenclatura se utilizan tanto para las bacterias, como para el resto de los seres vivos, excepto para los virus (véase el capítulo 6). Un ejemplo del reino animal permite constatar el paralelismo de la nomenclatura en los seres vivos: entre los invertebrados, en el filo de los nematodos (*Nematoda*), formado por gusanos redondos muy primitivos, el orden *Rhabditida* tiene varias familias, entre ellas *Rhabditidae* y *Strongyloidea*, entre los géneros que forman esta última, *Strongyloides* cuenta con varias especies, *Strongyloides stercoraria*

³ No se introduce en este texto el concepto de arqueobacteria ni el de los tres superreinos: *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*. Los superreinos se definirían en función de la estructura y fisiología de los tres tipos de células existentes en la Tierra: bacterias, arqueobacterias y células eucariotas. Hasta hace algún tiempo, las arqueobacterias, que son procariotas, se consideraban bacterias dentro del reino *Monera* (Fig. 1.2).

⁴ Los criterios para definir los seres que conforman las especies carentes de reproducción sexual se basan en la semejanza de su genoma.

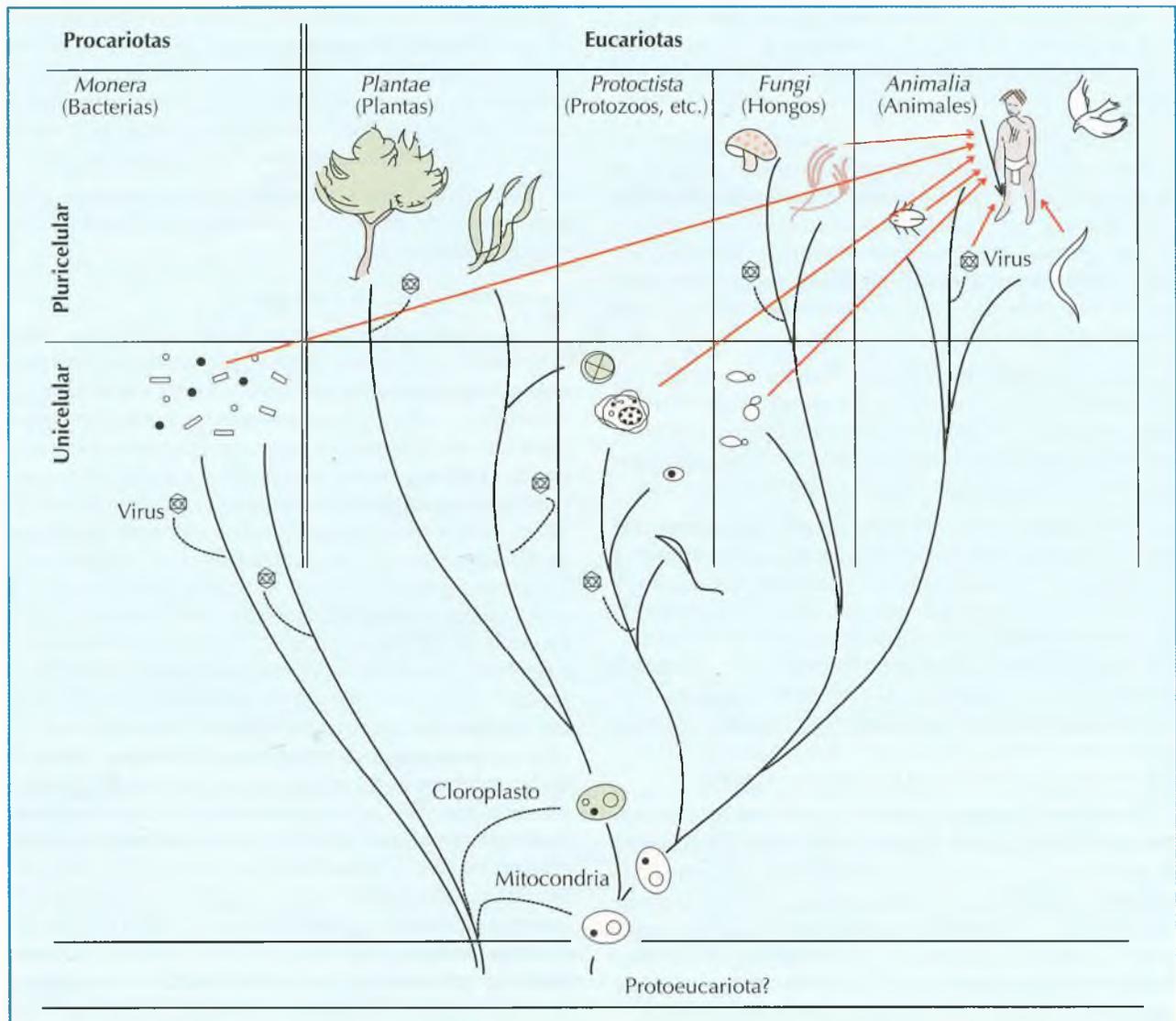


Figura 1.2. Los reinos de la naturaleza.

Se representa esquemáticamente los cinco reinos de la naturaleza y los virus.

Puede observarse los dos tipos de células, procariotas y eucariotas, y el carácter unicelular o pluricelular de los seres vivos. Los virus, para su replicación dependen de su hospedador respectivo y no conforman un reino natural.

En todos los reinos cuyos integrantes poseen metabolismo heterótrofo hay miembros que causan enfermedad al hombre (líneas rojas). Entre los virus humanos también hay patógenos para el hombre.

lis, *Stongyloides fuelleborn* y otras. *S. stercoralis* es conocido coloquialmente en lengua vernácula como anguila intestinal.

Los microbios

A los numerosísimos y variados seres vivos invisibles existentes en la naturaleza se les denomina colectivamente microbios. Entre ellos se encuentran los

virus, todos los seres unicelulares, como las bacterias, las algas unicelulares, las levaduras y los protozoos; pero también son microscópicos algunos seres pluricelulares, como algunas larvas de helmintos, entre otros⁵. Por tanto, bajo el concepto de microbio se incluye a todos los seres vivos invisibles a simple vista, independientemente de cualquier otra consideración, por lo que forman un conjunto extraordinariamente heterogéneo.

⁵ El ojo humano puede discriminar objetos de hasta 0,2-0,3 mm de tamaño (200-300 μm), el microscopio óptico permite observar objetos de hasta 0,2 μm . Una micra (μm) es la milésima de un mm.

SIMBIOSIS Y PATOGENICIDAD

Aunque la mayoría de los microbios viven libremente en la naturaleza —en el agua o en la tierra—, resulta interesante destacar que muchos se han adaptado a vivir en otro ser vivo de mayor tamaño y complejidad, llamado hospedador. Este proceso de simbiosis (vida conjunta) puede ser beneficioso o perjudicial para los simbiositos. Cuando la convivencia comporta beneficio para ambos, se denomina mutualismo, y si solo reporta beneficio a uno sin perjuicio para el otro, se habla de comensalismo.

En el hombre, tanto en la piel como en la mucosa de la faringe, en el tubo digestivo, en la uretra y la vagina, se halla una gran cantidad de microorganismos unicelulares que constituyen la denominada microbiota normal o autóctona (flora normal). Esta flora, formada casi exclusivamente por bacterias, es particularmente abundante en el intestino grueso, donde se alcanzan concentraciones de hasta 10^{11} microorganismos por gramo de heces (Fig. 1.3).

La mayoría de los microorganismos que colonizan la tierra, los vegetales y los animales realizan funciones

beneficiosas, algunas imprescindibles para mantener la vida en la Tierra, como el reciclado del carbono, del nitrógeno y otros elementos.

Los microbios que forman la flora normal del hombre son comensales o mutualistas al realizar funciones beneficiosas, cooperando en la digestión de los alimentos, sintetizando vitaminas y estimulando el sistema inmunitario. Sin embargo, determinados microorganismos llamados patógenos o parásitos, al colonizar y multiplicarse en las plantas o los animales, les producen enfermedades a las que se denomina enfermedades infecciosas. Entre los microorganismos patógenos para el hombre se encuentran diversos virus, que, como parásitos intracelulares obligados, lesionan las células en las que se replican, produciendo enfermedad. Entre los seres unicelulares, como las bacterias, las levaduras y los protozoos, también se hallan especies patógenas que invaden los tejidos humanos en los que se multiplican, lesionándolos. Algunos hongos pluricelulares, filamentosos, también poseen potencial patógeno.

Algunos helmintos, que están en los límites de lo visible, como la triquina y las filarias, parasitan los tejidos y sus larvas microscópicas pueden distribuirse por todo el

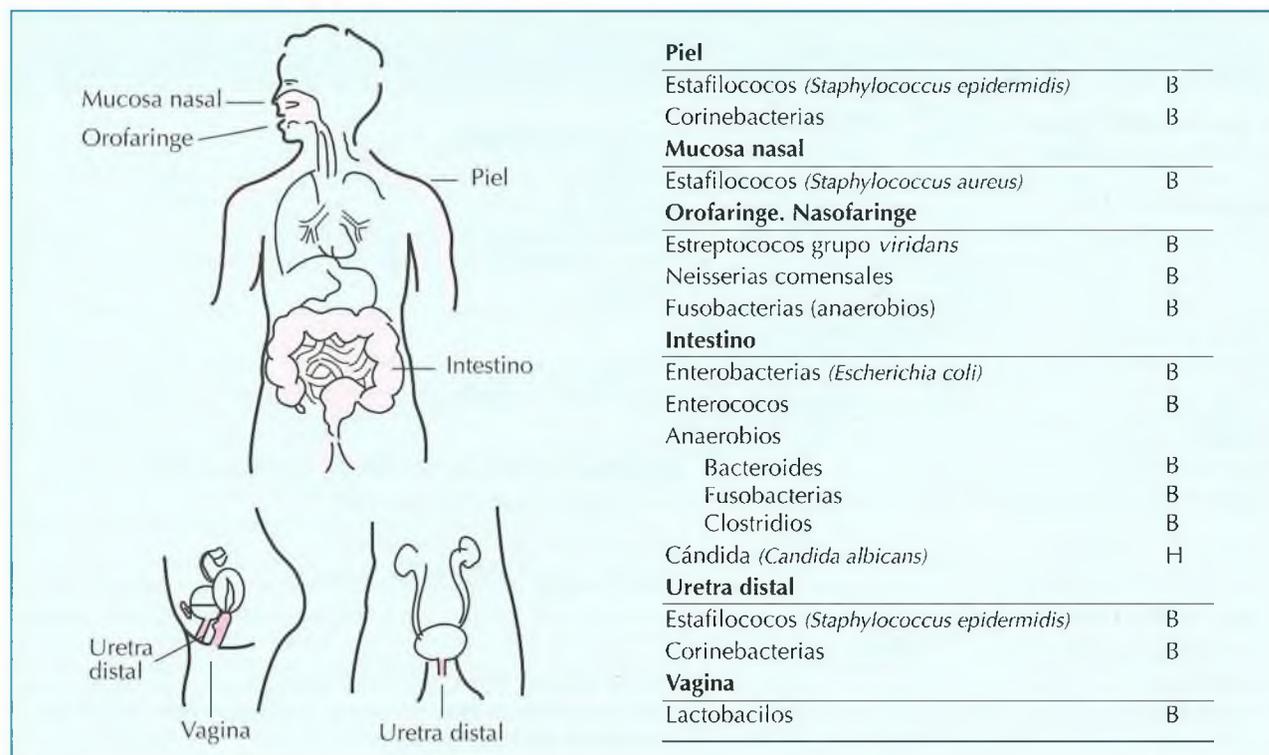


Figura 1.3. Flora normal.

Los humanos poseemos una microbiota normal que coloniza la piel, la nasofaringe y la orofaringe, el intestino, la vagina y la uretra distal. En esta figura solo se señalan algunos grupos o especies microbianas de entre las numerosísimas existentes en esos territorios.

La microbiota normal también se denomina microbiota autóctona y frecuentemente microbiota comensal, aunque los microorganismos que la forman, unos son comensales y otros mutualistas. Aunque el término correcto es «microbiota» muchos microbiólogos utilizan el término «flora» —flora normal— consagrado por el uso (véase *Simbiosis y patogenicidad*).

B: bacteria; H: hongo.

organismo; otros de tamaño macroscópico, como las tenias o los áscaris, infestan el tubo digestivo; por último, las larvas de parásitos animales, como las del equinococo, pueden invadir y enquistarse en los tejidos del hombre.

Un reducido número de artrópodos, como los piojos y las pulgas, parasitan la piel produciendo lesiones locales por picadura; pero el principal interés de los artrópodos en medicina radica en su capacidad de actuar como vectores de transmisión de algunos microorganismos patógenos (Tabla 1.1).

Reservorio y transmisión de los microorganismos

El lugar de la naturaleza donde un microbio se multiplica y persiste normalmente constituye su reservorio natural. Algunos microbios patógenos para el hombre tienen su reservorio en el medio ambiente (reservorio telúrico), otros en los animales y otros en el propio hombre.

Los microbios patógenos se transmiten desde su reservorio —telúrico, animal o humano— a las personas sanas, por lo que las enfermedades que causan son contagiosas (transmisibles). La transmisión puede llevarse a cabo:

1. Por contacto directo, como sucede con las tiñas de los animales o con la gonococia y la sífilis, que se transmiten por contacto sexual.
2. Por vía aérea, al inhalar los microorganismos, como ocurre con la gripe o la tuberculosis.
3. Por vía digestiva (por ingesta), como en la salmonelosis, la hepatitis A o la poliomielitis.
4. Por transmisión parenteral, a través de transfusiones o inyecciones, como sucede con el virus de la hepatitis B, la hepatitis C o el del sida, o vehiculados por artrópodos, como ocurre con las leishmanias o los plasmodios del paludismo, que son transmitidos por mosquitos.
5. Algunos microorganismos, como el virus de la rubéola o el toxoplasma, pueden transmitirse de la madre al feto a través de la placenta ocasionando una infección congénita (Fig. 1.4).

Mecanismos de patogenicidad

Cuando un microorganismo patógeno infecta a una persona, transcurre un período de tiempo, de duración variable, en que no se producen síntomas, constituyen-

Tabla 1.1
Organismos patógenos para el hombre

Grupos de seres vivos (reino de la naturaleza)	¿Hay patógenos en el grupo?	Ejemplos de patógenos
Estructura acelular: Virus (no definido)	Sí	Virus de la gripe. Virus de la poliomielitis. Virus del herpes simple. Virus de la hepatitis B. Virus de la rabia. Virus de la inmunodeficiencia humana.
Células procariotas: Bacterias (Uc) (<i>Monera</i>)	Sí	Estafilococos. Estreptococos. Meningococo. Salmonela. Brucela. Bacilo de Koch. Bacilo tetánico. Treponemas. Clamidias.
Células eucariotas: Protozoos (Uc) (<i>Protoctista</i>)	Sí	Tricomonas. Giardia. Ameba. Toxoplasma. Plasmodios
Algas (Uc /Pc) (<i>Protoctista</i>)	No	Son autótrofas (fotosintetizadoras) ¹
Plantas (Pc) (<i>Plantae</i>)	No	Son autótrofas (fotosintetizadoras) ¹
Hongos (Uc/Pc) ² (<i>Fungi</i>)	Sí	Cándida. Dermatofitos. Histoplasma
Animales (Pc) (<i>Animalia</i>)		
Invertebrados:		
Helmintos	Sí	Oxiuros. Áscaris. Tenias. Triquina. Filarias
Artrópodos ³	Sí	Insectos: moscas, mosquitos, piojos, chinches, pulgas. Arácnidos: garrapatas, arador de la sarna
Vertebrados	No	

Se indican los diversos grupos de seres vivos, el reino al que pertenecen, la existencia de patógenos en el grupo y algunos ejemplos de los mismos.

¹ Se comprende que sólo los seres heterótrofos; es decir, que se nutren de materia orgánica, puedan invadir los tejidos humanos y multiplicarse en ellos; lógicamente, las células fotosintetizadoras no pueden invadir los tejidos a los que no llega la luz.

² Los hongos unicelulares, como las cándidas o el criptococo, se denominan levaduras.

³ Aunque algunos artrópodos causan lesiones cutáneas o subcutáneas (exoparasitosis), poseen interés por vehicular y transmitir algunos microorganismos patógenos.

Uc: seres unicelulares; Pc: seres pluricelulares.

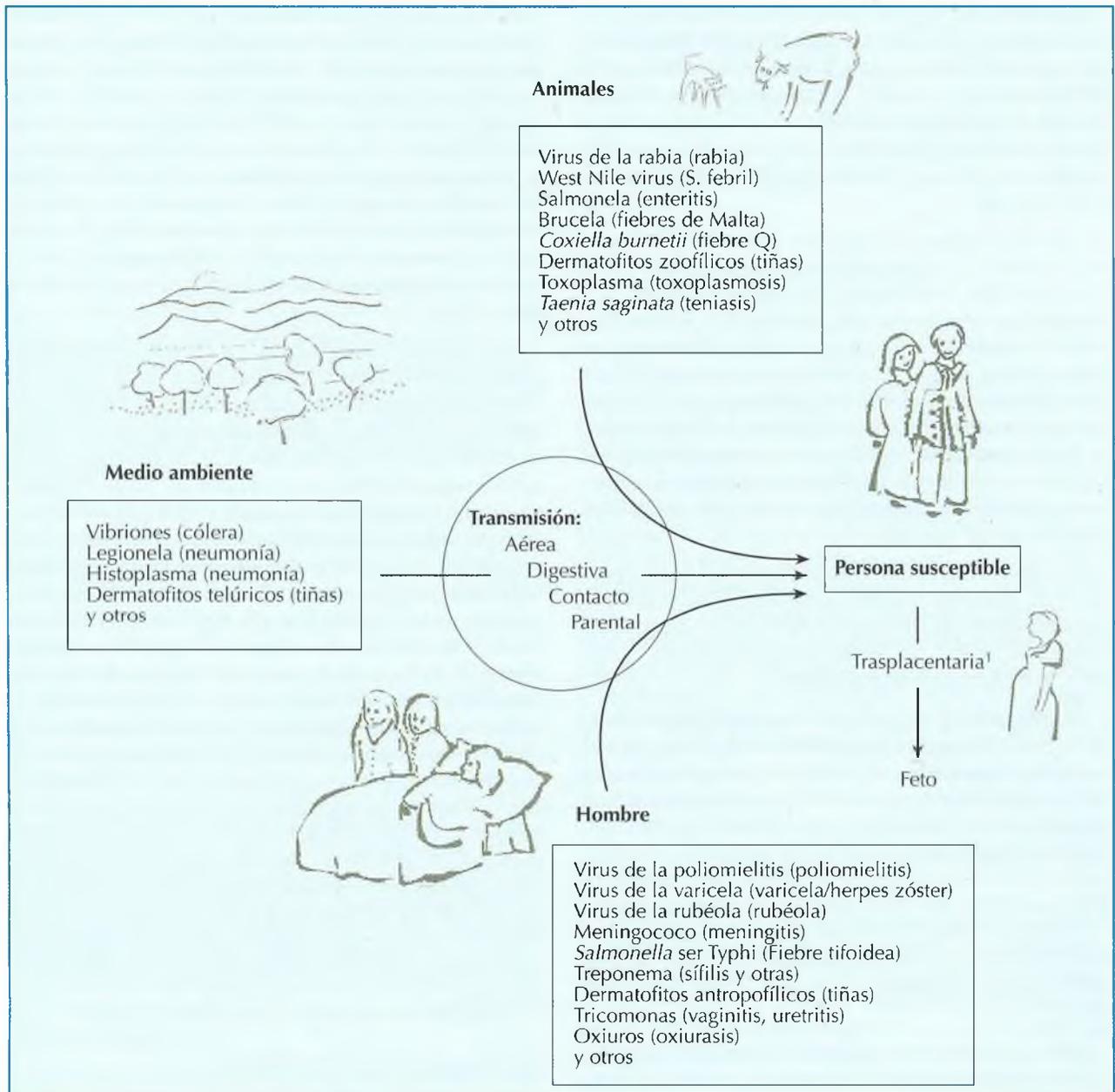


Figura 1.4. Reservorio y transmisión de los microorganismos patógenos.

El reservorio de un microorganismo es el lugar donde se encuentra y se perpetúa naturalmente, pudiendo ser el medio ambiente, los animales o el propio hombre. En esta figura se representa, a modo de ejemplo, el reservorio de algunos microorganismos patógenos para el hombre.

La transmisión de un microbio patógeno de una persona a otra tiene lugar mientras la primera persona está padeciendo la enfermedad, como en la gripe, la enteritis por salmonela o la cervicitis gonocócica; pero, en ocasiones, la persona que transmite el microorganismo puede ser un portador sano. Así puede suceder en la propia salmonelosis y en la gonococia, en las que después de curada la enfermedad el microorganismo puede persistir de forma asintomática en la vesícula biliar o cervix uterino respectivamente, lo que no ocurre en la gripe, porque tras la curación el virus es erradicado. La persona en la que persiste el microorganismo después de curada la enfermedad se denomina portador sano. La duración del período de portador, y por tanto de transmisibilidad de la enfermedad, es variable según la persona y el microorganismo (semanas o meses).

1. La mujer embarazada puede transmitir al feto algunos microorganismos a través de la placenta, como el virus de la rubéola, citomegalovirus, el virus de la inmunodeficiencia humana, la listeria, el treponema de la sífilis y el toxoplasma causándole infección congénita. Cabe diferenciar la infección congénita trasplacentaria de la infección perinatal que se produce por vía ascendente poco antes del parto o en la propia vía genital en el momento del parto. Las infecciones perinatales están causadas por el estreptococo del grupo B, *Escherichia coli*, los virus de las hepatitis B y C y el virus del sida (HIV).

do el período de incubación de la enfermedad; posteriormente sigue el período sintomático (o de estado), en el que aparecen las manifestaciones clínicas como con-

secuencia de la acción patógena del microbio, y después de la curación transcurre un tiempo hasta la recuperación total, denominado período de convalecencia.

En términos esquemáticos, puede decirse que los mecanismos por los que los microbios patógenos ejercen su acción lesiva son tres: 1) por invasión de los tejidos (mecanismo invasor), 2) por acción de exotoxinas específicas, producidas únicamente por algunas bacterias (mecanismo toxigénico), y en ambos casos puede sumarse una lesión, 3) por un mecanismo inmunopatológico asociado.

Los microorganismos invasores, como el estafilococo, el estreptococo del grupo A, el meningococo, el virus de la parotiditis, los rotavirus, las amebas o el gonococo penetran por una puerta de entrada (piel, mucosa respiratoria, digestiva, urinaria o genital) estableciendo en ella una infección local. La infección puede quedar circunscrita a ese lugar, pero en ocasiones los microorganismos difunden a las áreas contiguas y a distancia por vía linfática o por vía hemática, alcanzando otros tejidos u órganos en los que se multiplican y a los que lesionan. Estas localizaciones secundarias constituyen las metástasis infecciosas.

Por ejemplo, el estafilococo penetra por la piel y produce una infección del folículo piloso (foliculitis). Ocasionalmente, puede difundir al tejido celular subcutáneo contiguo (celulitis), pudiendo pasar a la sangre y localizarse en el pulmón o en los huesos.

El estreptococo del grupo A causa faringitis purulenta y la infección suele circunscribirse a la faringe; por el contrario, el meningococo desde la faringe, en la que produce una infección asintomática, pasa a la sangre para localizarse a las meninges, y el virus de la parotiditis, desde la faringe, también pasa a la sangre y se localiza en las glándulas salivales, en el páncreas y en el sistema nervioso central. En otros ejemplos, el rotavirus produce únicamente infección intestinal, en tanto que la *Entamoeba histolytica*, desde la mucosa intestinal a la que lesiona, puede alcanzar el hígado a través de la vena porta.

Las metástasis hematógenas suelen localizarse en órganos muy vascularizados, como el pulmón, el hígado o el riñón, o en aquellos por los que el microorganismo tiene una especial apetencia (meningococo: meninges; virus de la hepatitis A: hígado).

En la actualidad están siendo estudiadas intensamente las estructuras moleculares responsables de la patogenicidad de los microorganismos invasores, que constituyen los factores de virulencia que les permiten adherirse, penetrar y lesionar los tejidos, de los que carecen las especies no patógenas.

Las bacterias toxigénicas no suelen invadir profundamente los tejidos, pero desde su localización en la puerta de entrada liberan toxinas que actúan a nivel local o difunden por el organismo; por ejemplo, el bacilo diftérico penetra superficialmente en la mucosa de la faringe, pero su toxina difunde por todo el organismo lesio-

nando a las células del músculo cardíaco, del sistema nervioso y del riñón; en tanto que el vibrión del cólera coloniza la mucosa del intestino sin invadirla y la toxina colérica ejerce su acción localmente sobre las células intestinales. En el caso del botulismo y de la enteritis estafilocócica, las toxinas son producidas y liberadas en los alimentos contaminados por el bacilo botulínico y el estafilococo respectivamente (toxinas preformadas), siendo absorbidas a través del tubo digestivo al consumir los alimentos. Resulta obvio señalar que el principal factor de virulencia de las bacterias toxigénicas son sus toxinas.

Los antígenos microbianos pueden desencadenar procesos lesivos como consecuencia de la respuesta inmunitaria (procesos inmunopatológicos). En esos procesos, los mecanismos de defensa inmunitaria, en lugar de incidir selectivamente sobre el microbio para erradicarlo, afectan también a los tejidos del paciente lesionándolos. Un mecanismo inmunopatológico es el causante de la glomerulonefritis (que aparece tras la infección por el estreptococo del grupo A), del *shock* tóxico (descadenado por una enterotoxina producida por el estafilococo), de la encefalitis tardía tras la infección por el virus de la varicela, de las lesiones hepáticas asociadas al virus de la hepatitis B y de tantos otros. Los mecanismos íntimos de muchos de estos procesos inmunopatológicos no son conocidos con precisión a pesar de ser objeto de numerosos estudios. En las lesiones causadas por un microorganismo, a veces es muy difícil diferenciar el grado de participación respectivo del mecanismo invasor (o toxigénico) del inmunitario; así sucede por ejemplo con las lesiones necrotizantes producidas en la tuberculosis o por el virus de la hepatitis B, en que la destrucción de las células hepáticas, causada a través del mecanismo inmunopatológico, puede ser más importante que la producida directamente por la replicación del virus.

MECANISMOS DE DEFENSA

Las enfermedades infecciosas son el resultado de la interacción entre los microorganismos patógenos y los mecanismos de defensa antiinfecciosa del hombre. Las defensas antiinfecciosas se estructuran a tres niveles. El primero es la barrera constituida por la piel y las mucosas, que impide la penetración de los microbios. El segundo, la fagocitosis, que es el proceso por el que los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y los macrófagos endocitan y destruyen a los microorganismos que han logrado atravesar la barrera cutaneomucosa.

Las barreras cutaneomucosas son muy eficaces para impedir el paso de cualquier microorganismo a los tejidos profundos, evitando las infecciones que ocasionarían la propia flora normal y los microbios del medio

ambiente; sin embargo, los microorganismos genuinamente patógenos (patógenos primarios) se caracterizan por poseer la capacidad de atravesar las mucosas intactas. Una vez que el microorganismo ha penetrado, se inicia su fagocitosis. Tanto las estructuras químicas microbianas como el complemento y las quininas activadas, así como la histamina y las prostaglandinas producen vasodilatación local. Las citocinas, que son sustancias liberadas por los primeros leucocitos y macrófagos que llegan al lugar de la infección y por las células del endotelio vascular, actúan a nivel local produciendo vasodilatación y salida de los leucocitos del lecho vascular (diapédesis) y a nivel general causando fiebre, leucocitosis e incremento de opsoninas⁶. El proceso local de vasodilatación y diapédesis constituye la inflamación; proceso que se perpetua hasta la erradicación de los microbios por acción de la fagocitosis y la respuesta inmunitaria.

El último nivel de defensa lo constituye la respuesta inmunitaria, a través de tres mecanismos efectores: 1) la producción de anticuerpos denominada «respuesta humoral», 2) la activación de los macrófagos por los linfocitos T CD4, que incrementa la eficacia de su función fagocitaria normal y 3) la destrucción de las células infectadas por virus y otros microorganismos intracelulares por la acción lítica de los linfocitos citocidas T CD8 estimulados también por los T CD4. Estas dos últimas acciones efectoras activadas por los T CD4 constituyen la «respuesta celular».

Las bacterias y virus en localización extracelular (estafilococo, meningococo, virus de la poliomiелitis, etc.) a menudo son difícilmente fagocitados por poseer una cápsula o por otras razones, pero su recubrimiento por anticuerpos puede inactivarlos y, en todo caso, facilita su endocitosis y su posterior destrucción por los polimorfonucleares y macrófagos. Por otra parte, el único mecanismo de neutralización de las toxinas está constituido por los anticuerpos.

Algunos microorganismos, como el agente causal de la tuberculosis o las leishmanias, resisten la acción de los polimorfonucleares y sólo son destruidos por los macrófagos, pero incluso estos fagocitos no pueden erradicarlos definitivamente y los microorganismos persisten en latencia; su erradicación sólo es posible cuando los macrófagos son activados por el interferón γ (INF γ) producido por los linfocitos T CD4 que han reconocido el antígeno microbiano expuesto en la superficie del macrófago.

Los microorganismos de multiplicación intracelular obligada, como los virus, están al abrigo de la acción de los anticuerpos y de la fagocitosis. Para frenar su progresión, los linfocitos T CD8, tras reconocer los antígenos microbianos en la superficie de las células parasitadas, las destruyen bloqueando así la propagación del microorganismo⁷ (Fig. 1.5). Para mayor detalle, véase el capítulo 21).

INFECCIONES OPORTUNISTAS

En las personas con alteraciones en sus defensas antiinfecciosas, los microorganismos comensales (no patógenos) que forman parte de la flora normal de la piel, del tubo digestivo, o incluso los microorganismos inocuos del medio ambiente, pueden producir enfermedad dando lugar a las denominadas infecciones oportunistas. Las alteraciones de los sistemas defensivos que facilitan las infecciones oportunistas pueden deberse a 1) factores locales, que afectan la integridad física o funcional de las barreras cutáneas mucosas, como sucede en personas con quemaduras extensas, con úlceras de decúbito, con heridas traumáticas o incisiones quirúrgicas y también en pacientes con catéteres intravasculares, con intubación respiratoria, sonda urinaria o litiasis renal y 2) factores generales, cuando hay un déficit de la fagocitosis, como sucede en los pacientes granulopénicos, o déficit de la respuesta inmunitaria humoral, como se da en los pacientes con agammaglobulinemia o mielomas o de la respuesta inmune celular, como ocurre en los pacientes tratados con corticoides o con medicamentos inmunosupresores y en enfermos con cirrosis o con el sida, entre otros.

En todos estos casos son frecuentes las infecciones oportunistas; así sucede, por ejemplo, en los pacientes sondados o con litiasis renal, factores que predisponen a la infección urinaria; en los portadores de intubación traqueal, que facilita la neumonía, o en los pacientes con catéteres endovasculares que se colonizan con bacterias que posteriormente causan bacteriemia. Asimismo, en el paciente granulopénico es frecuente la infección de partes blandas y la bacteriemia, y en los pacientes con sida, en los que se afecta la respuesta inmunitaria celular, son muy frecuentes las neumonías y las enteritis. Todos estos procesos pueden estar causados por microbios no patógenos del medio ambiente o de la flora normal denominados microorganismos oportunistas (este tema se desarrolla en el capítulo 21).

⁶ Las diferentes citocinas (interleucinas, IL) parecen tener diversas acciones, muchas de ellas redundantes. Pueden clasificarse en varios grupos: 1) con acción proinflamatoria local (vasodilatación y extravasación leucocitaria a través de ICAM-1 y otros) y reacción general (reacción de fase aguda: fiebre, astenia etc.) como la IL1, IL6 y TNF- α 2) quimiocinas que son quimioattractantes de los leucocitos al lugar de inflamación como IL8, MCP-1, RANTES y 3) factores que promueve la maduración y salida desde la médula ósea de los leucocitos como IL3 y los CSFs. Otras como la IL2, IL4, IL5, IL12 participan fundamentalmente en la respuesta inmunitaria.

⁷ La acción destructiva de los linfocitos T CD8 sobre las células infectadas por virus constituye un mecanismo de defensa, pero también puede constituir un proceso patológico, como se señalaba más arriba para el virus de la hepatitis B.

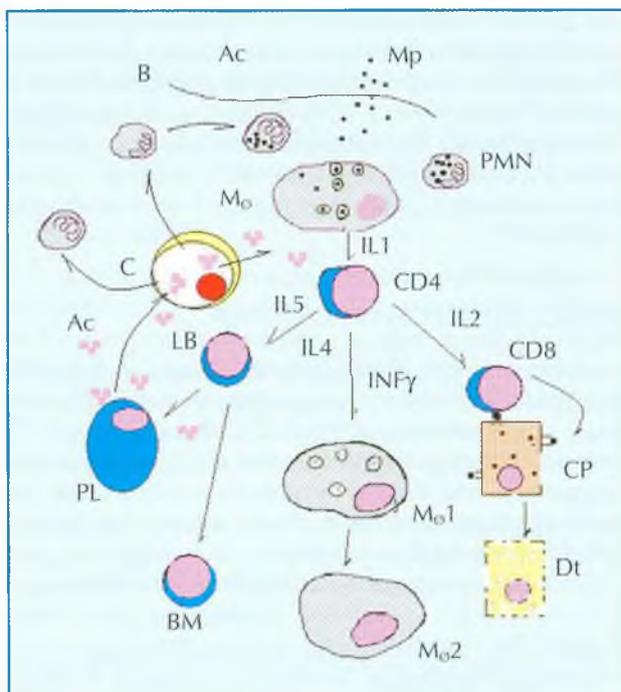


Figura 1.5. Mecanismos de defensa.

Cuando los microorganismos patógenos (Mp) atraviesan las barreras mucosas (B), desencadenan un proceso inflamatorio, que comporta una vasodilatación capilar (C) con salida a los tejidos de sustancias bactericidas y opsonizantes plasmáticas, como la lisocima, la proteína fijadora de manosa, el complemento y otras, así como de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y macrófagos ($M\phi$). Los neutrófilos y los macrófagos inician la fagocitosis de los microorganismos invasores. Los macrófagos, además, activan todo el sistema inmunitario a través de los linfocitos T CD4.

Los linfocitos B (LB) reconocen los antígenos de los microbios invasores y bajo el estímulo de las interleucinas IL4 e IL5 producidas por los linfocitos T CD4, maduran a células plasmáticas (PL) que producen anticuerpos (Ac) dirigidos contra esos antígenos. Los anticuerpos al unirse a los microorganismos los inactivan y facilitan su fagocitosis por los PMN (opsonización). Además, algunos quedan como linfocitos B memoria (BM), que responderán rápidamente ante una nueva aparición del mismo antígeno.

Algunos microorganismos resisten la fagocitosis de los PMN (*M. tuberculosis*, leishmania y otros). Los macrófagos los fagocitan y exponen en su superficie los antígenos microbianos que son reconocidos por los linfocitos T CD4, los cuales producen interferón γ (INF γ) que activa extraordinariamente la capacidad lítica de esos macrófagos ($M\phi 1$), lo que les permite erradicar los microorganismos ($M\phi 2$).

Por último, los microorganismos, como los virus, que se multiplican en el interior de las células parenquimatosas (CP) de los tejidos (células epiteliales, hepáticas, renales, pulmonares, etc.), y por tanto están al abrigo de la acción de los fagocitos, su propagación sólo puede detenerse mediante la destrucción de las células en las que se multiplican (Dt). Esa destrucción tiene lugar por la acción de los linfocitos T CD8, denominados citocidas, estimulados por la IL2 producida por los T CD4. Los T CD8 reconocen las células infectadas, porque éstas exponen en su superficie antígenos de los microorganismos que las parasitan.

PRINCIPALES SÍNDROMES INFECCIOSOS

Los síndromes infecciosos se describen con detalle en la Parte III de este libro. Aquí se presenta un breve resumen de sus principales características, para facilitar la comprensión de algunos conceptos expuestos en la Parte II.

Infecciones de la piel

Los microorganismos pueden penetrar a través de conductos naturales, como los folículos pilosos o glándulas sebáceas o sudoríparas, para causar lesiones supuradas, limitadas (foliculitis) o extensas cuando afectan a varios folículos contiguos (ántrax). En otras ocasiones, los microbios penetran por microheridas o traumatismos, produciéndose enrojecimiento de la zona, calor y tumefacción local por la infiltración, consecuencia del proceso inflamatorio agudo; en las causadas por estreptococo, se producen vesículas, ampollas o lesiones características en la dermis, como el impétigo y la crisipela. En otros casos, se produce linfangitis. Si la infección progresa en profundidad, se afecta el tejido celular subcutáneo (celulitis) sin o con necrosis. La necrosis puede afectar a las fascias musculares (fascitis) y al músculo (miositis). Cuando la necrosis es importante, se habla de gangrena.

La presencia de nódulos subcutáneos granulomatosos (granulomas) de evolución crónica, que en algún caso pueden fistulizar y acompañarse de adenomegalias satélites, responden a etiologías muy variadas (bacterias, hongos, protozoos).

Rinitis

Las infecciones víricas de la mucosa nasal, denominadas rinitis, son muy frecuentes. Cursan con abundante mucosidad y escasa afectación general, curando espontáneamente en pocos días.

Infecciones de la faringe (faringitis)

Se caracterizan por presentar dolor faríngeo que se exagera con la deglución. Se observa una mucosa orofaríngea enrojecida, acompañada de exudado, que a veces tiene carácter purulento. Pueden palparse ganglios linfáticos laterocervicales aumentados de tamaño (adenomegalias). También es muy frecuente en niños la infección del oído medio (otitis), caracterizada por dolor, fiebre y supuración ótica (otorrea), y, con menor frecuencia, laringitis y sinusitis, en ocasiones asociadas a una faringitis. La infección de la epiglotis (epiglotitis) en el niño es muy grave, ya que puede obstruir la vía respiratoria.

Mononucleosis

El síndrome mononucleósico se define por el incremento de las células linfomonocitarias, a veces atípicas, en la sangre periférica. Esta causado por diversos microorganismos, como el virus de Epstein-Barr, el citomegalovirus, el virus de la rubéola, el herpesvirus 6, el virus de la inmunodeficiencia humana y el toxoplasma. La linfomonocitosis se acompaña de fiebre o febrícula,

faringitis con frecuencia pultácea, exantema, poliadenomegalias y esplenomegalia, según el agente causal. La faringitis estreptocócica también produce angina pultácea, pero no se asocia al resto de signos y síntomas. En la hepatitis A puede haber una discreta linfomonocitosis, pero la alteración de las pruebas hepáticas es mayor.

Infecciones del pulmón

La infección del pulmón se denomina neumonía. El cuadro clínico típico de la neumonía bacteriana causada por el neumococo se inicia con escalofríos, fiebre, tos, dolor torácico que incrementa con la inspiración, respiración dificultosa y profunda (disnea) y emisión de un esputo herrumbroso, en el que se observan hematíes y leucocitos polinucleares. Existe leucocitosis con desviación a la izquierda, y la imagen radiológica generalmente revela una infiltración pulmonar unilateral y circunscrita. En las neumonías de otra etiología (micoplasma, legionela, gripe), el cuadro clínico, radiológico y biológico varía enormemente según el agente causal.

Infección urinaria

Las infecciones urinarias afectan principalmente a la mujer, se producen de modo ascendente y están causadas por bacterias de la flora perineo-uretral (*Escherichia coli* y otras), que pueden localizarse únicamente en la vejiga causando cistitis o alcanzar las vías altas afectando a los uréteres, pelvis y riñón (pielonefritis). Las infecciones urinarias se acompañan de síntomas caracterizados por la necesidad de orinar con frecuencia (polaquiuria), siendo la micción dolorosa (disuria) y con molestias o dolor hipogástrico, así como de fiebre y dolor lumbar si hay afectación de las vías altas.

Uretritis

La uretritis del varón, generalmente de transmisión venérea y causada por el gonococo, se caracteriza por disuria y polaquiuria, y se acompaña de secreción uretral purulenta.

Vaginitis y cervicitis

La vaginitis y cervicitis en la mujer se suele acompañar de secreción abundante, denominada leucorrea, y de prurito genital, pero sus manifestaciones pueden ser muy diversas según el agente causal (cándida, tricomonas, gonococo, virus del herpes, etcétera).

Enteritis

Algunas bacterias, virus y protozoos (salmonelas, campilobacter, rotavirus, giardia, etc.), así como algunas

toxinas de origen bacteriano, afectan al tubo digestivo y causan un cuadro caracterizado por la emisión frecuente de heces líquidas o pastosas (diarrea) que, de modo variable, se acompaña de náuseas, vómitos, dolor cólico abdominal y fiebre.

Meningitis

Las meningitis son infecciones de las meninges por localización metastásica de los microorganismos como meningococo, neumococo o enterovirus, a través de la sangre, salvo casos excepcionales en que un traumatismo ha puesto en comunicación el sistema nervioso central con el exterior. La inflamación de las meninges da lugar a dolor de cabeza (cefalea), vómitos, molestia por la luz (fotofobia), obnubilación, y signos de irritación radicular que se manifiestan en forma de rigidez de nuca y posición en gatillo.

Infecciones óseas y articulares

Las infecciones de los huesos y articulaciones—osteomielitis y artritis— pueden originarse, bien como consecuencia de una fractura abierta contaminada, bien secundarias a una intervención quirúrgica sobre un hueso o articulación. En otras ocasiones se producen por extensión local desde un proceso supurativo de las partes blandas adyacentes. También se producen osteomielitis o artritis a consecuencia de una diseminación hematógena de las bacterias u hongos originada desde un foco distante. En las osteomielitis y artritis agudas, el dolor y la impotencia funcional suelen ser muy evidentes.

Peritonitis

Se trata de una respuesta inflamatoria del peritoneo, que si bien puede tener múltiples causas, en el caso de las peritonitis infecciosas suele ser consecuencia de la perforación del tracto gastrointestinal o biliar, por neoplasia o tras un traumatismo perforante abdominal o por contaminación durante o después de una intervención quirúrgica. La peritonitis también puede producirse a partir de infecciones supuradas de los órganos intraabdominales, en particular del útero y de las trompas. Las peritonitis suelen estar causadas por la flora intestinal polimicrobiana. En general se trata de procesos graves de instauración aguda, con fiebre acompañada de dolor abdominal intenso con distensión progresiva, náuseas, vómitos y estado tóxico que puede abocar al *shock* (véase más abajo, septicemia).

En los pacientes cirróticos con ascitis puede producirse una infección del líquido peritoneal de modo silencioso o con mínima sintomatología. El agente causal suele

llegar desde el intestino por un proceso de translocación a través de la pared intestinal, anatómicamente intacta.

Septicemia

Las bacterias y hongos que causan infecciones focales pueden pasar a la sangre causando bacteriemia o fungemia (septicemia). En este proceso, a los síntomas locales de la infección, se añaden síntomas generales evidentes, como astenia, taquicardia, escalofríos y fiebre (continua o en forma de agujas). Se habla de *shock séptico* cuando a este cuadro se asocia taquicardia con un pulso débil, hipotensión arterial y perfusión tisular inadecuada, palidez, frialdad de la piel y disminución de la diuresis (oliguria, anuria). Al progresar el cuadro, se produce el fracaso funcional de múltiples órganos, como el riñón, los pulmones y el corazón, y en ocasiones se desencadena un cuadro de coagulación intravascular diseminada con petequias y/o equimosis. El cuadro de *shock séptico* está causado generalmente por bacterias y raramente por hongos.

DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

El diagnóstico etiológico de una enfermedad infecciosa —es decir, la identificación objetiva del microorganismo que la está causando— puede realizarse mediante métodos directos que permiten la detección del agente causal en el lugar donde está produciendo la infección 1) por observación microscópica, 2) por cultivo —en el que se constatará el crecimiento del patógeno—, 3) mediante la detección de antígenos específicos y 4) de fragmentos del genoma propios del microorganismo (DNA o RNA).

El diagnóstico etiológico indirecto se efectúa demostrando, mediante pruebas inmunitarias, la presencia de anticuerpos en el suero del paciente frente al microorganismo causante de la infección.

Las características biológicas de los diversos microorganismos —la morfología, tamaño, estructura antigénica, metabolismo y los procesos de reproducción— son muy variadas, por lo que las técnicas de laboratorio utilizadas para la detección y el estudio de cada grupo microbiano, aunque se ajustan al patrón general que se acaba de señalar, son muy heterogéneas.

Para efectuar los estudios en el laboratorio que permiten la detección de un microorganismo (observación microscópica, cultivo, detección de antígeno o detección del genoma), debe tomarse del foco de infección una

muestra de material denominada muestra clínica. Por ejemplo, en las infecciones urinarias se toma orina, en las enteritis, heces, en las meningitis, líquido cefalorraquídeo, y en la septicemia, sangre. En ocasiones, del foco infeccioso se toma un producto patológico que se ha formado durante la infección, como el pus, un esfacelo necrótico u otros. En la práctica, los términos muestra clínica y producto patológico se utilizan indistintamente como sinónimos, ya que en definitiva es el material que se toma del paciente y se traslada al laboratorio de Microbiología para su estudio (orina, heces, LCR, pus, sangre, etc.). Para los estudios serológicos, la muestra clínica siempre es la sangre del paciente que se deja coagular y de la que se obtiene el suero. En el capítulo 12, *Diagnóstico etiológico* se hace referencia detallada a la toma de muestras para el diagnóstico microbiológico.

En la figura 1.6 se resume de modo esquemático el proceso diagnóstico de una enfermedad infecciosa. La elección de los métodos o las técnicas más adecuadas para efectuar el diagnóstico microbiológico varía dependiendo del microorganismo que se sospecha como causante de la infección, de la localización de la infección y de los recursos técnicos y económicos disponibles.

Tratamiento y profilaxis

El tratamiento de las enfermedades infecciosas se basa en la administración de antibióticos. En algún caso se dispone de protocolos precisos para tratar determinadas infecciones, pero en otros la terapéutica se ha de individualizar según el agente causal y las características del paciente. No hace falta señalar la trascendencia histórica del descubrimiento de los antimicrobianos y su importancia sanitaria, social y económica. Debido a la rapidez con que se producen los cambios en este ámbito, este texto no incluye los tratamientos ni la profilaxis de las enfermedades infecciosas. Diversas guías terapéuticas de publicación anual aportan información actualizada sobre este tema⁸.

En ocasiones, para el tratamiento de una enfermedad infecciosa, son más importantes determinadas acciones, como el drenaje de un absceso o la eliminación de un cuerpo extraño (litisias renal, catéter, sonda, la limpieza quirúrgica de una zona necrótica, etc.) que la administración de antibióticos.

Siempre que sea posible, ha de evitarse el contagio con la fuente de infección, lo que es de gran importancia para evitar la difusión de las enfermedades de transmisión sexual y las infecciones intrahospitalarias. Para

⁸ Guía de terapéutica antimicrobiana. Mensa J y cols. Masson, Barcelona; The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy. Gilbert DN y cols. Antimicrobial Therapy Inc., USA; Compendio de terapéutica antiinfecciosa. Bartlett JG. Waverly Hispanica SA, Madrid. Todas estas Guías terapéuticas se actualizan anualmente. También pueden consultarse los protocolos terapéuticos publicados, como «Guidelines from the Infectious Diseases Society of America (IDSA)», en www.journals.uchicago.edu/IDSA/guidelines.

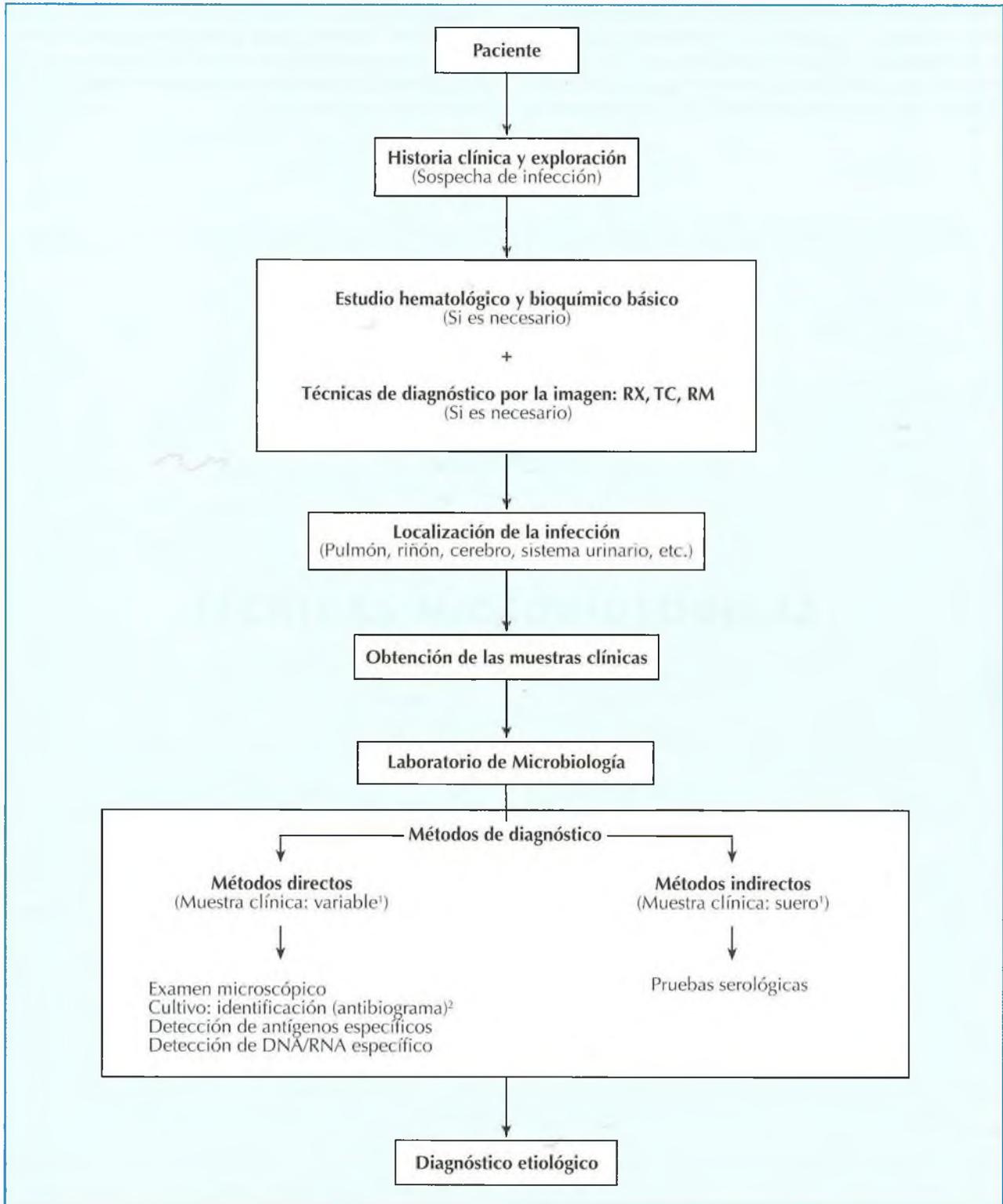


Figura 1.6. Diagnóstico etiológico de las enfermedades infecciosas.

1. La muestra clínica que ha de recogerse depende del lugar de la infección; por ejemplo, en una infección urinaria se tomará orina; en una gastroenteritis, heces; en una neumonía se recogerá esputo u otra muestra del aparato respiratorio; en una meningitis, líquido cefalorraquídeo y en las supuraciones, pus. La muestra para las pruebas serológicas es el suero.

2. Los microorganismos aislados por cultivo deben identificarse mediante procedimientos adecuados. Por otra parte, el antibiograma es una técnica que permite conocer la sensibilidad y resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos. En rutina se efectúa únicamente para algunas bacterias, hongos y virus.

evitar las toxiinfecciones alimentarias, debe asegurarse de que el agua y los alimentos no vehiculan microorganismos patógenos. La profilaxis también se basa en la vacunación cuando se dispone de vacunas eficaces. Algunas enfermedades infecciosas son de declaración

obligatoria a las autoridades sanitarias. Unas son de declaración individualizada, debiendo indicarse el nombre de la persona afectada, y otras de declaración numérica, debiendo informarse anónimamente el número de casos vistos cada semana⁹.

⁹ *Enfermedades de declaración individualizada en España:* amebiasis, botulismo, brucelosis, carbunco, cólera, difteria, fiebre botonosa, fiebre amarilla, fiebre tifoidea y paratifoidea, hepatitis A, hepatitis B, otras hepatitis víricas, hidatidosis, legionelosis, leishmaniasis, lepra, enfermedad invasiva por *Haemophilus influenzae* b, enfermedad meningocócica, meningitis tuberculosa, paludismo, parotiditis, peste, poliomielitis, rabia, rubéola, rubéola congénita, sarampión, shigelosis, sífilis congénita, tétanos, tétanos neonatal, tifus exantemático, tosferina, triquinosis, tuberculosis pulmonar, otras tuberculosis (menos pulmonar y meningitis).

Enfermedades de declaración numérica en España: enteritis y diarrea (se excluye la disentería), escarlatina, gripe, infección genital por clamidia, infección gonocócica, leptospirosis, otras enfermedades de transmisión sexual, oftalmía neonatal, neumonía, sífilis, varicela.

PARTE

II

TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

LAS BACTERIAS. CONCEPTO

En la naturaleza existen dos clases de células, las procariontas y las eucariontas; las primeras son evolutivamente más antiguas, sólo se hallan como seres unicelulares y constituyen las bacterias. El resto de los organismos vivos unicelulares y pluricelulares está formado por células eucariontas.

Las bacterias poseen un tamaño medio que oscila entre 2 y 10 μm . Su citoplasma está repleto de ribosomas; el material genético, constituido por ácido desoxirribonucleico (DNA), forma un conglomerado compacto (nucleoide) carente de membrana nuclear. La membrana citoplasmática está rodeada externamente por una pared dura y elástica, de peptidoglicano (glicopéptido, murcina), que confiere la forma a la célula. Por su morfología, las bacterias se clasifican en cocos, cuando tienen forma redondeada, y bacilos, cuando muestran una morfología alargada.

Las bacterias se clasifican en dos grupos diferentes en función de la estructura de su pared. Un grupo, las denominadas grampositivas, sólo poseen peptidoglicano; el otro, las denominadas gramnegativas, tienen adosada por fuera del peptidoglicano una membrana rica en lipopolisacáridos. Algunas bacterias tienen una cápsula rodeando la pared; también pueden poseer flagelos, que facilitan su movilidad, y fimbrias (pili), que desarrollan varias funciones, fundamentalmente de adherencia. En las bacterias, además del DNA cromosómico (nucleoide) puede existir DNA extracromosómico formando plásmidos (Fig. 2.1).

Algunas estructuras bacterianas, como el lipopolisacárido de la pared, el polisacárido capsular y las proteínas de los flagelos, son antigénicas, por lo que inducen la producción de anticuerpos cuando infectan al hombre.

Los diferentes grupos bacterianos poseen diversas capacidades metabólicas (litoautótrofas, fotoautótrofas, organoheterótrofas, etc.). El grupo que tiene interés en medicina es el que posee un metabolismo heterótrofo; es decir, requiere sustratos orgánicos como fuente de energía y de carbono. Para el desarrollo de su metabolismo algunas bacterias necesitan oxígeno (bacterias aerobias); para otras el oxígeno resulta letal (bacterias anaerobias) y algunas pueden multiplicarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (bacterias facultativas). Muchas

bacterias de interés en medicina se multiplican abundantemente en medios de cultivo de formulación sencilla, semejantes a un caldo casero, incubados a 37 °C.

Cabe señalar la existencia de bacterias atípicas, como las micobacterias, cuya pared es muy rica en lípidos; son resistentes a los ácidos y a los álcalis y algunas son de crecimiento lento. Las espiroquetas poseen una morfología espirilar; algunas, como las borrelias, crecen en medios de cultivo, pero otras, como el treponema causante de la sífilis, no han podido ser cultivadas. Los micoplasmas carecen de pared, por lo que son frágiles y pleomórficos, requiriendo medios muy ricos y osmóticamente equilibrados para su cultivo. Por último, las clamidias y las rickettsias han perdido enzimas de vías metabólicas esenciales, por lo que no se pueden cultivar en medios artificiales y son parásitos obligados de células eucariontas, como los virus.

En el capítulo anterior se ha señalado que bajo el sistema de nomenclatura linneano o binomial los diferentes taxones que agrupan y clasifican a los seres vivos —y entre ellos a las bacterias— se denominan con una palabra en latín. En cambio, para denominar las especies se utilizan dos palabras, la del género y la propia de la especie (por ejemplo: *Staphylococcus aureus*). Algunas bacterias se denominan informalmente mediante nombres vernáculos o incluso coloquiales (véase el capítulo 1. *La nomenclatura en biología*).

De entre el inconmensurable número de especies bacterianas existentes en la biosfera, sólo unas pocas colonizan las superficies cutáneomucosas del hombre, y un número aún más limitado posee capacidad patógena, causando las enfermedades infecciosas.

En la tabla 2.1 se recogen las principales bacterias de interés en medicina.

EL DIAGNÓSTICO EN BACTERIOLOGÍA

Las técnicas utilizadas para el diagnóstico etiológico de las infecciones dependen en gran medida de las características biológicas de los microorganismos que se pretende detectar.

La mayoría de las bacterias se pueden visualizar a través del microscopio óptico, ya sea en fresco o tras tinciones bacteriológicas, como la de Gram o la de Ziehl-

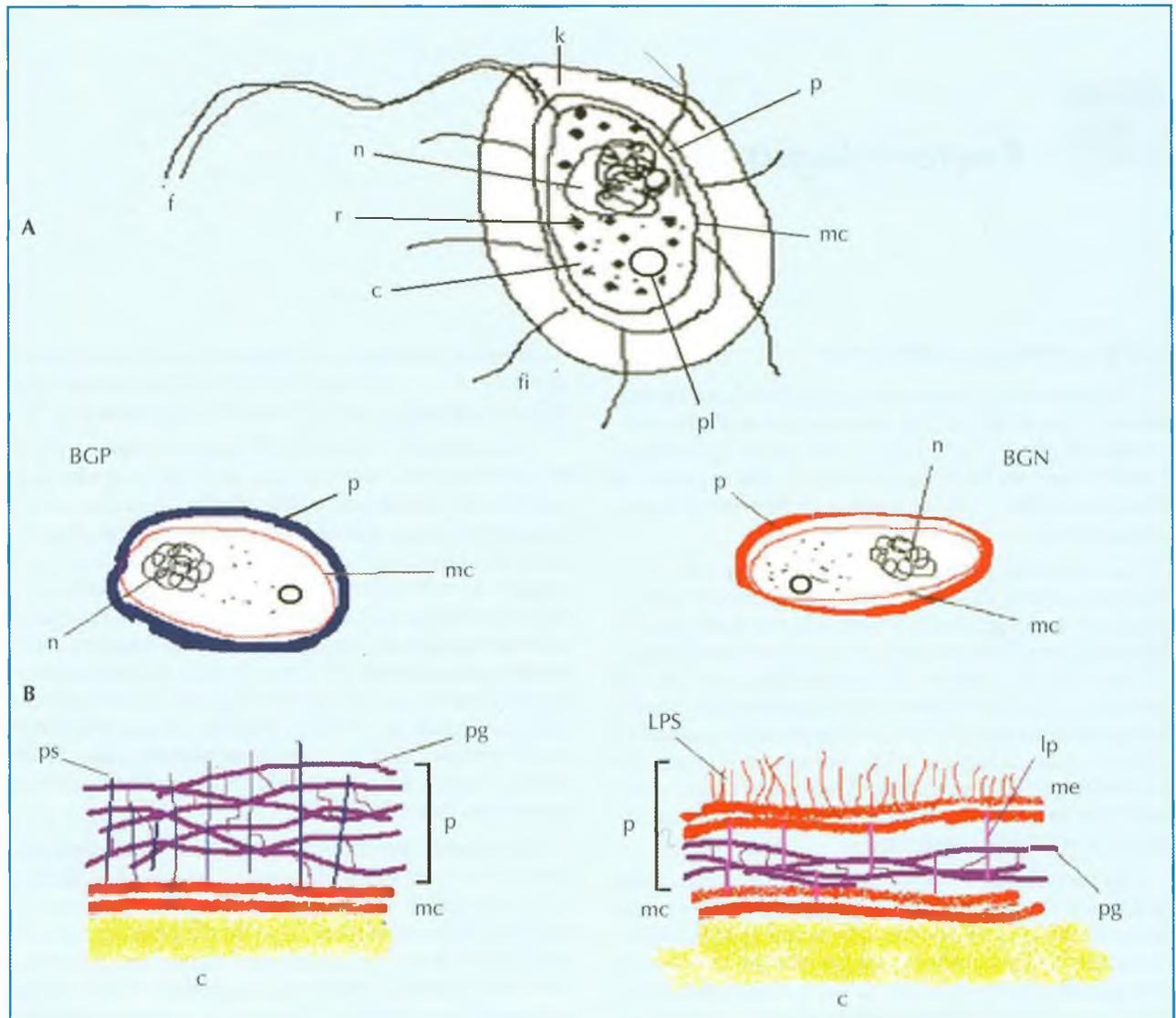


Figura 2.1. Estructura de las bacterias.

A. Elementos esenciales de las bacterias: citoplasma: c; membrana celular (o citoplasmática): mc; pared formada esencialmente por un entramado de fibras de péptidoglicano: p; ribosomas: r; nucleoide (DNA): n. Elementos accesorios: cápsula: k; flagelos: f; fimbrias: fi; plásmido: pl.

B. Estructura de la pared. Cuando las bacterias se tiñen por el método de Gram, unas adquieren el color violeta oscuro y otras el color rosa claro. Las primeras se denominan grampositivas y las segundas gramnegativas. Esa diferencia se debe a la estructura de su pared. En las grampositivas la pared esta formada por una gruesa capa de peptidoglicano y en las gramnegativas por una capa fina por fuera de la cual hay una membrana externa.

Bacterias grampositivas: BGP; Bacterias gramnegativas: BGN. Pared: de dentro a fuera: citoplasma: c; membrana celular: mc; pared celular: p; fibras de peptidoglicano: pg; polisacáridos: ps; membrana externa: me; lipoproteínas: lp; lipopolisacárido de la membrana externa: LPS.

Neelsen. Asimismo, muchas bacterias se multiplican en medios de cultivo artificiales de elaboración sencilla y posteriormente se identifican mediante pruebas bioquímicas que estudian sus características metabólicas.

Por ello, el diagnóstico de las infecciones bacterianas se efectúa mediante examen microscópico y cultivo de la muestra clínica obtenida del foco de infección (pus, orina, líquido cefalorraquídeo, etc.). Estos procedimientos permiten visualizar, aislar e identificar las bacterias causantes de la infección, estudiando posteriormente su

sensibilidad a los antimicrobianos mediante el antibiograma.

Ya se ha indicado que algunas bacterias, como los micoplasmas, algunos treponemas, las clamidias y las rickettsias, no pueden visualizarse o cultivarse por las técnicas bacteriológicas convencionales (Tabla 2.1). El diagnóstico de las infecciones causadas por estos microorganismos se lleva a cabo mediante técnicas de detección de antígeno o de secuencias específicas de sus ácidos nucleicos o, alternativamente, mediante pruebas serológicas¹ (capítulos 8 y 9).

¹ Estas pruebas también pueden aplicarse a las bacterias convencionales cuando son más eficaces que el examen microscópico y el cultivo.

Tabla 2.1
Principales bacterias de interés en medicina

1. Bacterias que pueden observarse microscópicamente y que crecen en medios de cultivo convencionales

Aerobias ¹	Géneros	Especies
Cocos grampositivos ²	<i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i>	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> ³ , <i>S. lugdunensis</i> , <i>S. saprophyticus</i> <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. pneumoniae</i> Estreptococos del grupo <i>viridans</i>
	<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i>
Cocos gramnegativos	<i>Neisseria</i> <i>Moraxella</i>	<i>N. meningitidis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> <i>M. catarrhalis</i>
Bacilos gramnegativos	Enterobacterias:	
	<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>
	<i>Shigella</i>	<i>S. sonnei</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. dysenteriae</i>
	<i>Salmonella</i>	<i>S. enterica</i>
	<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i> , <i>C. koseri</i>
	<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i>
	<i>Enterobacter</i>	<i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i>
	<i>Pantoea</i>	<i>P. agglomerans</i>
	<i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i>
	<i>Proteus</i>	<i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i>
	<i>Morganella</i>	<i>M. morganii</i>
	<i>Providencia</i>	<i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
	<i>Hafnia</i>	<i>H. alvei</i>
	<i>Yersinia</i>	<i>Y. pestis</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i>
	Otros bacilos facultativos:	
	<i>Plesiomonas</i> ⁴	<i>P. shigelloides</i>
	<i>Aeromonas</i>	<i>A. hydrophila</i> , <i>A. caviae</i>
	Bacilos curvados:	
	<i>Vibrio</i>	<i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. alginolyticus</i>
	<i>Campylobacter</i>	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. lari</i> , <i>C. fetus</i>
	<i>Helicobacter</i>	<i>H. pylori</i>
	Bacilos aerobios estrictos:	
	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>A. baumannii</i>	
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>S. maltophilia</i>	
<i>Burkholderia</i>	<i>B. cepacia</i> , <i>B. mallei</i> , <i>B. pseudomallei</i>	
<i>Alcaligenes</i>	<i>A. faecalis</i>	
<i>Achromobacter</i>	<i>A. xylosoxidans</i>	
Otros bacilos gramnegativos:		
<i>Haemophilus</i>	<i>H. influenzae</i> , <i>H. parainfluenzae</i> , <i>H. ducreyi</i> , <i>H. aegyptius</i>	
<i>Brucella</i>	<i>B. melitensis</i> , <i>B. abortus</i> , <i>B. suis</i>	
<i>Bordetella</i>	<i>B. pertussis</i> , <i>B. parapertussis</i>	
<i>Pasteurella</i>	<i>P. multocida</i>	
<i>Eikenella</i>	<i>E. corrodens</i>	
<i>Kingella</i>	<i>K. kingae</i>	
<i>Actinobacillus</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	
<i>Capnocytophaga</i>	<i>C. ochracea</i> , <i>C. canimorsus</i>	
<i>Cardiobacterium</i>	<i>C. hominis</i>	
<i>Streptobacillus</i>	<i>S. moniliformis</i>	
<i>Legionella</i>	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. micdadei</i>	
<i>Afipia</i>	<i>A. felis</i>	
<i>Calymmatobacterium</i>	<i>C. granulomatis</i>	

Tabla 2.1 (continuación)
Principales bacterias de interés en medicina

1. Bacterias que pueden observarse microscópicamente y que crecen en medios de cultivo convencionales

Aerobias¹	Géneros	Especies
Bacilos grampositivos	<i>Corynebacterium</i> <i>Gardnerella</i> <i>Listeria</i> <i>Erysipelothrix</i> <i>Arcanobacterium</i> <i>Nocardia</i> <i>Bacillus</i> ⁵	<i>C. diphtheriae</i> , <i>C. jeikeium</i> , <i>C. urealyticum</i> , <i>C. striatum</i> <i>G. vaginalis</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>E. rhusiopathiae</i> <i>A. haemolyticum</i> <i>N. asteroides</i> , <i>N. farcinica</i> <i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i>
Bacilos alcohol-ácido-resistentes	<i>Mycobacterium</i>	<i>M. tuberculosis complex</i> , <i>M. leprae</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. avium complex</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. scrofulaceum</i>
Anaerobias⁶	Géneros	Especies
Cocos grampositivos	<i>Peptostreptococcus</i> <i>Peptococcus</i>	<i>P. anaerobius</i> <i>P. niger</i>
Cocos gramnegativos	<i>Veillonella</i>	<i>V. parvula</i>
Bacilos gramnegativos	<i>Bacteroides</i> <i>Prevotella</i> <i>Porphyromonas</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Leptotrichia</i>	<i>B. fragilis</i> , <i>B. thetaiotaomicron</i> , <i>B. distasonis</i> <i>P. melaninogenica</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>P. bivia</i> , <i>P. disiens</i> <i>P. asaccharolytica</i> <i>F. nucleatum</i> , <i>F. necrophorum</i> <i>L. buccalis</i>
Bacilos grampositivos	<i>Propionibacterium</i> <i>Eubacterium</i> <i>Actinomyces</i> <i>Clostridium</i> ⁵	<i>P. acnes</i> <i>E. lentum</i> <i>A. israelii</i> <i>C. perfringens</i> , <i>C. tetani</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>C. difficile</i>

2. Bacterias de difícil observación microscópica y que no crecen en medios de cultivo convencionales

Bacterias sin pared	<i>Mycoplasma</i> <i>Ureaplasma</i>	<i>M. pneumoniae</i> , <i>M. hominis</i> , <i>M. genitalium</i> <i>U. urealyticum</i>
Espiroquetas	<i>Borrelia</i> <i>Leptospira</i> <i>Treponema</i>	<i>B. burgdorferi</i> , <i>B. recurrentis</i> <i>L. interrogans</i> , <i>L. biflexa</i> <i>T. pallidum</i>
Clamidias	<i>Chlamydia</i> <i>Chlamydophila</i>	<i>C. trachomatis</i> <i>C. pneumoniae</i> , <i>C. psittaci</i>
Rickettsias ⁷	<i>Rickettsia</i> <i>Coxiella</i> <i>Bartonella</i>	<i>R. conorii</i> , <i>R. prowazekii</i> , <i>R. typhi</i> , <i>R. rickettsii</i> <i>C. burnetii</i> <i>B. bacilliformis</i> , <i>B. henselae</i> , <i>B. quintana</i>

¹ En este apartado se incluyen las bacterias aerobias estrictas, las aerobias y anaerobias facultativas y las microaerófilas.

² Los géneros *Aerococcus*, *Abiotrophia*, *Granulicatella*, *Facklamia*, *Gemella*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Vagococcus* son cocos grampositivos catalasa negativa, taxonómicamente heterogéneos que se aíslan excepcionalmente en clínica de infecciones oportunistas y que conviene diferenciar de los estreptococos y enterococos. Algunos de estos géneros, como *Pediococcus* y *Leuconostoc*, son naturalmente resistentes a la vancomicina.

³ Forma parte de un grupo denominado estafilococos coagulasa negativa.

⁴ Se ha propuesto de forma tentativa su incorporación a la familia *Enterobacteriaceae*.

⁵ Forman esporas.

⁶ Hace referencia a las bacterias anaerobias estrictas.

⁷ La especie *R. africae* está distribuida en América del sur, y *R. felis* en el Caribe.

Un aspecto fundamental para efectuar un estudio microbiológico adecuado es que las muestras recogidas del lugar de la infección (o de otro lugar si fuera pertinen-

te) hayan sido tomadas, trasladadas y conservadas correctamente hasta su procesamiento. En el capítulo 12 y los siguientes se hace referencia detallada a este aspecto.

EL MICROSCOPIO

El microscopio óptico permite observar las bacterias, los hongos microscópicos y los protozoos, así como los huevos y larvas de los helmintos, que son invisibles a simple vista (Fig. 2.2).

Los microscopios, como el que se representa en la figura 2.3, poseen una superficie, denominada platina, sobre la que se coloca el portaobjetos de vidrio en el que se ha depositado el material clínico que se quiere examinar. La preparación se ilumina desde una fuente de luz que posee un diafragma, denominado de campo. La luz es proyectada y concentrada sobre la preparación mediante un condensador. Para conseguir la máxima nitidez de observación es necesario que el condensador esté bien alineado. El condensador dispone a su vez de un segundo diafragma, el diafragma de apertura o iris, que regula la intensidad de la luz proyectada sobre la preparación. Con este diafragma se consigue un equilibrio entre la intensidad de la iluminación y el contraste, debiendo estar más abierto al observar con mayores aumentos.

Los microscopios ópticos poseen un sistema de lentes para amplificar las imágenes formado por el objetivo, que es la lente próxima a la platina, y el ocular, que es la lente a través de la cual se efectúa la observación. Generalmente, los microscopios poseen dos oculares (binoculares). El área de la preparación que se visualiza se denomina campo.

En los microscopios que disponen de varios objetivos, éstos se sitúan en un revólver. Cada uno de ellos tiene una lente de diferente capacidad de aumento que se intercam-

bian al girar el revolver. Los aumentos obtenidos con el microscopio óptico son el resultado del producto del aumento del ocular por el del objetivo utilizado.

Ocular	Objetivo	Aumento final
x 10	x 10	x 100
x 10	x 40	x 400
x 10	x 100	x 1.000

Para observar a 1.000 aumentos debe añadirse una gota de aceite entre la preparación y el objetivo x 100 con el fin de unificar la refringencia del sistema (inmersión).

Para enfocar la preparación se dispone de un tornillo macrométrico y de otro micrométrico que permiten adecuar la distancia entre el objetivo y la misma. De ese modo, la muestra puede ser visualizada con nitidez.

Hay que acercar los objetivos a la preparación sin mirar por el ocular, vigilando lateralmente. Los objetivos x 10 y x 40 no llegan a tocar la preparación; pero sí el x 100, con el que hay que tener especial precaución al descenderlo, ya que puede golpear la preparación y romperse, tanto ésta como la propia lente del objetivo, que es muy frágil. Por ello, es recomendable enfocar inicialmente con un objetivo de menor aumento (x 10) para pasar después, girando cuidadosamente el revolver, al de inmersión (Fig. 2.3).

La calidad de la observación no solo depende de la capacidad de aumento del microscopio, sino también de su resolución, que es la cualidad que permite discriminar y observar diferenciadas las estructuras próximas

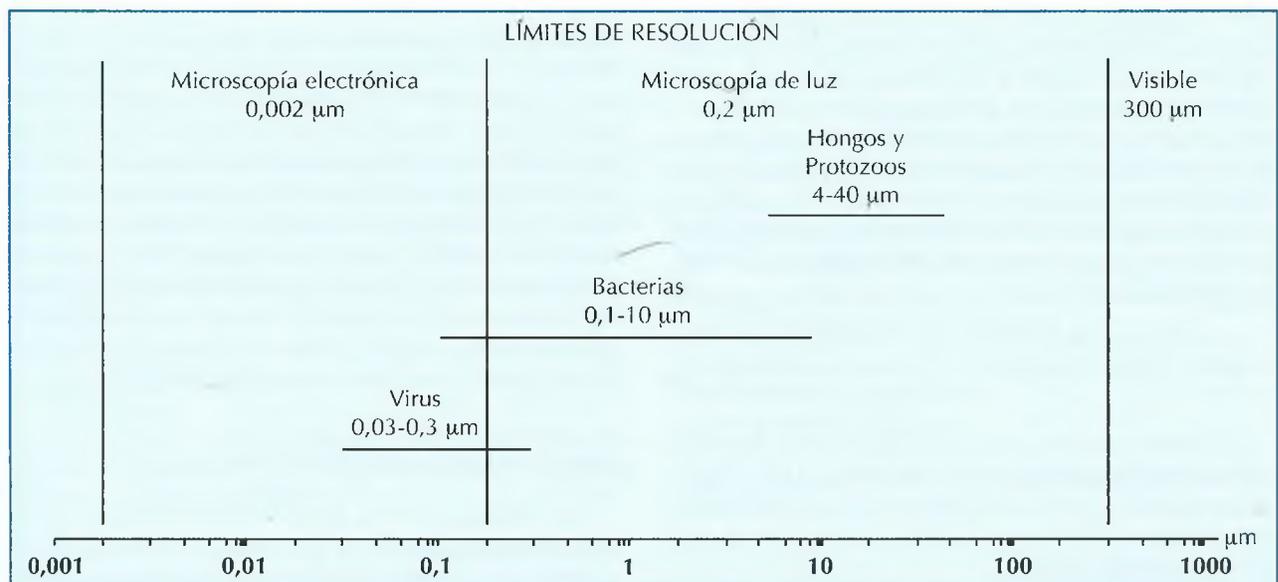


Figura 2.2. Tamaño de los microorganismos y resolución de los microscopios.

Puede verse el tamaño de diferentes microbios, expresado en micrómetros (micrómetro = micra = μm = 10^{-3} mm) y el límite de resolución del microscopio óptico y del microscopio electrónico (50.000 voltios).

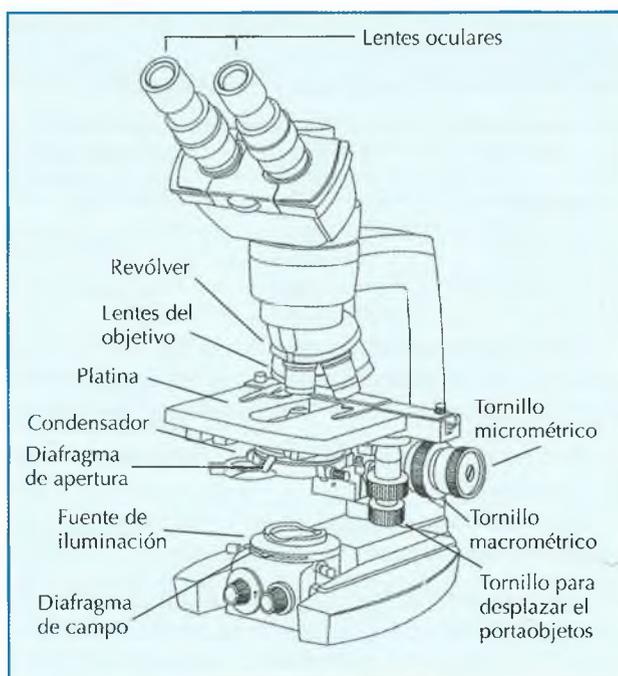


Figura 2.3. Microscopio óptico.

En esta figura pueden observarse los elementos principales de un microscopio óptico.

Dispone de dos juegos de lentes, las oculares, con un aumento de $\times 10$, y las del objetivo, constituidas por un juego de tres, situadas en un revólver que, al girarlo, permite intercambiarlas. Su aumento respectivo es de $\times 10$, $\times 40$ y $\times 100$. Los aumentos finales son de $\times 100$, $\times 400$ y $\times 1.000$. El portaobjetos con la extensión se coloca sobre la platina y se puede desplazar mediante los tornillos correspondientes. La luz generada por la fuente de iluminación se adecua a la observación con el diafragma de campo y el diafragma del condensador. Para enfocar la preparación se utilizan los tornillos macrométrico y micrométrico que desplazan arriba o abajo el tubo con las lentes o la platina.

entre sí. El límite de resolución equivale a la mínima distancia que debe existir entre dos puntos para que aparezcan individualizados y no confundidos en una mancha única. La capacidad de resolución es inversamente proporcional a la longitud de onda y a las aperturas numéricas del condensador y del objetivo, que, en cierta manera, vienen a indicar la intensidad del cono de luz que penetra por el objetivo. El límite de resolución con luz blanca de las mejores lentes de los microscopios ópticos es de $0,2 \mu\text{m}$.

Antes de iniciar la observación, debe ajustarse la iluminación según se señala en los protocolos técnicos 2.4 y 2.5.

Al acabar la observación, después de retirar la preparación, debe limpiarse el aceite del objetivo y de la platina con gran cuidado, con un papel suave y adecuado. Para limpiar el objetivo no debe utilizarse alcohol, acetona u otros disolventes.

Poseen especial interés los microscopios de fluorescencia. La lámpara de estos microscopios emite unas ondas hacia el objeto a observar cuya longitud pertenece

al espectro ultravioleta que es invisible ($< 380 \text{ nm}$). Si los microorganismos de la preparación se han teñido con una sustancia fluorescente, cuando esta sustancia recibe la energía ondulatoria ultravioleta la devuelve en forma de onda del espectro luminoso (luz entre 520 y 560 nm). De este modo, los microorganismos se hacen visibles y aparecen como elementos brillantes contra un fondo oscuro.

Muchos microorganismos se tiñen fácilmente con colorantes fluorescentes como la fluoresceína o la rodamina, que se unen a las macromoléculas de la superficie microbiana. Estas sustancias emiten fluorescencia al ser excitadas por ondas ultravioletas.

La capacidad de aumento y de resolución del microscopio de fluorescencia es semejante a la del óptico descrito anteriormente. Además, posee varias ventajas. Una de ellas es que, al observar los microorganismos como elementos muy brillantes sobre un fondo oscuro, permite realizar observaciones a menor aumento ($\times 400$) para detectarlos. Consecuentemente se puede explorar gran parte de la preparación en poco tiempo, ya que a menor aumento corresponde mayor superficie de campo observada. Otra ventaja de este tipo de microscopio radica en la posibilidad de utilizar técnicas de inmunofluorescencia que se detallan más adelante (capítulo 8).

EL ASA BACTERIOLÓGICA

El asa bacteriológica, también llamada asa de platino, constituye un instrumento básico en bacteriología. Consta de un mango de unos 20 cm de longitud en cuyo extremo lleva adosado un filamento de platino, o más frecuentemente de nicrom, que acaba en un bucle. Estos metales tienen la propiedad de alcanzar rápidamente temperaturas altas cuando se exponen a una fuente de calor (la llama de un mechero o mejor una resistencia eléctrica), y de enfriarse de nuevo rápidamente en pocos segundos. Ello permite tocar con el extremo de nicrom el material que contiene los microorganismos, efectuar las extensiones en los portaobjetos o las siembras en los medios de cultivo y esterilizar después por el calor el extremo de nicrom, que se enfría rápidamente, y en pocos segundos puede utilizarse de nuevo, lo que facilita la rapidez de las manipulaciones. En la actualidad existen asas de plástico estériles desechables (Fig. 2.4).

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

Las bacterias y otros microorganismos son de difícil visualización cuando se examinan directamente al microscopio sin teñir (en fresco), por ello se utilizan diversas coloraciones que facilitan su observación. Existen varias tinciones empleadas en bacteriología, pero las más utilizadas son la de Gram y la de Ziehl-Neelsen.

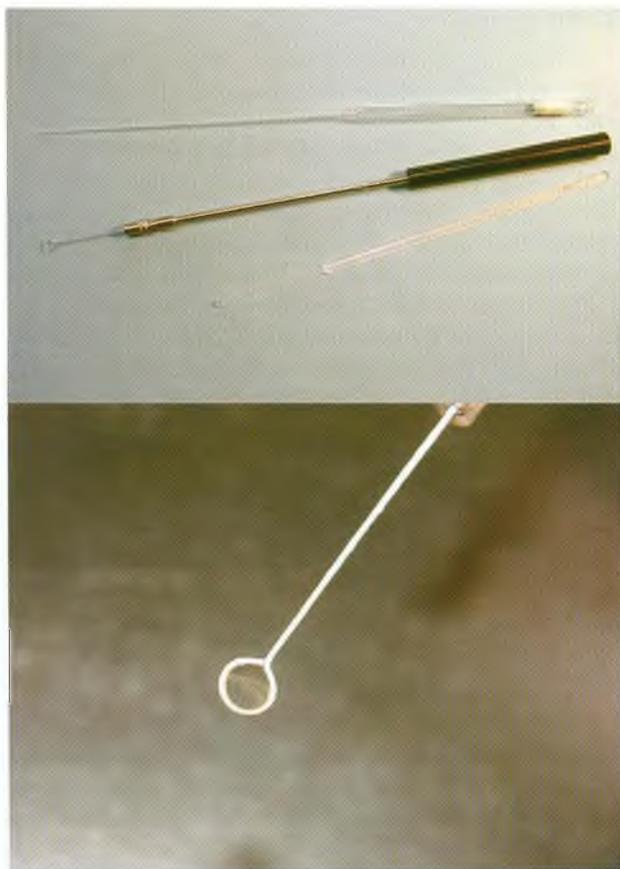


Figura 2.4. Asa bacteriológica.

El asa posee un mango y un filamento de nichrome, que acaba en un bucle, o en forma de pala plana en las que se utilizan en micología. Las asas se esterilizan mediante un calentador eléctrico o a la llama de un mechero. El nichrome se calienta rápidamente al rojo y se enfría en un instante, por lo que el proceso de esterilizar el filamento del asa por el calor apenas dura unos segundos. Existen comercializadas asas de plástico estériles desechables. Con el asa pueden practicarse extensiones en un portaobjetos y pueden sembrarse tubos o placas. Mediante pipetas de vidrio tipo Pasteur, estériles, también puede transferirse el material fluido a un portaobjetos o a una placa de Petri.

Para efectuar una tinción bacteriana, el primer paso consiste en la preparación del frotis o extensión del material a observar sobre un portaobjetos de vidrio, mediante un asa de nichrome o una pipeta, de modo que se obtenga una película homogénea de dicho material (Fig. 2.5).

La tinción de Gram

Esta tinción, además de facilitar la observación de las bacterias, permite diferenciarlas en dos grupos: grampositivas y gramnegativas.

En la primera parte de la tinción² la preparación se baña con violeta de genciana, quedando todas las bacterias teñidas de color violeta ultramar intenso. Al cubrir-

² Véase Protocolo técnico 2.3.



Figura 2.5. Preparación del frotis o extensión.

Si se desea practicar una extensión (frotis) de una muestra fluida, como la orina, el LCR o un cultivo en medio líquido, se toma con el asa la muestra del material a estudiar y se deposita sobre el portaobjetos extendiéndola mediante movimientos suaves de rotación sobre una superficie circular de alrededor de 1 cm de diámetro. Si el material es sólido, como una colonia bacteriana, se deposita previamente sobre el portaobjetos una gota de agua destilada estéril; se toma una pequeña porción de la colonia con el asa y se emulsiona en la gota de agua del portaobjetos. Una vez secas las preparaciones, pueden fijarse y teñirse.

se posteriormente la preparación con una mezcla de alcohol y acetona algunas bacterias conservan dicha coloración, mientras que otras se decoloran y la pierden totalmente. Las que conservan la coloración violeta se denominan grampositivas, y las que la pierden, gramnegativas. En la segunda parte de la tinción se hace actuar un colorante que contraste notablemente con el primero para teñir las bacterias gramnegativas que han quedado decoloradas. Si se utiliza la fucsina diluida o la safranina, adquieren el color rosado. El carácter grampositivo (violeta intenso) o gramnegativo (rosa suave) de las bacterias depende de la estructura de su pared.

La tinción de Gram es la más utilizada de todas las tinciones bacteriológicas, ya que permite visualizar la mayoría de las bacterias. La tinción consigue: 1) facilitar la observación nítida de las bacterias y, por tanto, su diferenciación en formas redondeadas, denominadas cocos, y formas alargadas, denominadas bacilos, y 2) su clasificación en función de su aptitud tintórea en grampositivas y gramnegativas (Fig. 2.6).

Observación microscópica de las muestras clínicas

El examen microscópico cuidadoso de las muestras clínicas teñidas por el método de Gram permite visualizar las bacterias causantes de la infección y en muchos casos su identificación con carácter presuntivo. En efecto, aunque la observación microscópica de un neu-

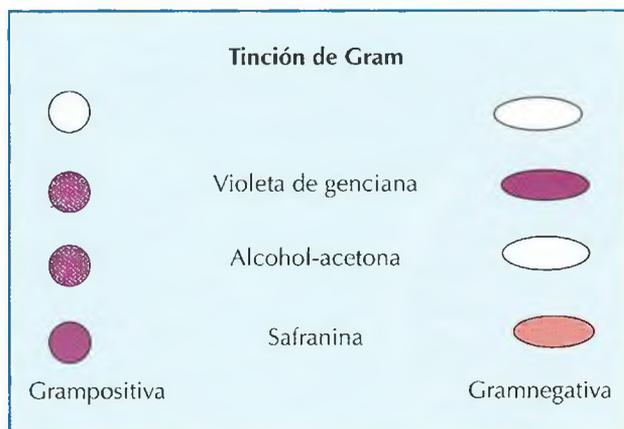


Figura 2.6. Tinción de Gram.

Las bacterias sin teñir se observan al microscopio como elementos tenues difíciles de visualizar; para facilitar su observación se utiliza la tinción de Gram. Para realizarla se efectúa una extensión del material a teñir. Se baña con violeta de genciana, que tiñe todas las bacterias de color violeta oscuro intenso. Se lava la preparación con agua y se baña con lugol, que actúa como mordiente. Se decanta el lugol y se decolora la preparación con alcohol-acetona. Unas bacterias retienen el color violeta y otras se decoloran. Las primeras son las grampositivas. Para visualizar bacterias gramnegativas, que se han decolorado, se tiñen con un colorante de contraste de color rosa suave como la safranina o la fucsina diluidas. El resultado de la tinción de Gram (grampositivas, violeta; gramnegativas, rosa) depende de la estructura de la pared (véase Fig. 2.1).

mococo, un meningococo, una nocardia u otra bacteria suele permitir su identificación por personas experimentadas, siempre es mejor considerar esta identificación como presuntiva hasta que se haya efectuado la identificación metabólica de la bacteria después del cultivo.

En la figura 2.7 se representa la morfología de algunas bacterias de interés en medicina.

TÉCNICAS Y MEDIOS DE CULTIVO

Al sembrar una muestra clínica en un medio de cultivo, las bacterias existentes en la muestra empiezan a multiplicarse. Como la mayoría de las bacterias se duplican cada 20-30 minutos, entre las 18 y las 24 horas se habrán desarrollado abundantemente. Ello permitirá su detección aunque su número inicial en la muestra clínica fuera muy bajo y, por tanto, no hubieran podido ser observadas en el examen microscópico. Además, el aislamiento de las bacterias por cultivo permite su posterior identificación y el estudio de su sensibilidad a los antimicrobianos.

Los medios de cultivo deben contener los elementos nutritivos necesarios para permitir la multiplicación de las bacterias. Inicialmente, pueden clasificarse en dos grupos: medios líquidos y sólidos.

Medios líquidos

Un medio líquido es una infusión que se prepara poniendo carne picada en una olla con agua, que se lleva a ebullición para solubilizar y extraer de la carne las proteínas, los factores esenciales y los oligoelementos. Este caldo se filtra para obtener un medio limpio, se añade cloruro sódico y se esteriliza al autoclave. También puede prepararse, más cómodamente, disolviendo en el agua unos gramos de un buen extracto de carne comercializado en lugar de utilizar la carne picada. Además, suelen añadirse otros nutrientes, como peptonas y glucosa, así como cloruro sódico y un tampón de pH (Fig. 2.8).

Medios sólidos

A un medio de cultivo líquido puede añadirse una sustancia gelificante, como el agar en polvo, que se disuelve por ebullición. Al enfriarse convierte el medio líquido en sólido, con una consistencia como la de la jalea de membrillo. Por calentamiento funde de nuevo y se puede verter en diversos recipientes, en los que al enfriarse adquiere nuevamente la consistencia sólida.

Los medios de cultivo se reparten en tubos, placas de Petri, botellas o matraces, según las necesidades. Las placas de Petri son recipientes cilíndricos de plástico o vidrio transparente con una tapa, en las que se vierten los medios sólidos, ofreciendo una gran superficie para la siembra³ (Fig. 2.9).

Aislamiento de las bacterias. Colonias bacterianas

Si imaginamos que en un material clínico —pus, orina, etc.— hay un solo tipo de bacteria (una sola especie), bastaría sembrarlo en un medio de cultivo líquido, en el cual las células bacterianas se multiplicarían libremente en suspensión, enturbiando progresivamente el medio a medida que aumenta su número. Como sólo existiría un tipo de bacteria, podría identificarse y estudiar su sensibilidad a los antibióticos; pero, como habitualmente no se conoce ese punto y con frecuencia en el material clínico hay varios tipos de bacterias, se utilizan medios sólidos para aislar (separar) e individualizar cada una de las diversas bacterias existentes en la mezcla⁴.

Para este propósito, la siembra del material clínico se efectúa con un asa de nicrom sobre la superficie del agar contenido en una placa de Petri, por la técnica de agotamiento, que permitirá separar las diferentes bacterias de la mezcla. La siembra por agotamiento consiste en reseguir en zigzag la superficie del medio con el asa de nicrom previamente cargada con el material a sembrar (orina, pus, etc.). Las células bacterianas se van depositando sobre la superficie del agar a lo largo del recorrido del asa, al final del cual quedan pocas bacterias, por

³ Las placas de Petri tienen diversos tamaños, siendo las de 9 cm de diámetro por 1 cm de alto las más utilizadas.

⁴ Sólo puede identificarse una bacteria cuando está pura en un cultivo. Las mezclas de bacterias no pueden identificarse, ya que los caracteres resultantes serían la suma de los caracteres de las existentes.

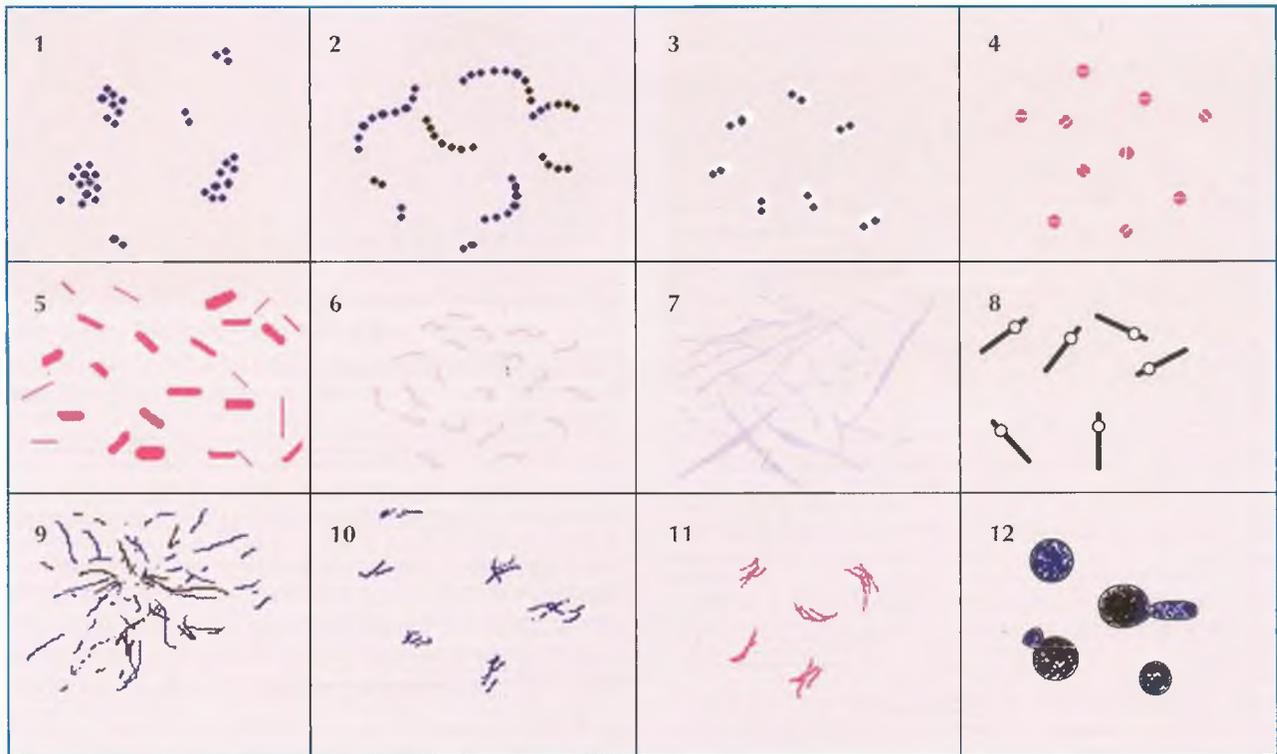


Figura 2.7. Morfología de algunas bacterias de interés médico.

Tanto la forma de las bacterias como el color que adquieren tras la tinción de Gram dependen de la pared, que es rígida. Los patrones morfológicos básicos de las bacterias están representados por la forma redondeada, a la que se denomina «coco» y la alargada conocida como «bacilo». Los cocos pueden disponerse en parejas, «diplococos», o formar cadenas, a veces poseen cápsula. Los bacilos pueden ser rectos o «fusiformes», lineales o curvados formando «vibriones» o «espirilos». Algunos bacilos forman esporas.

1. Estafilococos, 2. Estreptococos, 3. Neumococos (diplococos capsulados).
4. Neisserias (gonococo y meningococo). *Acinetobacter* y *Moraxella* tienen una morfología semejante.
5. Enterobacterias (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, etc.). *Pseudomonas*. Parvobacterias (*Brucella*, *Pasteurella*, *Haemophilus*).
6. Bacterias espirilares (*Campylobacter*, *Helicobacter*) y vibriones (*Vibrio cholerae*). 7. Bacteroides y fusobacterias (anaerobios).
8. *Bacillus*. *Clostridium* (anaerobios) ambos géneros forman esporas. 9. Actinomicetales (*Nocardia*, estreptomices) 10. Corinebacterias 11. Micobacterias (bacterias alcohol-ácido resistentes).
12. Levaduras (hongos unicelulares). Se incluyen con objeto de comparación del tamaño.

lo que se depositan muy separadas unas de otras (Protocolo técnico 2.6).

Las placas se llevan a la estufa y durante la incubación, generalmente de 18 a 24 horas, cada bacteria depositada sobre el agar se multiplica, dando lugar a unos agregados de millones de bacterias que forman las colonias, cuyo tamaño es de varios milímetros, por lo que son visibles a simple vista. Las bacterias que al final del recorrido del asa quedaron en el agar separadas entre sí dan lugar a colonias perfectamente separadas —aisladas— constituidas cada una de ellas por bacterias del mismo tipo, idénticas a la que las originó (Fig. 2.10).

Al observar las colonias en los medios de cultivo debe evaluarse su tamaño, su forma, la textura (muco-sas, lisas, rugosas), el brillo de la superficie y el aspecto de sus bordes, lo que permitirá constatar si existe un solo tipo de colonia o más de uno. La utilización de pequeñas lupas de relojero facilita enormemente la identificación de las colonias y permite observar ele-

mentos discriminativos que no pueden apreciarse a simple vista.

Clases de medios de cultivo

Como se ha indicado anteriormente, los medios de cultivo según su consistencia pueden ser líquidos o sólidos (coloquialmente, caldos y agares). Independientemente de que los medios sean líquidos o sólidos, desde el punto de vista de su aporte nutritivo pueden ser usuales o enriquecidos.

Medios usuales

Los medios usuales contienen las sustancias nutritivas mínimas para el crecimiento de las bacterias metabólicamente no exigentes, como el colibacilo o los estafilococos. Se preparan con una infusión o extracto de carne, añadiéndose agar cuando se desea obtener un medio sólido, como se ha descrito más arriba y se muestra en la figura 2.8. A estos medios también se les puede



Figura 2.8. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo líquidos, denominados coloquialmente «caldos», se preparan poniendo en una olla o matraz un litro de agua, 20 g de extracto de carne y 5 g de cloruro sódico. Puede añadirse unos gramos de peptona, que contiene péptidos y aminoácidos, así como glucosa y un tampón fosfato. El extracto de carne y las peptonas se hallan comercializados. La olla o el matraz se lleva al fuego hasta la ebullición del agua, para disolver las sustancias añadidas. Si es necesario, se filtra para obtener un caldo límpido. Se reparte en matraces o botellas o se dispensa en tubos u otros recipientes que se esterilizan en el autoclave (115-121 °C durante 20 minutos).

Si al medio líquido, durante su preparación o bien después, se añade 12 g de agar en polvo, que se disuelve por ebullición, al enfriarse, el medio gelifica, volviéndose sólido.

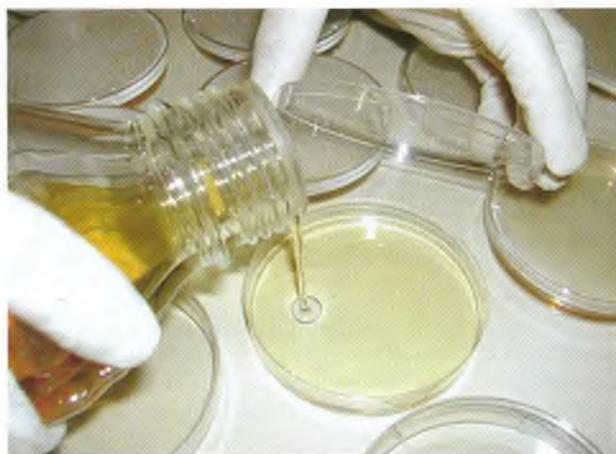


Figura 2.9. Placas de Petri.

Las placas de Petri, como las representadas en esta figura, son recipientes planos de vidrio o plástico transparente. Las más utilizadas tienen una base de 9 cm de diámetro por 1 cm de alto y poseen una tapa, aunque existen placas de diferentes diámetros. Los medios sólidos pueden fundirse por el calor y, mientras están fundidos se pueden verter en las placas de Petri tal como se representa en esta figura. Al enfriarse, el medio solidifica y ofrece una amplia superficie para la siembra por agotamiento.

añadir una pequeña cantidad de peptona (concentrado de péptidos y aminoácidos), extracto de levadura y glucosa, con lo que se consigue que tengan mayor valor nutritivo. También se añade a algunos medios almidón o carbón, que fijan y neutralizan sustancias tóxicas para las bacterias que se encuentran en algunos ingredientes del medio. Los medios de cultivo, además del aporte

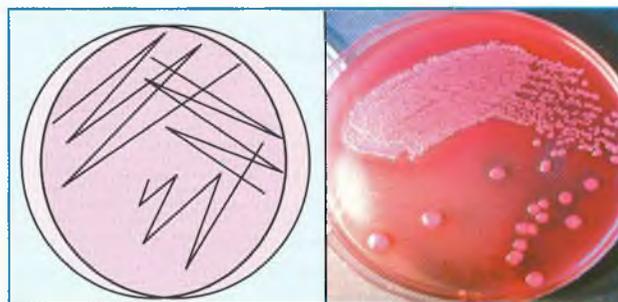


Figura 2.10. Aislamiento de las bacterias. Siembra por agotamiento.

Detalle de la técnica de siembra por agotamiento en una placa de Petri. El asa cargada con la muestra clínica, recorre la superficie del agar según se indica en el dibujo. Las células bacterianas que contiene la muestra se van depositando cada vez más espaciadas a lo largo del recorrido del asa (porque al irse depositando quedan menos).

La placa se lleva a la estufa a incubar. A partir de cada célula depositada se forma una colonia. Como en la parte final del recorrido del asa se depositan pocas células, al día siguiente, en esa zona se observa las colonias bien aisladas por lo que se pueden tocar individualizadamente con facilidad.

nutritivo suficiente, deben poseer un pH y una osmolaridad adecuados para la multiplicación de las bacterias.

Los medios usuales se emplean como tales para el cultivo de las bacterias no exigentes, pero también son utilizados como base para la preparación de otros medios (enriquecidos, selectivos, etcétera).

Medios enriquecidos

Son medios usuales a los que se añade suero, sangre o factores esenciales específicos, como vitaminas o cofactores. Permiten el crecimiento de las bacterias exigentes en requerimientos nutritivos, como los estreptococos, el neumococo, el gonococo, las bacterias hemófilas, y otras que no crecen bien en los medios usuales.

Además, en los medios con sangre puede observarse si alrededor de la colonia se ha producido un halo de hemólisis por acción de las hemolisinas liberadas por las bacterias. Las colonias pueden producir una hemólisis total, de modo que el agar se vuelve transparente alrededor de la colonia (hemólisis β), o una hemólisis parcial, formándose un halo verdoso alrededor de la colonia (hemólisis α). Todas estas características (tamaño, forma, hemólisis...) permiten detectar la presencia de diversos tipos de colonias y orientar sobre el microorganismo que las forma.

Desde el punto de vista de su finalidad, los medios se pueden clasificar en: 1) medios de aislamiento, 2) medios para resiembra, 3) medios de identificación, 4) medios para antibiograma y 5) medios de conservación.

Medios de aislamiento

Los medios utilizados para el aislamiento de las bacterias por la técnica de agotamiento han de ser sólidos, según se ha explicado anteriormente. Estos medios deben

ser nutricionalmente adecuados para las bacterias que se desea aislar; es decir, usuales para bacterias no exigentes y enriquecidos para las exigentes.

Medios selectivos

Cuando de una mezcla bacteriana interesa aislar específicamente un solo tipo de bacteria que está en escasa cantidad, es recomendable utilizar medios selectivos. Dichos medios permiten el crecimiento de esa bacteria, inhibiendo al resto de las existentes en la muestra. Diversas sustancias añadidas a un medio de cultivo pueden cumplir esta función, entre otras el cloruro sódico a concentración elevada, el citrato sódico, el cristal violeta, las sales biliares, así como diversos antibióticos y antisépticos. Cada producto inhibe a un grupo de bacterias sin afectar a otras.

Existen buenos medios selectivos para aislar estafilococos, estreptococos, enterococos, listeria, meningococo y gonococo, salmonelas, shigelas, yersinia, campilobacter, vibrio, legionela y nocardia entre otras bacterias; cada uno con su composición particular.

Medios de enriquecimiento

En algún caso puede ser útil sembrar previamente la muestra en un medio de enriquecimiento. Son medios líquidos que cumplen la misma función que los selectivos; es decir, permiten la multiplicación de la bacteria buscada e inhiben las otras. Tras su incubación, debe sembrarse por agotamiento en un medio selectivo sólido para obtener colonias aisladas de la bacteria buscada.

Medios selectivo-diferenciales

En los medios selectivos siempre crecen algunas bacterias diferentes a la buscada, por ello, para diferenciar las distintas colonias, se añade a los medios selectivos sustancias que confieren un color diferente a las colonias según la distinta actividad metabólica de las bacterias que las forman, convirtiéndolos en medios selectivo-diferenciales.

Para ese propósito se utilizan azúcares como el manitol, la lactosa, el sorbitol y otros, junto con un indicador de pH (rojo neutro, azul de bromotimol, etc.). Por ejemplo, puede prepararse un medio de cultivo sólido con gran cantidad de cloruro sódico, que inhibe a la mayoría de las bacterias pero permite el crecimiento de los estafilococos (medio selectivo para estafilococos), al que se añade manitol y rojo de fenol como indicador. El medio, cuyo pH es neutro, posee un color rosa pálido, y las bacterias que no utilizan el manitol, como la mayo-

ría de las especies de estafilococo, forman colonias blancas. El estafilococo dorado metaboliza el manitol, por lo que produce catabolitos ácidos, y la colonia y el medio alrededor de ella adquieren color amarillo intenso, ya que a ese pH el indicador (rojo de fenol) cambia el color de rosa a amarillo. Un medio de este tipo inhibe la mayoría de las bacterias, excepto los estafilococos. Permite detectar el estafilococo dorado (*S. aureus*), que es muy patógeno, por sus colonias amarillas, diferenciándolo de la gran mayoría de estafilococos no patógenos, que también crecen en el medio dando lugar a colonias rosadas o blancas (*S. epidermidis* y otros).

Asimismo, pueden prepararse medios diferenciales basándose en reacciones metabólicas diferentes de la fermentación de los azúcares, como la decarboxilación de la lisina, la producción de ácido sulfhídrico y otras, que también comportan cambios de color en las colonias.

En la actualidad, los medios selectivo-diferenciales tienden a prepararse utilizando sustancias cromogénicas. Dichas sustancias son productos químicos de síntesis que son incoloros cuando se unen a sustratos naturales por enlaces que son hidrolizados por enzimas microbianas específicas. Cuando la enzima microbiana hidroliza el enlace, se libera el compuesto cromogénico, que adquiere un color intenso. Así, por ejemplo, la galactosa se une a un colorante, el ortonitrofenol (ONF), por un enlace químico que es reconocido por una enzima bacteriana, la β -galactosidasa, cuya función natural es reconocer e hidrolizar el enlace entre la galactosa y la glucosa (que constituyen la lactosa). El complejo galactosa-ONF es incoloro, pero cuando es hidrolizado por la β -galactosidasa y se libera el ONF, éste adquiere un intenso color amarillo. La aparición de ese color en la colonia y a su alrededor indica la presencia de la enzima⁵. Algunas enzimas son específicas de un género, una especie o propias de un reducido número de especies, por lo que su detección permite su identificación. Así, por ejemplo, el medio CPS ID3[®], el medio Chromogenic UTI[®], el medio CHROMagar Orientation[®] o el medio URI Select 4[®], en el que crecen prácticamente todas las bacterias causantes de infección urinaria, permiten la identificación directa de las más frecuentes, como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y enterococos, y la orientación de otras especies, al poner en evidencia la actividad enzimática de la β -glucuronidasa o la β -galactosidasa y la β -glucosidasa de las bacterias formándose colonias de diferentes colores según la especie (Fig. 2.11). Estos caracteres pueden completarse con el estudio rápido del indol y la fenilalanina desaminasa.

Como se ha señalado, esta línea de medios de aislamiento, basada en la incorporación de diversas mezclas

⁵ Estos sustratos cromogénicos también pueden utilizarse en suspensión en agua destilada o en un tampón en un tubo (1 ml) como una prueba de identificación (véase más adelante).



Figura 2.11. Medios diferenciales clásicos y cromogénicos.

A la izquierda, puede observarse como el clásico medio de MacConkey permite diferenciar las bacterias que atacan la lactosa (*Escherichia coli*, rosa) de las que no la atacan (*Shigella flexneri*, transparente). Los medios cromogénicos mejoran la capacidad diferencial de los medios clásicos y permiten efectuar una identificación muy específica de algunas bacterias como *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterococcus* y otras. A la derecha puede observarse el aspecto de las diferentes colonias crecidas en un medio cromogénico.

cromogénicas a medios selectivos y no selectivos, permite la identificación presuntiva de alguna de las bacterias aisladas con un nivel tan elevado de especificidad que, en la práctica, hace innecesaria la realización de pruebas confirmatorias (Fig. 2.12).

Incubación

Cada tipo de bacteria requiere para su multiplicación una temperatura y atmósfera adecuada. Por ello, una vez sembrados los medios de cultivo, deben llevarse a la estufa, en cuyo interior existe la temperatura óptima para el crecimiento de las bacterias, que es de 35 a 37 °C para la mayoría de las de interés médico.

Para incubar los medios en aerobiosis, basta con poner las placas o los tubos en el interior de una estufa, cuya atmósfera es la del ambiente. En estas condiciones crecen bien las bacterias aerobias (tanto las aerobias estrictas, que sólo crecen en presencia de oxígeno, como las aerobias y anaerobias facultativas, que crecen tanto en presencia como en ausencia de oxígeno).

Para incubar los medios en anaerobiosis y permitir la multiplicación de las bacterias anaerobias estrictas, que



Figura 2.12. Medios diferenciales cromogénicos.

La introducción de los medios cromogénicos, algunos diseñados específicamente para el cultivo de la orina en las infecciones urinarias, permite identificar presuntivamente con buena especificidad diferentes microorganismos. Arriba: (izquierda) *Escherichia coli*; (derecha) *Klebsiella pneumoniae*. Abajo: (izquierda) *Enterococcus faecalis*; (derecha) *Pseudomonas aeruginosa*.

sólo crecen en ausencia de oxígeno, uno de los métodos habituales es el empleo de pequeños recipientes o jarras de cierre hermético, de cuyo interior se elimina el oxígeno por diferentes métodos (véase el capítulo 4).

Para lograr una atmósfera aerobia enriquecida en CO₂, que facilita el crecimiento de las bacterias capnófilas, como el neumococo, el gonococo, el meningococo, *Haemophilus influenzae* y otras, se han propuesto diversos métodos: puede utilizarse un recipiente cerrado, como el descrito anteriormente, en cuyo interior se enciende una vela que en la combustión genera CO₂ sin consumir todo el O₂ existente, o bien mediante sobres comercializados con reactivos, que en contacto con el agua generan CO₂.

Cuando se trabaja con un número elevado de placas y tubos que hay que incubar en anaerobiosis estricta o en una atmósfera enriquecida en CO₂, es preferible utilizar, en lugar de jarras, estufas de cierre hermético en cuyo interior, por inyección de N₂ y CO₂ en proporciones adecuadas, se genera la atmósfera deseada.

Medios para resiembra

Cuando en los medios de aislamiento se observan colonias, debe transferirse una colonia de cada tipo, mediante el asa, a un nuevo medio que permita su crecimiento en cultivo puro para su identificación. Este proceso se denomina resiembra.

Los medios para resiembra, que suelen repartirse en tubos, deben satisfacer las exigencias nutritivas de la bacteria a resembrar para permitir su crecimiento. Sin embargo, cuando las colonias en la placa de aislamiento son lo suficientemente grandes, accesibles y están bien aisladas, se puede realizar con el asa una suspensión espesa de la colonia en 1-2 ml de solución salina contenida en un tubo, lo que permite realizar directamente las pruebas de identificación y el antibiograma. Esta técnica tiene la ventaja de adelantar un día el resultado al eliminar las 24 horas de incubación de la resiembra.

Medios para identificación, antibiograma y conservación

Con la suspensión de la colonia en solución salina o la resiembra, se procede a la identificación metabólica de la bacteria, inoculando diversos medios de identificación que permiten revelar las diferentes reacciones bioquímicas del microorganismo.

El estudio de la sensibilidad a los antibióticos (antibiograma) también requiere el empleo de medios adecuados.

La conservación en un archivo de las cepas aisladas se puede realizar sembrándolas en medios adecuados

denominados «medios de conservación». Éstos deben guardarse, después de incubados, en un lugar fresco al abrigo de la luz, lo que permite mantener las cepas viables durante un tiempo variable de semanas o meses según el microorganismo. Para las bacterias no exigentes, los medios, lógicamente, deben permitir el crecimiento bacteriano, pero deben ser nutritivamente pobres. Preferentemente, las cepas se conservarán congeladas en leche descremada o caldo con glicerol a -80 °C o liofilizadas.

Medios comercializados

En la actualidad sólo se preparan artesanalmente, tal como se ha señalado anteriormente, algunos medios de cultivo que no se encuentran en el comercio. La mayoría de los medios pueden adquirirse en forma deshidratada (medios en polvo). Siguiendo las instrucciones del fabricante, el polvo se disuelve en agua por ebullición y, una vez disuelto y ajustado el pH, se reparte en matraces y se esteriliza. Una vez que se ha enfriado, si es necesario, se añaden componentes termolábiles esterilizados por filtración, y se reparte en tubos o placas de Petri. Hoy en día, en muchos laboratorios ni siquiera se preparan los medios a partir de sus componentes deshidratados, sino que se compran placas de Petri o tubos conteniendo los medios preparados para su uso⁶.

MEDIOS DE CULTIVO. DESCRIPCIÓN

Medios de aislamiento

Caldo (nutritivo) usual. Para su elaboración se utilizan 500 g de carne picada por litro de agua, se lleva a ebullición y se filtra para obtener una infusión de carne. Alternativamente, se puede preparar añadiendo a 1 l de agua 10-20 g de un extracto de carne comercializado. En ambos casos, se añaden 5 g de cloruro sódico. Esta formulación puede complementarse con peptonas, extracto de levadura y/o glucosa; asimismo, puede incorporarse un tampón (fosfato disódico u otro).

Este tipo de medios se encuentra comercializado bajo diferentes denominaciones; según su formulación más o menos rica: caldo nutritivo, caldo de infusión de cerebro-corazón (BHI), caldo tripton de soja (TSB), caldo brucela, caldo Columbia, etc. Cabe señalar que alguno de estos medios (BHI, TSB, Columbia) pueden ser bastante ricos desde el punto de vista nutritivo.

Estos medios líquidos, con diversos grados de suplementos nutritivos, pueden utilizarse para cultivar bacterias o como base de otros medios líquidos o sólidos.

⁶ Comercializan medios de cultivo: Anaerobe Systems, Applied Biosystems, BD Diagnostics; Microbiology Systems, bioMérieux. CHROMagar, Copan Diagnostics, Inc. Oxoid Inc. Remel Inc.

Agar (nutritivo) usual. Es un medio sólido que se prepara añadiendo 12 g de agar-agar a un caldo usual como los descritos anteriormente. Existen diversas clases de agar nutritivo comercializadas: agar nutritivo, agar de infusión de cerebro-corazón (BHI agar), agar triptona de soja (TSA), agar brucela, agar Columbia, agar GC, etcétera.

Agar sangre. Se prepara añadiendo 5% de sangre de carnero a un agar base rico, como el agar Columbia, agar brucela, TSA, agar GC y otros. Cuando se pretende leer la hemólisis, se debe preparar el medio sin azúcares (glucosa u otros).

Agar sangre-ácido nalidíxico y colistina. Es un agar sangre, formulado con agar Columbia como base, al que se añade ácido nalidíxico y colistina, que lo hacen selectivo para los estreptococos, incluyendo el neumococo y los enterococos, así como la listeria.

Agar sangre para anaerobios. Es un agar sangre con base de TSA u otra, enriquecida con hemina y vitamina K. Si se incorpora kanamicina y vancomicina, el medio se convierte en selectivo para bacilos gramnegativos anaerobios (*Bacteroides*, *Prevotella*, fusobacterias).

Agar chocolate. Es un agar con una base rica (GC agar) al que se añade factor X (hemina) y factor V (NAD). Permite el aislamiento de los hemófilos, el gonococo y el meningococo.

Agar Thayer-Martin. Es un agar chocolate preparado con agar GC como base, al que se ha añadido colistina, vancomicina y nistatina para hacerlo altamente selectivo para el gonococo y el meningococo.

Medio de Chapman (Mannitol salt agar). Es un medio selectivo para estafilococos por su elevado contenido en cloruro sódico (75 g/l). Incorpora manitol y rojo de fenol, por lo que permite diferenciar las especies manitol-positivas (*S. aureus* y otras), que forman colonias amarillas, de las manitol-negativas (*S. epidermidis* y otras), cuyas colonias son blancas.

CHROMAgar Staph aureus. Medio cromogénico selectivo para *S. aureus*.

CHROMAgar MRSA. Medio cromogénico para la detección de *S. aureus* metilín resistente (MRSA).

CHROMAgar Listeria. Medio cromogénico para listeria. Permite diferenciar *L. monocytogenes* de otras especies de listeria por el color característico de la colonia.

Agar MacConkey. Es un medio selectivo para bacilos gramnegativos no exigentes (enterobacterias, pseudomonas y otros) debido a la incorporación de sales biliares y cristal violeta. Contiene, además, lactosa y rojo neutro, por lo que permite diferenciar las colonias rojas características de las bacterias que atacan a la lactosa (*E. coli*, *Klebsiella*, etc.) de las que no la atacan que son incoloras (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Proteus*).

Agar MacConkey-sorbitol. Este medio es el agar clásico de MacConkey, al que se ha substituido la lactosa por el sorbitol. La mayoría de las cepas de *E. coli* fermentan el sorbitol (colonias rojas), excepto las del serotipo O157:H7 —causante de colitis hemorrágica— que no lo fermentan (colonias incoloras).

Agar eosina azul de metileno (EMB de Levine). Es un medio selectivo diferencial para bacterias gramnegativas no exigentes. Los colorantes contenidos en el medio inhiben el crecimiento de las bacterias grampositivas, excepto el de enterococo. Con ello, se permite la diferenciación de las enterobacterias fermentadoras de la lactosa (color violeta intenso) de las no fermentadoras (grisáceas). *E. coli* aparece violeta, como lactosa positiva, pero con un brillo metálico característico. Permite el crecimiento de nocardia formando colonias típicas.

Agar cistina lactosa electrolito deficiente (CLED). Es un medio que se utiliza principalmente para el urino cultivo; no contiene NaCl, por lo que impide la invasión de los proteus, y la presencia de cistina permite el crecimiento de bacterias más exigentes.

Agar Hektoen. Es un medio utilizado para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella*. Formulado con una base rica, las sales biliares actúan como elemento selectivo. Como elementos diferenciales, se incorporan la lactosa, sacarosa y salicina, que no son fermentadas por las salmonelas ni las shigelas. Como indicadores, se utilizan el azul de bromotimol y la fucsina ácida (que poseen una ligera acción selectiva frente a los cocos grampositivos). También permite identificar las colonias productoras de ácido sulfhídrico (el medio contiene tiosulfato sódico como fuente adicional de azufre y citrato férrico amónico, que actúa como indicador de la producción de SH₂, ya que, al combinarse con éste, da lugar a un precipitado negro). Las colonias de shigela son verdes o transparentes, y las de salmonela, verdes o transparentes con un precipitado negro (SH₂) en el centro.

Agar Salmonela-Shigela (SS). Medio para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella*. Los elementos selectivos son las sales biliares, citrato sódico y férrico, tiosulfato y el colorante verde brillante. El carácter diferencial se basa en la fermentación de la lactosa, siendo el indicador utilizado el rojo neutro. Las colonias lactosa-positivas son de color rojo, mientras que las colonias lactosa-negativas son transparentes. Al igual que en el medio de Hektoen, el tiosulfato sódico y el citrato férrico amónico permiten detectar las colonias productoras de SH₂. Las colonias de *Shigella* son transparentes, y las de *Salmonella*, transparentes con el centro negro.

Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD). Medio diferencial y selectivo utilizado para el aislamiento y dife-

renciación de bacterias enteropatógenas de muestras clínicas. Contiene azúcares y extracto de levadura como base nutritiva, desoxicolato sódico como agente selectivo y rojo de fenol como indicador. La presencia de tiosulfato sódico y de citrato férrico amónico permite la detección de colonias productoras de SH_2 . La presencia de xilosa y lisina ayuda a la diferenciación de las colonias de shigela y salmonela.

Agar cefsulodin-irgasan novobiocina (CIN). Es un medio selectivo para yersinia por la incorporación de desoxicolato sódico, cristal violeta, cefsulodin, irgasan y novobiocina.

Contiene manitol como azúcar diferencial y rojo neutro como indicador. Las colonias de yersinia presentan un borde transparente con un amplio centro rojo muy intenso en ojo de buho.

No es un medio totalmente específico para yersinia, ya que pueden crecer otros bacilos gramnegativos, en particular *Citrobacter freundii*, que además presenta colonias semejantes a las de yersinia.

CHROMagar Orientation; URI Select 4; Agar CPS-ID3; Chromogenic UTI. Se trata de medios cromogénicos diseñados para el aislamiento y recuento de microorganismos causantes de infección urinaria. Están compuestos de una base nutritiva rica que permite el crecimiento de todos los patógenos urinarios. Contiene sustratos cromogénicos para la detección de las enzimas, como β -galactosidasa, β -glucosidasa y β -glucuronidasa, así como triptófano para detectar la producción de indol y la triptófano desaminasa (TDA). Estos medios pueden ser también de utilidad para la diferenciación de microorganismos aislados de otros productos patológicos.

La adición de diferentes antibióticos a estos medios puede hacerlos selectivos para la detección de bacterias multirresistentes.

Agar Rambach; CHROMagar Salmonella. Medio cromogénico utilizado para la detección e identificación de salmonelas de muestras clínicas y alimentos.

Está compuesto por peptona, cloruro sódico, desoxicolato sódico, propilenglicol (sustrato diferencial), agar y una mezcla cromógena (indicador). Las salmonelas crecen dando lugar a colonias de color rojo.

CHROMagar O157. Medio cromogénico para el aislamiento e identificación de *E. coli* O157.

Agar Skirrow. Preparado con una base como agar brucela, TSA o agar Columbia enriquecida con sangre de carnero al 5% y que se ha hecho selectivo para campilobacter por la adición de vancomicina, polimixina y trimetoprim.

Campy-CVA. Al igual que el anterior, contiene una base nutritiva enriquecida con sangre de carnero. El

suplemento selectivo contiene cefoperazona, vancomicina y anfotericina B.

Agar carbón, deoxicolato cefoperazona (CCDA). Medio sin sangre que contiene carbón, sulfato ferroso y piruvato sódico para facilitar el crecimiento y la aerotolerancia de campilobacter. Incorpora como agentes selectivos el desoxicolato y la cefoperazona.

Agar tiosulfato, citrato, sales biliares (TCBS). Es un medio selectivo para las especies del género *Vibrio* debido a las altas concentraciones de tiosulfato sódico, citrato férrico y cloruro sódico que inhiben la mayoría de las enterobacterias. Por la presencia de sacarosa y el azul de timol y bromotimol como indicadores, permite diferenciar los microorganismos que fermentan este azúcar, como *V. cholerae* (colonias amarillas), de otros que no lo fermentan, como *V. parahaemolyticus* (colonias verdes), y, entre éstos, los productores de SH_2 (generalmente *Proteus* spp.).

CHROMagar Vibrio. Medio cromogénico selectivo para vibrio. Ayuda a diferenciar con facilidad *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* del resto de especies del género *Vibrio*.

Agar tamponado con extracto de levadura y carbón (BCYE). Es un medio rico, suplementado con L-cisteína y pirofosfato férrico, tamponado y con carbón. Permite el crecimiento de las legionelas. Cuando se añade polimixina, vancomicina y anisomicina, se hace selectivo para este microorganismo y para nocardia.

Medios de enriquecimiento

Caldo selenito F. Es un caldo con selenito sódico tamponado, que en ocasiones se suplementa con cisteína, diseñado para el enriquecimiento de las salmonelas. El selenito presente en el medio inhibe el crecimiento de los coliformes y los enterococos en las 12 primeras horas de incubación; por el contrario, las salmonelas y los proteus son poco inhibidos. Se incuba a 35-37 °C durante 8 a 12 horas. Puede sembrarse en Hektoen, XLD o SS agar.

Caldo para yersinia. Un caldo usual, incubado a 4 °C de 15 a 21 días permite el enriquecimiento de yersinia. Puede sembrarse en el medio de CIN. Esta técnica puede utilizarse para la recuperación de listeria, resembrando en agar sangre con ácido nalidíxico y colistina (véase más abajo).

Agua peptonada alcalina. Es un caldo preparado con agua, peptona y una concentración de cloruro sódico de 7 a 10 g/l al que se ha ajustado el pH a 8,4, por lo que este medio permite el enriquecimiento de las especies de *Vibrio*. Se incuba a 35-37 °C durante seis a ocho horas. Puede sembrarse en agar TCBS.

Caldo de enriquecimiento para listeria. Se prepara con una base rica a la que se incorpora ácido nalidíxico, esculina y acriflavina, que lo hacen selectivo para listeria. Se incuba a 30 °C durante 24 horas. Se puede resembrar en agar-sangre con ácido nalidíxico y colistina.

Medios de conservación

Agar conservación. Es un medio para bacterias no exigentes compuesto por agar, extracto de carne, peptona y NaCl. Se solidifica en tubos con tapón de rosca y se siembra por picadura en profundidad. Tras la incubación a 35-37 °C durante 24 horas, se puede guardar a temperatura ambiente (10-20 °C) al abrigo de la luz y evitando las variaciones de temperatura durante apro-

ximadamente dos-tres años. Es útil para la conservación de enterobacterias y otros bacilos gramnegativos no exigentes.

Caldo con glicerol⁷. Se incorpora glicerol al 10% (v/v), como preservativo al caldo con triptona de soja (TSB). Efectuar una suspensión espesa de la bacteria. Congelar a -80 °C.

Leche descremada. Leche descremada comercial. Efectuar una suspensión espesa de la bacteria. Congelar a -80 °C.

Medio de liofilización. Puede utilizarse leche descremada. Seguir el protocolo del liofilizador utilizado.

⁷ En el comercio existen tubos para congelar que contienen criopreservadores y pequeñas esferas cerámicas. Una vez inoculados y congelados, las esferas pueden sacarse individualizadamente, sin descongelar el tubo (Copan Diagnostics).

IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS

Las bacterias se clasifican en dos grupos, aerobias y anaerobias, según crezcan o no en la atmósfera normal, es decir, en presencia de oxígeno. Dentro de las bacterias aerobias, se diferencia entre las aerobias estrictas, que requieren obligatoriamente oxígeno para crecer, como las pseudomonas, y las que pueden crecer aún en ausencia de oxígeno, como las salmonelas, que se denominan aerobias y anaerobias facultativas («facultativas» para abreviar). Las bacterias anaerobias estrictas sólo pueden crecer en ausencia de oxígeno, por lo que no crecen en los medios incubados en la atmósfera normal (estufas convencionales).

En este capítulo se hace referencia únicamente a las bacterias aerobias estrictas y a las aerobias y anaerobias facultativas; es decir, las que crecen en los medios de aislamiento incubados en la atmósfera normal. Debe considerarse la posibilidad de que una bacteria aerobia no crezca en aerobiosis porque el medio de cultivo no sea suficientemente rico o porque sea capnófila, requiriendo CO_2 además de O_2 . El estudio de las bacterias anaerobias estrictas se presenta en el capítulo 4.

Para iniciar la identificación de las bacterias que crecen en aerobiosis hay que practicar una extensión de una colonia en un portaobjetos y realizar una tinción de Gram. De este modo, las bacterias pueden clasificarse por su morfología y apetencia tintórea en cuatro grupos: 1) cocos grampositivos, 2) cocos gramnegativos, 3) bacilos grampositivos y 4) bacilos gramnegativos (Fig. 2.7).

Para confirmar el tipo respiratorio, lo ortodoxo es resembrar la colonia crecida en el medio de aislamiento en dos placas e incubar una en aerobiosis y otra en anaerobiosis. Las bacterias aerobias estrictas sólo crecen en la placa incubada en aerobiosis; las facultativas, en ambas placas, y las anaerobias estrictas, sólo crecen en la placa incubada en anaerobiosis. Para los bacilos gramnegativos aerobios no exigentes, es decir, los que han crecido en medios usuales, MacConkey o similares, puede utilizarse un tubo con el medio sólido de Kligler sembrado en profundidad por picadura, que permite diferenciar entre las bacterias aerobias estrictas, como las pseudo-

monas que no crecen en profundidad, por lo que la base del agar permanece roja, y las facultativas, como las enterobacterias (*Escherichia coli*), que crecen y fermentan la glucosa virando la base del medio a amarillo (Fig. 3.1).

Dentro de las bacterias aerobias, cada uno de los cuatro grupos señalados más arriba en función de la tinción de Gram incluye numerosos géneros bacterianos, como se recoge en la tabla 2.1. Su identificación puede orientarse mediante pruebas sencillas, como el aspecto de las colonias, sus exigencias nutritivas (crecimiento en medios usuales, crecimiento en medios enriquecidos), el tipo respiratorio (aerobios estrictos o facultativos), el crecimiento en medios selectivos, la producción de enzimas como la catalasa, la citocromoxidasa, la posesión de flagelos constatada por la movilidad de las bacterias, la formación de esporas y otras.

El estudio de las exigencias nutritivas se efectúa comparando el crecimiento de la bacteria en agar usual (no exigentes), en agar sangre (exigentes), en agar chocolate



Figura 3.1. Tipo respiratorio.

Las bacterias que crecen en medios incubados en atmósfera aerobia (aire) pueden ser aerobias estrictas si solo crecen en presencia de aire o aerobias y anaerobias facultativas si crecen tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (aire). Las que solo crecen en ausencia de oxígeno son anaerobias estrictas. Para confirmar el tipo respiratorio se puede sembrar simultáneamente dos placas de Petri, incubadas una en aerobiosis y otra en anaerobiosis.

A. La bacteria mostrada en esta figura es anaerobia estricta ya que no crece cuando se incuba en presencia de oxígeno (placa de la izquierda incubación en ausencia de oxígeno, placa de la derecha incubación en atmósfera normal). B. Para determinar el tipo respiratorio de los bacilos gramnegativos no exigentes puede utilizarse el medio de Kligler, cuya base es anaerobia y la pendiente, en contacto con el aire, aerobia. Puede observarse una bacteria aerobia estricta (derecha) y otra aerobia y anaerobia facultativa (izquierda).

(exigentes y hemófilas) y/o en agar tamponado con extracto de levadura y cisteína (legionela). Las placas deben incubarse a la temperatura óptima, que para las bacterias de interés médico se sitúa alrededor de los 35-37 °C¹.

También debe procederse de la misma manera para conocer el crecimiento de una bacteria en un medio selectivo que ayuda a su identificación, como los estafilococos en el medio de Chapman (agar hipersalino), el gonococo y el meningococo en el medio de Thayer-Martin o los vibriones en el medio de tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (TCBS), entre otros. El aspecto de las colonias junto a la tinción de Gram, el tipo respiratorio, las exigencias nutritivas, la determinación de la oxidasa y la catalasa, así como el crecimiento en medios selectivos, son pruebas sencillas que permiten orientar la identificación de las bacterias y seleccionar las pruebas adicionales para realizar la identificación definitiva.

Pruebas rápidas

Algunas pruebas metabólicas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada, por lo que no es necesaria una incubación de 18 ó 24 horas. Generalmente, se enfrenta una solución del reactivo a una suspensión de la bacteria y se lee el resultado en unos minutos u horas. Por ejemplo, las pruebas de la catalasa y la oxidasa son rápidas y sencillas de realizar. Para practicar la prueba de la catalasa, se pone en un portaobjetos una gota de agua oxigenada diluida y se efectúa en ella una emulsión densa de la bacteria, tomada de una colonia con un palillo. Alternativamente, puede tomarse una colonia con un palillo o pipeta e introducirla en un tubo con agua oxigenada para observar la formación de burbujas. Si se trata de una bacteria catalasa positiva, aparecen de inmediato unas burbujas de oxígeno debido a la acción de la catalasa del microorganismo sobre el agua oxigenada (Fig. 3.2).

La producción de oxidasa se evalúa poniendo unas gotas de una solución de N-dimetil-p-fenilendiamina, preparada recientemente, en una tira de papel secante, situada sobre un portaobjetos o una placa de Petri. Con ayuda de un palillo de madera, se deposita sobre el papel el microorganismo tomado del cultivo. En caso de positividad, aparece de inmediato un color violeta intenso (Fig. 3.3).

Si se practica con el asa una suspensión muy espesa de *Escherichia coli* en un pequeño tubo de ensayo con 0,5 ml de una solución del reactivo ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido), que es de color blanco, a los 10-20 minutos aparece un color amarillo intenso por la acción de la enzima β -galactosidasa producida por la bacteria que hidroliza el ONPG liberando ortonitrofe-

nol, que es amarillo. *Proteus mirabilis* o las salmonelas carecen de β -galactosidasa, por lo que la suspensión permanece invariada, de color blanco (Fig. 3.4). Existen otras pruebas cromogénicas, como las que permiten determinar la producción de β -glucuronidasa, leucina-amino-peptidasa y γ -glutamyl-transpeptidasa entre otras. (Para detalles véase *Protocolo técnico*, 3.12.)

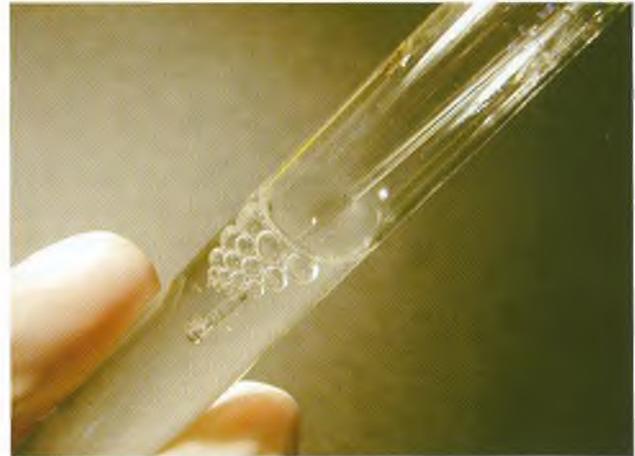


Figura 3.2. Prueba de la catalasa.

Se toma la bacteria a partir del cultivo en medio sólido con un palillo o una pipeta Pasteur. Se introduce en un tubo con agua oxigenada. Puede observarse la formación de burbujas, lo que indica la producción de catalasa. El tubo puede mantenerse durante toda la sesión de trabajo, tocando cada vez las colonias con un palillo o pipeta diferente. Esta prueba, alternativamente, puede efectuarse depositando una gota de agua oxigenada en un portaobjetos en la que se emulsiona la bacteria.

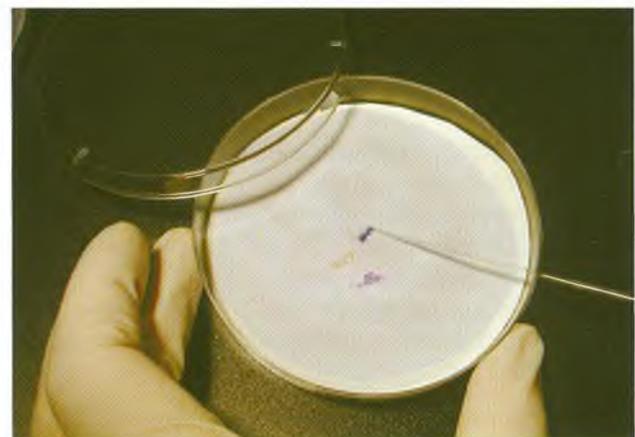


Figura 3.3. Prueba de la oxidasa.

Se impregna un papel secante, colocado en una placa de Petri, con el reactivo de la oxidasa (solución acuosa de N-dimetil-p-fenilendiamina) y se deposita en el papel las bacterias tomadas de la colonia con un palillo. En esta imagen puede verse dos reacciones positivas (violeta) y una negativa (incolora). La placa se mantiene cerrada y el reactivo puede utilizarse durante una sesión, aunque aparentemente este seco. Es obligado introducir controles al inicio y periódicamente durante la sesión de trabajo; aunque la prueba es muy robusta.

¹ Las yersinias poseen una temperatura óptima de crecimiento de 28 °C, y *Campylobacter jejuni*, *C. coli* y *C. lari*, de 42 °C. Todas ellas crecen a 35 °C, pero a esta temperatura su actividad metabólica puede verse limitada.



Figura 3.4. Prueba de la β -galactosidasa.

Al practicar una suspensión espesa de la bacteria en un tubo con una solución del reactivo ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) puede observarse el viraje al amarillo de la solución porque la bacteria que produce β -galactosidasa escinde el reactivo. Blanco: *Salmonella enterica*, amarillo: *Citrobacter freundii*.

Pruebas convencionales

Las pruebas de identificación metabólicas convencionales se practican cultivando las bacterias en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar. Tras 18-24 horas de incubación permiten revelar la reacción a través del cambio de pH producido por el catabolito resultante del proceso metabólico o bien detectando directamente el catabolito producido, mediante reactivos específicos. Por ejemplo, si una bacteria en un medio con glucosa y un indicador de pH, como el rojo de fenol, ataca este azúcar, se producen catabolitos ácidos, por lo que el indicador cambia de color y la colonia adquiere un color amarillo. Si la bacteria produce indol a partir de un medio con triptófano, al añadir el reactivo de Kovacs, que es amarillo pálido, se vuelve rojo en presencia de este catabolito.

Para la identificación de las bacterias también se utilizan técnicas de auxonograma. El auxonograma se basa en la capacidad de utilizar un sustrato para el crecimiento bacteriano, bien porque actúa como metabolito esencial o bien porque constituye la única fuente de carbono o de nitrógeno en el medio. La prueba se lee como «crecimiento» o «ausencia de crecimiento».

También puede ayudar a la identificación de una bacteria la determinación de la temperatura óptima de crecimiento, a la que pueden expresarse caracteres que no se expresan a otras temperaturas; por ejemplo, *Yersinia enterocolitica* produce acetoina, dando por tanto una prueba de Voges-Proskauer positiva, y es móvil a 28 °C, en tanto que estos dos caracteres son negativos a 37 °C.

También posee interés para la identificación conocer la sensibilidad del microorganismo a determinados anti-

bióticos, antisépticos o compuestos químicos. Aunque la determinación del serotipo de una bacteria confirma la identificación, el serotipado debe seguir a la identificación metabólica y no sustituirla.

La identificación de las bacterias también puede efectuarse mediante técnicas genéticas; en este contexto, la secuenciación del 16S rDNA es un procedimiento de identificación eficaz².

A continuación se muestran las pruebas utilizadas para la identificación metabólica de las bacterias aerobias y «facultativas» más importantes y frecuentes en microbiología clínica³.

Identificación de cocos grampositivos

Existen tres géneros de cocos grampositivos de gran interés en patología médica: *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*. En la tinción de Gram, su morfología presenta algunos caracteres diferenciales, ya que los estafilococos se agrupan en racimos, y los estreptococos en cadenas o parejas como el neumococo y los enterococos (Fig. 2.7).

Los tres géneros son aerobios y anaerobios facultativos; los estafilococos y los enterococos crecen en medios usuales, en tanto que los estreptococos requieren agar sangre, ya que en agar usual dan lugar a colonias diminutas a las 48-72 horas o no crecen. Los estreptococos producen hemólisis de diferentes tipos, siendo este carácter importante para la identificación de especie (Fig. 3.5) (Tabla 3.1).

Staphylococcus aureus es una especie cuyo hábitat principal es la mucosa nasal, y posee notable potencial



Figura 3.5. Hemólisis beta.

Algunas bacterias, como *Staphylococcus aureus*, representado en esta figura, o los estreptococos beta hemolíticos producen una hemólisis total de la sangre (hemólisis beta, β -hemólisis). Los medios para estudio de la hemólisis no deben incorporar azúcares.

² La secuenciación no debe considerarse como una prueba de valor absoluto, sino que sus resultados deben contrastarse con los de las pruebas metabólicas y serológicas.

³ En la tabla 3.22. *Medios de identificación*, se describen algunos medios utilizados para la identificación de las bacterias.

Tabla 3.1
Diferenciación de los cocos grampositivos aerobios y anaerobios facultativos

Género	Crecimiento en agar sangre ¹	Agrupación celular ²	Catalasa	LAP	PYR	VAN ³	Crecimiento	
							Agar usual ⁴	NaCl al 6,5% ⁵
<i>Staphylococcus</i>	+ (colonias 3-5 mm)	Racimos	+ ⁶	∅	v	S	+	+
<i>Streptococcus</i>	+ (colonias 1-3 mm)	Cadenas	-	+	- ⁷	S	-	-
<i>Enterococcus</i>	+ (colonias 2-3 mm)	Diplococos	-	+	+	v	+	+

¹ Los estafilococos forman en agar sangre colonias grandes de 3 a 5 mm, opacas, blancas o amarillentas, generalmente β-hemolíticas. Los estreptococos forman colonias medianas (2-3 mm) o pequeñas (1 mm), transparentes u opacas, que pueden ser β o α hemolíticas o no hemolíticas. Los enterococos forman colonias medianas (2-3 mm), transparentes o ligeramente opacas y en general no hemolíticas.

² El estudio de la agrupación celular se hace observando al microscopio una extensión del cultivo teñida por la técnica de Gram (véase Fig. 2.7). Los estafilococos forman racimos y los estreptococos cadenas de longitud variable, pero los neumococos (*Streptococcus pneumoniae*) forman parejas y tienen forma lancetada (Fig. 2.7); Los enterococos forman parejas (diplococos) o cadenas cortas.

³ Se han descrito cepas de *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina y recientemente de estafilococo. En la actualidad, el aislamiento de un coco grampositivo catalasa negativa resistente a la vancomicina orienta hacia los géneros *Leuconostoc* o *Pediococcus*, que son naturalmente resistentes. Hay que tener en cuenta las cepas de *E. faecium* resistentes a la vancomicina y el hecho de que dos especies de enterococo, raramente aisladas en clínica, *E. casseliflavus* y *E. gallinarum*, son naturalmente resistentes a la vancomicina, aunque con bajo nivel de expresión.

⁴ Crecimiento en agar usual: aunque los tres géneros crecen mejor en agar sangre, los estafilococos y enterococos crecen bien en agar usual a las 18-24 horas. La mayoría de estreptococos no crecen o forman colonias diminutas a las 48-72 horas.

⁵ El crecimiento en un caldo con 6,5% de NaCl se detecta al observar el caldo turbio tras 18 horas de incubación.

⁶ El género *Micrococcus* formado por cocos grampositivos también es catalasa positiva y se diferencia de los estafilococos por ser aerobio estricto y sensible a la furazolidona (disco con 100 µg; cuando el diámetro del halo de inhibición es inferior a 9 mm las cepas se consideran resistentes; las cepas sensibles suelen presentar halos de inhibición entre 15 y 35 mm) y resistente a la bacitracina (disco con 0,04 U; las cepas resistentes no presentan halo de inhibición). Los micrococcos pueden aislarse como contaminantes y solo excepcionalmente dan lugar a infecciones oportunistas.

⁷ *Streptococcus pyogenes* es PYR positivo.

Para la descripción de estas pruebas, véase la tabla 3.22, y para su realización, los Protocolos técnicos de este capítulo.

LAP: leucina aminopeptidasa; PYR: pirrolidónil aminopeptidasa; VAN: Vancomicina; S: sensible; +: positivo; -: negativo; v: variable; ∅: no se utiliza.

patógeno⁴. Se caracteriza por producir la enzima plas-mocoagulasa, por lo que se le conoce también como estafilococo coagulasa positiva (Fig. 3.6). Causa infecciones cutáneas como foliculitis, forúnculos y otras, desde donde circunstancialmente puede causar bacteriemia grave con metástasis en el pulmón, los huesos o el riñón.

S. epidermidis y otros estafilococos coagulasa negativa se hallan en la piel y pueden colonizar los catéteres endovenosos, desde los que ocasionan bacteriemia. También pueden contaminar las prótesis (articulares, cardíacas u otras) en el momento de su colocación causando infecciones persistentes en este material exógeno. *S. saprophyticus* es una especie de estafilococo coagulasa negativa que causa infecciones urinarias en la mujer joven.

El estreptococo del grupo A (*Streptococcus pyogenes*) se halla en la faringe, causa faringitis purulenta, infecciones de la piel y partes blandas y produce, por mecanismo inmunitario, fiebre reumática y glomerulonefritis⁵.

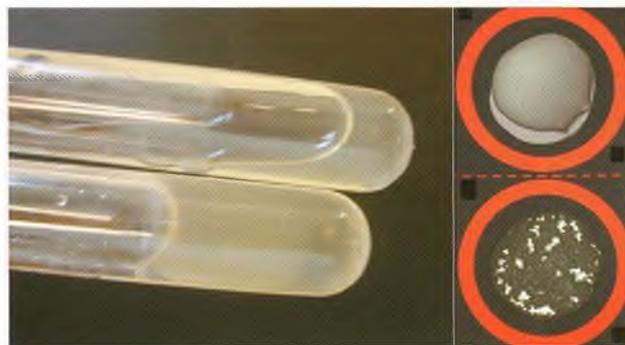


Figura 3.6. Prueba de la coagulasa.

Esta prueba puede practicarse en tubo o en porta. Puede verse como *Staphylococcus epidermidis* (arriba) es coagulasa negativa, en tanto que *Staphylococcus aureus* (abajo) coagula el plasma por acción de la plas-mocoagulasa que produce. La prueba en porta detecta la coagulasa ligada o clumping factor (imagen derecha).

El estreptococo del grupo B (*S. agalactiae*) se halla en el tubo digestivo, coloniza la vagina y puede infectar al recién nacido causándole sepsis neonatal.

⁴ *S. aureus* posee una dotación enzimática que le confiere notable virulencia causando infecciones cutáneas, neumonía, osteomielitis, etc., pero probablemente no posee factores de patogenicidad que le permitan atravesar la piel o las mucosas intactas. Es, por tanto, un gran patógeno potencial que «no sabe entrar» y debe aprovechar pequeñas lesiones, a veces inaparentes.

⁵ Son procesos debidos a que la respuesta inmune contra el estreptococo no es selectiva y afecta al endo y miocardio y al glomérulo renal respectivamente.

El hábitat natural del neumococo (*Streptococcus pneumoniae*) es la orofaringe. Produce neumonía típica y otitis, y desde esos focos puede causar bacteriemia y, secundariamente, meningitis de pronóstico muy grave.

Los estreptococos del grupo *viridans* y los enterococos (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*) ocasionan bacteriemias primarias en pacientes granulopénicos y endocarditis bacteriana. Los enterococos producen también infecciones urinarias y abdominales.

En las tablas 3.2-3.5 se señalan las pruebas utilizadas para la identificación de las especies más frecuentes de estos géneros.

Identificación de cocos gramnegativos

Los dos géneros de mayor interés en este grupo son *Neisseria* y *Moraxella*. El género *Neisseria* incluye varias especies comensales de la faringe (*N. sicca*, *N. flavescens* y otras) y dos especies patógenas de gran importancia, *N. meningitidis* (meningococo) y *N. gonorrhoeae* (gonococo).

El meningococo, tras colonizar la faringe, puede permanecer asintomático o pasar a la sangre pudiendo producir un cuadro de sepsis gravísimo y característico (sep-

sis meningocócica: *shock* y *petequias*); sin embargo, con mucha más frecuencia su paso por la sangre es poco expresivo o asintomático y el microorganismo se localiza en las meninges causando meningitis grave. En ocasiones se dan simultáneamente las dos formas clínicas: sepsis meningocócica clínicamente expresiva asociada a meningitis.

El gonococo produce uretritis supurada en el varón que puede complicarse con epididimitis. En la mujer causa infección del cérvix uterino (cervicitis), que puede hacerse ascendente causando salpingitis y enfermedad inflamatoria pélvica.

El género *Moraxella* posee una única especie, *M. catarrhalis*, que se ha asociado con infección de las vías respiratorias.

Las pruebas para la identificación de estas bacterias se recogen en la tabla. 3.6.

Identificación de bacilos grampositivos

Uno de los géneros de bacilos grampositivos aerobios de mayor interés en medicina es *Corynebacterium*, que incluye varias especies comensales de la piel y las mucosas⁶ responsables de infecciones oportunistas en

Tabla 3.2
Identificación del género *Streptococcus*

	Hemólisis ¹	PYR	Hidrólisis del hipurato	Grupo de Lancefield ²	Sensibilidad	
					Optoquina	Bacitracina
<i>Streptococcus pyogenes</i> (Estreptococo del grupo A)	β	+	-	A	∅	S
<i>Streptococcus agalactiae</i> (Estreptococo del grupo B)	β	-	+	B	∅	R
Estreptococos del grupo <i>viridans</i> ³	α, no hemolítico	∅	∅	∅	R ⁴	R
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ⁵ (Neumococo)	α	-	-	- ⁶	S ⁴	R

Este género está formado por cocos grampositivos que se disponen en cadenas o parejas y crecen pobremente o no crecen a 24 horas en medios usuales, requiriendo medios con sangre. Son aerobios y anaerobios facultativos, catalasa negativa, leucina-aminopeptidasa (LAP) positiva y no crecen en medios con 6,5% de NaCl (véase tabla 3.1).

¹ Hemólisis β: zona de hemólisis total (halo translúcido) alrededor de las colonias en agar sangre. Hemólisis α: zona de hemólisis parcial (halo verdoso) alrededor de las colonias en agar sangre. Este carácter es muy importante para la clasificación.

² La detección de los antígenos de grupo (carbohidrato C) suele hacerse por técnica de látex (aglutinación en porta; véase el capítulo 8). Los estreptococos β-hemolíticos de los grupos C y G que dan lugar a colonias grandes (*S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*) son semejantes a *S. pyogenes* en cuanto a su significación clínica. Los estreptococos β-hemolíticos de los grupos A, C, F y G que dan lugar a colonias pequeñas y son Voges-Proskauer positivo pertenecen al grupo «Anginosus» y se hallan incluidos dentro de los estreptococos del grupo *viridans*.

³ Los estreptococos del grupo *viridans* se clasifican en cinco grupos, basándose en la comparación de las secuencias de 16S rDNA ribosomal (ver tabla 3.4). Son PYR negativa y leucina-aminopeptidasa positiva y no crecen en NaCl al 6,5%. La diferenciación de los grupos y las especies dentro de cada grupo se realiza mediante pruebas metabólicas.

⁴ En las cepas con sensibilidad intermedia a la optoquina la identificación del neumococo y su diferenciación de un estreptococo *viridans* puede realizarse por el estudio de su solubilidad en sales biliares o por técnica de hibridación de ácidos nucleicos mediante una sonda específica comercializada (AccuProbe; GenProbe) (véase el capítulo 9).

⁵ El neumococo da lugar a colonias planas o mucosas con brillo característico y hemólisis α.

⁶ La división de los neumococos en serotipos (90 serotipos) se basa en el antígeno capsular polisacárido y no en el carbohidrato C de la pared, que es la estructura antigénica que permite la clasificación de los estreptococos β-hemolíticos en grupos de Lancefield.

Para la descripción de estas pruebas, véase la tabla 3.22, y para su desarrollo, los *Protocolos técnicos* de este capítulo.

PYR: pirrolidónil-aminopeptidasa; S: sensible; R: resistente; +: positivo; -: negativo; ∅: no se utiliza.

⁶ *Corynebacterium jeikeium*, *C. urealyticum*, *C. striatum*, *C. minutissimum*, *C. xerosis*.

Tabla 3.3
Identificación del género *Staphylococcus*

Especie	Fosfatasa alcalina	Coagulasa libre	«Clumping factor»	DNasa termoestable	Sensibilidad a novobiocina ¹	Manitol	Trealosa	PYR	Ureasa	ODC
<i>S. aureus</i> ²	+	+	+	+	S	+	+	-	v	-
<i>S. epidermidis</i>	+	-	-	-	S	-	-	-	+	-
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	-	-	S	v	+	+	-	-
<i>S. lugdunensis</i>	-	-	(+)	-	S	-	+	+	v	+
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	-	R ³	v	+	-	+	-
Otros estafilococos coagulasa negativa ⁴	v	v	v	v	v	v	v	v	v	-

Este género está formado por cocos grampositivos que se agrupan en racimos, aerobios y anaerobios facultativos, catalasa positiva, que crecen en medios con 6,5% de Na Cl y son resistentes a la bacitracina (véase tabla 3.1).

¹ Disco con 5 µg de novobiocina. Las cepas con un halo de inhibición inferior a 16 mm se consideran resistentes.

² Especie patógena, coagulasa positiva. Aparte de los caracteres señalados, suele producir pigmento amarillento y olor característico. Las cepas de *S. aureus* y la mayoría de las de *S. epidermidis* son resistentes a la polimixina B (disco con 300 U; resistente: < 10 mm).

³ El aislamiento del tracto urinario femenino de cepas de estafilococo coagulasa negativa resistentes a la novobiocina orienta hacia *S. saprophyticus*, que causa infección urinaria en la mujer joven. También son resistentes a la novobiocina *S. cohnii*, *S. xylosus* y *S. hominis*, pero se aíslan con menor frecuencia en clínica.

⁴ El grupo de estafilococos coagulasa negativa incluye más de 30 especies. Las que causan infección oportunista más frecuentemente son *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. lugdunensis*. Dado que poseen características patogénicas comunes, excepto *S. lugdunensis*, no es imprescindible su identificación a nivel de especie.

Para la descripción de estas pruebas, véase la tabla 3.22, y para su desarrollo, los *Protocolos técnicos* de este capítulo.

DNasa: deoxirribonucleasa; PYR: pirrolidónil-aminopeptidasa; ODC: ornitina-decarboxilasa; S: sensible; R: resistente; +: positivo; -: negativo; v: variable.

Tabla 3.4
Clasificación de los estreptococos del grupo viridans

Grupo	Especies	Pruebas fenotípicas				Hábitat	Patología
		VP	Arginina	Manitol	Sorbitol		
Mitis ¹	<i>S. mitis</i> <i>S. oralis</i>	-	-	-	-	Placa dental	Bacteriemia Endocarditis
Sanguinis	<i>S. sanguis</i> <i>S. gordonii</i>	-	+	-	v		Endocarditis
Mutans	<i>S. mutans</i> <i>S. sobrinus</i>	+	-	+	+	Placa dental Cavidad oral	Caries. Endocarditis
Salivarius	<i>S. salivarius</i> <i>S. vestibularis</i>	+	-	-	-	Cavidad oral	Sepsis en pacientes neutropénicos
Anginosus	<i>S. anginosus</i> <i>S. constellatus</i> <i>S. intermedius</i>	+	+	v	-	Flora oral y genitourinaria	Asociados a abscesos cerebrales, hepáticos y otros procesos supurados

¹ En este grupo está incluido además *Streptococcus pneumoniae*.

Aunque no existe un criterio estricto para la determinación de especie, la clasificación en grupos y especies se ha efectuado basándose en la secuencia del 16S rDNA y en pruebas metabólicas.

Streptococcus bovis, que se consideró siempre como estreptococo *viridans*, es un estreptococo del grupo D no enterococo, relacionado con endocarditis y cáncer de colon.

VP: Voges Proskauer; +: positivo; -: negativo; v: variable.

Tabla 3.5
Identificación de las especies de *Enterococcus*

Especies ¹	Manitol	Sorbosa	Arabinosa	Sorbitol	Piruvato	Movilidad ²	MGP ²
<i>E. faecalis</i>	+	-	-	+	+	-	-
<i>E. faecium</i>	+	-	+	v	-	-	-

Los enterococos son cocos grampositivos que se disponen en parejas, crecen en medios usuales, son aerobios y anaerobios facultativos, generalmente no hemolíticos, catalasa negativa, crecen en caldo con 6,5% de NaCl, hidrolizan la esculina y crecen en presencia de 40% de sales biliares (véase tabla 3.1).

¹ Los enterococos pueden dividirse en función de sus características metabólicas en cinco grupos (I-V) que incluyen 19 especies. *E. faecalis* y *E. faecium* pertenecen al grupo II, que se diferencia de los demás por ser manitol positivo y sorbosa negativa. El 80-90% de las cepas aisladas en clínica son *E. faecalis*, y el 5-10%, *E. faecium*. Las 17 especies restantes se aíslan muy excepcionalmente en patología humana.

² Se han descrito cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* con resistencia adquirida a la vancomicina estas cepas deben diferenciarse de otras especies que son naturalmente resistentes a la vancomicina (pero con resistencia de bajo nivel de difícil detección por la técnica de difusión), como *E. casseliflavus* (móvil, pigmentado y MGP+) y *E. gallinarum* (móvil y MGP+), y de otros géneros resistentes, como *Leuconostoc* o *Pediococcus*.

+: positivo; -: negativo; v: variable; MGP: metil-D glucopiranosido.

Tabla 3.6
Identificación de los cocos gramnegativos aerobios estrictos

Especie	Catalasa	Oxidasa	Crecimiento			Glucosa ²	Lactosa ²	Maltosa ²	γGT	DNasa
			Agar usual 35 °C	Agar chocolate 22 °C	Thayer Martin ¹ 35 °C					
<i>Neisseria meningitidis</i>	+	+	v	-	+	+	-	+	+	-
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ³	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Neisseria lactamica</i>	+	+	+	v	+	+	+	-	-	-
Neisserias comensales ⁴	+	+	+	+	v	v	-	v	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i> ³	+	+	+	+	v	-	-	-	-	+

Todas las especies de *Neisseria* y *Moraxella* presentan una morfología característica de diplococos gramnegativos en grano de café enfrentados por su cara plana. *Acinetobacter* también es aerobio estricto y presenta esa morfología, pero crece muy bien en medios usuales, da lugar a un olor característico y es oxidasa negativa. En ocasiones las neisserias pueden aparecer como ligeramente grampositivas semejando a algunos micrococos o estafilococos.

¹ En general una neisseria que crece en Thayer-Martin debe considerarse como *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* o *N. lactamica*. Muy excepcionalmente también crecen algunas cepas de *N. cinerea*, *N. polysacchara* y *N. subflava*.

² El estudio de la utilización de azúcares debe realizarse en medios específicos para neisseria o en galerías adecuadas para la identificación de estos microorganismos.

³ Frecuentemente, producen β-lactamasa, que puede detectarse mediante una prueba específica (véase *Antibiograma*).

⁴ Incluye diversas especies que forman parte de la flora comensal de la naso y orofaringe. Entre ellas se encuentran *N. lactamica*, *N. polysacchara*, *N. flavescens*, *N. cinerea* o *N. subflava*.

γGT: γ-glutamil-aminopeptidasa; DNasa: deoxirribonucleasa; +: positivo; -: negativo; v: variable.

catéteres y prótesis, semejantes a las causadas por los estafilococos coagulasa negativa (*S. epidermidis* y otros) y una especie patógena, *C. diphtheriae*, que causa la difteria por un mecanismo toxigénico. Asimismo, tienen interés el género *Listeria*, una de cuyas especies, *L. monocytogenes*, posee potencial patógeno, en particular en neonatos, ancianos, pacientes cirróticos y con otros factores de inmunodeficiencia en los que puede causar sepsis y meningitis⁷, y el género *Nocardia*, en el que

N. asteroides y *N. farcinica*, entre otras especies, causan infección pulmonar en pacientes tratados con corticoides o inmunodeprimidos. En la tabla 3.7 se recogen las pruebas para la identificación de estas bacterias.

Identificación de bacilos gramnegativos

Entre los bacilos gramnegativos existen varias familias y géneros de interés médico (Tabla 3.8). Entre ellas,

⁷ Recientemente, se ha atribuido capacidad enteropatógena, habiéndose descrito brotes de toxoinfección alimentaria.

Tabla 3.7
Diferenciación de bacilos grampositivos aerobios

Género/Especie	Colonias ¹	Alcohol-ácido resistencia ²	Oxidasa	Catalasa	Bilis-esculina	Movilidad	β-hemólisis	Esporas
<i>Corynebacterium</i> ^{3,4}	Blancas, opacas, rugosas o estriadas (24 horas)	-	v	+	-	-	v	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ⁵	Lisas, translúcidas, hemolíticas (24 horas)	-	-	+	+	+	+	-
<i>Bacillus</i> ^{3,6}	Grandes, rugosas o cerúleas (24 horas)	-	∅	+	∅	+	v	+
<i>Nocardia</i>	Aspecto vellosos (3-5 días) ⁷	+	-	+	∅	-	∅	-

¹ Se señala el aspecto de las colonias y el tiempo de incubación necesario para hacerse visibles.

² Determinada mediante la técnica de Kinyoun modificada (véase el capítulo 4).

³ Constituye un género muy heterogéneo en el que la identificación de especie suele presentar dificultad.

⁴ Las especies *C. urealyticum* y *C. jeikeium* son muy resistentes a los antimicrobianos.

⁵ Así como la mayoría de las corinebacterias muestran al Gram un aspecto granular, punteado o irregular, las listerias presentan un aspecto muy homogéneo.

⁶ Además de producir esporas, algunas especies poseen una morfología microscópica (Gram) característica o sugerente del género.

⁷ El aspecto vellosos se debe a la formación de filamentos vegetativos aéreos. Pueden ponerse de manifiesto de modo evidente cultivando en aerobiosis a 28 °C durante cinco días en el medio de EMB de Levine; en él las colonias de nocardia vistas con una lupa aparecen con un aspecto vellosos característico y algunas especies desprenden también un olor característico. El medio de BCYE utilizado para el aislamiento de legionela es un medio selectivo adecuado para este microorganismo.

+: positivo; -: negativo; v: variable; ∅: no se utiliza.

Tabla 3.8
Diferenciación de bacilos gramnegativos aerobios o facultativos

	Tipo respiratorio ¹	Base del medio de Kligler ²		Oxidasa	Crecimiento en		Sensibilidad a O/129 ⁴
		Crecimiento ¹ (color)	Gas		TCBS ³	6% NaCl	
<i>Enterobacteriaceae</i>	Ae/An	+ (amarillo)	v	-	-	-	-
<i>Vibrio</i>	Ae/An	+ (amarillo)	-	+	+	+	+
<i>Aeromonas</i> ⁵	Ac/An	+ (amarillo)	v	+	-	-	-
<i>Plesiomonas</i> ⁵	Ae/An	+ (amarillo)	-	+	-	-	v
Bacilos aerobios (BGN-NF) ⁶	Ae	- (rojo)	-	v	-	v	-

¹ El tipo respiratorio puede determinarse comprobando el crecimiento en un medio incubado en aerobiosis y otro en anaerobiosis o sembrando en picadura el medio de Kligler (véase Fig. 3.1).

² Permite determinar la fermentación de la glucosa y la producción de gas.

³ El medio con tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (agar TCBS) es muy selectivo para las especies del género *Vibrio*. *V. cholerae* crece dando lugar a las 12-18 horas a colonias amarillas debido a la fermentación de la sacarosa. Los serogrupos responsables del cólera epidémico son el O1 y el O139. Estas cepas pueden detectarse fácilmente por aglutinación en porta con antisueros específicos.

⁴ El compuesto O/129 es un antiséptico activo frente a *Vibrio*, algunas cepas de *Plesiomonas* y *Micrococcus*.

⁵ *Plesiomonas* puede diferenciarse de *Aeromonas* por ser ornitina-decarboxilasa positiva, fermentar el inositol y ser agasógena.

⁶ Los géneros aislados más frecuentemente en clínica son *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia* y *Alcaligenes*. Todos ellos se detectan fácilmente porque en el medio de Kligler no crecen en profundidad, y por tanto, al no fermentar la glucosa, la base del tubo no cambia de color. (Fig. 3.1). La identificación de los bacilos gramnegativos no fermentadores exige una batería específica de pruebas. La mayoría de cepas de *P. aeruginosa* producen un pigmento verde (piocianina) que permite su identificación (véase tabla 3.10). El género *Acinetobacter* se caracteriza por su morfología característica en diplococos semejantes a neisserias y por ser oxidasa negativa.

Ae: crecimiento en aerobiosis; An: crecimiento en anaerobiosis; +: positivo; -: negativo; v: variable.

la familia *Enterobacteriaceae* está formada por bacilos gramnegativos aerobios y anaerobios facultativos que fermentan la glucosa, son oxidasa negativa y crecen en medios usuales. Habitan como comensales en el tubo digestivo del hombre y de otros animales de sangre caliente. En algunos géneros, como *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*, hay especies o bioserotipos patógenos, y otros como *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Proteus* forman parte de la flora normal del tubo digestivo y pueden actuar como oportunistas⁸.

La relevancia médica de esta familia es enorme. En las especies patógenas esta importancia es obvia (algunos serotipos de *Salmonella enterica* causan gastroenteritis, y los serotipos Typhi y Paratyphi A, B y C, sepsis; *Shigella* y algunos serogrupos de *Yersinia enterocolitica* causan gastroenteritis y *Y. pestis* la peste); además, las especies comensales constituyen los gérmenes que producen con mayor frecuencia infecciones oportunistas en pacientes sondados, intubados o con enfermedades que disminuyen las defensas antiinfecciosas (Tabla 21.1), produciendo infecciones urinarias, colecistitis, neumonía en pacientes intubados, infección de la herida quirúrgica y sepsis. En los hospitales este tipo de infecciones oportunistas son más frecuentes que las producidas por patógenos primarios. Habitualmente, las enterobacterias se identifican a nivel de especie mediante un mínimo de 10 a 20 pruebas metabólicas.

La diferenciación de los grupos bacterianos afines a las enterobacterias se recoge en la tabla 3.8, y la identificación de las principales especies, en la tabla 3.9. En el capítulo 15 se presenta un esquema para el cribado de las bacterias enteropatógenas.

Las bacterias gramnegativas no exigentes, aerobias y anaerobias facultativas, oxidasa positiva como *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas*, forman un grupo taxonómicamente heterogéneo, pero la particularidad de los caracteres señalados orienta su identificación. Las especies enteropatógenas de vibrio son de hábitat acuático. *V. cholerae* 01 y 0139 causantes del cólera y *V. parahaemolyticus* se caracterizan, además de ser oxidasa positiva, por crecer en el medio de tiosulfato-citrato con sales biliares y sacarosa (TCBS).

El papel enteropatógeno de *Aeromonas* es controvertido y *Plesiomonas* sólo se ha descrito como patógeno oportunista.

Los bacilos gramnegativos aerobios estrictos, también llamados no fermentadores, aislados en clínica con mayor frecuencia pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, y, con menor frecuencia, los géneros *Achromobacter*, *Alcaligenes* y otros. Producen infecciones semejantes a las causadas por las

enterobacterias oportunistas. Estas bacterias tienen su reservorio en el medio ambiente y son de difícil identificación, excepto en casos especiales como *P. aeruginosa* pigmentada o *Acinetobacter baumannii*. Estas dos bacterias, junto a *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas putida* y *P. fluorescens*, son responsables de la gran mayoría de las infecciones producidas por bacilos gramnegativos no fermentadores. Sin embargo, en cualquier hospital puede instalarse una cepa inusual, que acabe adueñándose de la institución y causando infecciones oportunistas durante meses o años. En la tabla 3.10 se indican algunas características de las bacterias gramnegativas no fermentadoras aisladas con mayor frecuencia.

Identificación de otros bacilos gramnegativos

Las bacterias descritas hasta este momento incluyen gran parte de las bacterias gramnegativas no exigentes aisladas en clínica. Cabe destacar, sin embargo, la notable frecuencia y trascendencia médica de *Haemophilus*, *Bordetella*, *Campylobacter*, *Helicobacter* y *Legionella*, así como de *Brucella* en determinadas áreas rurales. Estas bacterias gramnegativas son exigentes o de crecimiento lento, por lo que no se aíslan en medios de cultivo usuales o en los tiempos de incubación convencionales, por lo que, si no se piensa en ellas y no se emplean las técnicas adecuadas, no pueden detectarse (Tabla 3.11).

Haemophilus influenzae. Se aísla en agar chocolate, se beneficia de la incubación con CO₂, causando infecciones semejantes a las producidas por el neumococo: infección respiratoria (otitis, epiglotitis, neumonía), sepsis y meningitis. La vacunación ha erradicado prácticamente la infección por las cepas capsuladas del serotipo b.

Bordetella pertussis es un cocobacilo gramnegativo aerobio estricto que se encuentra en las vías respiratorias del hombre; causa la tosferina y requiere medios específicos para su cultivo.

Campylobacter jejuni. Es una bacteria microaerófila y termófila, que crece a 42 °C. Desde su reservorio animal, en particular las aves de corral, es el primer agente bacteriano causante de gastroenteritis junto con salmonela. Su morfología al Gram es muy característica, por lo que puede observarse en las heces (Tabla 3-12 y Fig. 15.3).

Helicobacter pylori se ha asociado con la gastritis crónica antral, la úlcera duodenal y la neoplasia gástrica y posee también una morfología característica (Fig. 15.2).

Legionella pneumophila, desde su reservorio en las colecciones acuáticas, vehiculada por aerosoles, produce una neumonía de pronóstico grave particularmente en los ancianos con broncopatía crónica. Puede causar brotes epidémicos cuyo origen, en ocasiones, es difícil de determinar.

⁸ La especie *Escherichia coli*, a pesar de ser la bacteria comensal aerobia más abundante en el tubo digestivo, incluye algunos bioserotipos enteropatógenos.

Tabla 3.9
Identificación de las especies más frecuentes de enterobacterias

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Providencia stuartii</i>	<i>Providencia rettgeri</i>
ONPG	+	v	+	+	+	+	+	v	+	+	+	-	-	-	-	-	-
TDA/FDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
VP	-	-	+	+	+	+	+	+	+ ¹	-	-	-	v	-	-	-	-
SH ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	+ ²	+ ³	+ ³	-	-	-
LDC	v	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	- ⁴	-	-
Gas/glucosa	+	-	+	+	+	+	v	+	-	+	+	+ ¹	+	+	+	-	-
C. Simmons	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	v	v	-	+	+
Ureasa	-	-	+	+	-	v	v	-	v	v	v	-	+	+	+	v	+
Indol	+	v	-	+	-	-	-	-	v	+	v	-	-	+	+	+	+
Lactosa	v	-	+	+	+	+	-	-	-	v	v	-	-	-	-	-	-
Movilidad	+	-	-	-	+	+	+	+	+ ¹	+	+	+	+	+	+	+	+
ODC	v	v	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-

En esta tabla se recogen los géneros y las especies que se aíslan con mayor frecuencia en clínica y los caracteres mínimos para su identificación. Estas pruebas pueden realizarse utilizando galerías comerciales de lectura manual o automatizada. También pueden prepararse los medios en el laboratorio.

Para identificar las diferentes especies dentro de cada género, pueden utilizarse pruebas bioquímicas adicionales; aunque en algunos géneros como *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*, entre otros, puede ser difícil llegar a la identificación de algunas especies, tanto si se utilizan sistemas manuales como automatizados.

S. enterica se subdivide en seis subespecies (I, II, IIIa, IIIb, IV y VI). La mayoría de los serotipos relacionados con infección humana pertenecen a la subespecie I. Las pruebas utilizadas para la diferenciación de las subespecies son: malonato, galacturonato, mucato, fermentación de dulcitol y sorbitol y ONPG. En la práctica la subespecie I se identifica presuntivamente por ser glacturonato y ONPG negativa.

Salmonella enterica ser. Typhi y Paratyphi A son bioserotipos. (ser. Typhi es agasógena, productor débil de SH₂, ODC y citrato de Simmons negativo. Ser Paratyphi A es no productor o productor débil de SH₂, LDC y citrato de Simmons negativo).

¹ Reacción positiva a 25-28 °C.

² El serotipo Typhi es agasógeno y débil productor de SH₂.

³ Actualmente, un alto porcentaje de cepas no produce SH₂.

⁴ Algunos biogrupos, excepcionalmente aislados en clínica, son LDC positiva.

ONPG: orthonitrofenil-β-D-galactopiranosido (β-galactosidasa); TDA/FDA: deaminasasa del triptófano y de la fenilalanina; VP: Voges Proskauer; SH₂: producción de ácido sulfídrico; LDC: lisina decarboxilasa; Gas/glucosa: producción de gas a partir de la glucosa; C. Simmons: crecimiento en citrato de Simmons; ODC: ornitina decarboxilasa; +: > 90% positivo; -: > 90% negativo; v: 10-90% positivo.

Las tres especies de *Brucella* de mayor interés son *B. melitensis* (ganado ovino y caprino), *B. abortus* (bovino) y *B. suis* (porcino). El hombre suele infectarse por consumo de productos lácteos no esterilizados o por contagio profesional, produciéndose una bacteriemia que se traduce en un síndrome febril sin focalidad. La bacteria puede persistir tras la curación y tardíamente reactivarse en forma de síndrome febril, de artritis, espondilitis o meningitis.

También cabe señalar algunas bacterias gramnegativas poco frecuentes, pero causantes de procesos graves,

como sepsis y endocarditis, en ocasiones de foco desconocido; entre éstas, destacan, además de *Haemophilus* (otras especies que *H. influenzae*), a *Actinobacillus*, *Capnocytophaga*, *Eikenella* y *Kingella*, que en conjunto forman el grupo denominado HACEK. La mayoría son exigentes, por lo que requieren ser cultivadas en agar chocolate o agar sangre elaborado con una base rica e incubado en atmósfera aerobia enriquecida en 5-7% de CO₂ (capnófila). Generalmente, se aíslan en hemocultivos. Cuando se sospeche la presencia de estas bacterias, si

Tabla 3.10
Diferenciación de los bacilos gramnegativos no fermentadores (BGN-NF) más frecuentes

BGN-NF	Pio-cianina	PYR	TRYP	ACM	TTR	LDC	ADH	DNasa	COL	PsS	Crecimiento a 41 °C
Oxidasa positiva¹:											
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+ ²	+	+	+	+	-	+	v	S	R	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	v	+	v	v	-	+	-	S	S	-
<i>Pseudomonas putida</i>	- ³	-	+	-	-	-	+	-	S	S	-
<i>Burkholderia cepacia complex</i>	-	-	-	v	-	+	-	-	R	S	v
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	-	+	-	v	+	-	-	-	v	S	+
<i>Alcaligenes faecalis</i> ⁴	-	-	-	+	+	-	-	-	S	S	v
Oxidasa negativa:											
<i>Acinetobacter baumannii</i> ⁵	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ⁶	-	-	+	-	v	+	-	+	v	S	-

Las especies de este grupo crecen en la pendiente del medio de Kligler pero no en la base que permanece roja.

¹ Otras especies infrecuentes incluyen *Pseudomonas stutzeri*, que forma colonias secas, plisadas características, es oxidasa positiva, y *Shevanelia putrefaciens*, que forma colonias rosadas, es oxidasa positiva y produce SH₂ en el medio de Kligler.

² La piocianina es un pigmento azul verdoso difusible y soluble en cloroformo, característico de *P. aeruginosa*. En el 10% de las cepas de esta especie puede ser negativa. El pigmento de color azul verdoso se solubiliza en cloroformo y vira a rojo al acidificarlo (para confirmar la presencia de piocianina, poner 1 ml de cloroformo en el tubo con el agar inclinado en el que se ha cultivado la bacteria hasta que tome color azul, lo que indica que ha solubilizado el pigmento, decantar en un tubo de ensayo y añadir una o dos gotas de HCl 1N; tomará color rosado).

³ *P. fluorescens* y *P. putida* producen pioverdina y otros pigmentos por lo que pueden confundirse con *P. aeruginosa*. Se diferencian por no producir piocianina, poseer un olor característico y no crecer a 41 °C.

⁴ *A. faecalis* es sensible a la deferoxamina.

⁵ *A. baumannii* en el examen directo puede presentar morfología de cocobacilo gramnegativo. En el medio de glucosa campana con rojo de fenol vira a amarillo el medio en contacto con el aire, permaneciendo rosa el medio que se encuentra en el interior de la campana. No reduce los nitratos y es β-xilosidasa positiva.

⁶ *S. maltophilia* es α-manosidasa positiva y resistente a imipenem.

PYR: pirrolidónil aminopeptidasa; TRYP: tripsina aminopeptidasa; ACM: hidrólisis de la acetamida; TTR: tetratiónoreductasa; LDC: lisina decarboxilasa; ADH: arginina dehidrolasa; PsS: *P. aeruginosa* Screen, estudia por técnica de difusión la sensibilidad a la 1,10-fenantrolina mediante un disco (R: ≤ 14 mm; S: ≤ 18 mm). DNasa: deosirribonucleasa. Existen pastillas comercializadas para realizar estas pruebas (Diatabs[®], Rosco) (véase Protocolo técnico 4.13). COL: sensibilidad a colistina (disco de 10 µg); +: > 90% positivo; -: > 90% negativo; v: variable; S: Sensible; R: Resistente.

no se posee experiencia para su identificación, puede ser adecuado remitirlas a un centro especializado.

Aparte de las bacterias descritas hasta aquí, que pueden observarse al microscopio y cultivarse en medios convencionales, existe otro grupo que presenta características particulares que se describen a continuación.

Las espiroquetas poseen una estructura celular particular; algunas, como las borrelias, pueden observarse al microscopio óptico y crecen en medios especiales. Desde su reservorio humano o animal, se transmiten a las personas sanas a través de garrapatas causando fiebre recurrente (*Borrelia recurrentis* y otras) o la enfermedad de Lyme (*B. burgdorferi*). *Treponema pallidum*, causante de la sífilis, puede visualizarse en el chancro de inoculación por campo oscuro o inmunofluorescencia, pero no ha conseguido cultivarse⁹. Su diagnóstico es fundamentalmente serológico.

Las especies patógenas de *Leptospira* (*L. interrogans* y *L. biflexa*)¹⁰ causan infección renal en diversos animales,

pudiendo el hombre adquirir la enfermedad en aguas contaminadas con la orina de animales infectados. La enfermedad se caracteriza por fiebre, escalofríos, mialgias y conjuntivitis que pueden asociarse a hepatitis o meningitis. Su diagnóstico se hace fundamentalmente por serología.

Los micoplasmas son bacterias sin pared, de morfología irregular y tamaño variable, no se tiñen por los métodos usuales (Gram) y no se observan mediante el microscopio por técnicas convencionales. *Mycoplasma pneumoniae* causa neumonía atípica de pronóstico benigno. Su cultivo requiere medios ricos y es laborioso.

Las clamidias son bacterias pequeñas (0,2-0,8 µm) que se tiñen mal por los colorantes convencionales y no se observan al microscopio óptico. Han perdido parte de la dotación enzimática para la obtención de energía, por lo cual se han convertido en parásitos intracelulares obligados y no se puede obtener su cultivo en medios artificiales, sino en líneas celulares, como los virus. *Chlamydia trachomatis* causa uretritis y cervicitis, así como conjuntivitis y

⁹ *T. pertenue*, *T. endemicum* y *T. carateum* (de hecho, subespecies de *T. pallidum*) causan por contacto directo infecciones de la piel y de las mucosas (pian, bejel y carate).

¹⁰ La clasificación genética no guarda ninguna relación con la clasificación tradicional metabólica y serológica.

Tabla 3.11
Caracteres orientativos para la identificación de algunas bacterias exigentes

Microorganismo

<i>Haemophilus influenzae</i>	Bacilos gramnegativos pequeños y polimorfos. Anaerobios facultativos. Son oxidasa positiva. Requieren factores específicos para su crecimiento (factor X: hemina; factor V: NAD). Se aíslan en agar chocolate. Pueden crecer en agar sangre alrededor de las colonias de estafilococo (fenómeno de satellitismo). Su crecimiento es favorecido por una atmósfera rica en CO ₂ . Su identificación se realiza observando el crecimiento en agar usual alrededor de discos con los factores X, V y XV (<i>H. influenzae</i> : X: neg.; V: neg.; XV: +). Existen antisueros para la identificación de las cepas capsuladas, siendo el serotipo b el que se ha aislado con mayor frecuencia antes de la vacunación sistemática.
<i>Bordetella pertussis</i>	Es un cocobacilo gramnegativo aerobio estricto, catalasa y oxidasa positivas. No crece en agar MacConkey y requiere medios específicos como el de Bordet Gengou, que es un medio enriquecido con sangre de carnero, o el de Regan-Lowe, enriquecido con sangre de caballo y que incorpora almidón y carbón. Las colonias pueden observarse a los 3-4 días de incubación.
<i>Campylobacter</i>	Bacilos gramnegativos curvados de morfología muy característica, microaerófilos, que necesitan para desarrollarse una concentración de 5-10% de O ₂ (Fig. 2.7). <i>C. jejuni</i> y <i>C. coli</i> son las especies enteropatógenas más frecuentes; tienen una temperatura óptima de crecimiento de 42 °C, que es la que se utiliza para la incubación de los medios selectivos para su aislamiento de las heces. Los medios han de ser ricos, pero no requieren necesariamente sangre. El carbón facilita su crecimiento al neutralizar sustancias tóxicas del medio. La selectividad se consigue con diferentes mezclas de antibióticos (Tabla 3.12).
<i>Helicobacter</i>	Bacilos gramnegativos curvados característicos. Crecen a 37 °C en atmósfera microaerófila. A los cuatro-cinco días de incubación forman colonias visibles en medios enriquecidos con sangre. Son oxidasa positiva y producen una ureasa. La especie aislada con más frecuencia de la mucosa gástrica es <i>H. pylori</i> .
<i>Legionella</i>	Bacilos gramnegativos finos y pleomórficos que se tiñen mal por el método de Gram. Son aerobios estrictos y oxidasa y catalasa débilmente positiva. Requieren L-cisteína para su crecimiento, que es favorecido por el CO ₂ (capnofilia). Crecen lentamente entre 2-5 días a 35 °C. Pueden identificarse porque crecen en el medio de BYCE (con L-cisteína), y no crecen en agar sangre, por lo que, si no se siembran las muestras clínicas en el medio adecuado, estas bacterias no se recuperan. El carbón activado incorporado al medio facilita el crecimiento. Existen antisueros para la identificación de <i>L. pneumophila</i> , que es la especie que causa neumonía con más frecuencia.
<i>Brucella</i>	Cocobacilos gramnegativos pequeños aerobios estrictos. Crecen en medios enriquecidos a 37 °C de forma lenta en primoaislamiento (3-7 días), pero también crecen en medios usuales. Su crecimiento es favorecido por la incubación en atmósfera enriquecida con CO ₂ , y en algunas especies como <i>B. abortus</i> es imprescindible. Son oxidasa y catalasa positivas.
<i>Vibrio</i>	Bacilos gramnegativos curvados anaerobios facultativos. Son oxidasa positiva. Algunas especies requieren cloruro sódico para su crecimiento (halófilos), y en otras, el crecimiento se ve estimulado por su presencia. Muchas pruebas de identificación pueden realizarse añadiendo a los medios convencionales ya preparados 2-3 gotas de una solución estéril de cloruro sódico al 1% (Tabla 3.8).

Es muy importante señalar que estas bacterias no se aíslan por cultivo si no se siembran las muestras clínicas en el medio adecuado, bajo la atmósfera necesaria y el tiempo conveniente. *H. influenzae*, *Campylobacter* y brucela pueden recuperarse en los medios para hemocultivo.

Campylobacter y *Helicobacter* se sospechan por su morfología, la legionela por su mala tinción por Gram y por la ausencia de crecimiento en agar sangre y agar chocolate y crecimiento en BCYE. *Vibrio* posee una morfología microscópica sugestiva y crece en TCBS. Otras bacterias del grupo HACEK (*Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* y *Kingella*), causantes de bacteriemia y endocarditis no se incluyen en este apartado por su escasa frecuencia.

neumonía en el recién nacido (serotipos D a K), tracoma (serotipos A, B, Ba y C) y linfogranuloma venéreo (serotipos L1, L2 y L3). *Chlamydomphila pneumoniae* con reservorio humano y *Chlamydomphila psittaci* con reservorio aviar causan infecciones de las vías respiratorias altas y neumonía.

Las rickettsias pueden causar un cuadro tifódico o exantemático (*spotted fever*, fiebre botonosa y otros). Tie-

nen su reservorio en los piojos, las pulgas, las garrapatas y los ácaros, siendo inoculadas por estos artrópodos. *Rickettsia conorii* causa la fiebre botonosa mediterránea, que cursa como un síndrome febril con una lesión de inoculación típica y exantema, siendo la única rickettsiosis propia del área mediterránea.

Coxiella burnetii es una bacteria semejante a las rickettsias que infecta al ganado causando aborto y se eli-

Tabla 3.12
Identificación del género *Campylobacter*

Especies	Catalasa	Hidrólisis		Crecimiento		Sensibilidad a cefalotina
		Hipurato	Indoxil acetato	25 °C	42 °C	
<i>C. jejuni</i>	+	+	+	-	+	R
<i>C. coli</i>	+	-	+	-	+	R
<i>C. lari</i>	+	-	-	-	+	R
<i>C. fetus</i>	+	-	-	+	v	S
<i>C. upsaliensis</i>	-	-	+	-	v	v
<i>C. hyointestinalis</i> ¹	+	-	-	-	+	S

Las cepas de *Campylobacter* son difíciles de aislar de las heces si no se utilizan medios selectivos. En la mayoría de ellos, las colonias son bastante características y la tinción de Gram muestra unos bacilos gramnegativos con morfología curvada o espirilar (Figs. 2.7 y 15.3). Todas las especies son oxidasa positiva y reducen los nitratos.

Aunque tradicionalmente se ha determinado la sensibilidad al ácido nalidíxico como ayuda en la identificación de las especies de *Campylobacter*, hoy está en desuso debido a la resistencia adquirida por la gran mayoría de cepas.

¹ *C. hyointestinalis* produce SH₂ en TSI y la subespecie *lawsonii* es ureasa positiva.

+: > 90% positivo; -: > 90% negativo; v: variable.

mina por la leche, la orina y las heces de los animales. El hombre puede infectarse mediante aerosoles o consumiendo leche, causándole fiebre y afectación del estado general, que se puede asociar a neumonía o hepatitis.

El diagnóstico de todas estas infecciones bacterianas no se efectúa por examen microscópico y cultivo convencional, sino por técnicas de detección de antígeno y amplificación genómica (capítulos 8 y 9).

MEDIOS Y PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN

La mayoría de las pruebas de identificación propuestas anteriormente e incluidas en las tablas 3.1 a 3.12 corresponden a pruebas desarrolladas por métodos convencionales clásicos. Como se ha señalado anteriormente, estas pruebas se efectúan en medios de identificación, repartidos en tubos (12 x 120 mm), bien sea como pruebas rápidas o tras una noche de incubación (Fig. 3.7) (véase la tabla 3.22 para la fórmula y descripción de los medios de identificación y los protocolos técnicos 3.1-3.12 para su realización). El estudio de la sensibilidad a diferentes antimicrobianos es de gran utilidad para la identificación de algunos microorganismos (Tabla 3.13). La existencia en el mercado de paneles miniaturizados para el estudio de las pruebas metabólicas ha significado un adelanto para la identificación bacteriana.

Identificación mediante sistemas miniaturizados

Los paneles de pruebas metabólicas miniaturizadas incluyen en pequeños pocillos de plástico una mínima cantidad del medio de identificación o del sustrato a estudiar liofilizado o desecado. Éste se rehidrata con un pequeño volumen de una suspensión de la bacteria a identi-



Figura 3.7. Identificación de los bacilos gramnegativos.

Los bacilos gramnegativos no exigentes pueden identificarse mediante un conjunto de pruebas bioquímicas («serie», «galería», «kit de identificación»), preparadas en el propio laboratorio o comercializadas. La serie mostrada, preparada en el laboratorio, incluye el medio de Kligler (glucosa/gas, lactosa, ácido sulfídrico) el de LIA (lisina decarboxilasa, lisina deaminasa, ácido sulfídrico), MIO (movilidad, indol, ornitina decarboxilasa), Voges-Proskauer (acetoina), agar con citrato (medio de citrato de Simmons), agar para estudio de la fenilalanina deaminasa, medio para detección de la ureasa y medio para el estudio de la DNasa.

car en agua destilada o en medio de cultivo y se llevan a incubar. Estas galerías suelen incluir de 10 a 50 pruebas.

También existen paneles o galerías de este tipo que son procesados por instrumentos que efectúan la inoculación, la incubación y la lectura de modo automatizado, evaluando los resultados una computadora que efectúa la identificación. Todos los paneles comercializados deben manipularse y leerse de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Existen diferentes paneles diri-

Tabla 3.13
Antimicrobianos de utilidad en la identificación bacteriana

Antimicrobiano

Novobiocina	La mayoría de las especies de estafilococo son sensibles a la novobiocina. Algunas especies, entre las que destaca <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , agente causal de infección urinaria en la mujer joven, son resistentes. También son resistentes <i>S. hominis</i> y <i>S. cohnii</i> raramente aisladas en clínica.
Furazolidona	Ayuda a la diferenciación del género <i>Staphylococcus</i> (sensible) de <i>Micrococcus</i> (resistente). <i>E. faecalis</i> (resistente) y <i>E. faecium</i> (sensible).
Bacitracina	Ayuda a la diferenciación del género <i>Staphylococcus</i> (resistente) de <i>Micrococcus</i> (sensible). <i>Streptococcus pyogenes</i> es el único estreptococo β -hemolítico sensible a la bacitracina.
Optoquina	Dentro de los estreptococos del grupo <i>viridans</i> (hemólisis α), solamente <i>Streptococcus pneumoniae</i> es sensible a la optoquina.
Colistina	Todas las enterobacterias son sensibles a colistina, excepto el grupo <i>Proteus-Morganella-Providencia</i> , que es resistente y la gran mayoría de cepas del género <i>Serratia</i> , que muestran un pequeño halo de inhibición repleto de colonias (heteroresistencia). Todos los cocos grampositivos son resistentes a colistina. En el género <i>Staphylococcus</i> , solamente las especies <i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i> son resistentes, el resto de especies muestran un pequeño halo de inhibición.
Vancomicina	Es de utilidad para la diferenciación de bacterias grampositivas y gramnegativas.
Aztreonam	Es de utilidad para la diferenciación de bacterias grampositivas y gramnegativas.
Cefalotina	Las especies termotolerantes del género <i>Campylobacter</i> son resistentes.
Compuesto vibriostático O129	Se utiliza para la diferenciación de las enterobacterias y aeromonas (resistentes) de los vibrios y plesiomonas (sensibles).
Mupirocina	Ayuda a la diferenciación de <i>E. faecalis</i> (resistente) de <i>E. faecium</i> (sensible).

gidos a la identificación de los distintos grupos microbianos, como enterobacterias, bacilos gramnegativos no fermentadores, estafilococos, estreptococos, neisserias, bacilos corineformes y bacterias anaerobias¹¹.

El uso de paneles comercializados posee diversas ventajas. Entre ellas, destacan la homogeneidad de los reactivos, que permite comparar los resultados de diversos laboratorios, la rapidez de manipulación y la disposición de bases de datos computarizados para interpretar los resultados (Fig. 3.8).

Debe señalarse con gran énfasis que, a pesar de la existencia de estos sistemas miniaturizados y automatizados, la utilización de pruebas sencillas realizadas con medios y métodos convencionales preparados en el propio laboratorio y de calidad contrastada, como las señaladas en el texto y las tablas, ayudan extraordinariamente a la identificación de las bacterias aisladas con mayor frecuencia en el laboratorio de microbiología clínica (Figs. 3.9-3.11).

El CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), anteriormente denominado NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*), que es uno de los

comités norteamericanos de estandarización de técnicas de laboratorio más prestigiosos, ha asumido que la identificación de algunas bacterias y levaduras puede efectuarse basándose en el aspecto de las colonias junto a algunos caracteres metabólicos fundamentales, realizados con rigor, lo que permite una identificación presuntiva rápida, útil, económica y generalmente correcta.

En la tabla 3.22 se describen los medios de identificación convencionales, las técnicas para su siembra y la interpretación de los resultados.

A pesar de que la identificación de las bacterias se realiza basándose en los caracteres metabólicos, existen casos en que la identificación metabólica es difícil, requiere mucho tiempo y a veces resulta imposible. En estos casos, la identificación molecular basada en la secuencia del 16S rDNA es de gran utilidad. El rDNA codifica el RNA ribosomal y está formado por un conjunto de genes (operón) con regiones muy conservadas y otras de elevada variabilidad, siendo en estas últimas donde se encuentran las diferencias que permiten identificar las bacterias. Esta técnica se realiza mediante la amplificación de un fragmento génico del 16S rDNA seguida

¹¹ Las firmas comerciales que disponen de paneles manuales y automatizados son, entre otras, BD Diagnostics; bioMerieux; Rosco, Biolog Inc.; Dade Behring; Midi Inc.; Remel y Soria Melguizo.

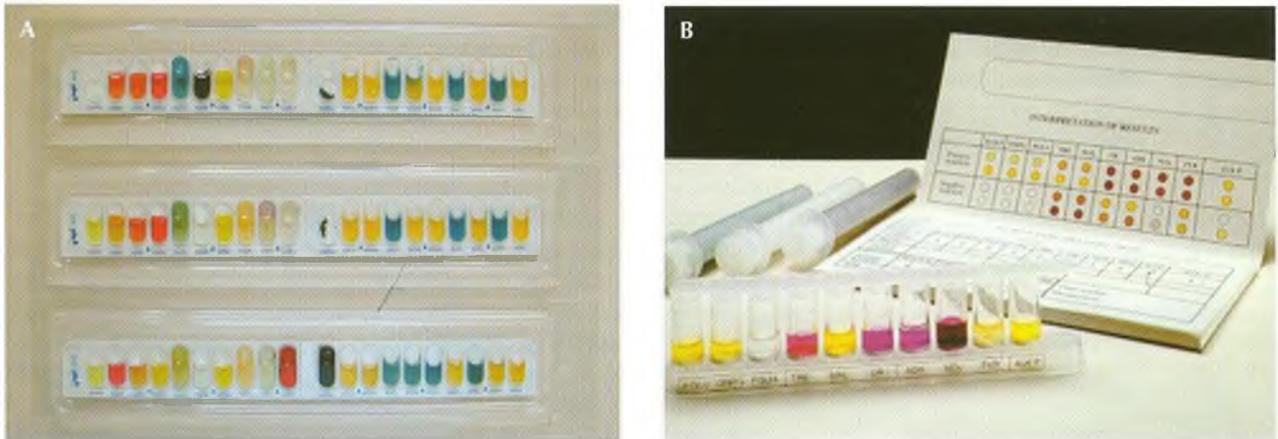


Figura 3.8. Series metabólicas comercializadas.

En el comercio se hallan numerosos kits de identificación. **A.** En la figura se muestra la galería API 20 E[®] utilizada para la identificación de las enterobacterias. Se siembran los microtubos y se incuban durante 24 horas. La introducción del resultado en una computadora con una base de datos, aporta la identificación más probable e indica los caracteres atípicos, si existen. **B.** La otra galería de identificación representada, Roscozym[®], se basa fundamentalmente en la detección de enzimas preformadas. Una vez inoculada se incuban durante 4 ó 18 horas, antes de leerla.



Figura 3.9. *Pseudomonas aeruginosa*.

En ocasiones, algunos caracteres elementales orientan hacia la identificación de una bacteria con elevada especificidad, como el pigmento azul-verdoso de *P. aeruginosa* (piocianina). Se diferencia de otros pigmentos producidos por las pseudomonas porque es soluble en cloroformo y vira a rojo en presencia de un ácido fuerte.

Figura 3.11. CAMP test.

Los estreptococos del grupo B producen una proteína (factor CAMP) que activa la beta lisina de *Staphylococcus aureus* al actuar sinérgicamente con ella. Cuando en una placa de agar sangre se dispone una estriá de estafilococo (vertical) y se hacen estriás perpendiculares de las bacterias a estudiar, las positivas producen una hemólisis en lazo de pajarita característica, como el estreptococo del grupo B mostrado en esta imagen. *Listeria monocytogenes* y algunas corinebacterias también pueden dar un test de CAMP positivo.

Arriba: test de CAMP negativo; Abajo: positivo.

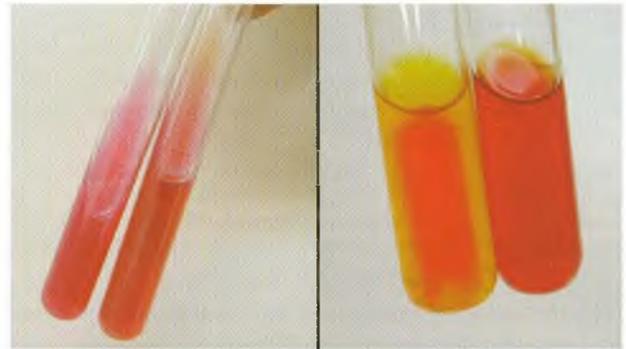
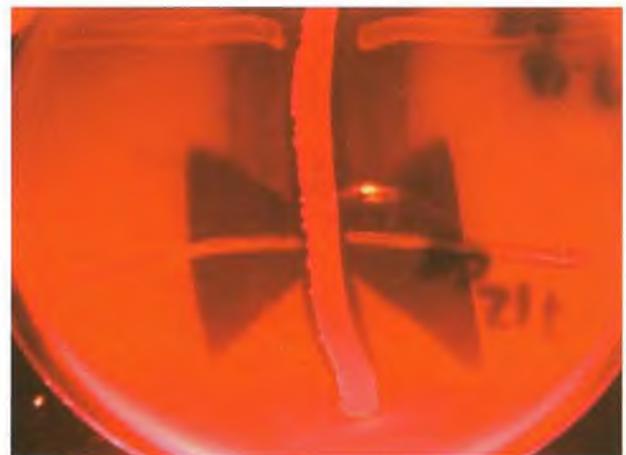


Figura 3.10. *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.

Otra prueba sencilla es la que permite diferenciar presuntamente *A. baumannii* de otros bacilos gramnegativos no fermentadores. Puede observarse como *P. aeruginosa* y *A. baumannii* aparecen en el medio de Kligler como dos cepas de bacilos gramnegativos no fermentadores indistinguibles; sin embargo, en el medio con glucosa y campana de Durham, *Acinetobacter* a diferencia de *Pseudomonas* acidifica el medio por fuera (oxidador muy activo); pero no fermenta y el medio en el interior de la campana permanece alcalino (véase Tabla 3.10).



de la secuenciación del fragmento amplificado y su comparación con secuencias de las diferentes bases de datos existentes¹². Existen productos comercializados que facilitan el desarrollo de este protocolo sustituyendo a técnicas de identificación más complejas, como la cromatografía de gases.

CLASIFICACIÓN INFRAESPECÍFICA

Los diferentes aspectos de la clasificación infraespecífica se detallan en el capítulo 10.

Una vez alcanzada la identificación de especie, las bacterias pueden subdividirse en grupos infraespecíficos según diferentes criterios. El interés en subdividir una especie en diferentes grupos estriba en que éstos pueden poseer diferente capacidad patogénica o tener una distribución geográfica diferente. Los métodos más utilizados para este objetivo son el biotipado, que subdivide las especies en función de caracteres metabólicos; el serotipado, que las divide en función de diferencias antigénicas, y el lisotipado o fagotipado, que las divide en función de la susceptibilidad a un juego de bacteriófagos. De forma genérica, estas variantes se denominan con la terminación en «variedad» o «var» (biovariedad o biovar, serovariedad o serovar, lisovariedad o lisovar, etcétera).

El estudio serológico es muy útil, ya que en algunas bacterias permite confirmar la identificación bioquímica, como ocurre en el caso del neumococo, meningococo¹³, *Haemophilus influenzae*¹⁴, listeria, algunos serotipos de *E. coli*, las salmonelas, las shigelas y las yersinias.

La determinación de los antígenos bacterianos se suele efectuar por aglutinación en porta de la bacteria a partir de un cultivo en medio sólido, con antisueros comercializados¹⁵ preparados contra cada uno de los diversos antígenos (véase el capítulo 10).

ANTIBIOGRAMA

Las bacterias son naturalmente sensibles a algunos antimicrobianos y resistentes a otros (resistencia natural); sin embargo, entre los microorganismos sensibles han aparecido cepas resistentes a antibióticos que eran

activos (resistencia adquirida), por lo que, al aislar un microorganismo, no puede saberse *a priori* si es sensible a un determinado antibiótico o si ha adquirido resistencia frente a él. Por tanto, para orientar el tratamiento debe estudiarse la sensibilidad de las bacterias a los antimicrobianos¹⁶.

Un antibiótico se considera activo frente a una bacteria cuando inhibe su multiplicación. Su actividad se evalúa *in vitro* determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM), que es la mínima concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento del microorganismo¹⁷. En el laboratorio, este parámetro, que cuantifica la sensibilidad, puede determinarse mediante técnicas de dilución en medio líquido, en medio sólido o por técnicas de gradiente de difusión, como el Epsilon-test (Etest). Todos estos métodos requieren una rigurosa estandarización del medio de cultivo, del inóculo bacteriano, de la temperatura, la atmósfera y el tiempo de incubación y de los criterios de lectura.

Es necesario realizar de forma rutinaria controles de calidad de las distintas técnicas de estudio de la sensibilidad, incorporando cepas de sensibilidad o resistencia conocida (*S. aureus* ATCC 29213, 25923; *E. coli* ATCC 35218, 25922; *E. faecalis* ATCC 29212, *S. pneumoniae* ATCC 49619; *P. aeruginosa* ATCC 27853; *H. influenzae* ATCC 49766, 49247; *C. jejuni* ATCC 33560).

Técnicas de dilución

Para determinar la CIM de un antibiótico para una bacteria por técnica de dilución se prepara una serie de tubos con una cantidad determinada de caldo de cultivo en cada uno, a los que se incorpora una cantidad de antibiótico creciente de modo que se obtengan concentraciones dobles progresivas; por ejemplo: en el primer tubo, 0,12 µg; en el segundo tubo, 0,25 µg; en el tercer tubo, 0,5 µg; en el cuarto tubo, 1 µg, y así sucesivamente hasta el decimosegundo tubo, con 256 µg. Se siembra la bacteria en los tubos, se incuban, y a las 18-24 horas se observa el crecimiento. Se podrá ver que el caldo está transparente en los tubos donde hay mayor concentración de antibiótico porque el crecimiento de la bacteria ha sido inhibido, pero que existe crecimiento en los tubos con menor concentración de antibiótico, por ejemplo en

¹² GenBank, NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RDP (Ribosomal Database Project), RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms).

¹³ Por la antigenicidad de la cápsula se distinguen 13 serogrupos de meningococo: A, B, C, D, 29E, H, I, K, L, W135, X, Y, Z. Los asociados con enfermedad meningocócica son los A, B, C, Y y W135, siendo extraordinariamente excepcionales las infecciones por meningococos de los otros serogrupos. Cada grupo se subdivide en tipos y subtipos en función de la estructura antigénica de las proteínas de membrana externa, por ejemplo: B: 4, P1:2 (B = grupo, 4 = tipo, P1: 2 = subtipo).

¹⁴ *H. influenzae* tiene seis tipos capsulares, de los que el b ha sido, hasta la introducción de la vacuna, el más frecuente. *Streptococcus pneumoniae* tiene 90 serotipos capsulares. Para los otros microorganismos, véase el capítulo 10.

¹⁵ Comercializan antisucros Bio-Rad/Pasteur; Oxoid Inc., Difco, Staten Serum Institut, Centro de Referencia de *E. coli* (Lugo, España).

¹⁶ Las técnicas que permiten conocer la sensibilidad o resistencia de los microorganismos a los antibióticos se denominan colectivamente antibiograma.

¹⁷ Las concentraciones inhibitorias mínimas, CIM (MIC en inglés) se expresan en microgramos/mililitro (µg/ml) o en su equivalente miligramos/litro (mg/l).

los tubos con 0,12 y 0,25 $\mu\text{g/ml}$. El tubo con la menor concentración de antibiótico que ha inhibido la bacteria indica la concentración inhibitoria mínima, en el ejemplo indicado es el tubo con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 3.12).

Esta prueba puede realizarse también en medio sólido, incorporando cada dilución de antibiótico a un frasco con el agar fundido, a temperatura alrededor de 50 °C. Se verterá el contenido de cada frasco en placas de Petri que se dejarán solidificar, obteniendo una serie de placas con concentraciones progresivas del antibiótico. Esta técnica, al permitir sembrar varias cepas (20-40) por placa, facilita el estudio simultáneo de la CIM de un gran número de cepas a un antimicrobiano.

Un antibiótico se considera adecuado para tratar una infección causada por una bacteria cuando, administrado en dosis terapéuticas (es decir, no tóxicas), alcanza en el foco de infección concentraciones cuatro o más veces superiores a la CIM (2 $\mu\text{g/ml}$, siguiendo con el ejemplo anterior).

Basándose en diferentes investigaciones en animales y humanos, se han podido determinar las concentraciones que alcanzan los antibióticos en los diversos órganos o tejidos (sangre, pulmón, riñón, LCR, hueso, etc.); por tanto, bastará conocer la concentración inhibitoria mínima (CIM) de un antibiótico para el microorganismo aislado para saber si es superior o inferior a la esperada en el lugar de la infección y, por tanto, si cabe una respuesta terapéutica o no. Sin embargo, en la práctica, una bacteria se considera sensible cuando las concentraciones plasmáticas (sangre) del antibiótico son cuatro veces superiores a la CIM, ya que las concentraciones plasmáticas se alcanzan en la mayoría de los tejidos, excepto algunos como el LCR, los huesos, la próstata o el globo ocular, en los que sólo alcanzan concentraciones terapéuticas determinados antibióticos.

Entre los antimicrobianos activos frente a un microorganismo, los que, por razones de eficacia terapéutica, farmacocinética y ausencia de toxicidad, son los más adecuados para ser administrados se denominan «de elección».

Microdilución

La técnica de microdilución en caldo es de gran utilidad práctica para el estudio de las CIM. No es más que la técnica de dilución en medio líquido, señalada anteriormente, pero realizada en placas de poliestireno, con micropocillos en lugar de tubos. Existen comercializados diversos paneles con varias columnas de pocillos, cada una con diferentes antimicrobianos. Los pocillos de cada columna contienen concentraciones crecientes de un antibiótico en forma de suspensión liofilizada o desecada, por lo que sólo debe añadirse el medio de cultivo líquido en el que se ha efectuado una suspensión de la

bacteria a estudiar (generalmente alrededor de 200 μl de medio por pocillo). Tras la incubación, se determina la CIM (Fig. 3.13).

Como en la macrodilución, la concentración inhibitoria mínima de cada antibiótico se lleva a una tabla que señala si el microorganismo es sensible o resistente; es decir, si la CIM del antibiótico es inferior o superior a la plasmática.



Figura 3.12. Antibiograma. Dilución en caldo.

El primer tubo de la derecha es un control de medio sin antibiótico en el que crece la bacteria a estudiar. Los tubos, de izquierda a derecha contienen una cantidad creciente de antibiótico. La cantidad incluida en cada tubo se expresa en microgramos por ml ($\mu\text{g/ml}$) o su equivalente mg/l. Puede observarse la inhibición de la bacteria en los tubos con las concentraciones altas de antibiótico. La concentración inhibitoria mínima (CIM, en inglés MIC) es la del tubo con menor cantidad de antibiótico que inhibe a la bacteria.

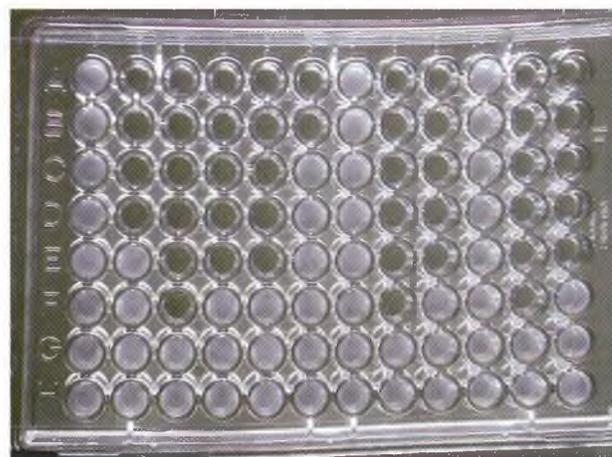


Figura 3.13. Antibiograma. Microdilución.

Existen paneles comercializados, que permiten detectar la concentración inhibitoria mínima por técnica de dilución en caldo. Los pocillos de cada columna contienen, de arriba a abajo, concentraciones decrecientes de antibióticos (cada columna corresponde a un antibiótico diferente). Puede observarse el crecimiento y la inhibición en los diferentes pocillos. La concentración inhibitoria mínima para cada columna de antimicrobiano es la del pocillo con menor cantidad de antibiótico que inhibe a la bacteria.

Existen paneles comercializados para los diferentes grupos bacterianos con variable nivel de automatización y de ayuda para la interpretación de los resultados (Sistemas de experto)¹⁸:

Disco-difusión en agar

Un método muy utilizado por su sencillez para el estudio de la sensibilidad de las bacterias es el de difusión en agar. Se basa en la inhibición del crecimiento de la bacteria alrededor de un disco cargado con un antimicrobiano que difunde en un medio sólido.

Esta técnica consiste en la siembra de la bacteria en la superficie de una placa con un medio de cultivo, sobre el que se depositan unos discos de papel cargados con una cantidad precisa de antibiótico, que difunde casi instantáneamente a través del agar, formándose un gradiente de concentración del mismo alrededor del disco. Posteriormente, se lleva a incubar a 37 °C durante 18 horas.

El microorganismo crece en la superficie de la placa, pero alrededor de los discos se forman unos halos de inhibición más o menos grandes, dependiendo de la mayor o menor sensibilidad de la bacteria a cada antibiótico (Fig. 3.14). Se mide el diámetro del halo (expresado en milímetros) y se lleva a las tablas que correlacionan los diámetros con la sensibilidad (Protocolo técnico 3.13) (Tabla 3.15-3.21).

La correlación diámetro/CIM no se efectúa en términos cuantitativos, porque la técnica no es lo suficientemente exacta como para permitir cuantificar con preci-



Figura 3.14. Antibiograma. Difusión en agar.

El antibiótico difunde desde los discos creando un gradiente de concentración. Las bacterias sensibles son inhibidas por el antibiótico formando un halo de inhibición. Para un mismo antibiótico, a mayor halo mayor sensibilidad (menor CIM). Los halos de los diferentes antibióticos no son comparables ya que el diámetro de la inhibición depende de la sensibilidad de la bacteria, pero también de la capacidad de difusión del antibiótico.

sión las CIM en relación a los halos producidos. Por ello, en la técnica de difusión se trabaja con puntos de corte, basados en dos medidas, un diámetro menor del halo de inhibición, por debajo del cual el microorganismo es resistente (R), y un diámetro mayor, por encima del cual es sensible (S). Entre ambos diámetros la sensibilidad se considera intermedia o indeterminada (I).

Se sugiere introducir para cada grupo de microorganismos los antibióticos recogidos en las tablas 3.15 a 3.21.

Tabla 3.14
Solución de Mc Farland

Estándar	Volumen (ml)		Concentración bacteriana equivalente (10 ⁸ ufc/ml)
	Ba Cl ₂ (1%)	H ₂ SO ₄ (1%)	
0,5	0,05	9,95	1,5
1	0,1	9,9	3
2	0,2	9,8	6
3	0,3	9,7	9
4	0,4	9,6	12
5	0,5	9,5	15
6	0,6	9,4	18
7	0,7	9,3	21
8	0,8	9,2	24
9	0,9	9,1	27
10	1	9	30

Para preparar las diferentes soluciones estándar mezclar las cantidades señaladas de la solución de Ba Cl₂ (1%) y H₂SO₄ (1%). Guardar en tubo perfectamente cerrado a temperatura ambiente al abrigo de la luz. Sería conveniente controlar la turbidez cada seis meses. Existen diversas compañías que tienen comercializados algún estándar, entre ellas: bioMérieux, Remel y Quelab Laboratories Inc.

¹⁸ ATB (bioMérieux), Vitek (bioMérieux), MicroScan (Dade Behring), Pasco (BD Diagnostics), Phoenix (BD Diagnostics), Sensititre (Trek Diagnostic Systems), Wider (Soria Melguizo) entre otros.

Tabla 3.15
Interpretación de la técnica de disco-difusión y valores críticos de CIM para las enterobacterias

Antibacteriano	Carga disco (µg)	Diámetro (mm)			CIM (µg/ml)	
		R	I	S	R	S
Ampicilina	10	≤ 13	14-16	≥ 17	≥ 32	≤ 8
Piperacilina	100	≤ 17	18-20	≥ 21	≥ 128	≤ 16
Amoxicilina-ácido clavulánico	20/10	≤ 13	14-17	≥ 18	≥ 32/16	≤ 8/4
Piperacilina-tazobactam	100/10	≤ 17	18-20	≥ 21	≥ 128/4	≤ 16/4
Cefalotina	30	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Cefuroxima	30	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Cefoxitina	30	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Cefotaxima ¹	30	≤ 14	15-22	≥ 23	≥ 64	≤ 8
Ceftacidima ¹	30	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Cefepima ¹	30	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Imipenem	10	≤ 13	14-15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
Meropenem	10	≤ 13	14-15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
Ertapenem	10	≤ 15	16-18	≥ 19	≥ 8	≤ 2
Aztreonam ¹	30	≤ 15	16-21	≥ 22	≥ 32	≤ 8
Gentamicina	10	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
Tobramicina	10	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
Amikacina	30	≤ 14	15-16	≥ 17	≥ 32	≤ 16
Cotrimoxazol	1,25/23,75	≤ 10	11-15	≥ 16	≥ 8/152	≤ 2/38
Ácido nalidíxico ²	30	≤ 13	14-18	≥ 19	≥ 32	≤ 8
Ciprofloxacina ²	5	≤ 15	16-20	≥ 21	≥ 4	≤ 1
Tetraciclina	30	≤ 14	15-18	≥ 19	≥ 16	≤ 4
Cloranfenicol	30	≤ 12	13-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8

¹ Las cepas portadoras de una betalactamasa de espectro ampliado son resistentes a las penicilinas, cefalosporinas y aztreonam independientemente de su sensibilidad *in vitro*.

² Las cepas resistentes a ácido nalidíxico (NAL) y sensibles a ciprofloxacina (CIP) presentan riesgo de mutación a CIP^R. En las infecciones extraintestinales por *Salmonella enterica* NAL^R, CIP^S, es recomendable informar NAL^R, CIP^R.

Para salmonela y shigela sólo son activas *in vivo* la ampicilina, las fluoroquinolonas, el cotrimoxazol, el cloranfenicol y las cefalosporinas de tercera generación.

R: resistente; S: sensible; I: intermedio/indeterminado (ver texto).

En la actualidad existen instrumentos que permiten leer automáticamente los halos e interpretar los resultados¹⁹.

Epsilon-test

Existe una prueba de difusión en gradiente denominada Epsilon test (Etest, AB Biodisk) que combina la simplicidad y flexibilidad de las pruebas de disco-difusión

con la capacidad para cuantificar la concentración inhibitoria mínima de las técnicas de dilución.

El Etest consiste en una tira de plástico no poroso de 5 cm de largo por 5 mm de ancho a lo largo de la cual se dispone un gradiente predefinido y señalado en la tira de un antimicrobiano equivalente a 15 concentraciones dobles progresivas. Una vez que se ha sembrado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de Etest

¹⁹ SIRScan (i2a); BIOMIC (Giles Scientific Inc.) y Osiris (Bio-Rad Laboratories Inc.), Aura Image (Oxoid Inc.); MastaScan Elite (Mast Diagnostic Ltd), Wider (Soria Melguizo).

sobre la superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte de plástico hasta el agar, creándose de este modo alrededor y a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano.

Tras la incubación de las placas, se puede observar a ambos lados de la tira una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. La carga indicada del punto de la tira en que el extremo de la zona de inhibición intersecciona con ella es el valor de la CIM (Fig. 3.15 y protocolo técnico 3.13).

El Etest es un método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana del que cabe destacar su sencillez y buena correlación con la técnica estándar de dilución. Se considera adecuado para el estudio de muy diversas bacterias, entre las que destacan, además de las bacterias no exigentes (enterobacterias, bacilos gramnegativos no fermentadores, estafilococos, enterococos), bacterias exigentes (neisserias, hemófilos, estreptococos, entre otras), bacterias anaerobias nocardias y micobacterias.

Tabla 3.16
Interpretación de la técnica de disco-difusión y valores críticos de CIM para *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia*

Antibacteriano	Carga disco (µg)	Diámetro (mm)			CIM (µg/ml)		Observaciones ¹
		R	I	S	R	S	
Piperacilina	100	≤ 17	–	≥ 18	≥ 128	≤ 64	Para <i>P. aeruginosa</i>
		≤ 17	18-20	≥ 21	≥ 128	≤ 16	Para <i>Acinetobacter</i>
Ticarcilina-ácido clavulánico	75/10	≤ 14	–	≥ 15	≥ 128/2	≤ 64/2	Para <i>P. aeruginosa</i>
		≤ 14	15-19	≥ 20	≥ 128/2	≤ 16/2	Para <i>Acinetobacter</i>
Piperacilina-tazobactam	100/10	≤ 17	–	≥ 18	≥ 128/4	≤ 64/4	Para <i>P. aeruginosa</i>
		≤ 17	18-20	≥ 21	≥ 128/4	≤ 16/4	Para <i>Acinetobacter</i>
Ceftacidima	30	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8	Para <i>B. cepacia</i>
		≤ 17	18-20	≥ 21			
Cefepima	30	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8	
Imipenem	10	≤ 13	14-15	≥ 16	≥ 16	≤ 4	
Meropenem	10	≤ 13	14-15	≥ 16	≥ 16	≤ 4	Para <i>B. cepacia</i>
		≤ 15	16-19	≥ 20			
Aztreonam	30	≤ 15	16-21	≥ 22	≥ 32	≤ 8	
Gentamicina	10	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 8	≤ 4	
Tobramicina	10	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 8	≤ 4	
Amikacina	30	≤ 14	15-16	≥ 17	≥ 32	≤ 16	
Cotrimoxazol	1,25/23,75	≤ 10	11-15	≥ 16	≥ 8/152	≤ 2/38	
Ciprofloxacina	5	≤ 15	16-20	≥ 21	≥ 4	≤ 1	
Levofloxacina	5	≤ 13	14-16	≥ 17	≥ 8	≤ 2	
Doxiciclina	30	≤ 12	13-15	≥ 16	≥ 16	≤ 4	
Minociclina	30	≤ 14	15-18	≥ 19	≥ 16	≤ 4	

* Cuando hay criterios diferentes según la especie, se señala en este apartado.

La técnica de difusión para estos microorganismos da resultados equívocos y discordantes con las técnicas estándar de dilución (ver texto). Por ello probablemente el Etest es la prueba más equilibrada.

P. aeruginosa es naturalmente resistente a ampicilina, cefalosporinas de primera y segunda generación, cefotaxima, ceftriaxona, tetraciclinas, cotrimoxazol y ácido nalidíxico.

S. maltophilia es naturalmente resistente a todos los betalactámicos, incluyendo los carbapenems, excepto ticarcilina-ácido clavulánico (posee dos β-lactamasas cromosómicas L1 y L2) y a los aminoglucósidos, dependiendo la resistencia *in vitro* en ambos casos del grado de expresión de las enzimas.

B. cepacia es naturalmente resistente a ticarcilina, ticarcilina-ácido clavulánico, imipenem, ácido nalidíxico, cloranfenicol y colistina.

El CLSI (NCCLS) recomienda solo estudiar la minociclina, la levofloxacina y el cotrimoxazol para *S. maltophilia* y la ceftacidima, el meropenem y la minociclina para *B. cepacia*.

R: resistente; S: sensible; I: intermedio/indeterminado.

Tabla 3.17
Interpretación de la técnica de disco-difusión y valores críticos de CIM para los estafilococos

Antibacteriano	Carga disco (µg)	Diámetro (mm)			CIM (µg/ml)		Observaciones
		R	I	S	R	S	
Penicilina ¹	10 U	≤ 28	–	≥ 29	β-lac	≤ 0,12	Halo con borde cortante: R Halo con borde en bisel: S
Oxacilina ^{2,3}	1	≤ 10 ≤ 17	11-12 –	≥ 13 ≥ 18	≥ 4 ≥ 0,5	≤ 2 ≤ 0,25	Para <i>S. aureus</i> Para estafilococo coagulasa neg.
Amoxicilina-ácido clavulánico	20/10	≤ 19		≥ 20	≥ 8/4	≤ 4/2	
Cefalotina	30	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8	
Imipenem	10	≤ 13	14-15	≥ 16	≥ 16	≤ 4	
Ertapenem	10	≤ 15	16-18	≥ 19	≥ 8	≤ 2	
Gentamicina	10	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 8	≤ 4	
Vancomicina ⁴	30			≥ 15		≤ 4	Halo < 14 mm, determinar CIM
Eritromicina ⁵	15	≤ 13	14-22	≥ 23	≥ 8	≤ 0,5	
Clindamicina ⁵	2	≤ 14	15-20	≥ 21	≥ 4	≤ 0,5	
Telitromicina	15	≤ 18	19-21	≥ 22	≥ 4	≤ 1	
Ciprofloxacina	5	≤ 15	16-20	≥ 21	≥ 4	≤ 1	
Cotrimoxazol	1,25/23,75	≤ 10	11-15	≥ 16	≥ 8/152	≤ 2/38	
Linezolid	30	–	–	≥ 21	–	≤ 4	
Tetraciclina	30	≤ 14	15-18	≥ 19	≥ 16	≤ 4	

¹ Un borde cortante del halo de la penicilina, sea cual sea su tamaño, indica producción de betalactamasa y, por tanto, resistencia a penicilina y aminopenicilinas. El halo en bisel es indicador de que la cepa es no productora de betalactamasa, aunque en este caso es adecuado confirmarlo mediante una prueba específica de detección de la enzima.

² Las cepas oxacilina^R son resistentes a todos los betalactámicos, incluyendo los carbapenems. La resistencia a oxacilina puede expresarse como homo o heteroresistencia, en este caso se observan colonias o un ligero velo en el interior del halo (véase detección de resistencia a oxacilina en el texto).

³ La técnica de difusión para oxacilina solo es útil para *S. aureus* y *S. epidermidis*. En el resto de especies, no existe buena correlación entre los halos y la resistencia, por lo que es necesario estudiar directamente la síntesis de PBP 2a.

⁴ Si se realiza la técnica de difusión, confirmar la resistencia por técnica de dilución en toda cepa con halos menores de 14 mm. Se ha sugerido utilizar una placa de agar BHI con 6 µg/ml de vancomicina

⁵ Eritromicina^R/clindamicina^S sin antagonismo (mecanismo de eflujo), informar la clindamicina como sensible. Eritromicina^R/clindamicina^S con antagonismo (fenotipo MLS inducible), la clindamicina se ha de considerar resistente.

β-lac: β-lactamasa. R: resistente; S: sensible; I: intermedio/indeterminado (ver texto).



Figura 3.15. Antibiograma. Epsilon test.

El Etest es una prueba con características intermedias entre las técnicas de difusión y dilución. A lo largo de la tira hay un gradiente de concentraciones del antibiótico. El microorganismo se siembra como para una prueba de difusión y se deposita la tira sobre el agar. Tras la incubación se produce un halo de inhibición. La concentración inhibitoria mínima viene dada por la concentración de antibiótico en el punto de la tira donde intercepta el halo de inhibición. Para el microorganismo representado la CIM es de 2 µg/ml.

Betalactamasas

La resistencia a la penicilina y ampicilina en algunas bacterias se produce por la acción de betalactamasas que hidrolizan el anillo betalactámico. En algunas bacterias, la detección de estas enzimas es necesaria para determinar su resistencia a los betalactámicos porque las técnicas de difusión o dilución no son suficientemente sensibles²⁰. Así sucede con los estafilococos, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, gonococo y los bacilos gramnegativos anaerobios estrictos.

²⁰ Cuando el resultado del estudio de la betalactamasa es positivo, debe considerarse la bacteria resistente a la penicilina y la ampicilina, independientemente del resultado del antibiograma por difusión o dilución.

Tabla 3.18
Interpretación de la técnica de disco-difusión y valores críticos de CIM para los enterococos

Antibacteriano	Carga disco (µg)	Diámetro (mm)			CIM (µg/ml)		Observaciones
		R	I	S	R	S	
Ampicilina	10	≤ 16	–	≥ 17	≥ 16	≤ 8	El resultado de ampicilina se puede extrapolar a AMX, PIP e IMP
Vancomicina	30	≤ 14	15-16	≥ 17	≥ 32	≤ 4	Toda cepa sensible a VAN es sensible a TCO. La resistencia a VAN puede ser difícil de detectar (véase texto)
Teicoplanina	30	≤ 10	11-13	≥ 14	≥ 32	≤ 8	
Eritromicina	15	≤ 13	14-22	≥ 23	≥ 8	≤ 0,5	
Tetraciclina	30	≤ 14	15-18	≥ 19	≥ 16	≤ 4	
Ciprofloxacina	5	≤ 15	16-20	≥ 21	≥ 4	≤ 1	
Levofloxacina	5	≤ 13	14-16	≥ 17	≥ 8	≤ 2	
Linezolid	30	≤ 20	21-22	≥ 23	≥ 8	≤ 2	
Gentamicina ¹ (alta carga)	120	6	7-9	≥ 10	≥ 500	≤ 500	Los halos intermedios han de confirmarse por técnica de dilución
Estreptomina ¹ (alta carga)	300	6	7-9	≥ 10	> 1.000		

* Se estudiará la sensibilidad con discos de alta carga de gentamicina y estreptomina en los casos de infección sistémica. Con estas cargas la sensibilidad indica, únicamente, que cabe esperar acción sinérgica entre el aminoglucósido y la ampicilina o vancomicina.

AMX: amoxicilina; PIP: piperacilina; IMP: imipenem; VAN: vancomicina; TCO: teicoplanina; R: resistente; S: sensible; I: intermedio/indeterminado (ver texto).

Existen varios métodos para la detección directa de betalactamasas, como el bacteriológico de Gots (Hodge), el acidimétrico, el yodométrico y el cromogénico, siendo este último el más utilizado (Fig. 3.16). La técnica cromogénica se basa en la realización de una suspensión espesa de la bacteria en una solución de nitrocefina, que es una cefalosporina que en solución presenta color amarillo, pero, al ser hidrolizada por la betalactamasa, da lugar en unos minutos a un producto rojo intenso.

Algunas enterobacterias y bacilos gramnegativos no fermentadores producen betalactamasas de espectro ampliado (BLEA) que hidrolizan, además de la penicilina y la ampicilina, las cefalosporinas y los monobactams (aztreonam), aunque son sensibles al ácido clavulánico y no hidrolizan los carbapenems (imipenem y otros).

En general, en las cepas productoras de BLEA las CIM de las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y del aztreonam están ligeramente elevadas, pero dentro de los límites de sensibilidad definidos por el CLSI, por lo que es importante utilizar técnicas de cri-

bado para su detección. Entre ellas se encuentra la consistente en estudiar la sinergia producida entre un disco cargado con una cefalosporina de tercera o cuarta generación (30 µg) y otro con ácido clavulánico (ampicilina/ácido clavulánico, 20/10 µg) colocados a una distancia de 30 mm (Fig. 3.17). También pueden detectarse comparando los halos de inhibición de un disco con una cefalosporina de tercera (o cuarta) generación (30 µg) y otro con este antibiótico y ácido clavulánico (30/10 µg), aceptándose como positiva una diferencia superior o igual a 5 mm. Esta prueba también puede realizarse mediante tiras de Etest con cefalosporinas de tercera o cuarta generación con y sin ácido clavulánico, pudiendo observarse la disminución de la CIM por acción del inhibidor. Para la detección de BLEA en caso de enterobacterias hiperproductoras de cefalosporinas cromosómicas, como *Enterobacter cloacae* o *Citrobacter freundii*, es importante realizar el cribado comparando la CIM de una tira de Etest con cefepime con otra con cefepime y ácido clavulánico, ya que ésta es la cefalosporina que resiste más la acción de la betalactamasa cromosómica responsable de la resistencia natural a los betalactámicos en estas especies.

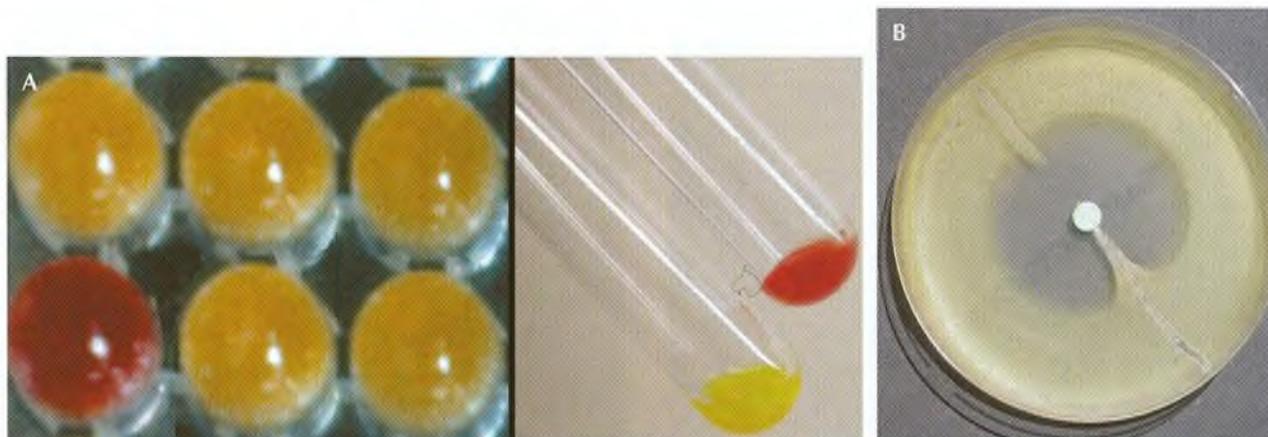


Figura 3.16. Betalactamasas.

A. El nitrocefín es un cefalosporina cromogénica cuya solución acuosa es de color amarillo y cuando es hidrolizado por las betalactamasas adquiere un color rojo. Al practicar una suspensión espesa de una bacteria, en un tubo o un pocillo con una solución de nitrocefín, si la bacteria es productora de betalactamasa, a los pocos minutos se observa la aparición del color rojo. En las bacterias gramnegativas, en las que las betalactamasas se acumulan en el espacio periplásmico en lugar de ser exportadas al exterior, es recomendable sonicar previamente la suspensión bacteriana. **B.** La técnica de Gots (Hodge) se practica sembrando la superficie de una placa de agar con una cepa de *Micrococcus luteus*. En el centro de la placa se dispone un disco de penicilina y se practican estrías radiales con las cepas problema; introduciendo siempre un control positivo y otro negativo. Tras su incubación, las cepas productoras de betalactamasa destruyen la penicilina en el borde del halo de inhibición y permiten el crecimiento del micrococo, tal como se observa en la parte inferior derecha de la figura.

Tabla 3.19
Interpretación de la técnica de disco-difusión y valores críticos de CIM para los hemófilos

Antibacteriano	Carga disco (µg)	Diámetro (mm)			CIM (µg/ml)		Observaciones
		R	I	S	R	S	
Ampicilina ¹	10	≤ 18	19-21	≥ 22	≥ 4	≤ 1	Sensibilidad extrapolable a amoxicilina
Amoxicilina-ácido clavulánico	20/10	≤ 19		≥ 20	≥ 8/4	≤ 4/2	
Cefuroxima	30	≤ 16	17-19	≥ 20	≥ 16	≤ 4	
Cefotaxima	30			≥ 26		≤ 2	Sólo se conoce la categoría sensible
Meropenem	10			≥ 20		≤ 0,5	Sólo se conoce la categoría sensible
Ertapenem	10			≥ 19		≤ 0,5	Sólo se conoce la categoría sensible
Azitromicina	15			≥ 12		≤ 4	Sólo se conoce la categoría sensible
Ciprofloxacina ²	5			≥ 21		≤ 1	Sólo se conoce la categoría sensible
Cotrimoxazol	1,25/23,75	≤ 10	11-15	≥ 16	≥ 4/76	≤ 0,5/9,5	

¹ Se ha de realizar siempre la detección de β-lactamasa por técnica cromogénica o acidimétrica. Una cepa productora de β-lactamasa será resistente a ampicilina sea cual sea el halo de inhibición, y sensible a amoxicilina-ácido clavulánico (AMC), cefuroxima y cefalosporinas de tercera generación.

Las cepas resistentes a ampicilina y no productoras de β-lactamasa se consideran resistentes a AMC y cefalosporinas de primera y segunda generación.

² La detección de la sensibilidad disminuida a las fluoroquinolonas se realiza utilizando un disco de ácido nalidíxico. Si el diámetro es < 21 mm ha de determinarse el valor de la CIM de la ciprofloxacina.

R: resistente; S: sensible; I: intermedio/indeterminado (ver texto).



Figura 3.17. Betalactamasa de espectro ampliado (BLEA).

Puede verse la imagen típica de sinergia en tapón de champagne entre la cefotaxima, el cefepime y el aztreonam con el ácido clavulánico, en una bacteria productora de una betalactamasa de espectro ampliado. Gracias al ácido clavulánico, que inhibe esas betalactamasas, las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y el aztreonam recuperan su actividad. La determinación de esta sinergia también puede efectuarse mediante Etest, de modo parecido a como se realiza para la detección de las metaloenzimas (véase figura 3.18).

Las carbapenemasas son betalactamasas con acción frente a los carbapenems (imipenem y otros). Algunas carbapenemasas se inhiben por acción del EDTA, por lo que, mediante un procedimiento semejante al utilizado para la detección de las BLEA, pero poniendo EDTA en lugar de ácido clavulánico, se puede sospechar su presencia (Fig. 3.18).

Algunas enterobacterias, como *Enterobacter*, *C. freundii*, *Serratia*, *Morganella* y *P. aeruginosa*, presentan constitutivamente en su cromosoma una betalactamasa inducible (clase C). La expresión de estas betalactamasas se pone de manifiesto en el antibiograma por la presencia de un antagonismo entre los discos de betalactámicos fuertemente inductores (cefotaxima, imipenem) y el resto de betalactámicos (Fig. 3.19). Cuando se produce una mutación en el gen regulador, se origina la desrepresión de la enzima, volviéndose entonces la bacteria resistente a las cefalosporinas de tercera generación y al aztreonam, manteniendo la sensibilidad al cefepime. Este patrón de resistencia es indistinguible del producido por las cefamicinas plasmídicas, betalactamasas derivadas de las cromosómicas de la clase C anteriormente citadas²¹.

Resistencia a macrólidos

Existen diferentes mecanismos de resistencia de las bacterias grampositivas a los macrólidos. Los más importantes son:

1. La metilación de la diana en los ribosomas, que impide la unión del antibiótico y, por tanto, su acción.



Figura 3.18. Metalocarbapenemasas.

Mediante diferentes técnicas puede detectarse la sinergia entre los carbapenems (imipenem y otros) y el EDTA, que se observa con las bacterias productoras de metalocarbapenemasas. Un disco cargado con imipenem y otro con imipenem más EDTA, permiten detectar la sinergia, al observar un halo mayor de 6 mm en este último disco respecto al primero. Las tiras de Etest para detectar la presencia de estas enzimas llevan en un lado el antibiótico a estudiar (imipenem) y en el otro ese antibiótico más EDTA. De este modo puede detectarse la presencia de las metalobetalactamasas a través de la acción de su inhibidor (EDTA). En la imagen puede verse que la MIC del imipenem es de 12 mg/l en tanto que la del imipenem más EDTA es muy inferior a 1 mg/l.



Figura 3.19. Inducción de la resistencia por los betalactámicos.

La técnica de difusión, aunque no permite determinar la CIM es muy informativa de algunos detalles de gran interés. Puede verse como el ácido clavulánico, la cefotaxima y el imipenem son inductores de la expresión de la betalactamasa cromosómica de la clase C, que confiere resistencia a las cefalosporinas de tercera generación y al aztreonam. Esta clase de enzimas esta producida por algunas enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*. En esta imagen puede verse la inducción de la enzima en una cepa de *Enterobacter cloacae*. El halo circular de inhibición se corrige y toma forma rectilínea, porque en ese punto el antibiótico inductor estimula la producción de betalactamasa por la bacteria que destruye la cefalosporina o el aztreonam y por tanto crece.

2. La expulsión del antibiótico del interior de la bacteria por acción de bombas de eflujo.

²¹ Las cefamicinas plasmídicas pueden sospecharse por la aparición de colonias en el borde del halo de las cefalosporinas de 3.ª G (B. Mirelis, comunicación personal).

Tabla 3.20
Interpretación de la técnica de disco-difusión y valores críticos de CIM para neumococo

Antibacteriano	Carga disco (µg)	Diámetro (mm)			CIM (µg/ml)			Observaciones
		R	I	S	R	I	S	
Oxacilina ¹	1	≤ 19		≥ 20				
Penicilina ¹					≥ 2	0,12-1	≤ 0,06	
Amoxicilina					≥ 8	4	≤ 2	No en meningitis
Cefuroxime					≥ 2	1	≤ 0,5	
Cefotaxima, ceftriaxona, cefepime					≥ 2	1	≤ 0,5	Meningitis
Ceftriaxona, cefotaxima, cefepime						≥ 4	2	≤ 1 No en meningitis
Imipenem					≥ 1	0,25-0,5	≤ 0,12	
Meropenem					≥ 1	0,5	≤ 0,25	
Vancomicina	30			≥ 17	-	-	≤ 1	
Eritromicina ²	15	≤ 15	16-20	≥ 21	≥ 1	0,5	≤ 0,25	
Clindamicina ²	2	≤ 15	16-18	≥ 19	≥ 1	0,5	≤ 0,25	
Telitromicina	15	≤ 15	16-18	≥ 19	≥ 4	2	≤ 1	
Tetraciclina	30	≤ 18	19-22	≥ 23	≥ 8	4	≤ 2	
Cloranfenicol	30	≤ 20	-	≥ 21	≥ 8	-	≤ 4	
Cotrimoxazol	1,25/23,75	≤ 15	16-18	≥ 19	≥ 4/76	1/19-2/38	≤ 0,5/9,5	
Levofloxacina	5	≤ 13	14-16	≥ 17	≥ 8	4	≤ 2	
Rifampicina	5	≤ 16	17-18	≥ 19	≥ 4	2	≤ 1	

¹ Las cepas con halos de oxacilina ≥ 20 mm se consideran sensibles a penicilina (CIM ≤ 0,06 µg/ml) y a aminopenicilinas, ureidopenicilinas, cefalosporinas y carbapenems (imipenem y ertapenem).

Halos de oxacilina ≤ 19 mm corresponden a cepas con resistencia moderada (CIM 0,12-1 µg/ml) o alta (CIM ≥ 2 µg/ml) de la penicilina. En estos casos, es necesario realizar estudio de CIM a penicilina y cefalosporinas de tercera generación.

² Tanto en el fenotipo MLSB constitutivo (ERY^R, CLI^R) como inducible (ERY^R, CLI^S con antagonismo) se consideran resistentes todos los macrólidos, clindamicina y estreptogramina B. En el fenotipo M (mecanismo de eflujo) (ERY^R, CLI^S sin antagonismo) sólo se consideran resistentes los macrólidos de 14 átomos de C (eritromicina, claritromicina) y 15 átomos de C (azitromicina).

ERY: eritromicina; CLI: clindamicina; R: resistente; S: sensible; I: intermedio/indeterminado (ver texto).

La metilación puede ser constitutiva o inducible. En la constitutiva, se produce continuamente la metilación del ribosoma, por lo que la bacteria se muestra resistente a todos los macrólidos y lincosaminas. Cuando una bacteria con una metilasa no constitutiva se enfrenta a un macrólido o lincosamina no inductor, es sensible, pero bajo la influencia de un macrólido inductor se activa la metilación y se vuelve resistente (Fig. 3.20).

Determinación de la resistencia a la meticilina y oxacilina en *Staphylococcus*

La meticilina y la oxacilina actúan fijándose y bloqueando las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), las cuales poseen actividades enzimáticas involucradas en la biosíntesis de la pared bacteriana. La resistencia de *S. aureus* a estos antibióticos se debe a la producción de una nueva

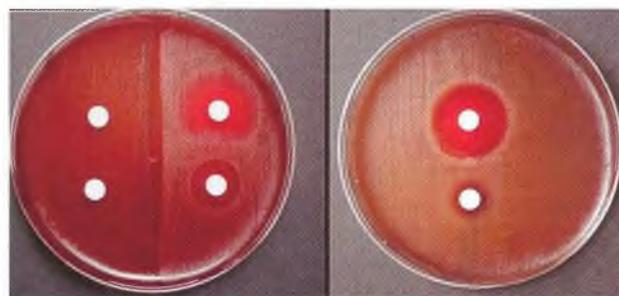


Figura 3.20. Inducción de la resistencia por los macrólidos.

Se muestran los antibiogramas de tres estroptococos del grupo B con discos de eritromicina y clindamicina. A la izquierda se observa una resistencia constitutiva a los macrólidos y a las lincosaminas. En el medio una resistencia inducible. El mecanismo en ambas es la metilación del ribosoma, que se produce de manera continua en la primera y solo cuando se induce en la segunda. A la derecha se observa una resistencia por eflujo, que afecta a algunos macrólidos; pero no a las lincosaminas.

proteína fijadora de penicilina (PBP 2a), a la que no se unen los antibióticos betalactámicos por su baja afinidad.

En algunos casos, la resistencia de *S. aureus* a la metilicina y oxacilina no puede detectarse en el antibiograma convencional (por técnica de difusión ni de dilución), porque la expresión fenotípica de la resistencia, en ocasiones, no tiene lugar bajo las condiciones estándar de cultivo utilizadas para realizar el antibiograma.

Para facilitar la expresión de este tipo de resistencia, puede realizarse el antibiograma convencional por difusión, utilizando el agar Mueller-Hinton con un 4% de NaCl o alternativamente incubando las placas a 30 °C.

Para la detección de la resistencia a oxacilina de *S. aureus*, se siembra la bacteria en una placa de agar Mueller-Hinton a la que se ha incorporado un 4% de NaCl y 6 µg/ml de oxacilina. La observación de crecimiento tras incubación a 35 °C durante 24 horas indica resistencia a la oxacilina. Es recomendable incorporar cepas de control (*S. aureus* ATCC 29213 oxacilina^s y *S. aureus* ATCC 43300 oxacilina^r).

Otra técnica sencilla de cribado para predecir esta resistencia es la utilización de un disco cargado con 30 µg de cefoxitina e incubación durante 24 horas a 35-37 °C. Se consideraran resistentes a oxacilina los halos de inhibición por la cefoxitina inferiores o iguales a 19 mm en *S. aureus* o inferiores o iguales a 24 mm en los estafilococos coagulasa negativa.

La mejor manera de estudiar esta resistencia es detectar la PBP 2a por aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos específicos para esa proteína (Denka-Seiken Co. Ltd.; Oxoid Inc, Mast Diagnostics Ltd) (Fig. 3.21) o amplificando (por PCR u otra técnica) el gen que codifica la PBP 2a (*mec A*). La prueba realizada por PCR en tiempo real permite obtener el resultado en unas horas (Fig. 3.22).

Resistencia a vancomicina

La resistencia a la vancomicina en los enterococos y estafilococos no es fácil de detectar mediante las técnicas convencionales de estudio de sensibilidad, por lo que es necesario realizar sistemas de cribado, como el de la

Tabla 3.21
Interpretación de la técnica de disco-difusión y valores de CIM equivalentes para estreptococos (excepto neumococo)

Antibacteriano	Carga disco (µg)	Diámetro (mm)			CIM (µg/ml)			Observaciones
		R	I	S	R	I	S	
Penicilina ¹	10 U			≥ 24	≥ 4	0,25-2	≤ 0,12 ≤ 0,12	Estreptococo <i>viridans</i> Estreptococos β-hem.
Ampicilina ¹	10			≥ 24	≥ 8	0,5-4	≤ 0,25 ≤ 0,25	Estreptococo <i>viridans</i> Estreptococos β-hem.
Cefotaxima	30	≤ 25	26-27	≥ 28 ≥ 24	≥ 4 -	2	≤ 1 ≤ 0,5	Estreptococo <i>viridans</i> Estreptococos β-hem.
Ceftriaxona	30	≤ 24	25-26	≥ 27 ≥ 24	≥ 4 -	2	≤ 1 ≤ 0,5	Estreptococo <i>viridans</i> Estreptococos β-hem.
Cefepime	30	≤ 21	22-23	≥ 24 ≥ 24	≥ 4 -	2	≤ 1 ≤ 0,5	Estreptococo <i>viridans</i> Estreptococos β-hem.
Meropenem	-						≤ 0,5	
Vancomicina	30			≥ 17			≤ 1	
Eritromicina ²	15	≤ 15	16-20	≥ 17	≥ 1	0,5	≤ 0,25	
Clindamicina ²	2	≤ 15	16-18	≥ 19	≥ 1	0,5	≤ 0,25	
Linezolid	30			≥ 21			≤ 2	
Cloranfenicol	30	≤ 17	18-20	≥ 21	≥ 16	8	≤ 4	
Levofloxacin	5	≤ 13	14-16	≥ 17	≥ 8	4	≤ 2	Estreptococos β-hem.

¹ No se conocen cepas de estreptococos β-hemolíticos resistentes a penicilina (CIM > 0,12 µg/ml), ampicilina (CIM > 0,25 µg/ml), cefotaxima, ceftriaxona, cefepime y meropenem (CIM > 0,5 µg/ml).

² Tanto en el fenotipo MLS_B constitutivo (ERY^r, CLI^r) como inducible (ERY^s, CLI^s con antagonismo) se consideran resistentes todos los macrólidos, clindamicina y estreptogramina B. En el fenotipo M (mecanismo de eflujo) (ERY^{kl}/ CLI^s sin antagonismo) sólo se consideran resistentes los macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono.

Todo estreptococo sensible a penicilina es sensible a aminopenicilinas, cefalosporinas y carbapenems.

ERY: eritromicina; CLI: clindamicina; β-hem: β-hemolítico; R: resistente; S: sensible; I: intermedio/indeterminado (ver texto).

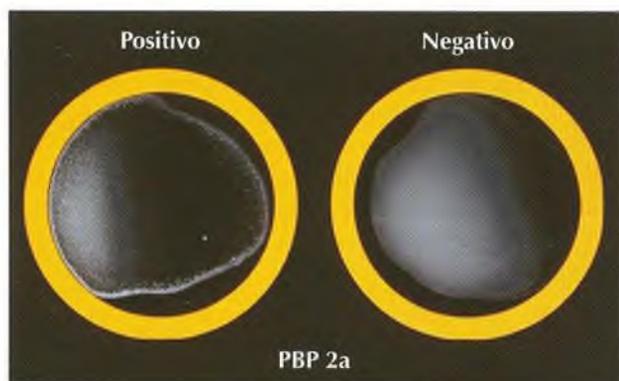


Figura 3.21. Determinación de la PBP 2a por técnica rápida de aglutinación.

La determinación de la PBP 2a puede efectuarse por una técnica de aglutinación en porta utilizando latex con anticuerpos dirigidos contra la PBP 2a. Este método es rápido, sensible y específico.

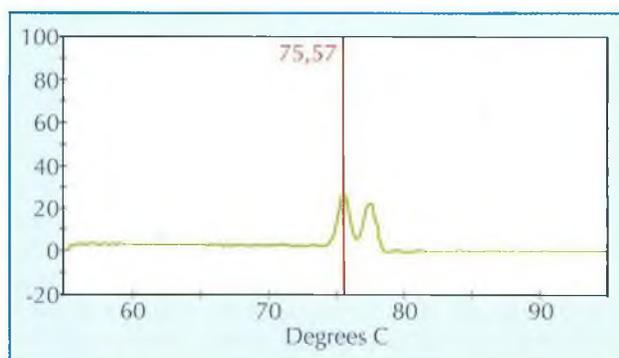


Figura 3.22. Determinación del gen *mecA*.

El gen *mecA* codifica la proteína fijadora de penicilina PBP 2a, que posee baja afinidad para todos los antibióticos betalactámicos. Por ello, las cepas de estafilococo que expresan esa PBP a las que se denomina estafilococos meticilin resistentes, son resistentes a todos los betalactámicos. El gen *nuc* codifica la termonucleasa, que es altamente específica de *Staphylococcus aureus*.

En la figura puede verse las temperaturas de fusión de los amplicones del gen *mecA* y de la termonucleasa, *nuc* (*mecA*: 75,9 y *nuc* 77,6). Los resultados pueden obtenerse alrededor de dos horas en una PCR a tiempo real. Estas determinaciones permiten detectar *S. aureus* meticilin resistente (MRSA) al identificar la especie *S. aureus* y constatar su meticilin resistencia.

inoculación de la cepa en placas agar BHI conteniendo 6 µg/ml de vancomicina.

Es recomendable realizar este cribado para detectar la resistencia en *S. aureus*.

Estudio de la sensibilidad de bacterias especiales

El estudio en el trabajo diario de la sensibilidad de algunas bacterias exigentes que requieren medios de cultivos ricos, como los estreptococos (incluido el neumococo), las neisserias (meningococo y gonococo), *Pasteurella* y otras, debe efectuarse mediante técnicas de dilución en medio líquido, bien con paneles de microdilución, como los indicados anteriormente, o por Etest, ya que la técnica de disco-difusión no es adecuada.

Para bacterias que crecen lentamente, como algunas corinebacterias y nocardias entre otras, no existen técnicas de difusión estandarizadas, e incluso las técnicas de dilución en medio líquido o sólido poseen sólo valor orientativo, pero se acepta la utilización del Etest.

El estudio de la sensibilidad de las bacterias anaerobias y las micobacterias se expone en el capítulo 4.

Las espiroquetas, los micoplasmas, las clamidias y las rickettsias son bacterias que para el estudio de la sensibilidad requieren técnicas sofisticadas con medios y métodos de cultivo muy complejos, por lo que no pueden introducirse en el día a día de un laboratorio de microbiología clínica.

Aunque existen diversas directrices establecidas por varios comités internacionales para la estandarización de los antibiogramas, entre las más seguidas se encuentran las publicadas por el CLSI, que en la actualidad cuenta con publicaciones para la normalización de las técnicas para el estudio de la sensibilidad de bacterias no exigentes, exigentes, anaerobias, micobacterias, actinomicetales y hongos (www.clsi.org), las establecidas por la Sociedad Francesa de Microbiología (www.sfm.asso.fr), por EUCAST (*The European Committee on antimicrobial susceptibility testing*) (www.eucast.org) y de la Mesa de normalización de la sensibilidad y resistencia a los antimicrobianos (MENSURA).

En las tablas 3.15-3.21 se recogen los criterios de interpretación del antibiograma para los diferentes grupos bacterianos.

Antibiograma interpretativo

La lectura interpretativa de un antibiograma comporta, en primer lugar, la identificación correcta de la especie y el conocimiento de su patrón de resistencia natural. Para determinar el mecanismo de resistencia a un antibiótico, es preciso incluir en el antibiograma los antibióticos de su familia que mejor indiquen los posibles mecanismos de resistencia involucrados. El conocimiento del mecanismo permitirá traducir el resultado de la lectura estándar en el patrón de resistencia de los antibióticos cuando se usan en clínica. Ambos resultados, el de la lectura estándar y el interpretativo, pueden o no coincidir. No siempre la valoración interpretativa de resistencia para un antibiótico sensible por criterios estándar significa el fracaso inexorable del antibiótico, sino un riesgo significativo de fracaso bajo determinadas condiciones.

Todas las cepas de *S. aureus* productoras de β -lactamasa se considerarán resistentes a las penicilinas y aminopenicilinas, sea cual sea el valor de la CIM, pero mantienen la sensibilidad a su asociación con el ácido clavulánico y al resto de β -lactámicos, siendo sin embargo la oxacilina y las cefalosporinas de primera generación los compuestos con mayor actividad.

Las cepas de estafilococos resistentes a las penicilinas isoxazólicas, como la cloxacilina y otras, por producción de la PBP 2a (MRSA y estafilococos coagulasa negativa meticilin-resistente), son resistentes a todos los β -lactámicos, incluyendo las cefalosporinas y los carbapenems.

Los enterococos (*E. faecalis* y *E. faecium*) son naturalmente sensibles a los glicopéptidos, pero pueden adquirir resistencia a los mismos. Existen varios fenotipos de resistencia; los que se encuentran con mayor frecuencia son el VanA, con alto nivel de resistencia a vancomicina y teicoplanina, y el VanB, con resistencia de bajo nivel sólo a vancomicina. Existen otras especies de enterococo (*E. gallinarum* y *E. casseliflavus*) con resistencia natural constitutiva de bajo nivel a vancomicina, codificada por el gen *van C*. Aunque la trascendencia epidemiológica y clínica de éstos es menor que la de *E. faecalis* y *E. faecium*, es importante su identificación.

Los mecanismos que confieren resistencia a los macrólidos son diversos, por lo que pueden observarse *in vitro* diferentes fenotipos de resistencia. Sin embargo, los mecanismos más frecuentes en estafilococos y estreptococos son la metilación y el eflujo.

Cuando la bacteria presenta el fenotipo MLSB (metilación constitutiva) o el fenotipo MLSB inducible (metilación inducible), se considerará resistente a todos los macrólidos y a la clindamicina. Si, por el contrario, presenta el fenotipo M (mecanismo de eflujo), se considerará resistente a los macrólidos de 14 átomos de C (eritromicina, claritromicina) y 15 (azitromicina), pero sensible a los de 16 (midecamicina) y a la clindamicina.

Las enterobacterias portadoras de una betalactamasa de espectro ampliado (BLEA) se consideraran resistentes a todos los betalactámicos, excepto los carbapenems (imipenem y otros). Las asociaciones de los betalactámicos con un inhibidor como el ácido clavulánico), generalmente se muestran activas *in vitro*, ya que estas enzimas son altamente sensibles a los inhibidores, que las inactivan, pero no está clara su eficacia *in vivo*, sobre todo si existe un alto inóculo en el lugar de la infección. Estos microorganismos son también frecuentemente sensibles a las cefamicinas (cefoxitina y otras), pero existen pocos datos clínicos de su eficacia. Así pues, los carbapenems son los antibióticos más efectivos para el tratamiento de las infecciones causadas por microorganismos productores de BLEA.

Klebsiella oxytoca posee una betalactamasa cromosómica sensible a los inhibidores, que cuando se produce a niveles bajos presenta un patrón de resistencia similar al de *K. pneumoniae*, pero cuando se hiperproduce, las cepas presentan una resistencia variable a los betalactámicos, en función de la cantidad de enzima producido. La interpretación es similar a la de las cepas portadoras de BLEA.

La hiperproducción de la betalactamasa cromosómica, tanto la no inducible de *E. coli*, como la inducible de *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Morganella* o *Pseudomonas aeruginosa*, confiere resistencia a todos los betalactámicos, con excepción de cefepime y de los carbapenems, que presentan mayor estabilidad a la hidrólisis por estas enzimas. Las variantes plasmídicas de estas betalactamasas cromosómicas dan lugar a patrones de resistencia e interpretación similares a los anteriormente citados.

En algunas cepas de enterobacterias que son resistentes al ácido nalidíxico, pero sensibles a las fluoroquinolonas según criterios estándar, se han documentado fracasos terapéuticos tras la administración de estas últimas, en particular en infecciones sistémicas por salmonelas gastroenteríticas; por ello, es adecuado considerar resistentes las cepas con esas características, en particular en infecciones graves.

Determinación de la resistencia por técnicas genéticas

La detección de las resistencias a los antimicrobianos también dispone de un buen instrumento en las técnicas genéticas, que permiten detectar mutaciones o genes que comportan resistencia tanto en las cepas aisladas como, en algún caso, directamente en la muestra clínica. En este caso, el mecanismo de resistencia queda confirmado por el estudio genético, siendo más fácil deducir los criterios interpretativos que hay que aplicar.

La detección de las resistencias por técnicas genéticas es muy útil en microorganismos de crecimiento lento como *Mycobacterium tuberculosis*, en los que las técnicas convencionales aportan resultados muy tardíos.

Las técnicas de hibridación inversa y amplificación/secuenciación son las más empleadas para el diagnóstico clínico. Algunas de ellas se han comercializado en particular para *M. tuberculosis*.

Se han publicado cebadores para la detección de resistencias por PCR a aminoglucósidos, betalactámicos, cloranfenicol, glicopéptidos, macrólidos, lincosaminas, estreptograminas, mupirocina, quinolonas, sulfamidas, tetraciclinas, trimetoprim, etambutol, pirazinamida, rifampicina, estreptomina e isoniacida.

OTRAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

En bacteriología, así como en otras áreas de la microbiología clínica (micología, virología, etc.), además del examen microscópico y el cultivo, que son las técnicas tradicionalmente utilizadas para el diagnóstico, se han introducido técnicas para la detección de antígenos y de secuencias específicas del DNA.

Estos procedimientos son especialmente útiles para el diagnóstico de un microorganismo cuando no pue-

Tabla 3.22
Medios de identificación. Descripción

Medio/Prueba	Fundamento	Resultado
Catalasa	<p>Se estudia la hidrólisis del peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) por la catalasa, dando lugar a agua y oxígeno.</p> <p>Se pone una gota de peróxido de hidrógeno de 110 vol al 30% sobre un portaobjetos y con un palillo se efectúa en ella una emulsión de una colonia. Si la bacteria posee catalasa, la liberación de oxígeno se observará por la aparición de burbujas.</p> <p>Es una prueba de gran importancia para la diferenciación de bacterias grampositivas.</p>	<p>Positivo: se observan burbujas en el agua oxigenada</p> <p>Negativo: no se observan burbujas</p>
Oxidasa	<p>Se detecta la presencia de la citocromoxidasa (citocromo C) presente en la cadena respiratoria de las bacterias.</p> <p>Se realiza según dos métodos: uno emplea el oxalato de N-dimetil para-fenilendiamina que, oxidado por el sistema citocromo C de las bacterias, se transforma en un compuesto de color violeta oscuro; el otro método utiliza una solución de clorhidrato de tetrametil para-fenilendiamina al 1% que, al ser oxidado por el citocromo C, se transforma en un compuesto púrpura.</p>	<p>Positivo: coloración violeta o púrpura</p> <p>Negativo: incolora</p>
Tipo respiratorio	<p>Las bacterias pueden clasificarse según su tipo respiratorio en aerobias estrictas (sólo crecen en presencia de aire), anaerobias estrictas (sólo crecen en ausencia de oxígeno), aerobias y anaerobias facultativas (crecen en presencia y en ausencia de oxígeno) y microaerófilas (crecen sólo a una tensión reducida de oxígeno).</p> <p>Se estudia sembrando una suspensión de la bacteria en un tubo largo y estrecho (12 x 180) que contiene agar semisólido regenerado por ebullición.</p> <p>El medio no debe poseer sustancias que permitan una respiración anaerobia y poseer la capacidad nutritiva para el crecimiento de la bacteria estudiada.</p> <p>En la práctica, el tipo respiratorio se puede determinar comprobando el crecimiento en el medio en una placa de Petri incubada en aerobiosis y otra en anaerobiosis. Alternativamente, en las bacterias no exigentes se evalúa observando el crecimiento en la profundidad del medio de Kligler.</p>	<p><i>Anaerobias estrictas</i>: crecimiento en la parte profunda del tubo</p> <p><i>Aerobias estrictas</i>: crecen en la superficie del tubo</p> <p><i>Anaerobias facultativas</i>: crecen en todo el tubo</p> <p><i>Microaerófilas</i>: crecen aproximadamente un centímetro por debajo de la superficie del medio</p> <p><i>Bacteria aerobia y anaerobia facultativa</i>: crecimiento en la pendiente y en la base del medio de Kligler fermentando la glucosa (base de color amarillo)</p> <p><i>Bacteria aerobia estricta</i>: crecimiento en la pendiente con ausencia de crecimiento y de fermentación en la base del Kligler (base roja)</p>
Crecimiento en diferentes medios de cultivo:	<p>El crecimiento en diferentes medios de cultivos se puede utilizar para determinar:</p> <p>1. Los requerimientos nutricionales (se compara el crecimiento en medios usuales y enriquecidos).</p>	<p>Incubar los días necesarios según la rapidez de crecimiento de la bacteria. Evaluar:</p> <p>Crecimiento</p> <p>No crecimiento (o menor crecimiento)</p>

Tabla 3.22 (continuación)
Medios de identificación. Descripción

Medio/Prueba	Fundamento	Resultado
Crecimiento en diferentes medios de cultivo (cont.):	<ol style="list-style-type: none"> La atmósfera óptima de crecimiento (se compara el crecimiento obtenido en atmósfera aerobia, enriquecida en un 5% de CO₂, anaerobia y microaerofílica). La temperatura óptima de crecimiento (se compara el crecimiento obtenido a varias temperaturas: 20, 28, 35, 42 °C). La capacidad de crecer en medios selectivos (MacConkey, Thayer-Martin, TCBS, BCYE, caldo con 6,5% de NaCl, entre otros). 	
Coagulasa	<p>La prueba de la coagulasa diferencia <i>Staphylococcus aureus</i> (positiva) de la mayoría de especies de estafilococo (negativa).</p> <p>Se puede estudiar la presencia de coagulasa libre determinando la capacidad del microorganismo de coagular el plasma citratado de conejo (técnica en tubo).</p> <p>La coagulasa ligada o <i>clumping factor</i> se determina por aglutinación en porta.</p>	<p>Positivo:</p> <p>Tubo: formación de un coágulo firme que no se desprende de las paredes del tubo (coagulasa libre)</p> <p>Porta: aglutinación positiva (<i>clumping factor</i>)</p> <p>Negativo: ausencia de coágulo en tubo o de aglutinación en porta</p>
Crecimiento en 6,5% de NaCl	Caldo nutritivo suplementado con 6,5% de NaCl al que se puede incorporar púrpura de bromocresol como indicador. El crecimiento se pone de manifiesto por la turbidez del medio con o sin viraje de lila a amarillo.	<p>Positivo: enturbiamiento del medio (amarillo)</p> <p>Negativo: no enturbiamiento del medio (lila)</p>
Aminopeptidasas: Pirrolidonil-Ap (PYR); Leucina-Ap (LAP)	<p>Evalúan la capacidad de la bacteria para hidrolizar una serie de sustratos aminopeptídicos detectando la presencia de la enzima amino-peptidasa específica. La hidrólisis libera β-naftilamina, que reacciona con el reactivo de revelado (p dimetil-amino-cinamaldehído) dando lugar a un color rojo.</p> <p>Existen tabletas comercializadas para realizar estas pruebas de modo individualizado (véase <i>Protocolo técnico</i> 3.12).</p>	<p>Positivo: rojo</p> <p>Negativo: incoloro</p>
Medio con hipurato sódico	<p>Detecta la hidrólisis del hipurato sódico a glicina. La técnica rápida se basa en la actividad de la enzima preformada, por lo que se inocula abundantemente una solución acuosa de hipurato sódico al 1%. Al añadir unas gotas de ninhidrina, si se ha formado glicina, se observa un viraje del reactivo al color azul oscuro.</p> <p>Existen tabletas comercializadas para realizar esta prueba de modo individualizado (véase <i>Protocolo técnico</i> 3.12).</p>	<p>Positivo: color azul oscuro</p> <p>Negativo: incoloro</p>

Tabla 3.22 (continuación)
Medios de identificación. Descripción

Medio/Prueba	Fundamento	Resultado
Agar bilis-esculina	<p>El agar bilis-esculina está formulado para detectar el crecimiento bacteriano en presencia de un 4% de bilis y la hidrólisis de la esculina a esculetina. El medio se intuba como agar inclinado. La producción de esculetina se observa porque ésta se combina con el citrato férrico amónico presente en el medio de cultivo dando lugar a una coloración negruzca del agar.</p> <p>Existen tabletas comercializadas para realizar esta prueba de modo individualizado (véase <i>Protocolo técnico</i> 3.12).</p>	<p>Positivo: crecimiento con coloración negruzca del agar</p> <p>Negativo: ausencia de crecimiento</p>
Indol	<p>EL indol se produce a partir del triptófano. Para su determinación, se utiliza un caldo usual al que se añade 1% de triptófano. El indol se detecta al añadir una solución alcohólica de p-dimetil-amino-benzaldehído (Reactivo de Kovacs). El indol se combina con el aldehído para dar lugar a una coloración roja de la fase alcohólica.</p> <p>Existen tabletas comercializadas para realizar esta prueba de modo individualizado (véase <i>Protocolo técnico</i> 3.12).</p>	<p>Positivo: reactivo color rojo cereza</p> <p>Negativo: el reactivo permanece amarillo</p>
Glucosa/gas	<p>Para estudiar la fermentación de la glucosa, se añade glucosa a un caldo a una concentración final del 1% y rojo de fenol como indicador de pH; la incorporación de una campana de Durham (invertida) permite detectar la producción de gas.</p>	
Citrato de Simmons	<p>Medio sintético que lleva como única fuente de carbono el citrato sódico y azul de bromotimol como indicador. Las bacterias capaces de utilizar el citrato como única fuente de carbono y energía crecerán alcalinizando el medio.</p>	<p>Positivo: el microorganismo crece y alcaliniza el medio que vira de verde a azul</p> <p>Negativo: no se observa crecimiento y el medio permanece verde</p>
Agar de Kligler (KIA)	<p>Está formulado para 1) detectar la fermentación de la glucosa, 2) la producción de gas a partir de este azúcar, 3) la utilización de la lactosa y 4) la producción de SH₂. El medio se intuba inclinado en pico de flauta con una base (anaerobia) y una pendiente (aerobia).</p> <p><i>Degradación de azúcares:</i> La glucosa se encuentra al 0,1% y la lactosa al 1%. El indicador de pH es el rojo fenol. La fermentación de la glucosa acidifica la base. En la pendiente, la menor cantidad de productos ácidos originados por la degradación aerobia de la glucosa son neutralizados por la alcalinización producida por el catabolismo de las peptonas; pero esta alcalinización no es suficiente para neutralizar la acidificación cuando además se produce la utilización de la lactosa. (que está 10 veces más concentrada).</p>	<p><i>Glucosa:</i></p> <p>Positivo: fondo amarillo</p> <p>Negativo: fondo rojo</p> <p><i>Lactosa:</i></p> <p>Positivo: pendiente amarilla</p> <p>Negativo: pendiente roja</p> <p><i>Producción de SH₂:</i> ennegrecimiento del medio</p> <p><i>Producción de gas:</i> formación de burbujas o desprendimiento del agar de las paredes del tubo</p>

Tabla 3.22 (continuación)
Medios de identificación. Descripción

Medio/Prueba	Fundamento	Resultado
Agar de Kligler (KIA) (cont.)	<i>Producción de SH₂</i> : El medio permite detectar la producción de SH ₂ tras la reducción del tiosulfato, ya que se combina con el citrato amónico férrico del medio para dar lugar a un precipitado negro.	
Movilidad-indol-ornitina (MIO)	Medio semisólido formulado para detectar la decarboxilación de la ornitina, la producción de indol y la movilidad de la bacteria. El medio contiene glucosa, ornitina, triptofano y púrpura de bromocresol como indicador. La bacteria en primer lugar utiliza el azúcar acidificando el medio que vira a amarillo. Si se produce decarboxilación de la ornitina, se alcaliniza el medio compensando la acidez, por lo que el medio no varía de color (lila). La movilidad se pone de manifiesto por el crecimiento de la bacteria (enturbiamiento) desde la picadura donde se sembró a través de todo el agar blando. Si se añade reactivo de Kovacs, se detectará la producción de indol a partir del triptofano.	<i>Ornitina:</i> Decarboxilación: color violeta No decarboxilación: color amarillo <i>Movilidad:</i> Positivo: crecimiento por todo el agar blando Negativo: crecimiento sólo en la picadura de la inoculación <i>Indol:</i> Positivo: reactivo vira a rojo Negativo: reactivo permanece amarillo pálido
Agar lisina-hierro (LLA)	Está formulado para detectar en las especies de enterobacterias la producción de lisina decarboxilasa (LDC), lisina deaminasa (LDA) y la producción de SH ₂ . El medio se intuba inclinado en pico de flauta. Lisina: el medio contiene glucosa y lisina. El indicador de pH es la púrpura de bromocresol. La fermentación de la glucosa produce catabolitos ácidos y la base del medio vira de violeta a amarillo. Si la lisina es descarboxilada, se producen catabolitos alcalinos (cadaverina) que neutralizan los ácidos y dejan el medio del color inicial. La deaminación de la lisina alcaliniza con mayor intensidad el medio y vira el indicador en la pendiente a rojo. Producción de SH ₂ : sigue los mismos principios que los descritos en el medio de Kligler. La aerobiosis del pico de flauta favorece la producción de LDA, ésta desaminará la lisina dando lugar a catabolitos que al reaccionar con las sales de hierro presentes en el medio da lugar a un color rojizo vinoso característico. Producción de SH ₂ : sigue los mismos principios que los descritos en el medio de Kligler.	<i>Lisina:</i> Decarboxilación: base y pendiente violeta Deaminación: pendiente roja No degradación: base amarilla y pendiente violeta <i>Producción de SH₂:</i> Precipitado negro fundamentalmente en la base

Tabla 3.22 (continuación)
Medios de identificación. Descripción

Medio/Prueba	Fundamento	Resultado
Voges-Proskauer	<p>Esta prueba detecta la producción de acetoina a partir del ácido pirúvico en la degradación de la glucosa. El caldo de Clark-Lubs es una solución tamponada de glucosa y peptona que se reparte en tubos anchos (18 x 180 mm) a razón de 2,5 a 3 ml por tubo. Una vez sembrado, se incuba durante 48 horas. La producción de acetoina se detecta añadiendo en primer lugar 0,6 ml (~10 gotas) de una solución alcohólica de α-naftol al 5% (intensificador de color) y en segundo lugar 0,2 ml (cuatro-cinco gotas) de una solución acuosa de KOH al 40% (oxidante). La acetoina es oxidada a diacetil, que a su vez se combina con determinados compuestos de las peptonas virando el color del reactivo a rojo en cinco minutos.</p> <p>La prueba puede leerse a las 24 horas de incubación; pero en este caso, después de añadir los reactivos, es necesario calentar suavemente el tubo a la llama del Bunsen hasta ebullición y agitar posteriormente durante 30 segundos.</p> <p>Existen tabletas comercializadas para realizar esta prueba de modo individual (véase <i>Protocolo técnico</i> 3.12).</p>	<p>Positivo: color rojo Negativo: incoloro</p>
Ureasa	<p>La ureasa descompone la urea en dos moléculas de amonio. Se puede estudiar con el medio de Christensen o el de Ferguson.</p> <p>El agar de Christensen es una solución tamponada de peptona y glucosa, a la que se añade un 20% de urea y rojo de fenol como indicador de pH. La producción de amonio a partir de la urea alcaliniza el medio y el indicador vira a un color rosa intenso.</p> <p>Puede realizarse una prueba rápida para el estudio de la ureasa efectuando una suspensión muy espesa en el medio líquido de Ferguson. Leer entre 30 minutos-dos horas.</p> <p>Existen tabletas comercializadas para realizar esta prueba de modo individual (véase <i>Protocolo técnico</i> 3.12).</p>	<p>Positivo: color rosa Negativo: incoloro</p>
Fenilalanina deaminasa	<p>Desamina la fenilalanina a ácido fenilpirúvico. Para su determinación se utiliza un agar base con un 0,2% de fenilalanina. El medio se intuba como agar inclinado, se siembra e incuba durante 24 horas. La reacción se revela añadiendo cuatro o cinco gotas de una solución acuosa de cloruro férrico al 10% sobre el crecimiento bacteriano. La lectura debe ser inmediata. Cuando existe ácido fenilpirúvico, éste se combina con el cloruro férrico y el reactivo vira a color verde intenso.</p> <p>Técnica rápida: existen tabletas comercializadas para realizar esta prueba de modo individual (véase <i>Protocolo técnico</i> 3.12).</p>	<p>Positivo: el reactivo adquiere un color verde Negativo: el reactivo permanece de color amarillo</p>

Tabla 3.22 (continuación)
Medios de identificación. Descripción

Medio/Prueba	Fundamento	Resultado
β -galactosidasa (ONPG)	<p>La prueba de la ONPG se usa para determinar la presencia de la β-galactosidasa, que forma parte del sistema enzimático para la utilización de la lactosa.</p> <p>Detecta la actividad de la β-galactosidasa (que escinde la lactosa en glucosa y galactosa) a través de la hidrólisis del o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (incoloro) dando lugar a o-nitrofenol (amarillo) y galactosa.</p> <p>Se utiliza una solución de o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido en agua destilada ajustando el pH a 7 con tampón fosfato, practicándose un inóculo espeso e incubando de 20 minutos a 24 horas a 37 °C. La β-galactosidasa es una enzima inducible, por lo que su detección deberá realizarse a partir de la bacteria crecida en un medio con lactosa.</p> <p>Existen tabletas comercializadas para realizar esta prueba de modo individual (véase <i>Protocolo técnico</i> 3.12).</p>	<p>Positivo: color amarillo</p> <p>Negativo: incolora</p>
γ -GT	<p>Prueba cromogénica que detecta la actividad de la γ-glutamyl transferasa a través de la hidrólisis del ácido γ L-glutámico p-nitroanilida.</p> <p>Existen tabletas comercializadas para realizar esta prueba de modo individual (véase <i>Protocolo técnico</i> 3.12).</p>	<p>Positivo: color amarillo</p> <p>Negativo: incolora</p>
Fosfatasa alcalina	<p>La actividad fosfatasa se estudia detectando la hidrólisis del p-nitrofenil fosfato, que es incoloro, dando lugar a p-nitrofenol de color amarillo por acción de la fosfatasa alcalina de la bacteria. Existen tabletas comercializadas para realizar esta prueba de modo individual (véase <i>Protocolo técnico</i> 3.12).</p>	<p>Positivo: color amarillo</p> <p>Negativo: incolora</p>
β -glucuronidasa	<p>La actividad de la β-glucuronidasa de una bacteria se puede detectar a través de la hidrólisis del ácido p-nitrofenil-β-D-glucopiranosido (incoloro), que da lugar a la liberación de p-nitrofenol (amarillo). Existen tabletas comercializadas para realizar esta prueba de modo individual (véase <i>Protocolo técnico</i> 3.12).</p>	<p>Positivo: color amarillo</p> <p>Negativo: incolora</p>
Fermentación de azúcares	<p>A un caldo de cultivo se le añade el azúcar cuya fermentación quiere estudiarse a una concentración final del 1% y rojo de fenol como indicador de pH. Pueden utilizarse otros indicadores, como el azul de bromotimol. Después de esterilizar el caldo en el autoclave, se reparte en tubos a razón de 4-5 ml por tubo. Algunos azúcares se hidrolizan en el autoclave, por lo que deben esterilizarse por filtración).</p>	<p>Positivo: color amarillo</p> <p>Negativo: color rojo</p>

Tabla 3.22 (continuación)
Medios de identificación. Descripción

Medio/Prueba	Fundamento	Resultado
Fermentación de azúcares (cont.)	<p>Se siembra la bacteria objeto de estudio y se incuba 18 horas a 35 °C. La fermentación de los azúcares da lugar a productos ácidos que viran el color del medio al amarillo (con rojo fenol como indicador). Puede estudiarse la producción de gas a partir de la glucosa añadiendo al tubo que contiene este azúcar una campana de vidrio invertida (campana de Durham). El gas quedará atrapado en el interior de la campana observándose como una burbuja.</p> <p><i>Nota:</i> el medio a utilizar para el estudio de la fermentación de los azúcares varía según el grupo de microorganismos estudiados. En el caso de las enterobacterias, puede utilizarse agua peptonada como medio base, rojo de fenol como indicador de pH incorporando el carbohidrato al 1%. Para bacterias exigentes se puede añadir 200 ml de suero por litro al agua de peptona. Existen medios específicos para las neisserias, los lactobacilos, los estreptococos y las bacterias anaerobias. Existen tabletas comercializadas para realizar esta prueba de modo individual (véase <i>Protocolo técnico</i> 3.12).</p>	
Pruebas de identificación basadas en la sensibilidad a antimicrobianos y antisépticos	<p>A partir de una suspensión de la bacteria de alrededor de 10^5 ufc/ml, en solución salina se siembra una placa de agar Mueller-Hinton sobre la que se coloca un disco cargado con el antimicrobiano a estudiar. Después de incubar 18 horas, se observa la presencia de un halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco.</p>	<p>El diámetro del halo de inhibición necesario para considerar a la cepa sensible al antimicrobiano estudiado se recoge en las distintas tablas de identificación y no se corresponde necesariamente con los criterios de sensibilidad o resistencia utilizados en el antibiograma.</p>

den aplicarse los métodos convencionales de examen directo o cultivo en razón de su complejidad o su coste. Otro factor importante a tener en cuenta es la rapidez de diagnóstico que aportan; no ha de olvidarse que los cultivos de algunas bacterias requieren días de incubación y algunas de estas técnicas pueden concluirse en un día.

En la actualidad, en el campo de la bacteriología, existen reactivos comercializados para la detección de antígeno de los estreptococos del grupo A y del grupo B, neumococo, meningococo (A y C), *H. influenzae*, legionela y clamidia entre otros, así como para la detección de las toxinas de *E. coli* verotoxigénica y de *Clostridium difficile* entre otras²².

Las técnicas de amplificación genética en bacteriología se utilizan para el diagnóstico de la tuberculosis, la tosferina y las infecciones por clamidia, para las que existen reactivos comercializados; con reactivos no comer-

cializados pueden realizarse muchas otras pruebas además de las señaladas.

Las técnicas serológicas en el ámbito de la bacteriología se utilizan para el diagnóstico de las infecciones por estreptococo del grupo A, brucela, treponema (sífilis), micoplasma, clamidias, coxiela y rickettsias. En los capítulos 8 y 9 se revisan con algún detalle las técnicas de detección de antígeno, las pruebas serológicas y las pruebas de detección de secuencias específicas (pruebas genéticas).

MEDIOS DE IDENTIFICACIÓN. DESCRIPCIÓN

Los medios de identificación pueden obtenerse como paneles comercializados, preparados para su uso inmediato. También pueden prepararse en el laboratorio como paneles o bien como pruebas individualizadas. En la tabla 3.22 se han descrito los principios teóricos y técnicos para el uso de estos reactivos.

²² En los alimentos pueden detectarse las enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus*. Su detección en pacientes con diarrea fuera del contexto de un brote es de difícil interpretación.

TÉCNICAS BACTERIOLÓGICAS ESPECÍFICAS

Las principales bacterias de interés en medicina se pueden dividir en dos grupos. En el primero se incluyen las bacterias que pueden observarse por examen microscópico y aislarse por cultivo. En el otro grupo se incluyen las bacterias que son de difícil visualización con el microscopio y no crecen en medios convencionales, por lo que se suelen estudiar preferentemente por técnicas de detección de antígeno, genéticas o por serología.

En el primer grupo, junto a las bacterias convencionales, puede establecerse dos subgrupos: el de las bacterias anaerobias estrictas y el de las micobacterias, cuyo estudio requiere técnicas que, si bien son semejantes a las convencionales descritas hasta aquí, poseen algunas peculiaridades que se señalan a continuación.

BACTERIAS ANAEROBIAS

Las bacterias anaerobias estrictas sólo crecen en ausencia de oxígeno, que es letal para ellas. Dentro de las bacterias anaerobias, existen numerosas especies de cocos y bacilos grampositivos y gramnegativos; en este capítulo sólo se presentarán los de mayor interés en medicina.

Los cocos grampositivos se incluyen en el género *Peptostreptococcus*, y los gramnegativos, en el género *Veillonella*. Los bacilos gramnegativos están constituidos por diversos géneros, como *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* y *Fusobacterium*, y los grampositivos, por los géneros *Actinomyces*, *Eubacterium* y *Propionibacterium* y el género *Clostridium*, formado por bacilos grampositivos esporulados.

Las bacterias anaerobias forman parte predominante de la flora gingival, orofaríngea e intestinal y causan infecciones oportunistas polimicrobianas, como abscesos pulmonares por aspiración de la secreción faríngea tras la pérdida de conciencia o anestesia, peritonitis secunda a apendicitis, diverticulitis, perforación del tubo digestivo o fallo de sutura tras una intervención en el intestino e infecciones de la herida quirúrgica tras cirugía colónica, entre muchos otros procesos. La mayoría de estas infecciones están causadas por una abundante

flora mixta constituida por diversas bacterias anaerobias y aerobias, como bacteroides, fusobacterias, eubacterias, *Escherichia coli*, proteus, enterococos y muchas otras.

Entre las bacterias anaerobias, algunos clostridios, como *Clostridium perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum* y otros con menor frecuencia (*C. sordellii*, *C. histolyticum*, *C. bifermentans*) pueden causar infecciones del tejido celular subcutáneo, de las fascias y de los músculos, dando lugar a un proceso necrotizante característico denominado gangrena gaseosa.

Otras especies de clostridios causan infecciones tóxicas muy graves, como el tétanos (*C. tetani*), el botulismo (*C. botulinum*) o la colitis pseudomembranosa (*C. difficile*) (Tabla 4.1).

Para el estudio de las bacterias anaerobias, todo el proceso debe realizarse en ausencia de oxígeno, ya que estas bacterias no solo no crecen en presencia de oxígeno, sino que mueren por la acción de este elemento.

Las muestras clínicas como secreciones, exudados, pus y otras en las que se sospeche la presencia de bacterias anaerobias no deben tomarse con escobillón sino con jeringa, inyectando el material en un pequeño vial para transporte de muestras anaerobias al laboratorio, del que existen diversos modelos comercializados, o, en su ausencia, en la propia jeringa. Cuando resulte absolutamente inevitable tomar la muestra con escobillón, debe seleccionarse un modelo con medio de transporte para anaerobios, aunque su eficacia es limitada.

Examen microscópico

El examen directo de la muestra clínica teñida por el método de Gram posee un gran valor para orientar el diagnóstico precoz de las infecciones por anaerobios. Algunos anaerobios poseen una morfología característica, como las fusobacterias, los bacteroides cocobacilares, los clostridios y los actinomices (Figs. 4.1 y 4.2). Como se ha señalado previamente, la mayoría de estas infecciones, excepto las específicas, como la gangrena por clostridios, el tétanos o la colitis pseudomembranosa, corresponden a procesos de etiología mixta en los que junto a diversas bacterias aerobias y facultativas se encuentra asociado un gran número de bacterias anaerobias.

Tabla 4.1
Infecciones por bacterias anaerobias más frecuentes

Infecciones generalmente polimicrobianas¹:

- Flemones peri y paradentales (a)
- Absceso del suelo de la boca (a)
- Absceso pulmonar (a)
- Absceso periesofágico (a)
- Peritonitis difusa (origen intestinal) (b)
- Abscesos peritoneales (absceso subfrénico, periapendicular, etc.) (b)
- Pelvipertonitis (b, c)
- Infección de la herida quirúrgica en cirugía cérvico-facial, abdominal y ginecológica (a, b, c)

Infecciones monomicrobianas toxigénicas:

- Gangrena gaseosa (*Clostridium perfringens*)²
- Colitis pseudomembranosa (*Clostridium difficile*)
- Tétanos (*Clostridium tetani*)
- Botulismo (*Clostridium botulinum*)³

Otras infecciones:

- Actinomicosis (*Actinomyces israelii*)

¹ Suelen estar causadas por flora mixta aerobia y anaerobia que refleja el origen de la infección: (a) flora gingivodental y faríngea (bacteroides, fusobacterias, peptoestreptococos, estreptococos *viridans*, neisserias); (b) intestinal (bacteroides, fusobacterias, eubacterias, clostridios, enterobacterias, enterococo); (c) genital (peptoestreptococos, estreptococos, enterobacterias, bacteroides).

² *C. perfringens* y otros (véase texto).

³ La toxina se produce y libera en los alimentos.

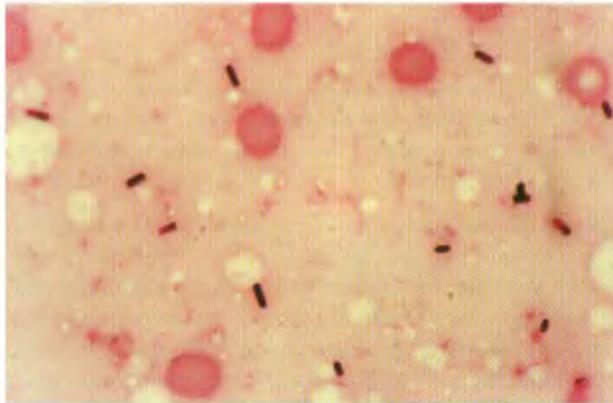


Figura 4.1. Exudado de gangrena. Tinción de Gram.

No se observan leucocitos polinucleares. Se observan bacilos grampositivos compatibles con clostridios.

robias, ofreciendo en este caso una imagen característica (Fig. 4.3).

Cultivo

Los medios de cultivo deben sembrarse inmediatamente después de la llegada del producto al laboratorio. Los medios mínimos a sembrar son una placa con agar sangre enriquecido con vitamina K₁, hemina y cisteína, y otra con agar sangre, enriquecido con los mismos elementos, pero selectivo para la flora anaerobia por incorporar amikacina y vancomicina. La amikacina y la van-

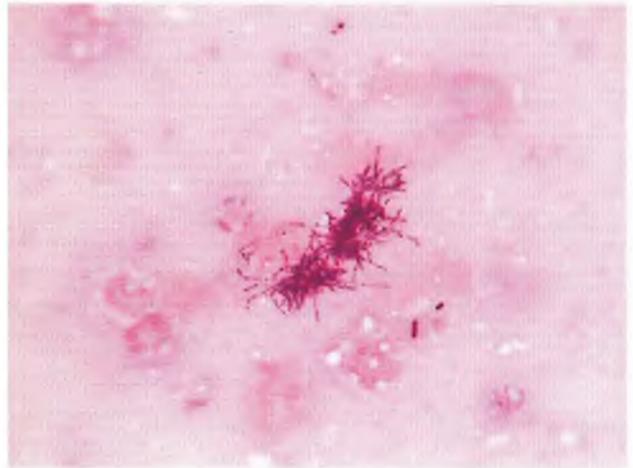


Figura 4.2. Actinomyces.

El género *Actinomyces* está formado por bacilos grampositivos ramificados de tinción irregular, anaerobios estrictos. Algunas de sus especies, como *A. israelii* y *A. naeslundii*, entre otras, causan diversas enfermedades probablemente de carácter oportunista como la actinomicosis cervico-facial, la enfermedad pélvica asociada a dispositivos intrauterinos y abscesos de diversa localización. Probablemente participan en la caries dental. Puede observarse *A. israelii* en una tinción de Gram efectuada en un pus de una supuración fistulosa actinomicótica.

comicina son antibióticos que inhiben gran parte de la flora aerobia (enterobacterias, pseudomonas, estafilococos, enterococos, etc.) permitiendo el crecimiento de la flora anaerobia. También es útil sembrar el material en un tubo con tioglicolato¹, que es un medio rico semisólido

¹ Alternativamente, puede usarse un medio con carne picada (*Cooked meat, chopped meat*).

lido, en el que el tioglicolato actúa como reductor, fijando el oxígeno; suele llevar un indicador de óxido-reducción (como la resazurina) para constatar su estado reducido. Idealmente, estos medios deben ser de preparación reciente o prerreducidos². También deben sembrarse los medios selectivos adecuados para recuperar la flora aerobia acompañante.

La incubación en anaerobiosis se efectúa colocando las placas de Petri o los tubos en jarras para cultivos anaerobios. Estas jarras, semejantes a una olla a presión, se cierran herméticamente y se hace el vacío en su interior

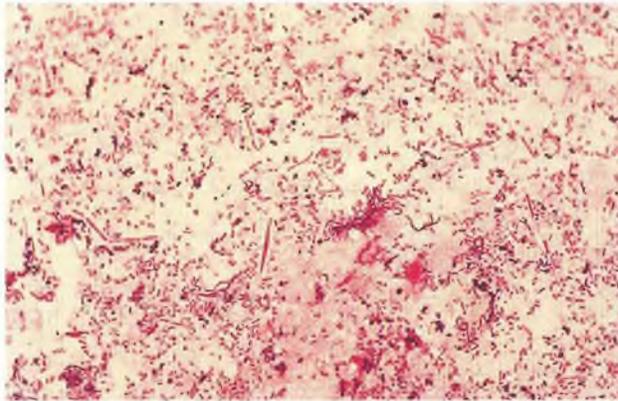


Figura 4.3. Infección polimicrobiana. Tinción de Gram.

Las asociaciones polimicrobianas con flora aerobia y anaerobia, como la que se observa en esta imagen son frecuentes en infecciones que se originan en la orofaringe, en el tubo digestivo y en el tracto genital femenino.

mediante una bomba aspirante, reemplazando el aire extraído por una mezcla de gases N_2 , O_2 y CO_2 (Fig. 4.4). La anaerobiosis también puede obtenerse por medios químicos; en una jarra como la señalada anteriormente, se introduce un sobre comercializado que contiene reactivos que al añadirle agua generan CO_2 e hidrógeno, el cual, en presencia de un catalizador (paladio), reacciona con el oxígeno produciendo agua y eliminando por tanto el oxígeno libre³. Existen bolsitas de plástico en las que caben una o dos placas de Petri, realizándose la anaerobiosis por métodos químicos. También se emplean estufas semejantes a las convencionales que cierran herméticamente, en las que puede efectuarse la anaerobiosis con facilidad mediante dispositivos automáticos que extraen el aire y lo sustituyen por mezclas gaseosas. Incluso algunas vitrinas para la manipulación pueden utilizarse posteriormente como estufas anaerobias, constituyendo verdaderas «estaciones» para la microbiología de los anaerobios (Fig. 4.4).

La incubación de los medios debe prolongarse durante varios días, ya que muchas bacterias anaerobias son de crecimiento lento. En determinadas circunstancias es útil sembrar dos juegos de placas, unas que se observan a los dos-tres días, y otras que no deben exponerse al oxígeno hasta su observación a los 5-15 días de incubación.

Muchas colonias de bacterias anaerobias son características de grupo, de género o de especie, como las de actinomicetos, clostridios, propionibacterias o las de pre-



Figura 4.4. Jarras y estaciones para cultivo de anaerobios.

Para el cultivo de las bacterias anaerobias, las placas y los tubos deben incubarse en recipientes de los que se ha eliminado el oxígeno. Existen pequeñas bolsas de plástico o jarras, como las que se representan en esta figura, de las que se puede eliminar el oxígeno por métodos físicos o químicos. Las estaciones-estufa anaerobias facilitan el trabajo cuando existe gran cantidad de muestras.

² Para prerreducir los medios, deben mantenerse en atmósfera anaerobia antes de su siembra. La prerreducción de los medios líquidos o semi-sólidos puede hacerse poniendo los tubos al baño María a ebullición unos minutos e introduciéndolos en un recipiente con agua fría inmediatamente antes de su uso.

³ BD Diagnostics; Difco Laboratories y Oxoid Inc entre otras compañías comercializan diversos sistemas de jarras y sobres para la incubación en anaerobiosis.

votela y porfiromonas, que producen un pigmento melánico característico (Fig. 4.5).

Identificación

Tras confirmar que las bacterias crecidas en las placas son anaerobias estrictas (véase el capítulo 3. *Identificación de las bacterias*) y determinar su morfología y apariencia tintórea (Gram) (Fig. 4.6), se identifican mediante pruebas metabólicas en medios prerreducidos y manipulados en condiciones de anaerobiosis. Alternativamente, pueden utilizarse paneles miniaturizados comercializados⁴. Estos paneles se basan en el estudio de pruebas metabólicas. Según el tipo de panel, la lectura debe hacerse tras 24 a 48 horas de incubación o a las cuatro horas.

La mayoría de estos paneles poseen una capacidad de identificación limitada o adecuada únicamente para algunas especies. Por ello, para una identificación precisa, las pruebas bioquímicas deben complementarse estudiando por cromatografía gaseosa los catabolitos específicos producidos por la fermentación de la glucosa y/o el perfil de ácidos grasos estructurales.

Para el estudio de los catabolitos de la glucosa, se siembra la bacteria a identificar en un medio adecuado, como el caldo PY con glucosa y se incuba en anaerobiosis durante 24-72 horas hasta observar un crecimiento abundante. Para la caracterización de los alcoholes y de los ácidos volátiles se realiza un extracto del cultivo en éter, mientras que para el análisis de los ácidos no volátiles, el extracto se realiza en cloroformo después de metilarlos con metanol y ácido sulfúrico. Los extractos se analizan en un cromatógrafo que detecta los picos



Figura 4.5. Bacilos gramnegativos anaerobios estrictos.

Este grupo de bacterias anaerobias incluye numerosos géneros y especies. Tradicionalmente se ha diferenciado el «grupo bilis resistente» («grupo *Bacteroides fragilis*») del resto de bacilos gramnegativos anaerobios estrictos por su mayor resistencia a los antimicrobianos. Las especies de los géneros *Prevotella* y *Porphyromonas* producen un pigmento negro característico.

producidos por los diferentes ácidos grasos de cadena corta (como, por ejemplo, los ácidos propiónico, butírico, láctico, etc.) (Protocolo técnico 4.1).

Las bacterias anaerobias esporuladas corresponden al género *Clostridium*. La forma y disposición de las esporas en los clostridios, que pueden ser redondas u ovaladas, terminales o subterminales, constituye un carácter taxonómico importante de las especies de este género, aunque en algunas son difíciles de observar (Fig. 4.7).

Los clostridios crecen bien en los medios selectivos para anaerobios señalados más arriba. Adicionalmente, como medio selectivo puede utilizarse el medio de yema de huevo y neomicina (NEY).

Aparte del interés obvio de las especies productoras de gangrena gaseosa, entre las que destaca *C. perfringens* (véase más arriba), en las infecciones polimicrobianas de



Figura 4.6. *Fusobacterium nucleatum*.

Las bacterias gramnegativas anaerobias estrictas presentan muy diferentes morfologías según la especie, desde bacilos gramnegativos semejantes a enterobacterias hasta pequeños cocobacilos y bacilos fusiformes alargados como los que se muestran en esta imagen.



Figura 4.7. Esporas de clostridio.

Puede observarse bacilos grampositivos con y sin esporas; las esporas son terminales y ovales (*C. ramosum*).

⁴ Algunas compañías que disponen de estos paneles son bioMérieux; BD Diagnostics, Dade Behring y Remel. Además, Rosco y Key Scientific Products disponen de reactivos para realizar pruebas metabólicas individualizadas.

origen intestinal pueden aislarse otras especies, como *C. clostridiiforme*, *C. innocuum*, *C. ramosum* o *C. butyricum*.

C. perfringens aparece en el examen directo como un bacilo grande, corto y grueso, con coloración irregular, con esporas ovales subterminales⁵; en ocasiones se observa capsulado y produce un doble halo de hemólisis característico en agar sangre (Fig. 4.8). Hidroliza la gelatina, digiere la leche y produce lecitinas observable en las placas de agar con yema de huevo.

El diagnóstico del tétanos es clínico. El aislamiento de *C. tetani* a partir de una lesión (cuando la lesión se conoce) suele ser excepcional.

El diagnóstico del botulismo (*C. botulinum*) también se efectúa basándose en la sintomatología clínica, pero deben recogerse los alimentos sospechosos y muestras de suero del paciente para remitirlas con urgencia a un centro especializado en la detección de toxina botulínica.

Para el aislamiento a partir de las heces de *Clostridium difficile*, causante de enteritis indiferenciada y colitis pseudomembranosa, se utiliza el medio selectivo agar cicloserina, cefoxitina, fructosa (CCFA), en el que forma colonias de aspecto característico, amarillas por fermentar la fructosa, estriadas y de olor inconfundible a heces de caballo. Morfológicamente, es un bacilo fino con esporas ovales subterminales que raramente se observan a partir de los cultivos. Alternativamente, el diagnóstico de la enteritis por *C. difficile* puede llevarse a cabo detec-



Figura 4.8. Cultivo en agar sangre de *Clostridium perfringens*.

Puede observarse el doble halo de hemólisis característico de las colonias de *C. perfringens*.

tando en las heces sus toxinas mediante técnicas inmunológicas (véase el capítulo 8).

Las especies de *Clostridium* se identifican por el aspecto de las colonias, la morfología microscópica y pruebas bioquímicas realizadas en sistemas como los indicados anteriormente; en algunas especies el perfil cromatográfico de los catabolitos es característico.

Antibiograma

La técnica estandarizada por el CLSI para el estudio de la sensibilidad de las bacterias anaerobias a los antimicrobianos es la de dilución en medio sólido. Es una técnica muy laboriosa de difícil incorporación en rutina, por lo que, en algunos laboratorios, periódicamente, se estudian de modo simultáneo gran número de bacterias anaerobias mediante esa técnica para conocer la epidemiología de las resistencias de este grupo bacteriano, lo que permite orientar el tratamiento empírico de las infecciones causadas por estos microorganismos.

La técnica de disco-difusión no está estandarizada para las bacterias anaerobias debido a la falta de correlación existente con la técnica estándar de dilución en agar. Sin embargo, se acepta que las técnicas de microdilución en caldo pueden ser utilizadas para el estudio de los miembros del grupo *Bacteroides fragilis*⁶.

La sencillez de realización de la técnica cuantitativa de Etest y su buena correlación con la técnica estándar de dilución aprobada por el CLSI hacen de esta técnica una alternativa muy válida para el estudio de la sensibilidad de este grupo bacteriano.

En las infecciones polimicrobianas, es imposible realizar antibiograma a todas las bacterias que las causan, por lo que el tratamiento es empírico y fundamentado en la epidemiología de la resistencia.

En caso de infecciones monomicrobianas, es interesante conocer la sensibilidad de la bacteria aislada a los antimicrobianos con actividad anaerobioicida⁷ (Tabla 4.2). En aquellos casos en que la penicilina es el antimicrobiano de elección, puede realizarse la detección de β -lactamasas por técnica cromogénica (Nitrocefín).

El tratamiento de las infecciones polimicrobianas con participación de bacterias anaerobias suele ser empírico y basado en los datos epidemiológicos de sensibilidad.

⁵ La esporulación es infrecuente en los medios de cultivo, para facilitarla se recomienda sembrar el microorganismo en agar *chopped meat* incubado en anaerobiosis a 37 °C y dejarlo envejecer.

⁶ Pueden utilizarse para el estudio de la sensibilidad de las bacterias anaerobias los paneles comercializados por PML Microbiologicals Inc. y Trek Diagnostics Systems entre otros. El CLSI ha publicado un documento de estandarización de las pruebas de sensibilidad para las bacterias anaerobias (www.clsi.org).

⁷ Poseen actividad anaerobioicida la penicilina, la ampicilina, amoxicilina, piperacilina, cefoxitina y otras cefamicinas, imipenem, ertapenem y otros carbapenem, cloranfenicol, tetraciclina, clindamicina y metronidazol. La amoxicilina con ácido clavulánico y la piperacilina con tazobactam, así como la cefoxitina, el imipenem y el ertapenem son activos frente a los bacteroides productores de betalactamasas.

Tabla 4.2
Interpretación de los valores de CIM de los antimicrobianos de elección a las bacterias anaerobias

Antimicrobiano	CIM (µg/ml)		
	S	I	R
Penicilina ¹	≤ 0,5	1	≤ 2
Ampicilina ¹	≤ 0,5	1	≤ 2
Amoxicilina-ácido clavulánico	≤ 4/2	8/4	≤ 16/8
Piperacilina-tazobactam	≤ 32/4	64/4	≤ 128/4
Cefoxitina	≤ 16	32	≤ 64
Imipenem	≤ 4	8	≤ 16
Ertapenem	≤ 4	8	≤ 16
Clindamicina	≤ 2	4	≤ 8
Metronidazol	≤ 8	16	≤ 32

¹ Las cepas productoras de betalactamasas han de considerarse resistentes a estos antimicrobianos independientemente de su CIM. CIM: concentración inhibitoria mínima; S: sensible; I: intermedio; R: resistente.

MICOBACTERIAS

Las micobacterias constituyen un grupo de bacterias de gran interés en medicina, ya que junto a especies telúricas y oportunistas se hallan dos especies patógenas de gran importancia, *Mycobacterium tuberculosis* (bacilo de Koch) y *M. leprae* (bacilo de Hansen).

M. tuberculosis es un microorganismo con elevada virulencia que causa la tuberculosis. El reservorio es fundamentalmente humano y la forma contagante de la enfermedad es la pulmonar. El enfermo de tuberculosis pulmonar elimina el bacilo de Koch al hablar, estornudar o toser. Cuando un huésped susceptible inhala partículas de 1 a 5 µm contaminadas, *M. tuberculosis* llega a los alvéolos pulmonares, donde es fagocitado por los macrófagos, y puede diseminarse por vía linfática y hematogena por todo el organismo (primoinfección tuberculosa).

En la mayoría de los casos, la primoinfección es subclínica y la respuesta inmune celular del huésped limita la multiplicación y diseminación de *M. tuberculosis*. No obstante, algunos bacilos permanecen latentes durante muchos años. La primoinfección puede detectarse explorando la respuesta inmunitaria celular frente al bacilo de Koch (prueba de la tuberculina o intradermoreacción de Mantoux [Fig. 4.9], capítulo 8). Las personas con infección latente presentan durante su vida un riesgo medio del 10 al 20% de reactivar clínicamente la infección, aunque la mayoría de los casos se dan en los dos primeros años después de la primoinfección. La tuberculosis de reactivación más frecuente es la pulmonar, aunque también pueden darse otras formas de reactivación: ósea, renal, genital o del sistema nervioso central (meningitis). En los enfermos con sida, la progresión de la pri-

mo infección tuberculosa a enfermedad es mucho más rápida, resultando frecuentes las formas diseminadas.

El complejo *M. tuberculosis* incluye además de *M. tuberculosis* a *M. bovis*, *M. bovis*-BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae* y *M. pinnipedii*. *M. bovis* causa enfermedad en el ganado, en el hombre y algunos primates, en carnívoros (que incluyen perros y gatos) y pájaros. En el hombre la infección es indistinguible de la causada por *M. tuberculosis*. La pasteurización de la leche ha hecho dis-



Figura 4.9. Prueba de Mantoux.

Puede observarse la reacción inmune retardada que aparece entre 24 y 48 horas después de la inoculación intradérmica de un antígeno proteico purificado, obtenido a partir de la tuberculina de Koch (PPD), en una persona infectada por *Mycobacterium tuberculosis*. Lo característico no es el eritema, sino la induración que se produce como consecuencia del infiltrado celular (la induración se observa o es palpable). La infiltración desaparece entre cuatro y siete días después de la inoculación del antígeno.

minuir considerablemente los casos humanos. *M. bovis*-BCG (bacilo de Calmette y Guérin) es una cepa de *M. bovis* atenuada en el laboratorio que se utiliza como vacuna para la tuberculosis en muchas partes del mundo. *M. africanum* se encuentra en varias regiones del África tropical donde puede llegar a ser responsable de hasta el 60% de la tuberculosis humana. *M. microti* da lugar a enfermedad en algunos roedores y solo excepcionalmente en el hombre. *M. canettii*, cuyo reservorio es desconocido, se ha aislado en unos pocos casos de tuberculosis humana ocurridos fundamentalmente en el cuerno de África. *M. caprae* se ha aislado de lesiones granulomatosas en el ganado vacuno, cabras, ovejas, ciervos y también en humanos. Finalmente, *M. pinnipedii* causa enfermedad en diversas especies de focas.

La lepra es una enfermedad granulomatosa crónica causada por *M. leprae*. El reservorio es humano. El espectro de la enfermedad, que afecta a la piel, las mucosas y los nervios contiguos, oscila desde una forma localizada, granulomatosa, con muy pocos bacilos en las lesiones (lepra tuberculoide), a una forma generalizada con una gran multiplicación bacilar por la ausencia de una inmunidad celular efectiva (lepra lepromatosa). *M. leprae* se diferencia de las demás micobacterias en el hecho de que no puede cultivarse en medios de cultivo artificiales.

Las dos especies de micobacterias no pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* que se aíslan con mayor frecuencia con significación clínica en los laboratorios de microbiología son *M. kansasii* y el complejo *M. avium*. La forma clínica más frecuente de infección por *M. kansasii*, que es una micobacteria ambiental, con cierto grado de virulencia, es una infección pulmonar crónica parecida a la tuberculosis. La infección suele darse en personas con enfermedad respiratoria crónica.

Tradicionalmente, en el complejo *M. avium* se incluyen dos especies: *M. avium* y *M. intracellulare*. Existen evidencias de una tercera especie cuyos miembros se conocen como cepas MAC-X. En *M. avium*, en función de datos fenotípicos y genotípicos, se han propuesto tres subespecies: *M. avium* subsp *avium*, *M. avium* subsp *paratuberculosis* y *M. avium* subsp *silvaticum*. *M. avium* y *M. intracellulare*, de hábitat telúrico, patógenas para las aves y los cerdos, ocasionalmente causan infección pulmonar crónica en pacientes con factores predisponentes. *M. avium* es también una causa frecuente de adenopatía cervical en niños.

En los enfermos con sida, antes de la introducción de los actuales tratamientos, eran frecuentes las infecciones diseminadas por *M. avium*. En aquellos pacientes también se observaban infecciones diseminadas por *M. kansasii* y *M. genavense*. Para el aislamiento de *M. genavense*, puede utilizarse agar de Middlebrook 7H11 suplementado con micobactina J, o medios con pH ácido, como el Bactec 7H12 PZA (utilizado como control en el antibiograma de pirazinamida), o el agar de Middlebrook acidificado y suplementado con sangre o carbón. Las

condiciones de microaerofilia también favorecen el crecimiento de *M. genavense*. Esta especie crece con extraordinaria lentitud (hasta seis meses).

La infección por *M. haemophilum* se caracteriza por la presencia de nódulos cutáneos múltiples, observándose en pacientes con sida, trasplantados de riñón o de médula ósea. Para realizar el diagnóstico microbiológico, deben tenerse en cuenta los requerimientos nutricionales de esta especie (hemina, citrato férrico amónico), aunque crece bien en agar chocolate; su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C.

M. marinum, de hábitat acuático, da lugar a infecciones cutáneas papulonodulares o granulomas subcutáneos por contaminación de heridas a partir del agua (peceras y otros reservorios). *M. ulcerans* produce una lesión cutánea ulcerada, propia de los trópicos (para ambas especies, la temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C).

Las micobacterias de crecimiento rápido, como *M. fortuitum* o *M. chelonae*, pueden causar infecciones de heridas (quirúrgicas y traumáticas), así como infecciones asociadas a cuerpos extraños (catéteres).

En la tabla 4.3 se recogen otras especies que dan lugar a infección oportunista con menor frecuencia o que pueden aislarse en el laboratorio como colonizantes o contaminantes de las muestras clínicas.

Diagnóstico

Para el diagnóstico de las infecciones causadas por micobacterias, se sigue el mismo procedimiento que para el de otras bacterias, examen directo, cultivo e identificación, además del estudio de la sensibilidad a los fármacos antituberculosos cuando está indicado.

El diagnóstico se ve influido por dos características de estas bacterias: la lentitud de su crecimiento y el alto contenido lipídico de su pared. En efecto, la pared de las micobacterias se caracteriza por su riqueza en lípidos y, aunque estructuralmente puedan ser consideradas como bacterias grampositivas, no se tiñen mediante la tinción de Gram.

Por otra parte, el crecimiento de muchas micobacterias es lento, por lo que, cuando se pretende aislarlas de productos como el esputo o la orina, donde existen bacterias comensales de crecimiento rápido, éstas deben eliminarse para que su sobrecrecimiento no impida la recuperación de las micobacterias en los cultivos. La eliminación de las bacterias comensales acompañantes (decontaminación) es posible gracias a la especial estructura de la pared, que confiere a las micobacterias una mayor resistencia a diversas sustancias químicas.

Examen microscópico

Para la visualización de las micobacterias en los productos patológicos se utiliza la tinción de Ziehl-Neel-

Tabla 4.3
Clasificación de las micobacterias

Grupo	Microorganismo	Hábitat	Acción patógena	Observaciones
Crecedores lentos:				
No cromógenos	<i>M. tuberculosis complex</i>	Humano. Animales de sangre caliente	Patógeno primario	Tuberculosis
	<i>M. avium complex</i>	Ambiental. Animales de sangre caliente	Oportunista	Infección broncopulmonar. Adenopatías en niños. Infección diseminada en pacientes con sida (véase texto)
	<i>M. genavense</i>	Desconocido. Pájaros	Oportunista	Infección diseminada en pacientes con sida
	<i>M. haemophilum</i>	Desconocido	Oportunista	Nódulos cutáneos múltiples en pacientes con sida y transplantados (riñón, médula ósea)
	<i>M. mageritense</i>	Ambiental	Oportunista	Linfadenitis en niños. Enfermedad pulmonar crónica
	<i>M. celatum</i>	Desconocido	Oportunista	
	<i>M. ulcerans</i>	Plantas. Koalas	Patógeno	Infección ulcerada en los trópicos. Úlcera de Buruli (Africa). Úlcera de Bairnsdale (Australia)
	<i>M. terrae</i>	Ambiental	Excepcional	Tenosinovitis postraumática
	<i>M. gastri</i>	Ambiental	Excepcional	
	Fotocromógenos	<i>M. kansasii</i>	Ambiental. Ganado	Oportunista
<i>M. marinum</i>		Agua. Peces	Oportunista	Infecciones cutáneas papulonodulares o esporitricoides asociadas a heridas contaminadas con agua
<i>M. simiae</i>		Primates. ¿Agua?	Excepcional	Áreas geográficas limitadas. Enfermedad pulmonar crónica. Infección diseminada
Escotocromógenos	<i>M. xenopi</i>	Agua	Oportunista	Infección pulmonar. Infecciones diseminadas en inmunodeprimidos
	<i>M. goodii</i>	Agua	Excepcional	
	<i>M. scrofulaceum</i>	Ambiental	Oportunista	Linfadenitis en niños. Enfermedad pulmonar. Infección diseminada
	<i>M. flavescens</i>	Ambiental	Excepcional	
Crecedores rápidos				
	Grupo <i>M. fortuitum</i>	Ambiental	Oportunista	Infección de heridas (quirúrgica, traumática). Celulitis. Osteomielitis
	<i>M. chelonae</i>	Agua. Murciélagos	Oportunista	Nódulos cutáneos diseminados en inmunodeprimidos. Infección de heridas
	<i>M. abscessus</i>	Agua	Oportunista	Enfermedad pulmonar crónica. Infección de heridas. Enfermedad cutánea diseminada en inmunodeprimidos
	<i>M. mucogenicum</i>	Agua	Oportunista	Infección de heridas
	<i>M. smegmatis</i>	Superficies húmedas. Flora urogenital	Excepcional	Infección de heridas
No crecen en medios de cultivo	<i>M. leprae</i>	Humano	Patógeno primario	Lepra

Crecedores lentos: > siete días; crecedores rápidos: < siete días (Medio de Lowenstein Jensen). No cromógenos: no forman pigmento. Fotocromógenos: sólo forman pigmento en presencia de luz y de oxígeno. Escotocromógenos: producen pigmento tanto en presencia como en ausencia de luz.

sen, que se basa en la resistencia de estas bacterias a la decoloración por la acción de ácidos y alcoholes, lo que depende de la estructura de su pared (Figs. 4.10 y 4.11). También pueden utilizarse, con un procedimiento semejante a la tinción de Ziehl, colorantes fluorescentes, como la auramina, que facilitan el examen directo al poder efectuarlo a menores aumentos, abarcando mayor superficie de campo observado, por lo que se requiere menor tiempo de observación (Fig. 4.12).

Para realizar la tinción de Ziehl-Neelsen, ha de prepararse una extensión en un porta como se efectúa para la tinción de Gram. En la primera parte de la tinción, se baña la preparación con fucsina, y todos los elementos de la preparación quedan teñidos de rojo intenso. Al lavar

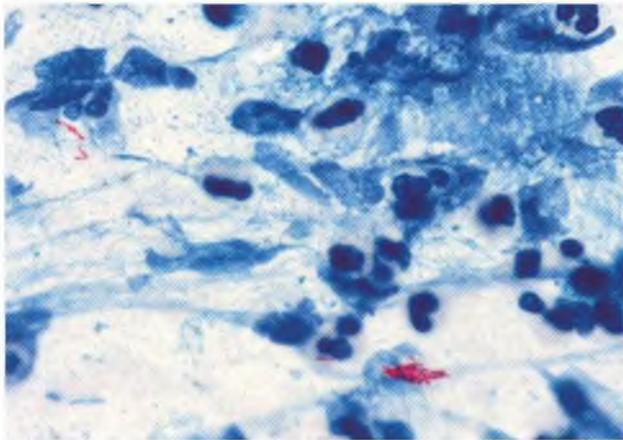


Figura 4.10. Tinción de Ziehl. *Mycobacterium tuberculosis*.

Las micobacterias, en la tinción de Ziehl-Neelsen aparecen como alcohol ácido resistentes, con un color rojo característico.

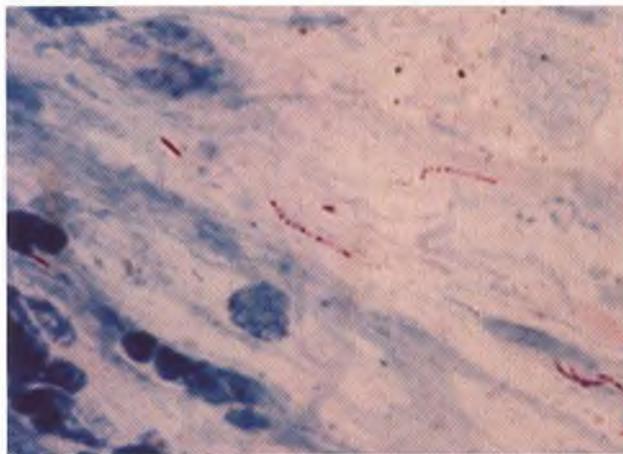


Figura 4.11. Tinción de Ziehl. *Mycobacterium kansasii*.

Algunas micobacterias poseen caracteres morfológicos que permiten sospechar su identificación. *M. kansasii* presenta una tinción irregular con listas, atigrada.

con una mezcla de alcohol y ácido clorhídrico, las micobacterias conservan dicha coloración, mientras que las otras bacterias la pierden. Las que conservan el color rojo se denominan alcohol-ácido resistentes, y las que lo pierden, no alcohol-ácido resistentes. En la segunda parte de la tinción, se hace actuar el azul de metileno, que es un colorante que contrasta marcadamente con el primero, para teñir las bacterias y los demás elementos no alcohol-ácido resistentes que han quedado decolorados.

La tinción de Ziehl-Neelsen posee gran utilidad, ya que las micobacterias son alcohol-ácido resistentes y tienen una forma característica, por lo que pueden reconocerse con facilidad en las preparaciones⁸ (Figs. 4.10 y 4.11) (Protocolo técnico 4.2).

El diagnóstico de la lepra es fundamentalmente clínico, pero puede confirmarse, especialmente en la forma lepromatosa, por la observación de bacilos alcohol-ácido resistentes (Ziehl-Neelsen) en el raspado de la mucosa nasal o en la biopsia de las lesiones cutáneas.

Técnicas de cultivo

Los productos a cultivar procedentes de territorios estériles, como el líquido cefalorraquídeo o una muestra de biopsia (ganglionar, etc.), pueden sembrarse directamente en los medios de cultivo, pero los que proceden o atraviesan territorios con flora comensal, como el esputo o la orina, antes de sembrarlos hay que decontaminar la muestra de la flora comensal.

La decontaminación puede llevarse a cabo sometiendo la muestra a tratamientos con sustancias como el hidró-

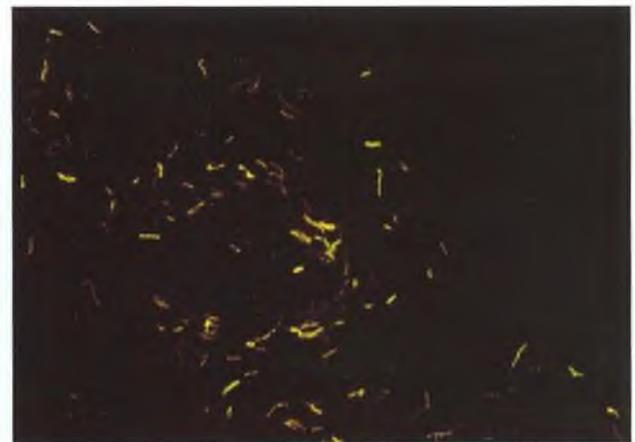


Figura 4.12. Tinción con auramina.

Por un procedimiento semejante al de la tinción de Ziehl y utilizando auramina en lugar de fucsina, las micobacterias se tiñen selectivamente con este colorante fluorescente. El examen microscópico de una muestra clínica, con esta tinción puede hacerse a 400 aumentos en lugar de x 1.000 lo que permite explorar más superficie de la preparación en menos tiempo, lo que incrementa la sensibilidad de la observación.

⁸ Además de las especies de *Mycobacterium*, también pueden aparecer alcohol-ácido resistentes las especies de los géneros *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, *Dietzia* y *Gordonia*; éstas, sin embargo, son débilmente alcohol-ácido resistentes, por lo que deben teñirse por la técnica de Kinyoun, ya que, a diferencia de las micobacterias, si se tiñen por la técnica de Ziehl-Neelsen, pueden aparecer como no alcohol-ácido resistentes (Tabla 4.4).

Tabla 4.4
Bacterias alcohol-ácido resistentes de interés en medicina

	AAR	Filamentos aéreos	Morfología microscópica
<i>Mycobacterium</i>	+	-	Bacilos
<i>Nocardia</i>	+ ¹	+	Filamentos ² entrecruzados de tinción irregular
<i>Rhodococcus</i>	+ ¹	-	Cocos y bacilos
<i>Tsukamurella</i>	+ ¹	-	Cocos y bacilos
<i>Gordonia</i>	+ ¹	-	Cocos y bacilos
<i>Dietzia</i>	+ ¹	-	Cocos y bacilos

¹ Son débilmente alcohol-ácido resistentes, por lo que deben teñirse por la técnica de Kinyoun, ya que teñidos por la técnica de Ziehl-Neelsen pueden aparecer como no alcohol-ácido resistentes.

² Este aspecto es característico de las nocardias en las muestras clínicas (Fig. 21.8). En los cultivos pueden adquirir apariencia pleomórfica. Muchas de las especies de estos géneros presentan una morfología característica al microscopio.
AAR: alcohol-ácido resistencia; +: positivo; -: negativo.

xido sódico o el fosfato trisódico, asociados a fluidificantes (agentes mucolíticos, tipo N-acetil-cisteína o similares), que cuando se mezclan durante períodos precisos de tiempo con el material clínico destruyen la flora contaminante manteniéndose viables las micobacterias, aunque el exceso de tratamiento puede destruirlas. En el caso del esputo, los fluidificantes tienen además la misión de licuar la muestra. Tras este tratamiento, el pH debe neutralizarse y concentrar la muestra por centrifugación para efectuar el examen microscópico y sembrar los medios de cultivo.

Para el aislamiento de las micobacterias, se utilizan tanto medios sólidos como líquidos. Los medios sólidos pueden ser de formulación compleja, con base de huevo, como el medio de Löwenstein Jensen, o semisintéticos,

con base de agar, como los medios de Middlebrook 7H10 y 7H11 (Figs. 4.13 y 4.14). Suelen verterse en tubos en forma de agar inclinado y se siembran en la superficie, incubándose durante largos períodos de tiempo bien cerrados para que no se des sequen. Los medios líquidos se utilizan en frascos cerrados herméticamente y suelen basarse en formulaciones parecidas al medio de Middlebrook 7H9 suplementado con diversos factores de crecimiento y mezclas de antibióticos. Además de que los medios semisintéticos pueden suplementarse con facilidad para enriquecerlos o hacerlos selectivos, las formulaciones líquidas, como el 7H9, pueden dispensarse en frascos o botellas que tras ser inoculados se incuban en estufas permitiendo su lectura automática (continua o periódica). Estos sis-

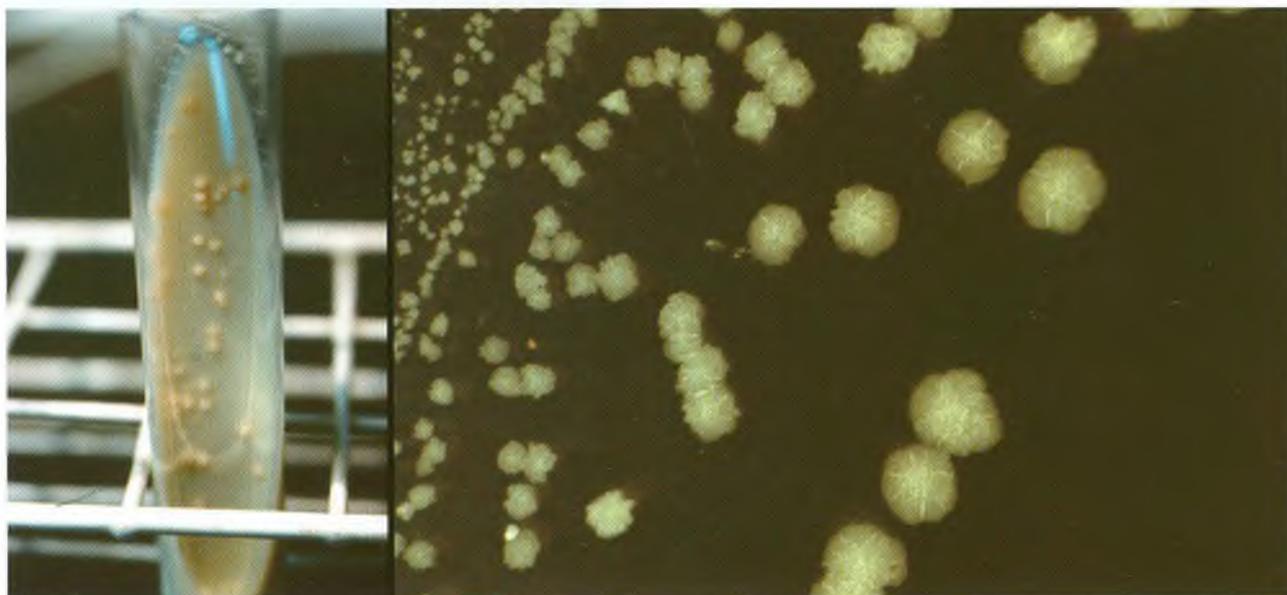


Figura 4.13. Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*.

Pueden observarse las colonias características de *M. tuberculosis* en el medio tradicional de Lowenstein-Jensen (izquierda). También puede observarse un cultivo en el agar de Middlebrook 7H10 (derecha).



Figura 4.14. Cultivo de *Mycobacterium marinum* en Lowenstein-Jensen.

M. marinum causa granulomas cutáneos. Su reservorio son las peceras y otros hábitats acuáticos. Su temperatura óptima de crecimiento es de 28-30 °C. Las colonias son fotocromógenas.

temas automáticos detectan el inicio de la multiplicación bacteriana muy precozmente, en relación con los cultivos convencionales en medio sólido, como el de Löwenstein, en los que no se consigue visualizar las colonias de las especies de crecimiento lento hasta después de 15-45 días de incubación. Por otra parte, algunas micobacterias exigentes sólo pueden aislarse en medios líquidos.

Según el método de detección, estos sistemas automáticos se dividen en radiométricos y no radiométricos. El sistema radiométrico BACTEC® (BD Diagnostics) detecta la producción de CO₂ radioactivo (C¹⁴O₂) a partir de ácido palmítico marcado con C¹⁴. Por razones obvias, actualmente se imponen los sistemas no radiométricos. Éstos, se basan en la detección de cambios de color de una membrana indicadora (MB-BacT®, bioMérieux), o de cambio de la presión de los gases contenidos en los frascos (ESP® culture System II, Trek Diagnostic Systems) o en la emisión de fluorescencia (BACTEC 960 MGIT®, BD Diagnostics). El sistema radiométrico requiere autorizaciones especiales para el manejo de radioisótopos, lo que dificulta su introducción en el laboratorio de microbiología.

La selección de medios para el aislamiento de las micobacterias es una decisión basada en las preferencias personales y/o la tradición del laboratorio. Se acepta que para una recuperación óptima es necesaria la utilización de un medio líquido combinado con un medio sólido.

Anteriormente se han expuesto las ventajas de los medios líquidos. Los medios sólidos aportan la visualización de la morfología colonial como primer paso en la identificación, así como la posibilidad de detectar cultivos mixtos.

Identificación

Para la identificación de las micobacterias se utilizan diversas características biológicas y metabólicas. Inicialmente, se subdividen en varios grupos, en función de la velocidad de crecimiento (crecedores lentos y rápidos) y de la pigmentación de las colonias (escotocromógenos, fotocromógenos y no cromógenos) (véase pie de la tabla 4.3).

En cada uno de estos grupos se estudian diversas propiedades metabólicas. Así, por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis* es de crecimiento lento (superior a siete días), sus colonias no son pigmentadas, es niacina positiva, produce una catalasa termolábil y una nitrato reductasa (Tabla 4.5).

Las micobacterias también pueden identificarse mediante el estudio de la composición en ácidos micólicos y ácidos grasos de su pared por técnicas cromatográficas, pero éstos son procedimientos complejos utilizados en laboratorios especializados.

Por último, existen comercializadas sondas de DNA, de utilización sencilla, que identifican por técnicas de hibridación las especies que se aíslan con más frecuencia, como *M. tuberculosis complex*, *M. kansasii*, *M. goodii* y *M. avium complex* (capítulo 9). La identificación por técnicas genéticas es mucho más rápida que por las técnicas metabólicas convencionales. En la tabla 4.6 se propone un esquema para la identificación rápida de las principales especies de micobacterias (Fig. 4.15).

Antibiograma

El antibiograma de *M. tuberculosis* requiere técnicas especiales, diferentes a las que se utilizan para otras bacterias. Esto es debido a la lentitud con que crece *M. tuberculosis* y a la necesidad de que estas técnicas sean capaces de cuantificar el número de mutantes naturales resistentes existentes en la población bacteriana estudiada. El método más utilizado es el de las proporciones de Canetti, que consiste en evaluar la proporción de bacilos resistentes que existe en una población de *M. tuberculosis*. Por ello, debe utilizarse un inóculo que, sembrado en la superficie del medio de Lowenstein-Jensen, dé un número abundante de colonias pero fácilmente contable. Este inóculo se siembra en tubos con el medio de

Tabla 4.5
Pautas para la identificación de algunas micobacterias de interés en medicina

Especie	Crecimiento		Pigmento ¹	Niacina	Reducción de nitratos	Catalasa (68 °C)	Arylsulfatasa (3 días)	Hidrólisis Tween (10 días)	Crecimiento ²		Sondas comercializadas
	Velocidad	T° óptima (°C)							Na Cl (5%)	T2H (10 µ/ml)	
<i>M. tuberculosis</i>	lenta	37	NC	+	+	-	-	v	-	+	Sí ³
<i>M. africanum</i>	lenta	37	NC	v	v	-	-	-	-	v	Sí
<i>M. bovis</i>	lenta	37	NC	-	-	-	-	v	-	-	Sí
<i>M. kansasii</i>	lenta	35	FC	-	+	+	-	+	-	+	Sí
<i>M. marinum</i>	lenta	30	FC	v	-	v	v	+	-	+	
<i>M. avium complex</i>	lenta	35-37	- ⁴	-	-	+	-	-	-	+	Sí ⁵
<i>M. celatum</i>	lenta	35	NC	-	-	+	+	-	-	+	
<i>M. ulcerans</i>	lenta	30	NC	-	-	+	-	-	-	+	
<i>M. genavense</i>	lenta	37	NC	-	-	+	-	+	-	+	
<i>M. haemophilum</i>	lenta	30	NC	∅	-	-	-	-	-	+	
<i>M. malmoense</i>	lenta	30	NC	-	-	v	-	+	-	+	
<i>M. scrofulaceum</i>	lenta	37	SC	-	-	+	v	-	-	+	
<i>M. xenopi</i>	lenta	42	SC	-	-	v	+	+	-	+	
<i>M. goodii</i>	lenta	37	SC	-	-	+	v	+	-	+	Sí
Grupo <i>M. fortuitum</i> ⁶	rápida	28-30	NC	-	+	+	+	v	+	+	
<i>M. chelonae</i>	rápida	28-30	NC	v	-	v	+	v	v	+	
<i>M. abscessus</i>	rápida	28-30	NC	-	-	∅	+	v	v	∅	

¹ NC: no cromógena, SC: escotocromógena, FC: fotocromógena.

² En el medio MacConkey sin cristal violeta solamente crece el grupo *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus*.

³ Sonda del complejo *M. tuberculosis*. No diferencia entre especies.

⁴ Algunas especies son escotocromógenas.

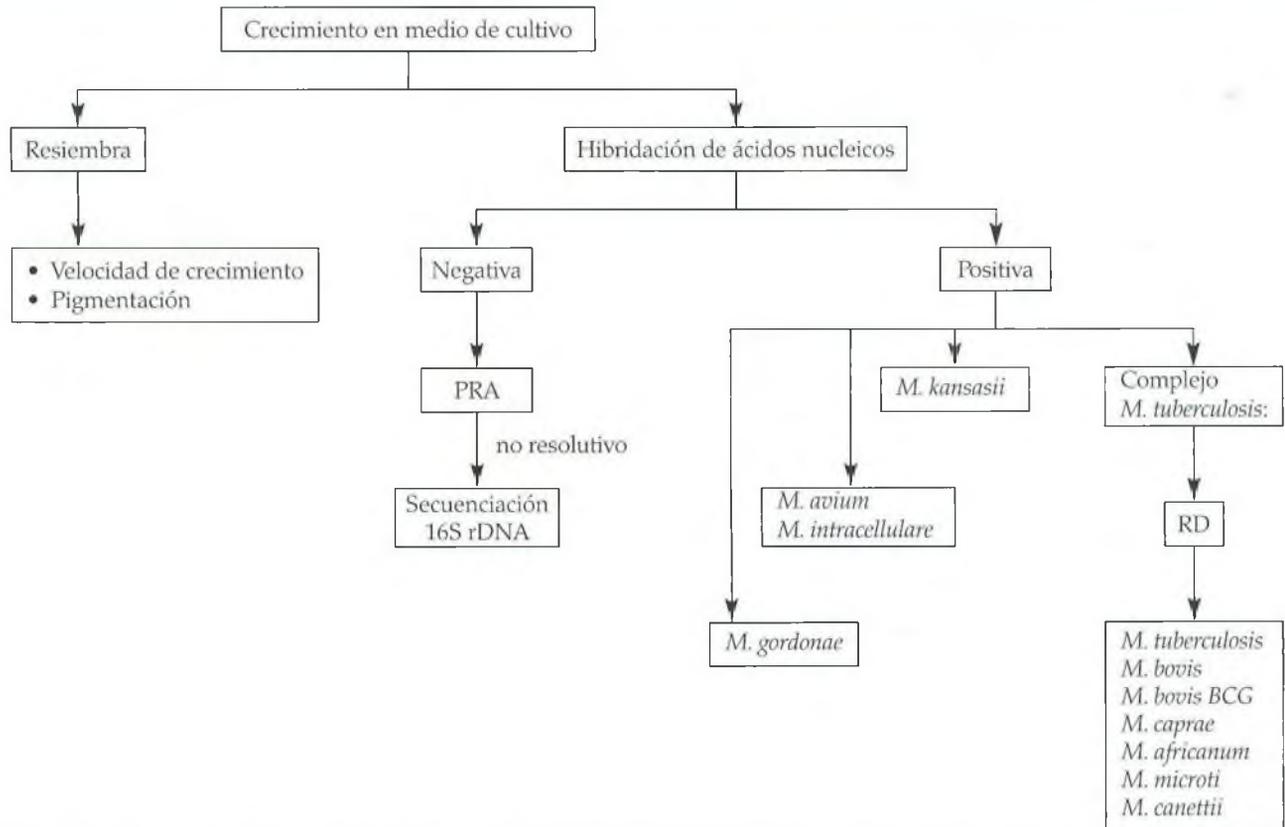
⁵ Existe una sonda del complejo *M. avium* y sondas de las especies *M. avium* y *M. intracellulare*.

⁶ Incluye *M. fortuitum*, *M. peregrinum* y *M. fortuitum* tercera biovariedad.

+ : positivo; - : negativo; v : variable; ∅ : no utilizado.

T2H: Hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico.

Tabla 4.6
 Algoritmo para la identificación rápida de las micobacterias utilizando técnicas de biología molecular



PRA: patrón de amplificación y restricción. Se amplifica un determinado fragmento de DNA, en este caso de la *heat shock protein* 65k Da y el producto de amplificación se digiere independientemente con varios enzimas de restricción, los fragmentos resultantes de la digestión se separan mediante electroforesis en un gel de agarosa. Las especies se caracterizan por uno o más patrones de bandas (Fig. 4.15).

RD: análisis de las regiones de diferencia. Las deleciones de material genético en determinadas regiones de diferencia permite separar los miembros del complejo *M. tuberculosis*. Estas RD se amplifican por PCR y el tamaño de los amplificados permite conocer si ha ocurrido o no la pérdida de material genético en las regiones estudiadas.

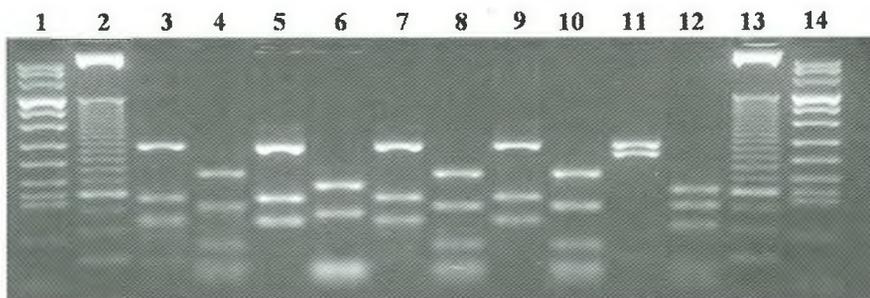


Figura 4.15. Restricción del gen de la *heat shock protein* de 65 kDa de micobacterias.

La técnica de PRA (PCR-restriction endonuclease analysis) consiste en la identificación de un microorganismo amplificando una secuencia de DNA y estudiando sus patrones de restricción cuando son específicos de especie. Un fragmento del gen *hsp65* (*heat shock protein* de 65 kDa) se amplifica y se corta mediante las enzimas de restricción *BstEII* y *HaeIII*, independientemente. La combinación de los perfiles de restricción generados por ambas enzimas permite la identificación de las micobacterias.

Canales 1, 2, 13, 14: marcadores de peso molecular. Calles 3 y 4; 7 y 8; 9 y 10: *M. xenopi*. Calles 5 y 6: *Mycobacterium* no identificado (debe identificarse por secuenciación). Canales 11 y 12: *M. kansasii* genotipo I. En cada una de las calles de los diferentes pares: 3 y 4; etc. la restricción se ha hecho con una enzima diferente, lo que explica que los perfiles de cada par de calles sean diferentes entre sí. <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>.

Lowenstein-Jensen con antibiótico y sin antibiótico. De esta manera, pueden contarse las colonias crecidas en ambos medios y deducir la proporción de bacilos resistentes (número de colonias en el medio con antibiótico) sobre la totalidad de la población bacilar estudiada (número de colonias en el medio sin antibiótico). La cepa se considerará resistente al antibiótico si el número de mutantes resistentes es superior al 1%.

El antibiograma de *M. tuberculosis* no suele efectuarse de modo sistemático, ya que es una técnica laboriosa, lenta y cara y el número de cepas resistentes

en personas sin tratamiento previo (resistencia primaria) es bajo. Por ello, sólo se indica en pacientes con factores de riesgo de infección por bacilos con resistencia primaria o para poder seleccionar un régimen terapéutico adecuado en enfermos previamente tratados en los que se sospecha una resistencia adquirida a determinados fármacos. El incremento de cepas resistentes y la disposición de técnicas más sencillas y económicas puede modificar en un futuro inmediato estos criterios de estudio.

El sistema radiométrico BACTEC®, así como algunas técnicas automatizadas de cultivo en medios líquidos (MB-BacT®, MIGIT®) se han adaptado para practicar antibiogramas de *M. tuberculosis* obteniéndose resultados fiables y más rápidos que por el método de las proporciones.

Existe un reactivo comercializado (INNO LiPA®, Innogenetics), basado en una técnica de hibridación inversa, que permite detectar las mutaciones puntuales que confieren resistencia a la rifampicina en *M. tuberculosis*.

LOS HONGOS. CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN

Los hongos están formados por células eucariotas. El DNA está organizado en cromosomas que se hallan envueltos por la membrana nuclear. El citoplasma, con orgánulos membranosos y abundantes ribosomas, está limitado por una membrana citoplasmática rica en ergosterol. Recubriendo la membrana se encuentra una pared celular rígida de estructura polisacárida compleja, compuesta mayoritariamente por quitina, mananos y glucanos, que protege de la lisis osmótica y regula el paso de moléculas. Tienen un metabolismo de tipo quimioheterótrofo absorptivo, es decir, obtienen la energía y el carbono absorbiendo los nutrientes de la materia orgánica, que descomponen mediante la producción de exoenzimas. Pueden reproducirse por medio de procesos asexuales —mediante división binaria o formando esporas asexuales— o a través de esporas sexuales.

Los hongos pueden ser unicelulares o pluricelulares. Los primeros están formados por células aisladas redondas u ovaladas, denominadas levaduras. Los pluricelulares están constituidos por células alargadas que crecen por extensión de sus extremos, tabicándose de un modo más o menos completo, formando largos filamentos denominados hifas que con frecuencia se ramifican. Estos hongos, denominados mohos, al crecer forman matas de filamentos entrelazados, como puede apreciarse en el pan o las frutas enmohecidas (Fig. 5.1).

Otros hongos filamentosos son macroscópicos, forman estructuras con un elevado nivel de complejidad y organización de sus hifas y presentan una morfología característica; constituyen las denominadas setas.

Levaduras

Las levaduras tienen forma redonda u oval, con un diámetro de entre 3 y 30 μm , por lo que pueden observarse fácilmente mediante el microscopio óptico. Se reproducen asexualmente mediante gemación, que es un proceso de división binaria mitótica convencional, en el que a partir de una célula madre se forman protuberancias protoplásmicas o yemas (también llamadas blastoconidios) que irán creciendo hasta separarse y formar una nueva célula. En ocasiones, las células hijas no se separan y forman cadenas de células, que se denominan pseudohifas (seudomicelios) y pueden confundirse con

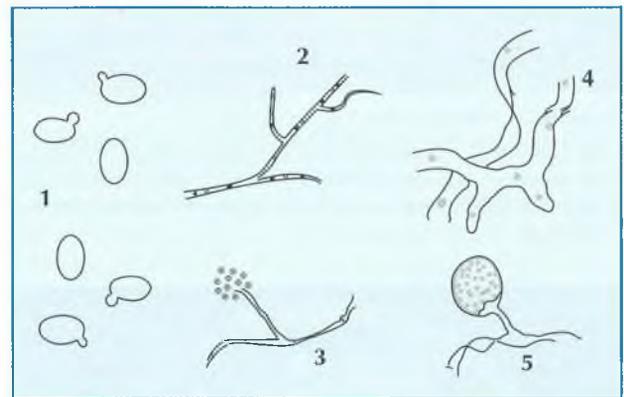


Figura 5.1. Morfología de los hongos.

1. Las levaduras son hongos unicelulares, redondos u ovalados, que se reproducen por gemación. Se representa alguna célula dividiéndose mediante formación de yemas (gemación).
2. Los hongos filamentosos (mohos) son pluricelulares. Están constituidos por células alargadas que forman filamentos, denominados hifas, que se entrecruzan. Los hongos filamentosos superiores están formados por células fúngicas alargadas y finas, separadas por septos.
3. Estos hongos forman esporas asexuales (conidias) de localización externa en el extremo de un conidióforo.
4. El micelio de los hongos filamentosos inferiores es más ancho que el de los superiores y presenta escasos septos, formando un sincitio celular (el citoplasma es continuo y contiene numerosos núcleos).
5. Las esporas asexuales de los hongos inferiores se sitúan en el interior de un sáculo (esporangio). Algunos hongos de todos los grupos señalados pueden formar esporas de resistencia llamadas artrosporas, que son rectangulares, en forma de tonel (Fig. 5.13).

una hifa. Sin embargo, algunas levaduras pueden formar hifas verdaderas (Fig. 5.2). En los medios de cultivo sólidos las levaduras crecen dando lugar a colonias compactas, visibles macroscópicamente a las 24-48 horas de incubación, muy similares a las bacterianas (Fig. 5.3).

Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son pluricelulares; las células son alargadas, con una anchura de 3 a 15 μm de diámetro y de longitud variable. Crecen por extensión apical, tabicándose para formar nuevas células que no se desprenden. Los filamentos celulares así constituidos se denominan hifas y van ramificándose con frecuencia hasta formar un conjunto entrelazado de hifas que se denomina micelio (Fig. 5.4).

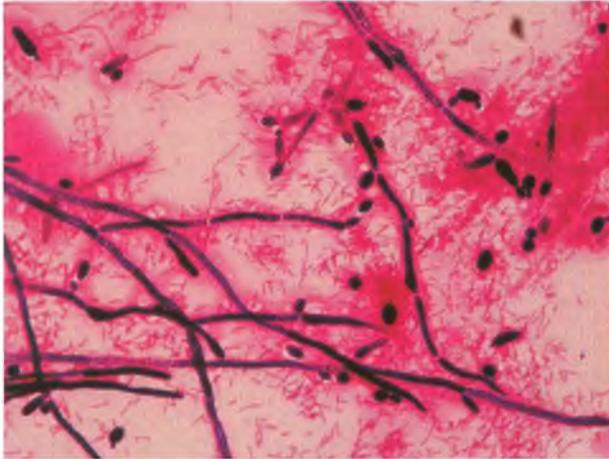


Figura 5.2. Cándida en orina. Tinción de Gram.

Puede observarse abundantes bacilos gramnegativos y levaduras (grampositivas). Algunas aparecen como células aisladas y otras están gemando. También pueden observarse pseudomicelios y micelios verdaderos.



Figura 5.3. Colonias de los hongos.

Las colonias de las levaduras tienen un aspecto semejante a las de las bacterias. Las colonias de los hongos filamentosos tienen un aspecto algodonoso inequívoco y fácilmente reconocible, aunque algunos hongos filamentosos forman colonias compactas o cerúleas, menos características.

Los hongos filamentosos pueden clasificarse en superiores e inferiores. En los superiores, las hifas son delgadas (2-5 μm) y las células fúngicas que las forman están separadas entre sí por tabiques provistos de un poro que permiten el intercambio de material citoplasmático entre células contiguas. Forman esporas (conidias) directamente en las hifas o en estructuras específicas llamadas conidióforos, constituyendo esporas externas. En los hongos inferiores las hifas son más anchas (10-15 μm) y no están tabicadas, por lo que las células forman un con-

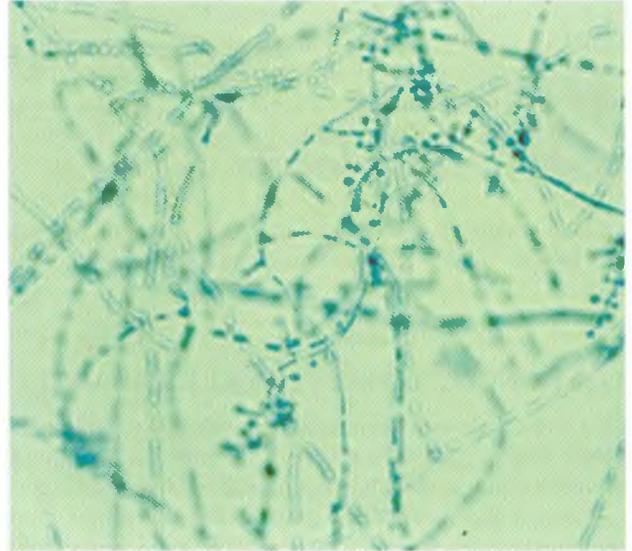


Figura 5.4. Micelio fúngico.

Se observa el micelio de un hongo formado por filamentos (hifas) finos y septados. Corresponde a un hongo filamentosos superior.

junto coenocítico con múltiples núcleos y un citoplasma único; las esporas, denominadas esporangioesporas, se forman en el interior de estructuras saculares, llamadas esporangios (esporas internas). Cuando los hongos filamentosos crecen en un medio de cultivo sólido, una parte del micelio penetra en el medio para absorber nutrientes (micelio vegetativo), mientras que el micelio aéreo se proyecta hacia el exterior, dando lugar a matas de apariencia tenaz, algodonosa o pulverulenta, características de las colonias de los hongos filamentosos, fácilmente diferenciables de las colonias de las levaduras (Fig. 5.3).

Hongos dimórficos

Entre los hongos microscópicos superiores, algunos pueden presentar alternativamente la forma de levadura o la filamentosos, dependiendo de las condiciones de crecimiento, como la temperatura o los nutrientes; estos hongos se denominan dimórficos.

La morfología de las estructuras de reproducción asexual es suficientemente característica y específica como para permitir identificar morfológicamente un gran número de hongos filamentosos y dimórficos de interés en medicina (véase más adelante).

Setas

Los hongos macroscópicos, denominados macromicetos o setas, aunque en apariencia son muy diferentes de los hongos microscópicos que se tratan en este capítulo, tienen una estructura básica filamentosos y un metabolismo idéntico al de éstos, por lo que se incluyen dentro de los mismos grupos taxonómicos. El interés gastronómico de las setas es conocido, pero también son fuente de un gran número de compuestos biológicos,

algunos de gran utilidad para la industria alimentaria, química y farmacéutica, en tanto que otros son tóxicos, pudiendo producir enfermedades muy graves, e incluso letales. Sin embargo, las setas son incapaces de causar infecciones al hombre y no se tratan en este capítulo.

Clasificación y nomenclatura

La clasificación de los hongos es compleja, variada y llena de controversias, pues pretende ordenar un grupo de microorganismos muy diversos.

Los criterios de clasificación se basan principalmente en las características morfológicas de las estructuras involucradas en la reproducción sexual. Por ello, para poder identificar y clasificar los hongos, es necesario observar estas estructuras, aunque con frecuencia no las forman en los medios de cultivo habituales y requieren medios especiales para hacerlo¹.

Actualmente, bajo criterios del tipo de reproducción sexual, dentro del reino *Fungi*, se aceptan cuatro filas: *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* y *Chytridiomycota*², que a su vez se subdividen en diferentes clases, órdenes, familias y géneros, hasta llegar al nivel básico de la clasificación, que es la especie. Los *Zygomycetes* son los hongos filamentosos inferiores, señalados anteriormente, que se reproducen sexualmente mediante la formación de zigoesporas (esporas de pared gruesa formadas por la fusión de dos gametangios). Dentro de los filas *Ascomycota* y *Basidiomycota*, se incluyen los hongos filamentosos superiores de micelio tabicado y las levaduras (hongos unicelulares). Los primeros se reproducen sexualmente formando ascosporas (esporas sexuales endógenas formadas dentro de una célula ascógena o asco), y los *Basidiomycetes* forman basidioesporas (esporas sexuales exógenas formadas sobre basidios). Para los hongos cuya fase sexual se desconoce (hongos imperfectos) se ha creado un grupo arbitrario, el filum *Deuteromycota*. En este grupo se incluye la gran mayoría de los hongos causantes de micosis al hombre.

La nomenclatura de los hongos sigue las reglas del sistema binomial, idénticas a las descritas en el capítulo primero³, de modo que los géneros, familias, órdenes, etcétera, se denominan con una palabra latinizada, escrita en cursiva con la inicial en mayúscula, y las especies con dos palabras: la primera del género al que pertenece la especie en cursiva y con la inicial en mayúscula, y la segunda propia de la especie, en cursiva y minúscu-

las (ejemplo: familia: *Mucedinaceae*, género: *Aspergillus*, especie: *Aspergillus fumigatus*).

Dado que la clasificación de los hongos se basa fundamentalmente en características morfológicas y puesto que la morfología de la fase asexual (imperfecta o anamorfa) difiere considerablemente de la de la fase sexual (perfecta o teleomorfa), la clasificación de los hongos está llena de controversias. Muchos hongos comunes son conocidos con dos nombres diferentes, uno que se refiere a su fase imperfecta y otro que hace referencia a la fase perfecta (ejemplo: teleomorfo: *Pseudallescheria boydii*; anamorfo: *Scedosporium apiospermum*). Por otro lado, con la incorporación de las técnicas de biología molecular, constantemente se están describiendo nuevas especies y reclasificando las ya existentes.

En micología clínica, se ha optado por basar la identificación y utilizar la nomenclatura de la forma asexual porque es la más antigua, esta consagrada por el uso, hace referencia a la fase del hongo que suele observarse en los medios de cultivo convencionales y se aplica a todos los hongos, incluyendo aquellos cuya forma sexual se desconoce.

En la tabla 5.1 se muestran los principales hongos de interés en medicina.

INFECCIONES FÚNGICAS

Aunque la mayoría de los hongos se encuentran como saprofitos en el medio ambiente y en los vegetales, desempeñando un papel fundamental en la naturaleza al reciclar la materia orgánica, algunos pueden causar patología al hombre, ya sea produciendo cuadros alérgicos, por la inhalación de esporas (rinitis, asma, alveolitis, neumonitis), intoxicaciones por la producción de diversas sustancias nocivas⁴ o infecciones, dada la capacidad que tienen algunas especies fúngicas de colonizar, invadir y multiplicarse en diferentes órganos o tejidos causando micosis, ya sea en el huésped previamente sano (hongos patógenos primarios) o en el huésped con diferentes grados de disminución de los mecanismos de defensa (hongos oportunistas).

Las micosis presentan perfiles clínicos muy diferentes según el agente causal, la localización de la infección o los factores predisponentes del paciente.

Una de las formas más empleadas para la clasificación práctica de las micosis es la que se basa en la loca-

¹ Cuando los hongos sólo expresan las estructuras de reproducción asexual, están en su «forma imperfecta» o «anamorfa». La forma «teleomorfa» o «perfecta» es aquella que expresa las estructuras y la diferenciación propia del estado de reproducción sexual.

² La inclusión de *Chytridiomycota* dentro del reino *Fungi* es discutida, pues son los únicos organismos considerados hongos que poseen flagelos.

³ Véase el capítulo 1. *La nomenclatura en biología*.

⁴ Los hongos microscópicos pueden contaminar los alimentos y liberar micotoxinas, denominadas genéricamente aflotoxinas con capacidad citotóxica y/o carcinogénica (micotoxicosis).

Algunas setas o macromicetos contienen diferentes sustancias tóxicas que pueden dar lugar a intoxicaciones alimentarias (micetismos), resultando en ocasiones mortales.

Tabla 5.1
Clasificación de las micosis basada en la localización de la infección

Clasificación	Micosis	Principales agentes etiológicos
Micosis superficiales	Pitiriasis Piedras Tiña negra	<i>Malassezia furfur</i> <i>Trichosporon ovoides</i> , <i>T. inkin</i> , <i>Piedraia hortae</i> <i>Hortaea werneckii</i>
Micosis cutáneomucosas	Dermatofitosis Candidosis cutánea Mucositis candidósica	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>Microsporum canis</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i> <i>Candida albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i> <i>Candida albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i>
Micosis subcutáneas ¹	Esporotricosis Feohifomicosis Cromoblastomicosis Micetomas (granos negros) (granos blancos) Lobomicosis ² Rinosporidiosis ² Adiasporomicosis ² Entomoftoromicosis ²	<i>Sporothrix schenckii</i> <i>Alternaria</i> , <i>Bipolaris</i> , <i>Curvularia</i> , <i>Phialophora</i> , <i>Aureobasidium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Exophiala</i> <i>Fonsecaea pedrosoi</i> , <i>F. compacta</i> , <i>Cladophialophora carrionii</i> , <i>Phialophora verrucosa</i> , <i>Rhinocladiella aquaspersa</i> <i>Madurella mycetomatis</i> , <i>M. grisea</i> <i>Leptosphaeria senegalensis</i> , <i>Pyrenochaeta romeroi</i> <i>Acremonium</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Scedosporium apiospermum</i> <i>Lacazia loboi</i> <i>Rhinosporidium seeberi</i> <i>Emmonsia parva</i> <i>Conidiobolus coronatus</i> , <i>Basidiobolus ranarum</i>
Micosis sistémicas primarias	Histoplasmosis Blastomicosis Coccidioidomicosis Paracoccidioidomicosis	<i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Blastomyces dermatitidis</i> <i>Coccidioides immitis</i> <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Micosis sistémicas oportunistas	Candidosis sistémica Criptococosis Aspergilosis sistémica Mucormicosis ³ Pneumocistosis Penicilosis ⁴	<i>Candida albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> (serotipos A, B, C y D) <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>A. terreus</i> <i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>R. microsporus</i> , <i>Absidia corymbifera</i> , <i>Rhizomucor pusillus</i> <i>Pneumocystis jiroveci</i> <i>Penicillium marneffeii</i>
Otras micosis sistémicas ⁵ (oportunistas)		<i>Fusarium solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>Scedosporium apiospermum</i> , <i>S. prolificans</i> , <i>Blastoschizomyces capitatus</i> , <i>Trichosporon asahii</i> , <i>T. mucoides</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>R. mucilaginosa</i>

¹ En la tabla se refieren sólo algunos de los agentes de micosis subcutáneas.

² La lobomicosis se presenta en forma de nódulos queloidiformes de evolución muy lenta. La rinosporidiosis se caracteriza por la formación de quistes en el tejido subepitelial de la mucosa nasal. Los agentes de lobomicosis (*Lacazia loboi*) y rinosporidiosis (*Rhinosporidium seeberi*) se clasifican taxonómicamente entre los hongos, aunque no han podido cultivarse.

³ Las entomoftoromicosis (o micosis por hongos del orden de los *Entomophthorales*) son las únicas micosis subcutáneas causadas por hongos filamentosos inferiores. *Conidiobolus coronatus* da lugar a granulomas de la mucosa nasal y paranasal, mientras que las lesiones causadas por *Basidiobolus ranarum* suelen localizarse en la espalda y en las extremidades.

⁴ Otros agentes de mucormicosis menos frecuentes son *Mucor*, *Syncephalastrum* y *Cunninghamella*.

⁵ Aunque el género *Penicillium* esta formado por hongos filamentosos superiores (no dimórficos) no patógenos, una especie *P. marneffeii* es dimórfica, aunque sólo se han descrito infecciones en pacientes inmunodeprimidos.

⁶ Aunque otros géneros y especies de hongos se han implicados en infecciones sistémicas oportunistas, su incidencia es baja o meramente anecdótica.

lización de la infección; siguiendo este criterio, las micosis se pueden clasificar en superficiales, cutáneas o cutáneomucosas, subcutáneas y profundas o sistémicas (Tabla 5.1).

Las micosis superficiales

Son aquellas que se limitan al estrato queratinizado de la piel y o del pelo, sin que exista ningún tipo de reacción inflamatoria y muy poca evidencia clínica de enfermedad.

La mayoría de estas micosis están producidas por pequeñas levaduras lipófilas del género *Malassezia*, como *M. furfur* o *M. pachydermatis*. Al colonizar la epidermis, dan lugar a la aparición de máculas cutáneas hiper o hipopigmentadas, conocidas con el nombre de pitiriasis versicolor. Otras micosis superficiales son menos frecuentes o de distribución restringida⁵.

Las micosis cutáneomucosas

Son las que afectan a la piel y a las mucosas; la infección puede alcanzar los estratos profundos, pero sin llegar al tejido celular subcutáneo y sin que exista invasión linfática. Se habla de dermatomicosis para referirse de modo genérico a las infecciones micóticas de la piel, y de dermatofitosis para referirse de forma más concreta a las micosis cutáneas causadas por un grupo de hongos queratinofílicos denominados dermatofitos.

Las mucositis constituyen infecciones banales de la mucosa oral o vaginal. La mayoría están producidas por *Candida albicans*, pero también por *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*, entre otras.

Las infecciones superficiales de la mucosa oral, generalmente, se asocian a tratamientos prolongados con antibióticos de amplio espectro, prótesis dentales, inmunodeficiencias ligeras (senectud, diabetes u otros) o factores no precisados. La vaginitis por candida es un proceso frecuente, caracterizado por prurito y secreción vaginal, asociado también a tratamiento antibiótico y otros factores.

En los pacientes inmunodeprimidos, sida y otros, pueden presentarse mucositis candidiásicas muy graves en la mucosa oral, el esófago u otras localizaciones, asociadas a veces a infecciones por virus del herpes simple.

Entre las dermatomicosis son frecuentes las infecciones cutáneas, habitualmente producidas por levaduras del género *Candida*, que se dan en particular en las zonas de roce y húmedas (onicomicosis con paroniquia en manos de lavanderas, intertrigos en pliegues submamarrios o en el periné de niños con pañal, etcétera).

Los dermatofitos tienen capacidad para parasitar las zonas queratinizadas de la piel, y algunas especies también pueden afectar a los cabellos y las uñas. Dan lugar a lesiones epidérmicas de aspecto muy variable: eritematosas, circinadas, vesiculares, agrietadas, hiperqueratóticas o inflamatorias, que suelen clasificarse de acuerdo a la zona anatómica afectada: *tinea pedis*, *tinea capitis* y *tinea corporis*. Existen tres géneros distintos de dermatofitos: *Epidermophyton*, *Trichophyton* y *Microsporum*, que

agrupan a múltiples especies de diferentes nichos ecológicos humano, animal y telúrico. Los dermatofitos antropofílicos se han adaptado a parasitar específicamente al hombre, sus lesiones son poco inflamatorias y de evolución crónica, en contraposición a las de evolución aguda y muy inflamatorias de los dermatofitos cuyo hábitat natural son los animales o el suelo (zoofílicos y geofílicos respectivamente).

En la tabla 5.2 se resumen las principales especies de dermatofitos, los principales cuadros clínicos que causan, su hábitat y distribución geográfica.

Las micosis subcutáneas

Agrupan a un conjunto muy heterogéneo de infecciones fúngicas producidas por hongos taxonómicamente muy diversos, que generalmente alcanzan el tejido celular subcutáneo por inoculación traumática. Son procesos habitualmente limitados a la piel y al tejido celular subcutáneo, que evolucionan muy lentamente formando granulomas o queloides, sin que suela existir diseminación sistémica.

La esporotricosis es una micosis subcutánea relativamente común en climas templados, producida por *Sporothrix schenckii*: un hongo dimórfico de hábitat telúrico. Tras la inoculación accidental del hongo, generalmente por un pinchazo con espinas o restos vegetales, se desarrolla una pápula indolora que se infiltra y da lugar a un nódulo con tendencia a ulcerarse; esta lesión primaria se cronifica, siendo característica la aparición de nódulos secundarios a lo largo del trayecto de drenaje de los vasos linfáticos regionales.

Sin embargo, la gran mayoría de las micosis subcutáneas están causadas por un grupo muy heterogéneo de hongos filamentosos superiores, sin poder patógeno primario, que tienen en común el hecho de poseer hifas pigmentadas (con melanina en su pared) dando lugar a colonias negras, por lo que se denominan hongos dematiáceos y las micosis que causan feohifomicosis. Se producen por inoculación traumática accidental del hongo, y causan, como se ha señalado, lesiones nodulares granulomatosas subcutáneas o queleoides de evolución muy prolongada.

La cromoblastomicosis es una micosis subcutánea de etiología y cuadro clínico variado con carácter granulomatoso y evolución lenta. Independientemente de la especie causal, se caracteriza por la presencia de células fumagoides (o cuerpos fúngicos escleroidales⁶) en el tejido celular subcutáneo.

⁵ Las infecciones por *Hortaea werneckii* dan lugar lesiones superficiales en forma de manchas negruzcas (tiña negra) que suelen localizarse en las palmas de las manos.

Las piedras son nódulos fúngicos adheridos a la porción extrafolicular del pelo. Las piedras blancas, producidas por *Trichosporon inkin* y *T. ovoides*, tienen una distribución geográfica universal y dan lugar a nódulos blanco-grisáceos en los pelos de la región axilar, pubiana y/o crural; mientras que las piedras negras, causadas por *Piedraia hortae*, afectan al cuero cabelludo y se ven sólo en áreas tropicales de Sudamérica, Extremo Oriente y las islas del Pacífico.

⁶ Los cuerpos escleroidales se consideran una forma de adaptación tisular del hongo frente a la respuesta del hospedador. Se trata de estructuras moruloides de color marrón de unos 5-10 µm.

Tabla 5.2
Principales especies de dermatofitos. Clasificación ecológica

Dermatofito	Hábitat	Áreas endémicas	Principales cuadros clínicos
Microsporum:			
<i>M. audouinii</i>	A	África	<i>Tinea capitis</i> (de grandes placas)
<i>M. ferrugineum</i>	A	Asia y Europa del Este	<i>Tinea capitis</i> (de grandes placas)
<i>M. canis</i>	Z		Niño: querion (<i>tinea capitis</i> inflamatoria) Adulto: herpes circinado
<i>M. persicolor</i>	Z		Herpes circinado de la piel glabra
<i>M. nanum</i>	G		Querion (<i>tinea capitis</i> inflamatoria)
<i>M. gypseum</i>	G		Herpes circinado
Trichophyton:			
<i>T. rubrum</i>	A		Herpes circinado Intertrigos interdigitoplantares y onicomicosis
<i>T. mentagrophytes var. interdigitale</i>	A		Intertrigos interdigitoplantares y onicomicosis
<i>T. mentagrophytes var. mentagrophytes</i>	Z		Querion (<i>tinea capitis</i> inflamatoria)
<i>T. erinacei</i>	Z	Nueva Zelanda	Herpes circinado de la piel glabra
<i>T. tonsurans</i>	A		<i>Tinea capitis</i> (de pequeñas placas)
<i>T. violaceum</i>	A	Norte de África, cuenca mediterránea	<i>Tinea capitis</i> (de pequeñas placas)
<i>T. soudanense</i>	A	África subsahariana	<i>Tinea capitis</i> (depilantes de pequeñas placas)
<i>T. schoenleinii</i>	A	Marruecos	<i>Tinea capitis</i> (tiña fávica)
<i>T. yaoundei</i>	A	África central	<i>Tinea capitis</i>
<i>T. megninii</i>	A	Portugal, Cerdeña	<i>Tinea barbae</i>
<i>T. verrucosum</i>	Z		Querion (<i>tinea capitis</i> inflamatoria)
Epidermophyton:			
<i>E. floccosum</i>	A		Intertrigos inguinales e interdigitoplantares Herpes circinado de la piel glabra

La mayoría son de distribución universal. Se señalan las áreas hiperendémicas de algunas especies y los principales cuadros clínicos que causan. A: antropofílicos; Z: zoofílicos; G: geofílicos.

Los micetomas también se engloban en el grupo de las micosis subcutáneas. Son lesiones pseudotumorales granulomatosas del tejido subcutáneo de evolución crónica que pueden afectar al tejido óseo por contigüidad. Suelen localizarse en las extremidades inferiores (especialmente en los pies: pie de Madura), y se caracterizan por la formación de microabscesos que fistulizan y se abren a la piel drenando un líquido seroso más o menos rico en gránulos (pequeñas concreciones fúngicas) que, según el agente causal, pueden ser negros o blancos. Aunque la mayoría de los agentes causales de micetomas de gránulos blancos tienen una distribución geográfica muy amplia, el cuadro clínico es excepcional fuera de las áreas intertropicales (cinturón intertropical africano, México, India, Venezuela, Brasil y Argentina).

Por último, algunas micosis subcutáneas están producidas por especies fúngicas concretas que dan nom-

bre a la enfermedad, como la lobomicosis, la rinosporidiosis o las entomoftromicosis⁷, con cuadros clínicos relativamente característicos. En la tabla 5.1 se describen las micosis subcutáneas y sus agentes causales.

Micosis sistémicas

El término micosis sistémica se emplea para referirse a todas aquellas infecciones fúngicas en las que se produce una fungemia y/o la invasión de algún órgano profundo. Las micosis sistémicas se pueden clasificar en primarias u oportunistas, según se puedan dar en el huésped inmunocompetente o se precise de algún factor predisponente o de inmunodeficiencia.

Las micosis sistémicas primarias están producidas por los hongos dimórficos *Histoplasma capsulatum* (histoplasmosis), *Blastomyces dermatitidis* (blastomicosis),

⁷ Algunos autores incluyen en este grupo de infecciones a las prototecosis, infecciones causadas por algas aclorofílicas del género *Prototheca*, que presentan una clínica y una fisiopatogenia muy similar.

Coccidioides immitis (coccidioidomicosis) y *Paracoccidioides brasiliensis* (paracoccidioidomicosis), todos ellos considerados hongos patógenos primarios por su capacidad de infectar al huésped inmunocompetente⁸.

Estos hongos dimórficos muestran una distribución geográfica irregular, encontrándose restringidos a zonas endémicas. En su hábitat telúrico se encuentran en forma filamentosa y cuando parasitan los tejidos adoptan una forma levaduriforme o esferular. Las esporas penetran por vía inhalatoria y originan una infección pulmonar que suele ser asintomática en la mayoría de las ocasiones, aunque el hongo puede persistir latente. En las formas sintomáticas la infección pulmonar evoluciona de forma subaguda o crónica y puede dar lugar a recidivas⁹.

La histoplasmosis humana esta causada por dos variedades de *Histoplasma capsulatum*, *H. capsulatum* var. *capsulatum* e *H. capsulatum* var. *duboisii*. La primera es endémica de América del Norte (cuencas de los ríos Mississippi y Ohio), América Central y del Sur, Cuba y Puerto Rico, aunque se encuentra localizada en nichos ecológicos muy concretos, como algunas cuevas de murciélagos y posaderos de aves. La variedad *duboisii* esta limitada al África Central y se desconoce cuál es su nicho ecológico; tiene un curso más indolente y tendencia a afectar a la piel y al hueso.

Coccidioides immitis es un hongo endémico de ciertas regiones desérticas y semidesérticas del continente americano (suroeste americano, California, Nuevo México, Arizona, Texas y norte de México, Venezuela, Paraguay). Tras la dispersión aérea de las artroconidias, las personas se infectan por vía inhalatoria, dando lugar a un cuadro pulmonar que suele remitir sin complicaciones o evolucionar como una infección sistémica generalizada, con afección ósea, meníngea y cutánea.

El hábitat natural de *Blastomyces dermatitidis* se ha relacionado con las madrigueras de los castores, siendo endémico en las cuencas de los ríos Mississippi, Ohio, San Lorenzo y los Grandes Lagos (norte de EE.UU. y sur del Canadá). La blastomicosis, cuando es sintomática, cursa como una neumonía atípica, que puede evolucionar a la cronicidad y dar lugar a lesiones metastásicas, habitualmente cutáneas, en forma de nódulos que finalmente se ulceran, y más infrecuentemente óseas.

La paracoccidioidomicosis (o blastomicosis sudamericana) está producida por *Paracoccidioides brasiliensis*, un hongo endémico de América del Sur, que tiene su hábitat natural en las zonas boscosas de los grandes ríos y lagos de Brasil, Venezuela, Colombia, Paraguay y Argen-

tina. En los adultos producen infecciones crónicas del pulmón, acompañadas de lesiones mucosas infiltrantes en orofaringe y nariz y/o lesiones metastásicas en otros órganos.

En los niños y los pacientes inmunodeprimidos, la forma sintomática cursa con afectación pulmonar y del sistema reticuloendotelial (adeno y hepatoesplenomegalia).

Las micosis sistémicas oportunistas

Están producidas por hongos no patógenos, cuyo hábitat natural es el hombre, como *Candida* y *Malassezia*, o el medio ambiente, como *Aspergillus*, *Fusarium* y otros.

A diferencia de las micosis producidas por hongos patógenos primarios, éstas son de distribución geográfica universal y pueden tener formas de presentación clínica muy diversas, según el hongo involucrado, el órgano que afecten y el tipo de paciente en el que se den.

Las candidosis sistémicas son infecciones invasivas producidas por diferentes especies de levaduras del género *Candida*, generalmente *C. albicans* (> 50%), pero también *C. glabrata*, *C. tropicales* y *C. parapsilosis* o, con menor frecuencia, *C. krusei*, *C. guilliermondii* y *C. dubliniensis*. Son infecciones de origen endógeno, pues *C. albicans* suele formar parte de la flora comensal de la cavidad bucal, el tracto digestivo y la piel, y se dan en pacientes con factores predisponentes que han recibido tratamientos prolongados con antibióticos de amplio espectro. Las candidemias suelen tener una puerta de entrada cutánea, generalmente a través de catéteres intravasculares o por paso (traslocación) de las levaduras desde el intestino a la sangre en pacientes con lesiones mucosas, que se producen tras la radioterapia, quimioterapia o por otras causas. Una vez en el torrente sanguíneo, alcanzan los órganos más vascularizados, como riñón, corazón, sistema nervioso central o retina, dando lugar a diferentes cuadros clínicos en función del órgano afecto, y generalmente se acompañan de fiebre.

En los enfermos neutropénicos en fase de recuperación es clásica la afección hepatoesplénica de evolución crónica, con hemocultivos negativos y presencia de múltiples abscesos en hígado y riñón de los que difícilmente se consigue aislar las levaduras.

La criptococosis sistémica cursa habitualmente con meningoencefalitis y afecta a pacientes con déficit de la inmunidad celular. Está producida por *Cryptococcus neoformans*, que es un hongo levaduriforme capsulado del

⁸ *Penicillium marneffe* es un hongo dimórfico agente de micosis invasiva sistémica en el paciente con sida y excepcionalmente en personas inmunocompetentes; presenta una distribución restringida al sudeste asiático.

⁹ Estos hongos tienen capacidad de sobrevivir intracelularmente en los macrófagos y se comportan de manera semejante a *Mycobacterium tuberculosis*, dando lugar a infecciones pulmonares con capacidad para difundir por vía hematogena de evolución subaguda, crónica o recidivante.

que se han identificado tres variedades y cuatro serotipos, con reservorio y distribución geográfica diferente¹⁰.

El hongo se adquiere por inhalación de las basidioesporas, que por su pequeño tamaño pueden alcanzar el alvéolo pulmonar. Generalmente, la infección es controlada a este nivel por los macrófagos alveolares y resuelta sin manifestaciones clínicas, pero en personas con la inmunidad celular alterada (sida¹¹, tratamiento con corticoides, inmunosupresores, u otros), la infección progresa y el hongo puede diseminarse por vía hematogena afectando regularmente al sistema nervioso central, por el que tiene un especial tropismo, dando lugar a un cuadro de meningoencefalitis de evolución subaguda o crónica.

Malassezia furfur y otras especies, que causan micosis superficiales, como la pitiriasis versicolor, pueden dar lugar a fungemias de origen en el catéter en pacientes con nutrición parenteral. Son cuadros generalmente poco graves que suelen cursar con fiebre e infiltrados pulmonares y que remiten al retirar el catéter.

Otras levaduras, como *Blastoschizomyces capitatus*, *Trichosporon asahii*, *T. mucoides*, *Rhodotorula glutinis* o *R. mucilaginosa*, también pueden causar micosis oportunistas invasivas en pacientes con inmunodepresión grave, pero con mucha menor frecuencia.

Las aspergilosis invasivas, pulmonares o generalizadas, están producidas por diferentes especies de *Aspergillus*, pero *A. fumigatus* es el agente causal de más del 90% de los casos, seguido por *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. versicolor*, *A. glaucus* y *A. terreus*.

Los aspergilos son hongos de distribución geográfica universal con una amplia dispersión en la naturaleza; sus esporas se encuentran en todas las latitudes y sobre todos los medios y alcanzan el alvéolo pulmonar por vía aérea.

En los pacientes broncópatas, con un ligero grado de inmunosupresión por tratamientos prolongados con corticoides, los aspergilos dan lugar a un cuadro invasivo pulmonar de evolución crónica: la aspergilosis pulmonar semiinvasiva o crónica necrotizante. Por el contrario, en los pacientes con neutropenia prolongada y profunda, dan lugar a una bronconeumonía necrotizante por afectación vascular, de curso agudo, rápidamente progresiva, con diseminación metastásica a múltiples órganos, como el SNC, el corazón o el riñón, y una alta mortalidad (30-40%).

Diferentes especies del género *Fusarium* (*F. solani*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*) pueden dar lugar a fungemia

y micosis sistémicas diseminadas en pacientes neutropénicos o con otras inmunodeficiencias graves, pero también a queratitis y endoftalmitis entre otras. La fusariosis diseminada puede tener una puerta de entrada pulmonar, digestiva o cutánea, pero también hay infecciones asociadas a catéter. Esta micosis suele producir lesiones metastásicas cutáneas en forma de escaras necróticas y tiene una mortalidad muy elevada, cercana al 75%.

Con menor frecuencia, *Scedosporium apiospermum* y *S. prolificans* son capaces de producir cuadros sistémicos muy similares a los de las aspergilosis invasivas. Ambas especies son resistentes a la anfotericina B.

Con el nombre genérico de mucormicosis se agrupa a una serie de infecciones fúngicas, generalmente sistémicas, producidas por diferentes géneros y especies de hongos filamentosos inferiores del orden *Mucorales*, entre los que por su frecuencia cabe destacar *Rhizopus arrhizus*, *R. microsporus* var. *rhizopodiformis*, *Absidia corymbifera* y *Rhizomucor pusillus*.

Todos son hongos de distribución cosmopolita, que afectan generalmente a pacientes hospitalizados con enfermedades graves, como diabetes cetoacidósica, neutropenia o trasplantados, dando lugar a enfermedades agudas, de progresión rápida y gran letalidad (50-80%).

En la mucormicosis rinocerebral, el hongo penetra por la mucosa nasal y progresa rápidamente hacia senos paranasales y cavidad orbitaria, invadiendo posteriormente el cerebro y llevando a la muerte en pocos días. Igualmente graves, pero menos frecuentes, son la mucormicosis pulmonar o la gastrointestinal.

Pneumocystis jiroveci (anteriormente *P. carinii*) se considera actualmente un hongo, y es responsable de neumopatías en el enfermo inmunodeprimido, especialmente en el paciente con sida y un recuento de T CD4 inferior a 200/mm³. Es un hongo de distribución mundial, aunque con baja prevalencia en África, que se adquiere por vía inhalatoria y da lugar a una neumonía intersticial difusa, de pronóstico grave si no se instaura el tratamiento adecuado, siendo excepcionales las formas extrapulmonares.

TÉCNICAS EN MICOLOGÍA

Para el diagnóstico de las infecciones fúngicas se procede a partir de las muestras clínicas de modo parecido al utilizado para el diagnóstico de las infecciones bacte-

¹⁰ *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A), de hábitat natural desconocido, tiene una distribución geográfica universal, aunque es más prevalente en EE.UU. y Japón; *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D) es predominante en el continente europeo y tiene su hábitat natural en los suelos contaminados con material fecal de aves (especialmente palomas), mientras que *C. neoformans* var. *gattii* (serotipos B y C) sólo se localiza en zonas tropicales y subtropicales: el serotipo B tiene su hábitat natural en los eucaliptos y se encuentra prácticamente restringido a Australia, mientras que el serotipo C es prácticamente exclusivo del sur de California.

¹¹ El 80-90% de los casos de meningoencefalitis criptocócica se dan en pacientes con sida (< 200 linfocitos T CD4/mm³).

rianas. El examen directo, así como las técnicas de cultivo, posee gran utilidad, por lo que se emplean sistemáticamente.

Los cultivos de los productos en los que se sospecha la presencia de hongos filamentosos y dimórficos deben realizarse en condiciones de seguridad¹², sembrándose en tubos y no en placas de Petri. Cuando en una placa de Petri crece un hongo filamentoso, la placa debe sellarse con cinta adhesiva y manipularse en una cabina de seguridad de clase II, tanto para evitar la contaminación ambiental del laboratorio por las esporas, como, fundamentalmente, para evitar infecciones del personal, en caso de que se trate de un hongo patógeno.

Los hongos levaduriformes forman colonias semejantes a las bacterianas, de consistencia cremosa, por lo que, para efectuar las resiembras y las identificaciones, y estudiar su sensibilidad a los antifúngicos, pueden manipularse de modo semejante a las bacterianas. Los hongos filamentosos dan lugar a colonias que forman una mata tenaz, por lo que han de manipularse de forma diferente a la efectuada con las bacterianas¹³.

Las técnicas de identificación son también diferentes según se trate de hongos levaduriformes o filamentosos; en el primer caso, se basan en el estudio de las características metabólicas, y en el segundo, en el de las características morfológicas, en particular de las estructuras de reproducción asexual.

MUESTRAS CLÍNICAS

Para el diagnóstico de las mucositis candidósicas, las muestras de exudado bucal, faríngeo o vaginal se tomarán con escobillones con medio de transporte tipo Stuart. No hay que olvidar que, con frecuencia, en pacientes con granulopenia o sida, estas infecciones pueden ser mixtas y estar asociadas a bacterias y virus como el del herpes simple, de modo que debe preverse una recogida adecuada a estos microbios.

Las muestras de lesiones cutáneas, cabellos o uñas, en las que se sospecha una infección por dermatofitos se obtienen por raspado de la piel y de las uñas, y, si es posible, también puede cortarse pequeños fragmentos de la uñas afectadas. Los cabellos enfermos, rotos y de aspecto frágil, han de arrancarse con pinzas. Todo este material se recoge en placas de Petri estériles, que pueden conservarse a temperatura ambiente sin excesivas precauciones. En las tiñas inflamatorias supuradas (querion) debe tomarse una muestra del pus, que se recogerá, si es posible, con jeringa y si no es posible, con un escobillón que incorpore un medio de transporte tipo

Stuart; también deben recogerse cabellos si están afectados.

La biopsia es la muestra más adecuada para el estudio de las lesiones subcutáneas, pues también permite efectuar estudios histopatológicos, que son indispensables para efectuar un diagnóstico de seguridad. Si hay granulomas fistulizados o ulcerados, es preferible tomar una muestra biopsica de la lesión y desechar el pus.

Los líquidos orgánicos, como la orina, el líquido cefalorraquídeo y otros, han de recogerse por métodos convencionales en un recipiente o tubo estéril de cierre hermético. La sangre para hemocultivo se recoge y procesa según la técnica convencional, aunque es útil prolongar la incubación hasta un mes.

Con respecto a las muestras de la vía respiratoria, cuando se trata de detectar un hongo patógeno, como *Histoplasma* o *Coccidioides*, se puede aceptar un esputo de buena calidad, aunque es mejor una muestra de lavado broncoalveolar. En el caso de infecciones oportunistas, como las causadas por aspergilos o cándida, deberá obtenerse, si es posible, una muestra biopsica de parénquima pulmonar o, alternativamente, una muestra mediante cepillo protegido o lavado broncoalveolar, aunque éstas, en particular la última, no permiten un diagnóstico de seguridad, siendo difícil interpretar los resultados y diferenciar la infección de la colonización.

Para una visión más detallada de la toma de muestras, véase el capítulo 12.

EXAMEN MICROSCÓPICO

El examen microscópico directo posee gran valor para el diagnóstico de las infecciones causadas por hongos, pues permite evaluar la calidad de la muestra y orientar sobre la presencia de elementos fúngicos sin esperar al cultivo. De las diversas muestras clínicas —como la orina, el exudado vaginal o de la mucosa oral, el líquido cefalorraquídeo o el pus de diferentes procedencias— se efectúan extensiones, directas o después de centrifugar, en un portaobjetos y se fijan y tiñen por el método de Gram. Las levaduras y algunas hifas fúngicas se tiñen como grampositivas, aunque en ocasiones de modo irregular. También es de gran utilidad observar la muestra en fresco, entre porta y cubre, contrastada con una gota de azul de lactofenol o empleando el blanco de calcoflúor, que es un colorante fluorescente (Figs. 5.5 y 5.6).

La observación en el LCR de una levadura capsulada, mediante un examen con tinta china, permite diagnosticar la meningitis causada por criptococo (Fig. 5.7).

¹² La mayoría de los hongos oportunistas requieren de un nivel de contención 2, pero los hongos dimórficos (*H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *C. immitis* y *P. brasiliensis*) y *Cladophialophora bantiana* se consideran agentes biológicos del grupo 3 (véase el capítulo 11).

¹³ Para cortar y resembrar las colonias de los hongos filamentosos se utiliza una asa en forma de pala de panadero, diferente a las asas empleadas en bacteriología. Estas asas también suelen emplearse para depositar muestras sólidas sobre los medios de cultivo.

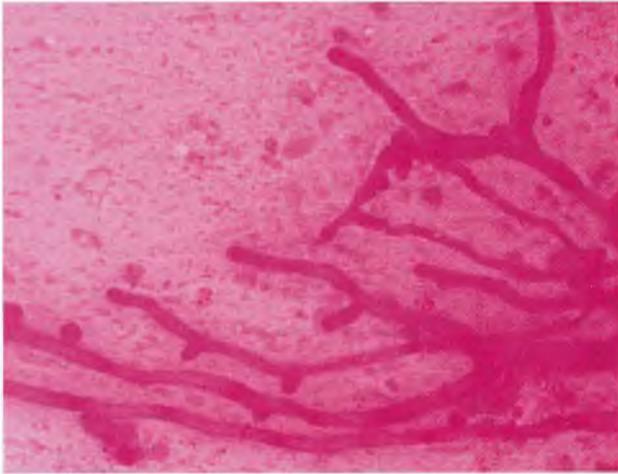


Figura 5.5. Lavado broncoalveolar. Tinción de Gram.

Tinción de Gram de una muestra de lavado broncoalveolar. Pueden verse hifas de un hongo filamentosos que fue identificado como *Aspergillus fumigatus*.

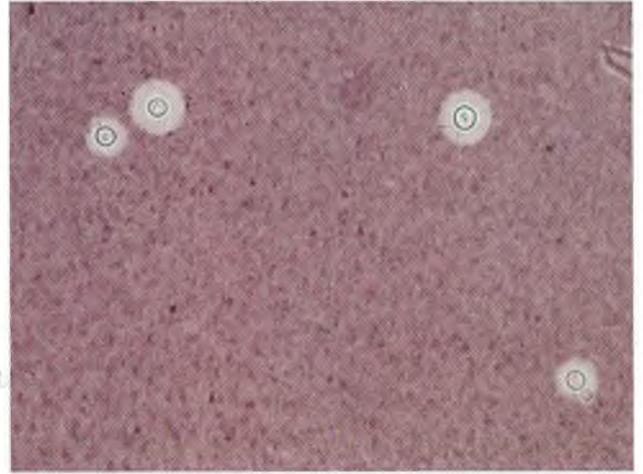


Figura 5.7. Examen microscópico de criptococo (tinta china).

Puede observarse una levadura capsulada contrastada con tinta china. Esta observación en un líquido cefalorraquídeo es prácticamente patognomónica de meningoencefalitis por *Cryptococcus neoformans*.

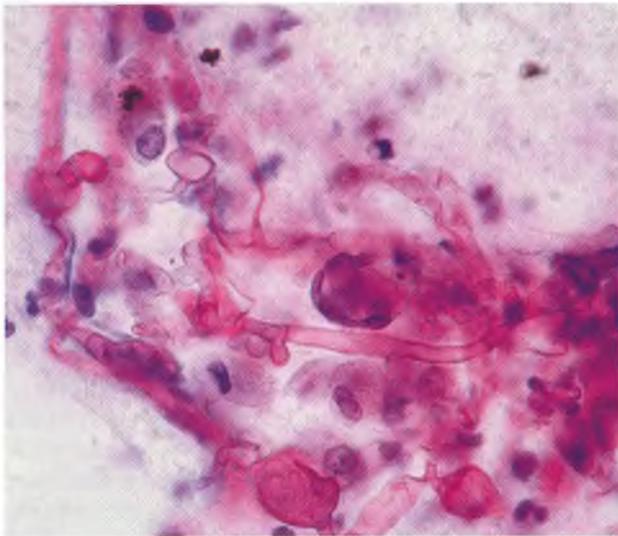


Figura 5.6. Lavado broncoalveolar. Hematoxilina-cosina.

En un lavado broncoalveolar teñido con hematoxilina-eosina para la investigación de células malignas pudo observarse este hongo filamentosos.

Para observar las levaduras causantes de la pitiriasis versicolor, como *Malassezia furfur*, se emplea una cinta adhesiva, que después de adherirla a la lesión se engancha a un portaobjetos para su observación microscópica (Fig. 5.8).

Para la observación de los dermatofitos, las escamas del raspado cutáneo o ungular se transfieren desde el contenedor a un portaobjetos en el que previamente se ha depositado una gota de hidróxido potásico que disgrega las células queratinizadas y facilita la observación de las hifas. Los cabellos pueden observarse directamente entre cubreobjetos y portaobjetos para detectar el patrón de invasión de los dermatofitos. Estas

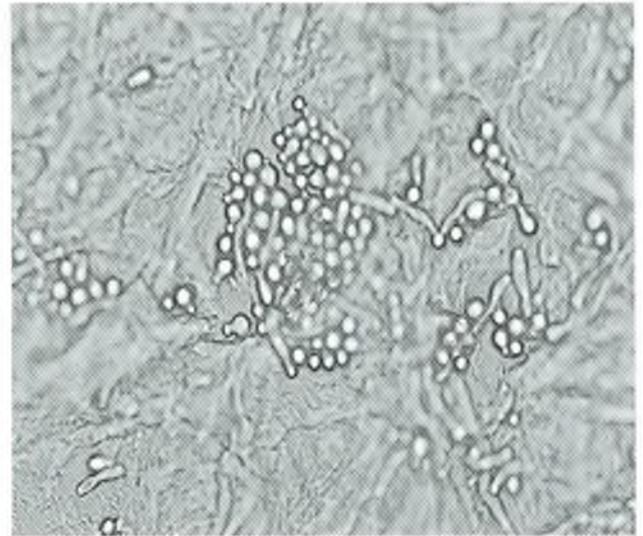


Figura 5.8. Pitiriasis versicolor.

Al adherir un celo sobre una lesión cutánea despigmentada de pitiriasis y después fijarlo sobre un portaobjetos pudieron observarse estos grupos de levaduras y micelio típicos de *Malassezia*.

preparaciones pueden contrastarse añadiendo una gota de azul de lactofenol, que tiñe las estructuras fúngicas (Fig. 5.9).

Las muestras biópsicas tomadas de las infecciones subcutáneas y otros tejidos profundos se estudian por técnicas histológicas convencionales, tiñéndolas para la visualización de los hongos mediante la tinción de PAS (ácido periódico de Schiff) o tinciones argénticas (plata-metenamina).

En ocasiones, el examen microscópico de las muestras clínicas permite identificar con precisión la especie fúngica. Por ejemplo, en el caso de las micosis sistémi-

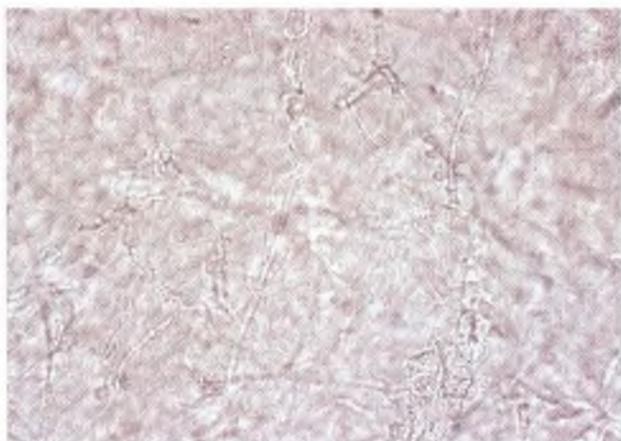


Figura 5.9. Hifas de un dermatofito.

Las muestras clínicas pueden observarse entre porta y cubre directamente o contrastadas con azul de lactofenol (azul algodón) que facilita la visualización de las estructuras fúngicas. En este caso puede observarse las hifas de un dermatofito en una lesión cutánea.

cas por hongos dimórficos, la morfología de las formas tisulares puede ser suficientemente característica como para permitir un diagnóstico etiológico, la observación de levaduras redondas y capsuladas en el LCR puede considerarse sinónimo de meningoencefalitis criptocócica y el diagnóstico de la pneumocistosis puede realizarse mediante la observación microscópica de una muestra de lavado broncoalveolar teñida por Diff-Quik, metenamina argéntica o blanco de calcoflúor, y también se pueden efectuar tinciones específicas con anticuerpos marcados con fluoresceína (IFD).

CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS

Medios y técnicas de cultivo

Para evitar contaminaciones por las esporas de los hongos filamentosos, las muestras se siembran en tubos de agar inclinado cuya boca estrecha dificulta la difusión de las esporas cuando se abren. Sin embargo, las muestras de las que no se espera el crecimiento de hongos filamentosos o dimórficos, sino tan solo de levaduras, como las orinas, los exudados vaginales u orales, pueden sembrarse en medios vertidos en placas de Petri.

Los medios usuales utilizados en bacteriología permiten el crecimiento de los hongos, pero en micología se utilizan medios específicos, como el de Sabouraud, muy rico en glucosa y cuyo pH bajo (pH 5-5,6) dificulta el crecimiento de las bacterias facilitando el crecimiento de los hongos. Para incrementar este carácter selectivo frente a las bacterias se puede añadir al medio de Sabouraud diversos antibacterianos, como el cloranfenicol, la gentamicina u otros, y ajustar el pH entre 6,5 y 7,2, más favorable para el crecimiento de los hongos.

Existen medios cromogénicos, como el CHROMagar® Candida con buena capacidad diferencial para las levaduras, al revelar determinadas actividades enzimáticas por la hidrólisis específica de un sustrato cromogénico incorporado al medio. Estos medios permiten la identificación presuntiva de algunas especies del género *Candida* cuyas colonias adquieren colores diferentes, como *C. albicans*, *C. tropicalis*, y *C. krusei*. Existen otros medios de aislamiento con capacidad diferencial¹⁴ (Fig. 5.10).

Muchos hongos saprófitos se inhiben en presencia de la cicloheximida (Actidiona®), que es un antifúngico que se incorpora al medio de Sabouraud junto con los antibacterianos señalados más arriba, para hacerlo más selectivo y facilitar el aislamiento de los dermatofitos y los hongos dimórficos, que son resistentes a este antifúngico.

Los medios de cultivo más utilizados en micología se recogen al final de este capítulo (Medios de cultivo), aunque existen muchos otros y diversas modificaciones de los descritos, como el que se obtiene por la adición de ácidos grasos de cadena larga (aceite de oliva estéril) al medio de Sabouraud cuando se sospecha la implicación de levaduras lipofílicas, como las del género *Malassezia*¹⁵.

Cuando se utilizan tubos con agar inclinado, no se puede efectuar en ellos la siembra por la técnica de agotamiento como se realiza en las placas, de modo que los productos (pus, escamas, etc.) se depositan sobre la superficie del agar inclinado, asegurando un buen contacto con el medio y utilizando diversos tubos para una misma muestra, con el fin de incrementar la posibilidad de obtener colonias aisladas.

Los hongos son aerobios estrictos, aunque excepcionalmente algunas levaduras son anaerobias facultativas; por ello, en el laboratorio de micología médica, los medios siempre se incuban en aerobiosis.

La temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de los hongos patógenos se sitúa entre 28 y 30 °C, siendo ésta la temperatura que se recomienda para incubar todos los cultivos micológicos, pues si bien los hongos causantes de micosis sistémicas crecen bien a 37 °C, no así muchos de los agentes de micosis cutáneas. La incubación a 37 °C sólo se recomienda para demostrar el dimorfismo térmico de algunos hongos.

Los hongos tienen un crecimiento más lento que la mayoría de las bacterias, por lo que es adecuado mantener los cultivos durante cuatro semanas, excepto si se

Los hongos tienen un crecimiento más lento que la mayoría de las bacterias, por lo que es adecuado mantener los cultivos durante cuatro semanas, excepto si se

¹⁴ CHROMagar Candida (CHROMagar). Candiselect agar, Albicans ID, Fongiscreen 4H (Sanofi Diagnostics Pasteur). Methyl blue Sabouraud agar (BD Diagnostics). Fluoroplate Candida (Merk).

¹⁵ Véase Medios de cultivo.



Figura 5.10. Medios cromogénicos.

A diferencia del aspecto homogéneo y relativamente indiferenciado de las colonias de las especies de *Candida* en el medio de Sabouraud (izquierda), en los medios cromogénicos (derecha) algunas especies dan lugar a colonias de diferentes colores. Colonias verdes: *C. albicans*; colonias azules: *C. tropicalis*; colonias violeta: posible *C. glabrata* (CHROMagar *Candida*).

espera el crecimiento de levaduras (muguet, vaginitis o dermatitis por candidas), en cuyo caso suele ser suficiente incubar los cultivos durante un período máximo de dos a tres días. Si se sospecha una criptococosis (meningitis o sepsis), debe prolongarse la incubación un mínimo de siete días. En caso de que exista una sospecha clínica de histoplasmosis, podría estar indicado alargar la incubación de los cultivos hasta 12 semanas antes de considerarlos definitivamente negativos.

Identificación de los hongos

La identificación de los hongos se basa en tres caracteres: 1) el aspecto macroscópico de las colonias y su observación microscópica, que permite confirmar si se trata de hongos levaduriformes o filamentosos, 2) las características bioquímicas, útiles para la identificación de las levaduras y 3) la morfología microscópica, que permite identificar los hongos filamentosos.

Morfología macroscópica de las colonias

Los hongos levaduriformes dan lugar a colonias semejantes a las bacterianas, cremosas, opacas, con un diámetro de 3 a 7 mm, y en general de crecimiento relativamente rápido (24-72 horas).

Los hongos filamentosos dan lugar a colonias de mayor tamaño (10-30 mm), que crecen radialmente de modo progresivo, de aspecto inconfundible, vellosas, algodonosas o pulverulentas, de vistosos y variados colo-

res, que deben ser observadas en el anverso y reverso, donde puede verse si el pigmento difunde al medio. Su crecimiento suele ser más lento que el de las levaduras (3-20 días), pero pueden llegar a invadir toda la superficie del medio de cultivo. El color, forma y tamaño de las colonias puede variar según el medio de cultivo utilizado.

Los hongos dimórficos dan lugar a colonias filamentosas cuando se incuban en medios usuales entre 25 y 30 °C, y a colonias levaduriformes si se incuban en agar sangre a 37 °C¹⁶.

Para confirmar la diferenciación entre colonias de hongos levaduriformes o filamentosos, lo que habitualmente es innecesario por su aspecto tan característico, basta efectuar un examen en fresco realizando una observación microscópica entre portaobjetos y cubreobjetos.

El examen microscópico de los cultivos se efectúa de modo diferente según se trate de colonias pertenecientes a hongos levaduriformes o filamentosos. Los primeros se observan efectuando una suspensión de la colonia en una gota de solución salina depositada sobre un portaobjetos y observándola en fresco, contrastándola con azul de lactofenol o fijándola y tiñéndola por la técnica de Gram. Para la observación microscópica de las colonias filamentosas, se toma un pequeño fragmento de las mismas, cortado con el asa micológica, o se recoge parte del micelio aéreo tocando la superficie de la colonia con la cara adhesiva de un fragmento de cinta

¹⁶ Clásicamente, el medio de base para estudiar el dimorfismo ha sido el agar infusión de corazón y cerebro (*Brain heart infusion agar*), al que se añade sangre al 5%.

adhesiva transparente que se transfiere a un portaobjetos en el que se ha depositado una gota de azul de lactofenol para su coloración (Fig. 5.11). La técnica de la cinta adhesiva (celo) permite una mejor observación de la morfología y la disposición óptima de las estructuras de reproducción asexual, resultando el método de elección si se pretende la identificación de los hongos filamentosos (Fig. 5.12).

Las resiembras de colonias de hongos levaduriformes se realizan como las de las bacterias, pero para resembrar hongos filamentosos debe cortarse con el asa micológica un fragmento de micelio de la colonia y transferirlo a otro tubo; por lo que es más difícil obtener cultivos puros.

Identificación de las levaduras

Los hongos levaduriformes se identifican fundamentalmente mediante pruebas metabólicas semejantes a las bacteriológicas; aunque determinados aspectos complementarios, como el pigmento rojo o salmón de las

colonias de rodotórula o esporobolomices, la presencia de cápsula en el criptococo, la producción de pseudofilamentos en algunas especies de *Candida*, la producción de tubos germinativos (verdaderos filamentos) o clamidosporas por *Candida albicans* y la formación de artrosporas por *Geotrichum*¹⁷ o *Trichosporum* (y *Blastoschizomyces*) ayudan a su identificación (Figs. 5.13-5.16).

Las pruebas metabólicas más utilizadas son la fermentación y asimilación de diversos hidratos de carbono. La fermentación de los hidratos de carbono se detecta en medio líquido con campana invertida de Durham,



Figura 5.12. *Scedosporium*.

Mediante la técnica del celo pueden observarse las estructuras de los hongos filamentosos con facilidad y mínima distorsión. Obsérvese la morfología característica de los conidióforos y las conidias de *Scedosporium* tomados con esta técnica.

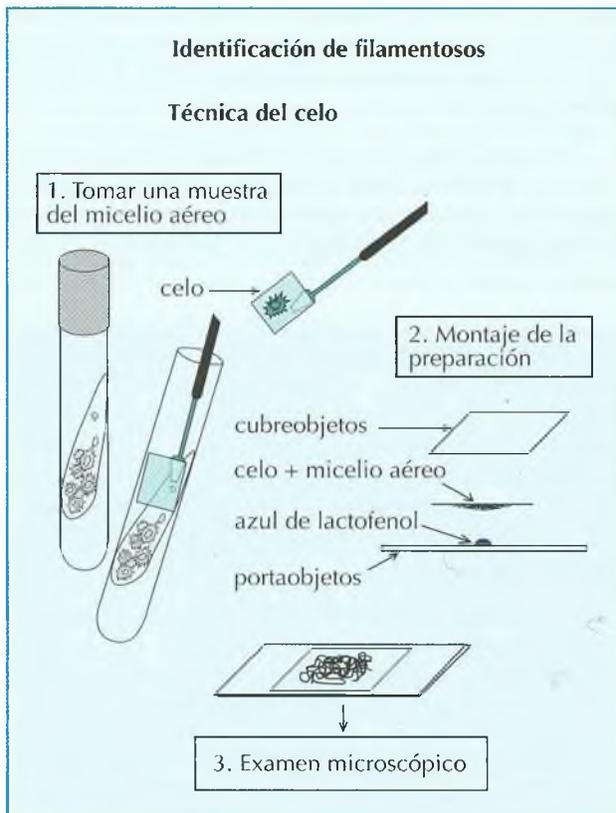


Figura 5.11. Observación microscópica del micelio aéreo.

Una técnica que facilita la observación del micelio aéreo es la utilización de un fragmento de celo (cinta adhesiva) con el que se contacta el micelio fúngico y después se deposita sobre una gota de azul algodón puesta en un portaobjetos, tal y como se muestra en esta figura. Este procedimiento distorsiona poco las estructuras fúngicas.

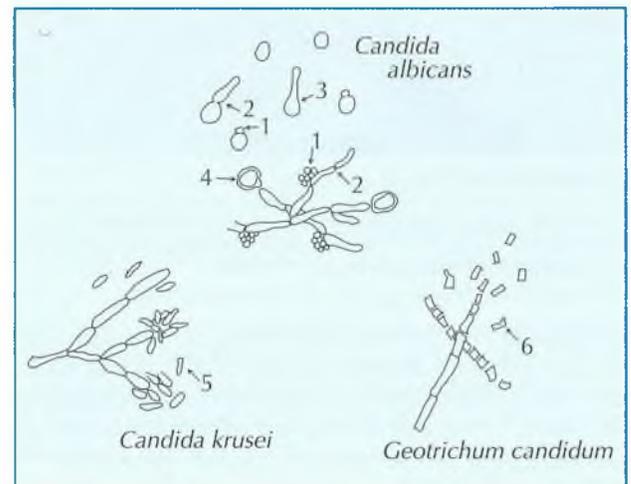


Figura 5.13. Levaduras: gemación, pseudohifas, hifas y clamidosporas.

Puede observarse la diferencia entre las yemas (1); las pseudohifas (2); el micelio verdadero (3) y las clamidosporas (4). Las pseudohifas se diferencian del micelio verdadero por su cuello estrecho en el origen (2). Algunas levaduras tienen forma ovoide (5). Las artrosporas tienen forma de dados o tonel (6).

¹⁷ La observación de artrosporas vacías obliga a descartar *Coccidioides immitis*.

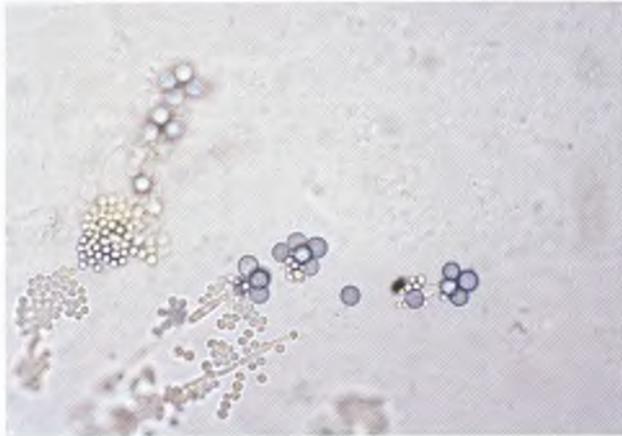


Figura 5.14. *Candida dubliniensis*.

Aunque la identificación de las levaduras se basa fundamentalmente en el estudio de sus características metabólicas, algunos caracteres morfológicos ayudan a su identificación. En esta imagen pueden verse clamidosporas terminales múltiples, características de *C. dubliniensis*; en *C. albicans* suelen ser únicas. Estas son las dos únicas especies de *Candida* que forman clamidosporas.

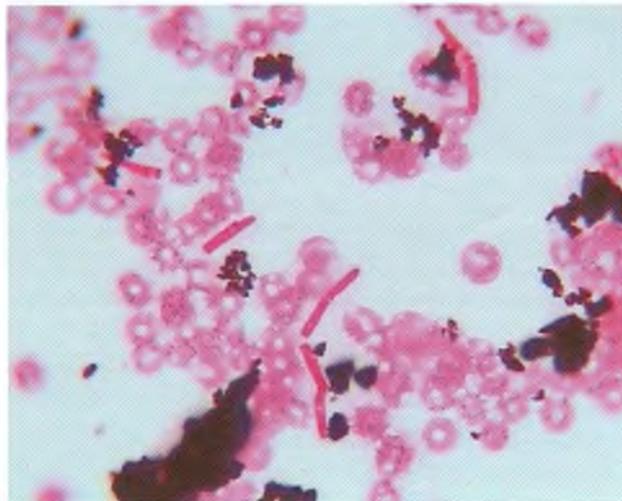


Figura 5.15. *Blastoschizomyces capitatus*.

Es una levadura que forma micelios verdaderos y pseudomicelios; algunas cepas forman artroconidias. Puede causar infecciones oportunistas en pacientes inmunodeprimidos.

debido a la producción de gas (CO_2) por la capacidad de la levadura de atacar los azúcares por vía fermentativa. Las pruebas de asimilación estudian la capacidad de utilizar los diversos azúcares como única fuente de carbono; para ello se emplean medios que contienen todos los elementos esenciales para el crecimiento menos una fuente de carbono, a los que posteriormente se incorpora un determinado azúcar; la capacidad del hongo para asimilar el carbono de ese azúcar se pon-

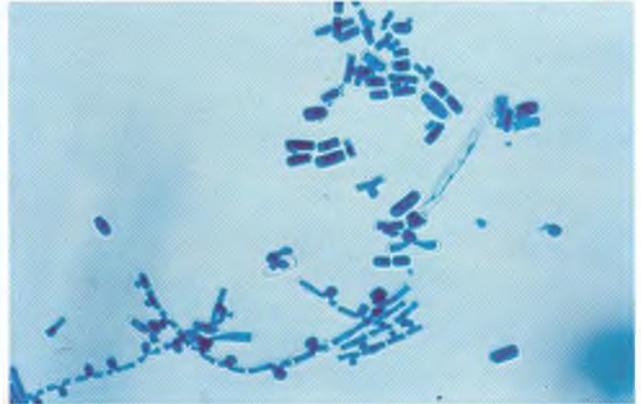


Figura 5.16. Artrosporas.

Artrosporas características. Se fragmentan del micelio tomando este aspecto de cubo o tonel. Las producen tanto algunas levaduras (*Geotrichum candidum*), como hongos filamentosos (dermatofitos) y dimórficos (*Coccidioides immitis*).

drá en evidencia por el crecimiento del mismo en el medio. Esta técnica se denomina auxonograma. Las pruebas de fermentación y el auxonograma para la identificación de las levaduras pueden realizarse mediante técnicas convencionales, mediante micrométodos comercializados o sistemas automatizados¹⁸ (Figs. 5.17 y 5.18 y Tabla 5.3).

Otras pruebas adicionales utilizadas para la identificación de levaduras son la producción de ureasa, la reducción de los nitratos, la exigencia de factores específicos de crecimiento y la resistencia a la cicloheximida, entre otras.

Resumiendo, y desde un punto de vista práctico, las especies de *Candida* más frecuentes (que se aíslan de la mucosa oral, vaginal y de la orina) pueden identificarse presuntivamente, pero con una elevada especificidad, a partir de medios cromogénicos, como el CHROMagar *Candida* y otros. La confirmación de la identificación de *C. albicans* puede realizarse por medio de pruebas sencillas, como la filamentación en suero y la formación de clamidosporas.

La identificación presuntiva del criptococo, aislado del líquido cefalorraquídeo o de la sangre, puede realizarse mediante la demostración de la cápsula por observación con tinta china y la producción de ureasa.

En relación con las levaduras que causan infecciones sistémicas, aisladas de territorios como líquido peritoneal, el tejido celular subcutáneo (lesiones cerradas) o sangre, no identificadas en las placas cromogénicas, es necesario llegar a la identificación de la especie, ya sea estudiando las fermentaciones y el auxonograma con

¹⁸ Micrométodos: API 20C Aux, API ID 32C, ATB ID 32C (bioMérieux), Auxacolor System (Sanofi Diagnostics Pasteur), y RapIDYeast Plus System (Innovative Technology Inc.) entre otros. Sistemas automatizados: Vitek 2[®] (bioMérieux), Biolog YT MicroPlate[®] (Biolog Inc.) y Rapid Yeast Identification Panel MicroScan[®] (Dade Behring).

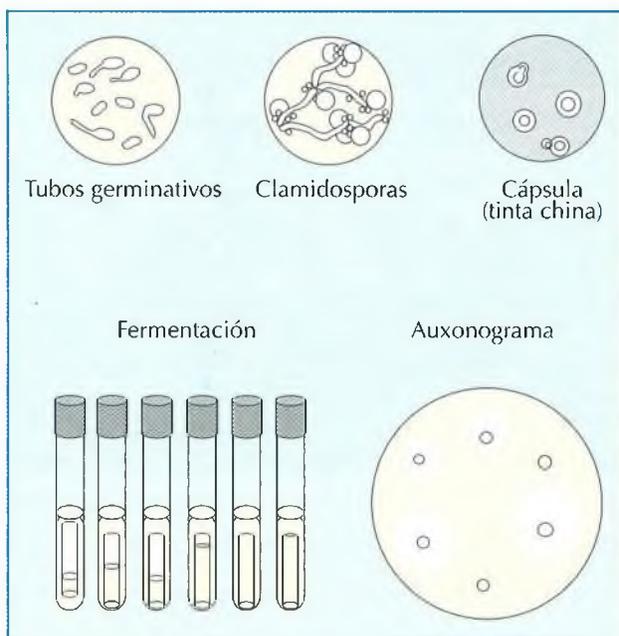


Figura 5.17. Identificación de las levaduras.

La identificación de *Candida albicans* puede orientarse mediante pruebas sencillas que estudian la morfología. Sin embargo, como procedimiento sistemático, para la identificación de las levaduras deben efectuarse pruebas de fermentación y auxonotrofia de azúcares. La capacidad para fermentar un determinado azúcar se pone en evidencia por la producción de gas que queda retenido en la campana invertida de Durham. El auxonograma, que evalúa la posibilidad de utilizar carbono a partir de diferentes azúcares es una prueba muy útil para la identificación de los hongos levaduriformes. Puede realizarse por técnicas de difusión en agar o mediante galerías comercializadas. En el agar están todos los nutrientes esenciales menos una fuente de carbono, las levaduras crecen alrededor de los discos que aportan el carbono a través de diferentes azúcares.



Figura 5.18. Auxonograma.

Puede verse un auxonograma por técnica de difusión. El medio de cultivo carece de una fuente de carbono, que es aportada por los azúcares de los discos. Si la levadura es capaz de asimilar el azúcar se produce crecimiento alrededor del disco que lo contiene. Se han utilizado discos comerciales; el empleo de un cuarto de disco ahorra dinero y resulta igual de eficaz.

medios preparados en el laboratorio o utilizando paneles comercializados, como el API ID 32C (Tabla 5.3).

La identificación rápida enzimática o inmunológica de las especies naturalmente resistentes a los antifúngicos es de gran interés para orientar el tratamiento (*C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* a los azoles, *C. lusitanae* a anfotericina B). Alguna de estas especies pueden identificarse presuntivamente mediante los medios cromogénicos.

Identificación de los hongos filamentosos

La identificación de los hongos filamentosos se lleva a cabo por el aspecto de las colonias y, fundamentalmente, por la morfología microscópica del micelio, de las esporas y de las estructuras en las que se forman, que suelen ser características de género o incluso de especie; por tanto, su identificación se basa en la observación microscópica, aunque algunas características metabólicas pueden ayudar a la identificación, particularmente la exigencia en factores esenciales de crecimiento.

Cuando se corta con el asa micológica un fragmento de una colonia micelial y se transfiere a un portaobjetos o incluso si se emplea la técnica del celo, con frecuencia las estructuras se alteran y fragmentan y no pueden visualizarse intactas, lo que impide la correcta identificación del hongo, aunque permite la diferenciación entre hongos filamentosos inferiores y superiores.

Para obviar este hecho y poder observar sin distorsión el micelio y las estructuras de reproducción asexual, es preferible recurrir al microcultivo. La técnica del microcultivo consiste en cortar de una placa de Petri con agar Sabouraud un dado de 1 cm de lado y depositarlo sobre un portaobjetos estéril situado en otra placa de Petri vacía. A cada lado del cubo de agar se inocula el hongo filamentosos. Se coloca sobre el agar un cubreobjetos y se coloca la tapa de la placa de Petri incubándose en ambiente húmedo. Cuando el micelio crece, al cabo de unos días, se expande como una planta trepadora por la cara inferior del cubreobjetos, el cual puede tomarse con cuidado y ponerse sobre un portaobjetos en el que previamente se haya depositado una gota de colorante de contraste, como el azul de lactofenol. Así, pueden observarse las estructuras fúngicas sin distorsión (Figs. 5.19 y 5.20). Se han comercializado sistemas que facilitan el desarrollo de esta técnica¹⁹.

La identificación inicial de los hongos dimórficos suele basarse en las características morfológicas de las estructuras de reproducción asexual, que se observan sembrando el hongo en agar Sabouraud incubado a 28 °C, donde crece en la forma filamentosos (esporuladora). Para demostrar su dimorfismo térmico, se realizan resiembras

¹⁹ MycoEase, ScientificDevice Laboratory.

Tabla 5.3
Identificación de hongos levaduriformes de interés clínico

Especies	Morfología				Asimilación de azúcares						Fermentación				
	Clamidosporas	Seudomicelios	Tubos germinales	Cápsula	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Galactosa	Lactosa	Rafinosa	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Galactosa	Úreasa
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	v	v	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>Candida krusei</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>Candida glabrata</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Candida guilliermondii</i>	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
<i>Candida lusitanae</i>	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	-	v	-	-	-	-	+
<i>Trichosporon asahii</i>	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>Geotrichum candidum</i>	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Los hongos levaduriformes forman colonias lisas semejantes a las bacterianas (Fig. 5.10).

Las colonias de *Candida* y *Cryptococcus* son blancas, estas últimas con tendencia a presentar aspecto mucoso y ureasa positiva. Las de *Trichosporon* y *Geotrichum* son blancas, pero de superficie rugosa o aspecto pulverulento, y por examen microscópico pueden observarse artrosporas. Las de *Rhodotorula* son rojas y ureasa positiva, y las de *Sporobolomyces*, asalmonadas.

Malassezia se caracteriza por su exigencia en ácidos grasos para el cultivo, su pequeño tamaño (2-4 µm) y un cuello de gemación ancho. Para la descripción de estas pruebas, véase el texto, y para el desarrollo técnico, ver los protocolos técnicos 5.3 y 5.5-5.8. Los medios de identificación se describen en el apartado Medios de cultivo.

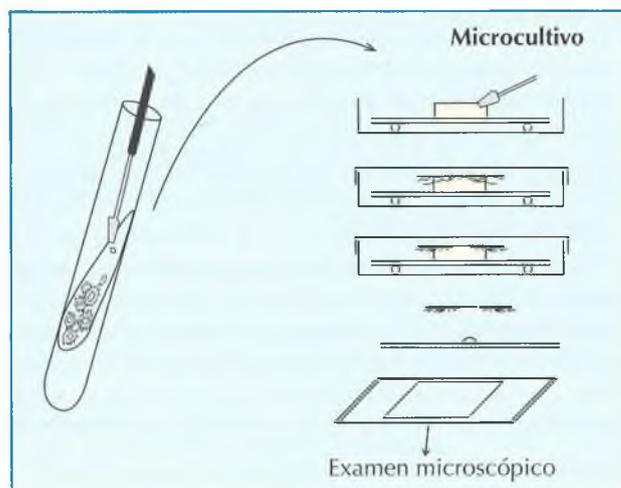
Existen galerías miniaturizadas comercializadas para la identificación de levaduras (véase texto).

Tubos germinales: micelio verdadero; pseudomicelio: yemas alargadas, véase figura 5.13.

+: Positivo; -: Negativo; v: Variable.

en medios con sangre y se incuban a 37 °C durante varios días (Figs. 5.21 y 5.22).

Otro grupo de hongos patógenos primarios está constituido por los dermatofitos. Algunos son de distribución



universal, y otros de distribución restringida. Su identificación requiere una cierta experiencia. En la figura 5.23 se señalan las características generales de los tres géneros: *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*, y en las figuras 5.24 a 5.27, las características de algunas de las especies aisladas con más frecuencia en nuestro medio.

Su identificación se basa en la morfología de sus conidios, siendo en ocasiones necesario complementar esta información con algunas pruebas metabólicas.

No es excepcional que un hongo filamentosos no esporule, observándose únicamente un micelio sin conio-

Figura 5.19. Microcultivo.

El microcultivo permite la observación de las estructuras microscópicas de los hongos filamentosos, en particular las esporas asexuales, sin alteración de las mismas. Para realizarlo se corta y dispone un cubo de agar estéril sobre un portaobjetos. En los laterales del agar se siembra el hongo a estudiar, se pone sobre el bloque de agar un cubreobjetos, y se coloca todo ello en una placa de Petri en cámara húmeda. Tras incubación de unos días, según el hongo, se toma el cubre que lleva adheridos los filamentos fúngicos que se han ido formando y trepando y se pone sobre un porta, en el que se ha depositado una gota de azul algodón, para su observación microscópica (Fig. 5.20).

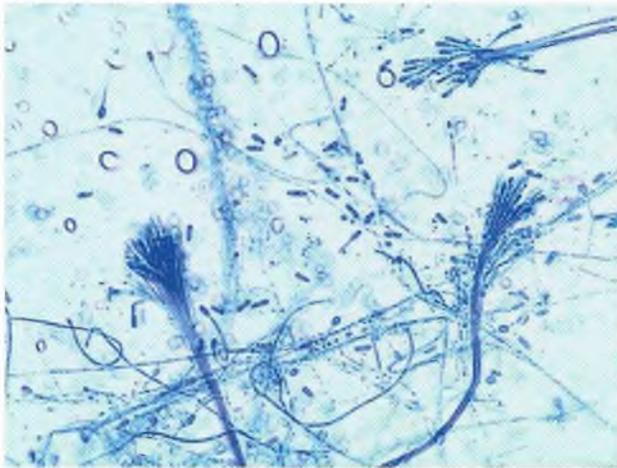


Figura 5.20. Observación de un microcultivo.

Puede observarse el conidióforo y las conidias obtenidas por microcultivo de un hongo filamentoso. Las estructuras están notablemente bien conservadas (*Graphium*).

dios (micelio estéril), por lo que resulta imposible su identificación. En este caso, para conseguir la esporulación, pueden utilizarse medios de cultivo con poco aporte nutritivo, como el agar patata, diseñados para este fin (véase Medios de cultivo).

En la figura 5.28 se representan esquemáticamente las características morfológicas de las estructuras de reproducción asexual de algunos hongos filamentosos oportunistas y/o contaminantes. La identificación de estos hongos requiere una notable experiencia. En la figura 5.29 se observa un cultivo característico de *Aspergillus flavus* y de la figura 5.30 a la 5.37 se observa el aspecto microscópico de alguno de estos hongos²⁰.

TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS Y MOLECULARES

Se han efectuado muchos estudios para poner a punto técnicas sensibles y específicas para la detección de antígenos fúngicos en líquidos estériles, sangre u orina, en particular de hongos oportunistas, como *Candida* y *Aspergillus* cuando producen infecciones sistémicas profundas en el pulmón, el riñón y otros órganos.

Los únicos reactivos comercializados con amplia experiencia y que hasta la actualidad se han mostrado útiles son los dirigidos a la detección de antígeno de *Pneumocystis jirovecii* (IF), del antígeno capsular de *Cryptococcus* en el LCR o en el suero (látex) y del galactomano de *Aspergillus fumigatus* en el suero (ELISA).

Existen otras técnicas comercializadas para la detección de antígenos fúngicos (enzimoinmunoanálisis para la detección de mananos de *Candida*).

También se han comercializado antígenos para la detección de anticuerpos antimanos (ELISA) y antimicelio de *Candida* (IFI), así como para la detección de anticuerpos frente a varias especies de *Aspergillus*²¹ por diversas técnicas. Por otra parte, también es posible detectar mediante técnicas enzimáticas componentes no antígenicos, como los 1-3 β -glucanos, presentes en la mayoría de los hongos. Todas estas pruebas son de reciente incorporación y están en fase de evaluación. Como en todos los reactivos comercializados, para su uso debe seguirse estrictamente las indicaciones del fabricante.

La aplicación de técnicas moleculares para el estudio de las infecciones fúngicas se encuentra en plena fase de desarrollo. Actualmente, sólo existen reactivos comercializados para la identificación por técnicas de hibridación de algunos hongos patógenos primarios *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* (Accuprobe®, Gen-Probe), mientras que las técnicas diagnósticas por métodos de amplificación sólo están disponibles a nivel experimental.

SENSIBILIDAD A LOS ANTIFÚNGICOS (ANTIFUNGIGRAMA)

Durante mucho tiempo, por razones fundamentalmente técnicas, ha existido gran incertidumbre sobre el valor del antifungigrama para determinar las concentraciones inhibitorias de los antifúngicos y, por tanto, para orientar el tratamiento. En los últimos años se ha progresado en la estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos, lo que ha permitido obtener resultados más reproducibles y comparables entre laboratorios y secundariamente efectuar estudios clínicos multicéntricos que han facilitado la interpretación de los resultados *in vitro* en relación con la eficacia del antifúngico en el tratamiento.

En la línea de la estandarización en 1997, el NCCLS aprobó un protocolo para el estudio de sensibilidad de las levaduras del género *Candida* y *Cryptococcus neoformans* (documento M27-A; M27-A2), y en 2002, para el estudio de sensibilidad de los hongos filamentosos (documento M38-A).

Sin embargo, las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos aún tienen algunos problemas metodológicos y limitaciones en cuanto a los puntos de corte establecidos.

²⁰ Las imágenes de este capítulo proceden de los laboratorios de Microbiología del Hospital de Sant Pau y del Hospital Vall d'Hebron. Una iconografía complementaria puede encontrarse en www.doctorfungus.org.

²¹ La detección de anticuerpos antiaspergilos se ha demostrado más útil en el diagnóstico de las aspergilosis alérgicas y las no invasivas, como el aspergiloma, que en las aspergilosis invasivas agudas o las semiinvasivas, en las que todavía no se han desarrollado anticuerpos (agudas) o es imposible diferenciar entre colonización e invasión (semiinvasivas).

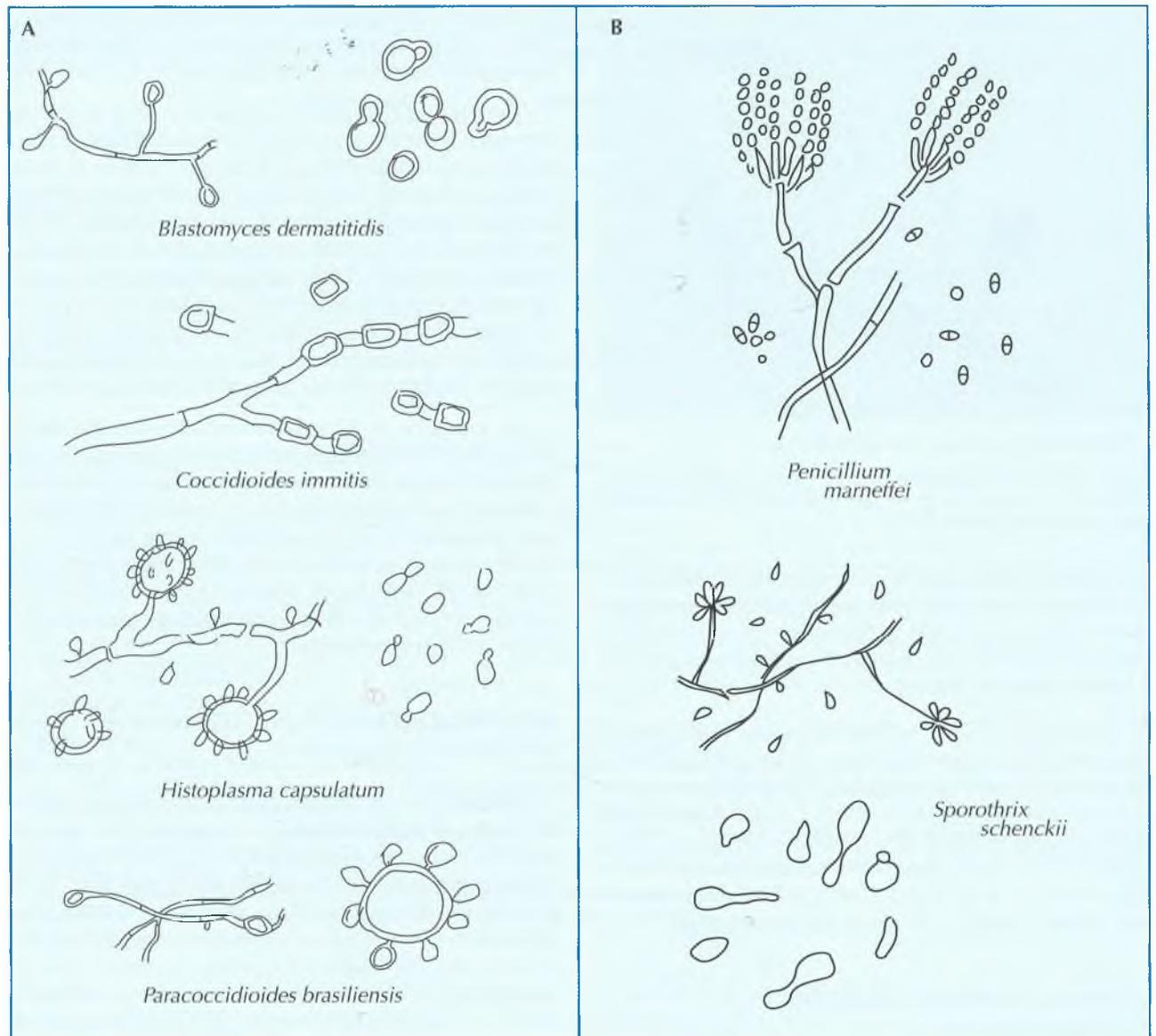


Figura 5.21. Aspecto microscópico de los hongos dimórficos.

Los hongos dimórficos se encuentran en estado filamentosos en la naturaleza y cuando se incuban a 28 °C. Por el contrario, cuando invaden los tejidos o se incuban a 37 °C adquieren la morfología de levadura. Entre los más importantes están *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, que se consideran patógenos primarios y *Penicillium marneffei*, que causa infecciones en pacientes inmunodeprimidos. Todos ellos producen infecciones pulmonares que puede generalizarse. Poseen una distribución geográfica restringida. *Sporothrix schenckii*, es de distribución universal y tras su inoculación accidental causa infecciones subcutáneas crónicas de diseminación linfática (granulomas).

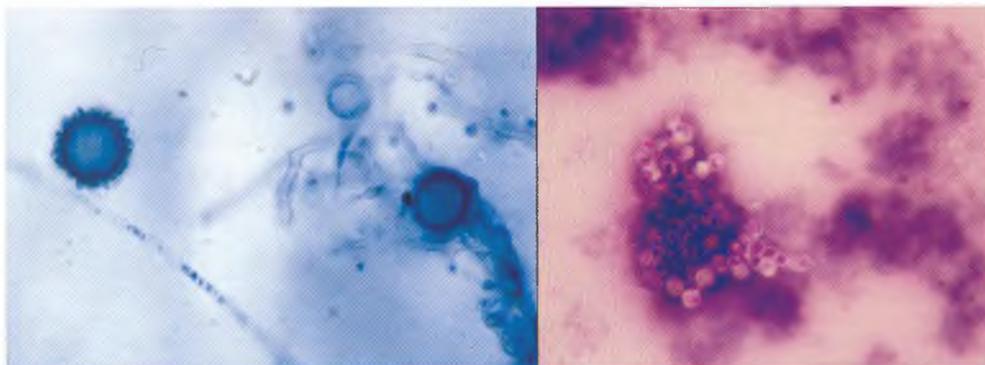


Figura 5.22. *Histoplasma capsulatum*.

Puede verse su forma filamentosas con macro y microconidias (izquierda) y la forma de levadura en un hemocultivo incubado a 37 °C (derecha). Este hongo dimórfico en su forma filamentosas esporulada no debe confundirse con *Scedonium*, hongo filamentosos que posee unas macroconidias semejantes, pero carece de microconidias (Fig. 5.28).

Dr Ferrán Sánchez. Servicio de Microbiología. H. de Sant Pau.

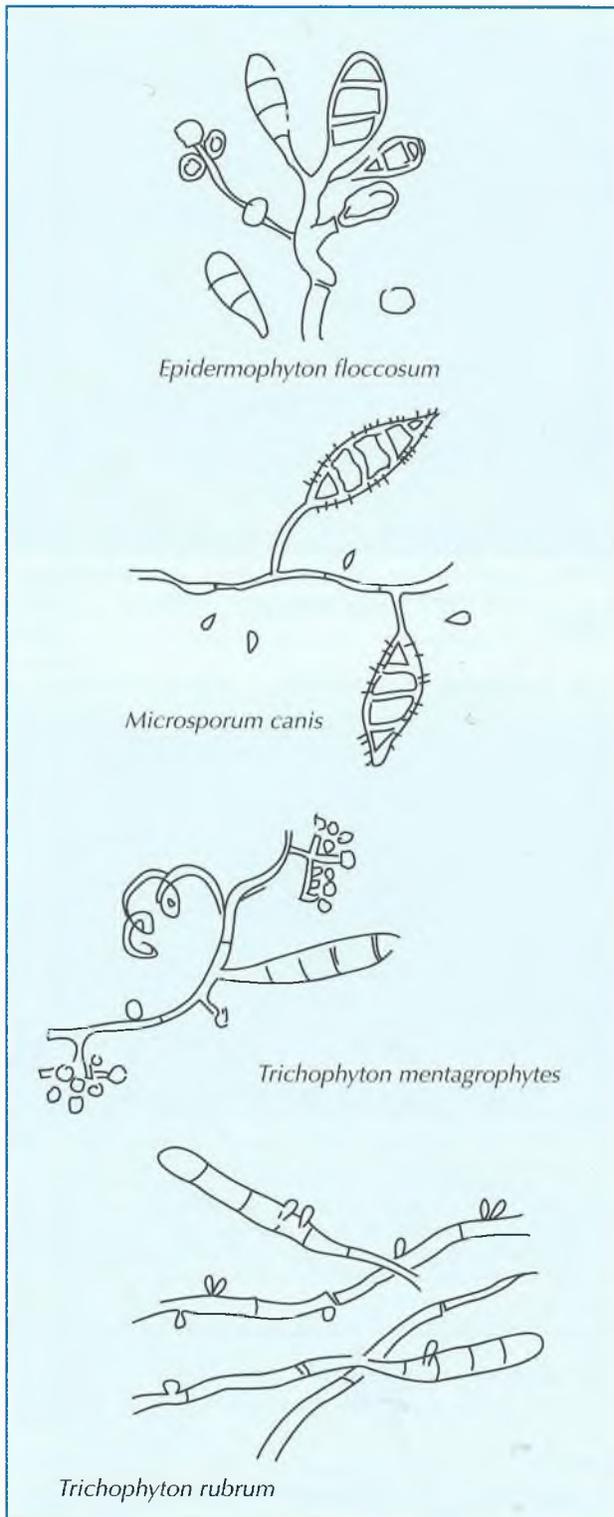


Figura 5.23. Dermatofitos.

Es característico de los dermatofitos la formación de conidias de gran tamaño, septadas (macroconidias) y de pequeño tamaño (microconidias). El género *Epidermophyton* produce numerosas macroconidias de pared gruesa y lisa, pero no produce microconidias. *Microsporum* produce macroconidias de pared gruesa, rugosa o equinuladas y generalmente pueden observarse microconidias. *Trichophyton* produce abundantes microconidias y escasas macroconidias de pared fina y lisa.



Figura 5.24. Dermatofitos. *Epidermophyton floccosum*.

Suele crecer lentamente y alcanza un buen desarrollo en unos 8 a 12 días. Las hifas son septadas. Las macroconidias, a veces agrupadas, tienen forma de porra con el extremo redondeado, una pared de grosor variable y lisa y con dos a cuatro septos. No forma microconidias.

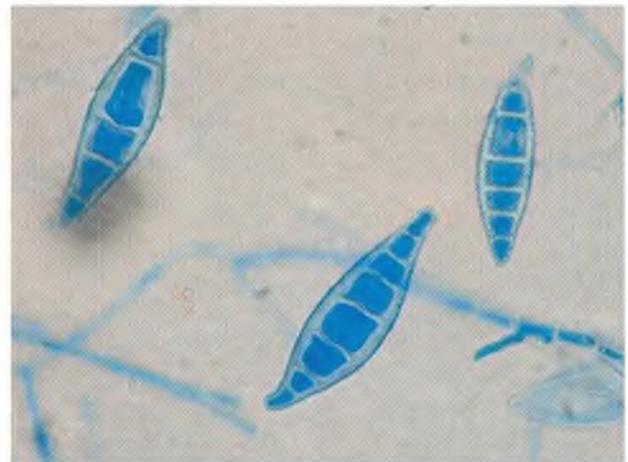


Figura 5.25. Dermatofitos. *Microsporum canis*.

Crece en seis a ocho días. Las hifas son septadas. Las macroconidias son grandes, anchas y con los extremos afinados lo que le confiere un aspecto fusiforme y tienen la pared gruesa, rugosa o con espinas. Se forman escasas microconidias piriformes a lo largo de las hifas.

A pesar de ello el antifungigrama es de gran utilidad al permitir confirmar la sensibilidad esperada de los hongos aislados en clínica o poder detectar la adquisición de resistencias en el curso de tratamientos prolongados con algunos antifúngicos²².

²² La mayoría de los hongos (levaduriformes y filamentosos) son sensibles a la anfotericina B, así como la mayoría de las levaduras lo son a los azoles, si bien *C. krusei* tiene una resistencia natural a éstos y *C. glabrata* es resistente en un alto porcentaje de casos. Durante tratamientos prolongados con algunos antifúngicos se ha demostrado la selección de resistencias *in vivo*, como en el caso del fluconazol y *C. albicans*.

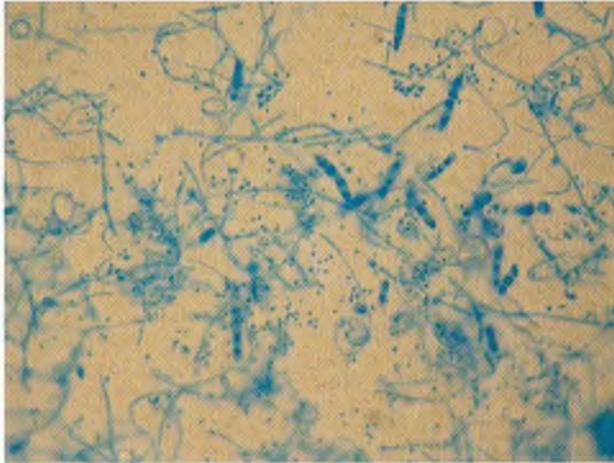


Figura 5.26. Dermatofitos. *Trichophyton mentagrophytes*.

Crece en siete a nueve días. Las hifas son septadas y algunas forman espirales. Las macroconidias son escasas, alargadas, en forma de salchicha, con pared fina y 5 a 10 septos. Las microconidias son muy abundantes, redondas y se forman en conidióforos ramificados.

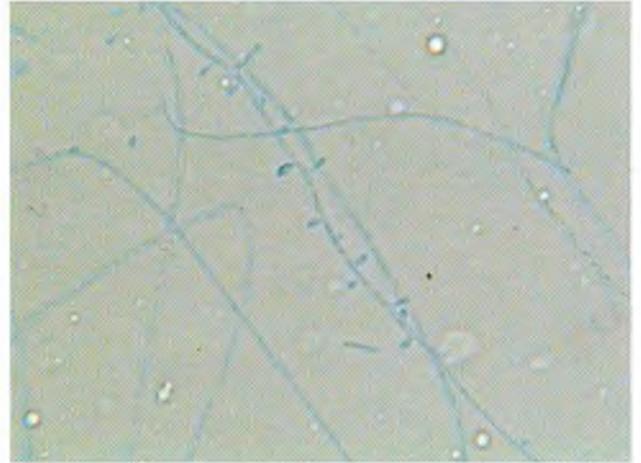


Figura 5.27. Dermatofitos. *Trichophyton rubrum*.

T. rubrum crece más lentamente, 15 días; tiene macroconidias algo más largas, de lados paralelos, con 6 a 10 septos, y de abundancia variable, aunque en general escasas. Las microconidias piriformes (en lagrima) se forman en las hifas o en las propias macroconidias, pero no en conidióforos.

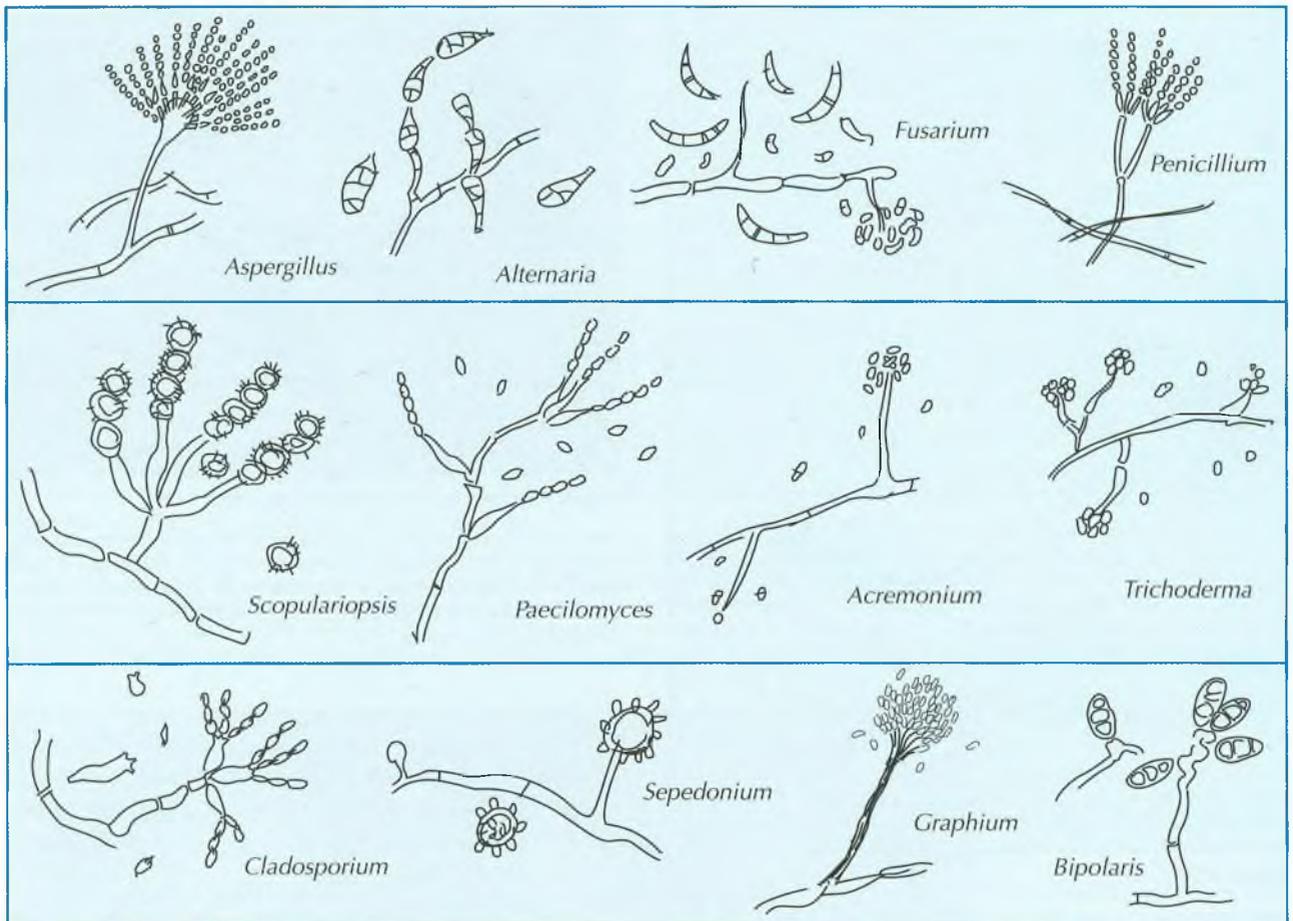


Figura 5.28. Hongos contaminantes y oportunistas.

En estas imágenes se muestran algunos hongos filamentosos superiores que pueden ser contaminantes de laboratorio o, en ocasiones y según la especie, agentes de infección oportunista como *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Sepedonium*, *Graphium* y *Bipolaris* entre otros. Los hongos inferiores se caracterizan por sus hifas anchas no septadas y las esporas asexuales internas, como en *Rhizopus* (Fig. 5.37).

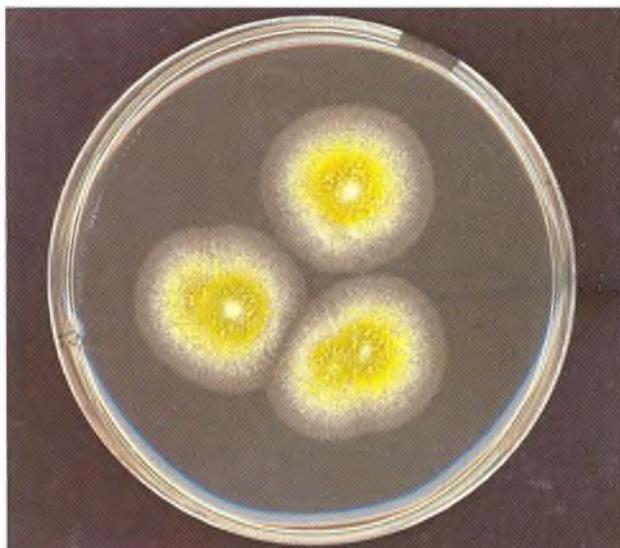


Figura 5.29. Cultivo de *Aspergillus flavus*.

A. flavus en el medio de Sabouraud da lugar a unas colonias amarillentas, verdosas o amarronadas con el anverso dorado o ligeramente tostado.

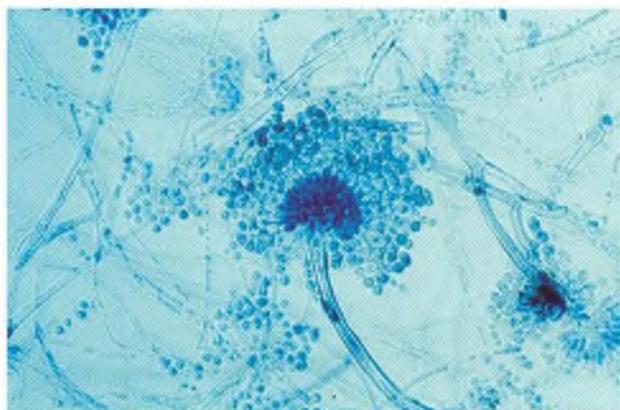


Figura 5.30. Aspecto microscópico de *Aspergillus*.

A. fumigatus, *A. niger*, *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. terreus* y *A. clavatus*, entre otros, se han descrito como oportunistas en diferentes infecciones. La identificación precisa de las especies requiere experiencia. Son de crecimiento rápido. Las hifas, de anchura media de tres a ocho micras, son septadas. El conidióforo es alargado y acaba en una gran cabeza o vesícula. Algunas especies forman en la cabeza pequeñas ramas (métulas) de las que sale la fiálide que da lugar a las conidias (fiálides biseriadas) y en otras especies la fiálide se forma de la cabeza sin métula (fiálide uniseriada). Las conidias redondas pueden ser lisas o rugosas.

Normalmente, no se estudia la sensibilidad de todos los hongos aislados en el laboratorio y suele limitarse a los procedentes de infecciones sistémicas graves o de infecciones persistentemente recidivantes de la piel o de las mucosas (dermatitis, muguet, vaginitis).

Hay que tener en cuenta que, en la mayoría de los enfermos con infecciones fúngicas invasivas, para erradicar la infección continúa siendo más importante remontar la inmunodepresión o eliminar el catéter que



Figura 5.31. *Aternaria*.

Produce filamentos septados y amarronados. Los conidióforos son de trayecto irregular y las conidias de color marrón, piriformes, con septos transversales y verticales, son muy características.



Figura 5.32. *Fusarium*.

Produce macroconidias septadas con forma característica de plátano con los extremos afinados y microconidias.

ha propiciado su instauración que la administración de antifúngicos, aunque éstos resultan imprescindibles para controlar la infección.

Las técnicas consideradas de referencia por el NCCLS (CLSI) para el estudio de la sensibilidad de los hongos son técnicas de macro y microdilución en medio líquido perfectamente estandarizadas en cuanto al medio de cultivo (RPMI 1640), tampón, pH, inóculo, tiempo y temperatura de incubación. La técnica permite cuantificar la inhibición de crecimiento que produce el antifúngico comparándola con el crecimiento de la levadura o moho en un control sin antifúngico y establece diferentes categorías de sensibilidad: sensible, sensible dosis dependiente, intermedio y resistente. La técnica presenta cierta dificultad de lectura en el caso de los azoles, pues el punto de corte se establece como la concentración más baja que produce una reducción impor-

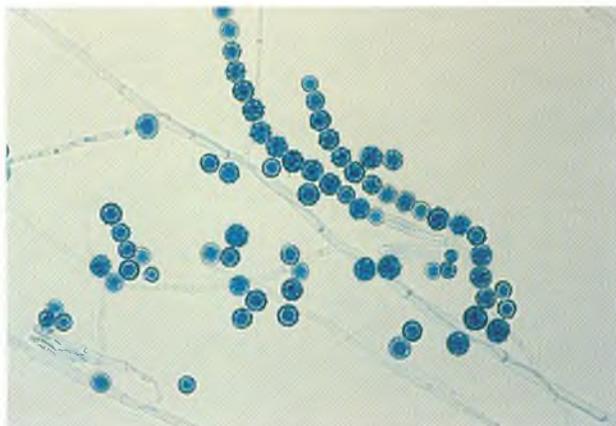


Figura 5.33. *Scopulariopsis*.

Forma hifas septadas con conidióforos cortos a veces ramificados. Las conidias son redondas oscuras y equinuladas. En ocasiones puede confundirse con *Penicillium*.



Figura 5.34. *Penicillium*.

Las especies de este género suelen ser contaminantes. Son de crecimiento rápido. Las hifas son finas y septadas. Los conidióforos forman pequeñas ramas, llamadas métulas, de las que se originan filidies en forma de botella, de las que salen las cadenas no ramificadas de conidias redondas y lisas (el aspecto global es de «pincel»). *P. marneffei*, es un hongo dimórfico en el que hay que pensar cuando el reverso de una colonia de *Penicillium* muestra un pigmento rojo difusible. Se halla en extremo oriente y no se ha detectado en Europa occidental.

tante del crecimiento ($\geq 80\%$) con respecto al crecimiento del control.

Existen paneles con antifúngicos deshidratados a distintas concentraciones; algunos incorporan un indicador que cambia de color cuando existe crecimiento fúngico. En el comercio se hallan diversos paneles disponibles, uno colorimétrico, cuantitativo (Sensititre YeastOne®), otro no colorimétrico de fácil incorporación en los laboratorios de rutina, pero que carece del voriconazol (ATB fungus® 2, bioMerieux), y un método colorimétrico de concentraciones críticas (Fungitest®, BioRad Laboratories Inc.). Los paneles comercializados sólo



Figura 5.35. *Graphium*.

De sus hifas se originan unos conidióforos largos y muy finos unidos entre sí para formar un haz (sinemata) en cuyo apex hay un conjunto de conidias pequeñas y alargadas con forma de grano de arroz.



Figura 5.36. *Bipolaris*.

Posee hifas oscuras y septadas. Su conidióforo presenta un trayecto irregular en zigzag y las conidias son grandes, oblongas y oscuras.

son útiles para estudiar la sensibilidad de los hongos levaduriformes.

Los métodos basados en la difusión en agar han sido poco útiles debido a problemas de difusión de la mayoría de antifúngicos. Recientemente, se ha introducido un método cuantitativo de difusión en agar (Etest®, AB Bio-disk) que emplea tiras de plástico inerte que incorporan un gradiente de concentración de antifúngico y permite determinar la concentración inhibitoria mínima (Fig. 5.38).

La correlación del Etest con el método de referencia del CLSI depende del medio de cultivo que se emplea, del tiempo de incubación, del antifúngico que se evalúa y de la especie fúngica que se estudia, pero parece ser buena. Esta técnica tiene la ventaja de ser cuantitativa, de metodología fácil, individualizada para cada antifúngico y aplicable tanto a hongos levaduriformes como filamentosos.

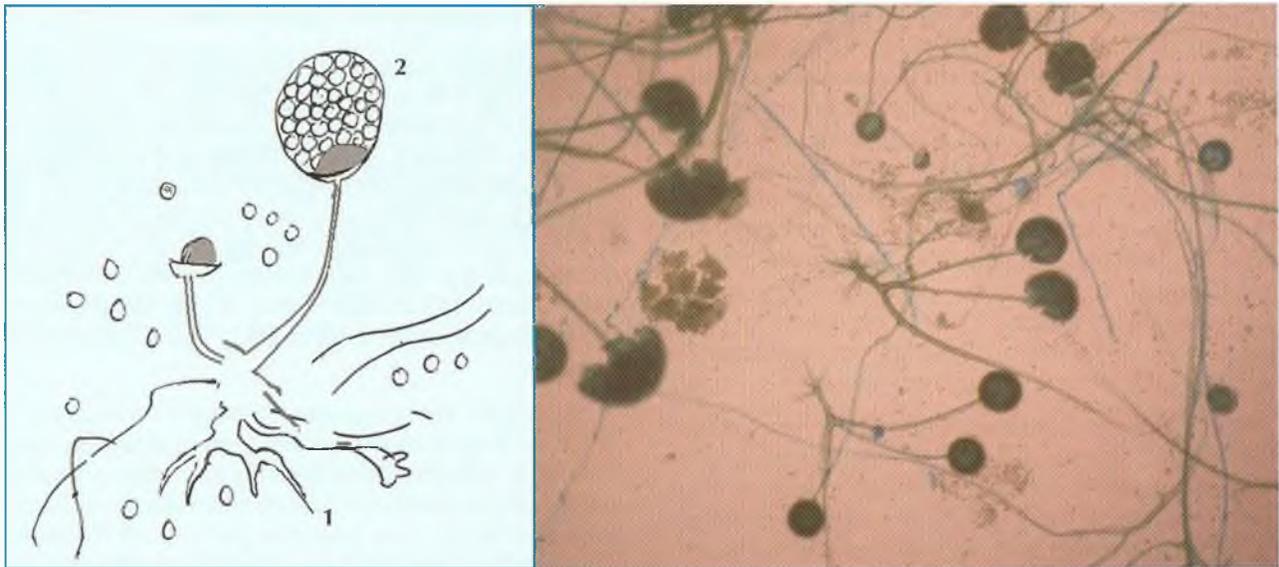


Figura 5.37. *Rhizopus*.

Es un género de hongo inferior, con hifas con escasos septos. Forman grupos de esporangióforos que tienen en su base unos rizoides y en su extremo superior un esporangio sacular en cuyo interior están las esporas.

1 Rizoides. 2. Esporangio.



Figura 5.38. Etest.

Puede observarse como la concentración inhibitoria mínima (CIM) viene determinada por la intersección entre la línea de inhibición del hongo y la tira de Epsilon test. En ocasiones en el interior del halo de inhibición hay una microcolonia, que en el caso de los imidazoles no ha de tenerse en cuenta.

En determinadas circunstancias puede tener interés la incorporación de fluconazol a un medio de cultivo convencional o cromogénico para la detección de cepas resistentes al fluconazol. Los métodos de dilución en agar no suelen emplearse para estudios de sensibilidad en el ámbito clínico.

Se está estudiando intensamente la posibilidad de estandarizar y generalizar técnicas para el estudio de la sensibilidad de hongos filamentosos.

MEDIOS DE CULTIVO²³. DESCRIPCIÓN

Medios de aislamiento

Medio (agar) de Sabouraud. Permite el aislamiento de la práctica totalidad de los hongos implicados en patología humana.

Para su preparación se mezclan 20 g de glucosa, 10 g de peptona y 20 g de agar en 1.000 ml de agua destilada, ajustando el pH a 6,8-7. Se esteriliza por autoclavado a 121 °C durante 15 minutos. Puede prepararse como caldo, con la misma formulación pero sin agar. La fórmula propuesta es la modificación de Emmons, que tiene una concentración de glucosa del 2% y un pH neutro (entre 6,8 y 7), parece más idónea que la fórmula clásica para la recuperación de la mayoría de los hongos y consigue una mayor estabilidad de la morfología colonial.

Medio de Sabouraud con antibióticos. La adición de antibióticos al medio base de Sabouraud inhibe el crecimiento de la flora bacteriana acompañante y se recomienda para la siembra estándar de todas las muestras. Suelen emplearse soluciones de cloranfenicol o gentamicina, o ambos simultáneamente, a concentraciones de 0,05 y 0,5 g/l respectivamente.

²³ La mayoría de estos medios deshidratados o preparados para su uso están comercializados por bioMérieux, BBL, Difco Laboratories, Oxoid Inc. y Remel, entre otras compañías.

Medio de Sabouraud con cicloheximida. La adición de cicloheximida (0,5 g/l) al medio base de Sabouraud o Sabouraud con antibióticos es útil para evitar el sobrecrecimiento de hongos contaminantes, pero algunos, como la mayoría de especies de mucorales, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Pseudallescheria*, *Cryptococcus neoformans* y algunas especies de *Candida* son sensibles a este antifúngico, por lo que es un medio que debe reservarse para recuperar hongos patógenos primarios, como los dermatofitos y los hongos dimórficos, que por su crecimiento más lento pueden ser inhibidos por el sobrecrecimiento de hongos contaminantes, no siendo recomendable para la siembra sistemática de todas las muestras.

CHROMagar Candida®. Se trata de un medio selectivo empleado para el aislamiento e identificación de las levaduras. Sobre una base de peptona y glucosa incorpora cloranfenicol y una mezcla de substratos cromogénicos que lo convierten en un medio selectivo y diferencial, que permite la identificación de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei*.

Agar cerebro-corazón. Los medios basados en caldo de cerebro y corazón (BHI) son medios ricos que pueden suplementarse con un 5-10% de sangre de carnero. Estos medios, suplementados con antibióticos, son útiles para el aislamiento de hongos patógenos primarios. Se utilizan para estudiar el dimorfismo (BHI con 5% de sangre de carnero incubado a 37 °C). Para su preparación se disuelven por ebullición 52 g del medio deshidratado de cerebro-corazón en 1 l de agua destilada y se esteriliza por autoclavado a 121 °C durante 15 minutos.

Dermatophyte test medium (DTM). Es un medio muy útil para el aislamiento de dermatofitos. Para prepararlo se disuelven 10 g de peptona, 10 g de glucosa y 20 g de agar en 1 l de agua destilada. A continuación se añaden 40 ml de solución de rojo de fenol (0,5 g de rojo de fenol en 15 ml de 0,1 N OHNa, completando con agua destilada hasta 100 ml) y 6 ml de HCl 0,8 M. Tras disolver 0,5 g de cicloheximida en 2 ml de acetona, se añade al medio mientras se calienta y disuelve. Se incorpora 0,1 g de sulfato de gentamicina previamente disuelto en 2 ml de agua destilada y se autoclava a 121 °C 10 minutos. Se disuelve 0,1 g de clortetraciclina en 25 ml de agua destilada estéril añadiéndola después al medio. El pH final ha de ser de $5,5 \pm 0,1$, con lo que el medio tiene un color amarillo. Repartir en tubos con tapón de rosca.

Medio de Sabouraud con ácidos grasos de cadena larga. Permite la recuperación de levaduras lipófilas del género *Malassezia*. Como fuente de ácidos grasos de cadena larga suele emplearse el aceite de oliva virgen, que puede añadirse en caliente durante la preparación del medio (a la proporción del 1%) o adicionarse en frío después de la siembra de la muestra (tres-cuatro gotas recubriendo la muestra y la superficie del medio).

Medios empleados en identificación

Agar patata-zanahoria-bilis (PCB). El medio patata-zanahoria-bilis (PCB) se emplea para estudios morfológicos de levaduras, siendo el medio de elección para evaluar la producción de clamidosporas por *Candida albicans*. Para su preparación, se hierve durante una hora 20 g de pulpa de patata y 20 g de zanahoria, se filtra y se añade el agua suficiente para completar un litro. Se disuelven 20 g de agar por ebullición durante cinco minutos, se añaden 15 g de bilis fresca o su equivalente comercial y se esteriliza por autoclavado a 121 °C durante 15 minutos.

Agar para auxonograma. Se emplea en la identificación de hongos levaduriformes, como medio base para estudiar la asimilación de hidratos de carbono. Para su preparación se añaden 4,5 ml de una solución nitrogenada al 6,7% (6,7 g de *yeast-nitrogen* base en 100 ml de agua destilada, esterilizar por filtración) a tubos con 36 ml de agar noble al 2% (esterilizado por autoclavado a 121 °C durante 15 minutos).

Medio de fermentación. Se emplea para la identificación de hongos levaduriformes, como medio base para estudiar la fermentación de hidratos de carbono. Para su preparación se disuelve un medio base de peptona (7,5 g) y extracto de levadura (4,4 g) en 1.000 ml de agua destilada, que se vierte a razón de 1,5 ml por tubo, en tubos de 12 x 120 mm con campana invertida de Durham y se esteriliza por autoclavado a 121 °C durante 15 minutos. Los diferentes azúcares se añaden antes de la siembra, a razón de 1 ml por tubo de una solución acuosa al 6% esterilizada por filtración. Los azúcares pueden guardarse en la nevera en viales sellados al fuego.

Medio de Czapek. Se considera el medio de referencia para estudios morfológicos de hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Para su preparación se disuelven los diferentes ingredientes por ebullición en un litro de agua (NaNO₃ 3 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄ 7H₂O 0,5 g, KCl 0,5 g, FeSO₄ 7H₂O 0,01 g y 15 g de agar) y seguidamente se incorporan 30 g de sacarosa, que sustituye a la glucosa como fuente de hidratos de carbono. El medio se esteriliza por autoclavado a 121 °C durante 15 minutos.

Agar patata-glucosa. Se trata de un medio empleado para favorecer la esporulación de la mayoría de los hongos filamentosos. Para su preparación se hervirán durante una hora, a fuego lento, 200 g de pulpa de patata; se filtra y se repone el agua suficiente para completar un litro. Se disuelven por ebullición 10 g de glucosa y 15 g de agar por litro. Se reparten en tubos que se esterilizan por autoclavado a 121 °C durante 15 minutos. Dejar solidificar inclinados.

Medio lactrimel de Borelli. Se emplea para favorecer la producción de pigmentos y la esporulación de la mayoría de los dermatofitos, siendo especialmente útil

para conseguir la esporulación de algunas especies del género *Microsporum* y para estimular la producción de pigmentos en *Trichophyton rubrum*. Para su preparación, se emplean 14 g de harina de trigo, 14 g de leche descremada en polvo, 20 g de agar y 7 g de miel, que se disuelven en 1.000 ml de agua destilada, lentamente y evitando la formación de grumos. Se reparte en tubos. Se esteriliza por autoclavado a 110 °C durante 10 minutos. Dejar solidificar inclinados.

Agar urea de Ferguson. Permite evaluar la capacidad de algunos hongos para hidrolizar la urea, siendo

de gran utilidad en la identificación de los hongos levaduriformes, como *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Trichosporon* y *Rhodotorula*, que son ureasa-positiva, y también en el caso de algunos dermatofitos. Se disuelven 29 gramos de urea agar base (Christensen) en 100 ml de agua destilada. Se esteriliza por filtración. Tras disolver 15 g de agar en 900 ml de agua destilada, se autoclava a 121 °C 15 minutos. Cuando el agar está aproximadamente a 50 °C, se añade 100 ml de la urea agar base preparada. Mezclar y repartir en tubos. Dejar solidificar inclinados.

LOS VIRUS. CONCEPTO

Los virus están formados por un fragmento de ácido ribonucleico o desoxirribonucleico, rodeado por proteínas llamadas capsómeros, que forman una cubierta denominada cápsida; ambos elementos —ácido nucleico y cápsida— forman la nucleocápsida, en cuyo interior, en algunos virus, también puede existir polimerasas para la replicación de los ácidos nucleicos y otras proteínas.

Según la forma de la nucleocápsida, se diferencian dos tipos de virus: los que presentan apariencia esférica porque los capsómeros se disponen formando un icosaedro (poliedro de veinte caras y doce vértices), y los helicoidales o alargados, en los que los capsómeros se sitúan alrededor y a lo largo de la cadena de ácido nucleico.

Los virus con las características que acaban de describirse se denominan desnudos. Existen otros virus, llamados envueltos, en los que la nucleocápsida está recubierta por una envoltura lipídica originada en la membrana nuclear o en la citoplasmática, según el virus, en la que hay glicoproteínas codificadas por el genoma vírico (Fig. 6.1).

Tanto los virus icosaédricos como los helicoidales pueden ser desnudos o envueltos, aunque todos los helicoidales de interés en patología humana son envueltos. Los poxvirus por la particularidad de su estructura se han considerado de simetría compleja.

Cuando un virus penetra dentro de una célula, libera el ácido nucleico, el cual se replica por acción de su propia polimerasa o de las de la célula, efectuando numerosas copias de sí mismo¹. El material genético del virus codifica las proteínas, que, a través del RNA mensajero, son sintetizadas en los ribosomas de la célula parasitada. Las principales proteínas víricas son los capsómeros, que recubrirán a cada una de las copias del ácido nucleico para constituir la nucleocápsida, que permitirá a los virus salir al exterior sin ser destruidos en el medio extracelular por la acción de agentes físicos o químicos, así como las polimerasas y proteasas propias de algunos virus. Los virus maduros liberados al exterior de la célula, denominados viriones, están en condiciones de infectar nuevas células en el interior de las cua-

les se libera el material genético para iniciar un nuevo ciclo de replicación.

Los viriones tienen un tamaño submicroscópico, entre 30 y 300 nm, por lo que no pueden observarse mediante el microscopio óptico convencional, aunque pueden visualizarse mediante el microscopio electrónico.

Los virus sólo se propagan en el interior de las células porque carecen de mecanismos propios para la obtención de energía y para la síntesis proteica. Los que se multiplican en células procariotas (bacterias) se denominan bacteriófagos (coloquialmente, fagos); los otros se multiplican en células eucariotas (protistas, vegetales, fúngicas, animales). En general, todos los virus tienen una elevada especificidad de huésped. También pueden propagarse en el laboratorio en células mantenidas *in vitro*.

Durante la multiplicación en la célula, tanto *in vivo* como *in vitro*, se sintetiza gran cantidad de proteínas estructurales y funcionales (capsómeros, glicoproteínas de la envoltura y polimerasas) que poseen capacidad antigénica, por lo que la célula está repleta de antígenos específicos del virus. Esta gran cantidad de material vírico, junto con las lesiones celulares asociadas, da lugar a la formación de estructuras características, que son visibles mediante microscopía convencional, denominadas cuerpos de inclusión. Estos cuerpos de inclusión pueden ser de localización nuclear o citoplasmática, y suelen ser típicos para cada grupo de virus, por lo que resultan útiles para su identificación.

Clasificación y nomenclatura

Los virus en microbiología clínica suelen agruparse en función del cuadro clínico que producen; entre estos grupos, destacan los virus respiratorios, los causantes de exantema, los que producen enteritis, los virus de las hepatitis y otros; pero en algún caso un mismo virus o virus muy próximos pueden producir cuadros muy diferentes, por lo que es preferible agruparlos por criterios basados en sus características biológicas.

Atendiendo a sus propiedades biológicas, los virus se clasifican por el tipo de material genético (DNA o

¹ Existen diferentes estrategias para la replicación, según el tipo de virus y la clase de ácido nucleico, DNA o RNA.

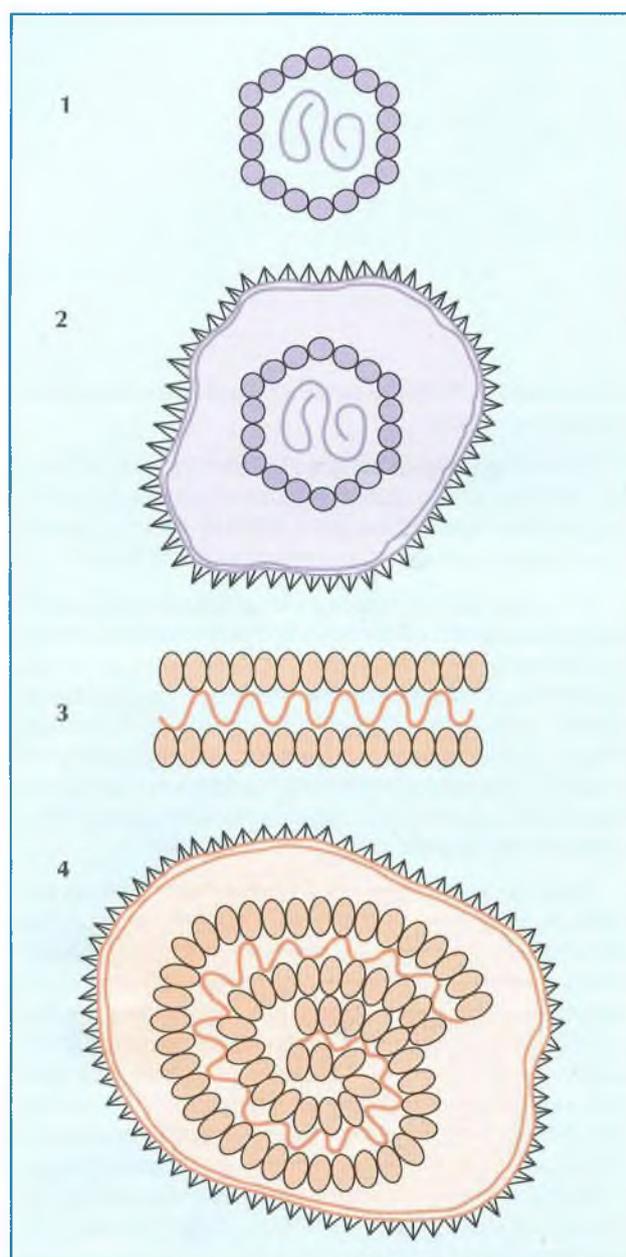


Figura 6.1. Esquema de las distintas morfologías de los viriones.

1. Partícula vírica en que los capsómeros se disponen alrededor del ácido nucleico formando un icosaedro. 2. Partícula vírica formada por una nucleocápsida con simetría icosaédrica recubierta por la envoltura. 3. Partícula vírica en la que los capsómeros se sitúan alrededor y a lo largo de la cadena del ácido nucleico presentando simetría helicoidal. 4. Partícula vírica formada por una nucleocápsida con simetría helicoidal, plegada y recubierta por la envoltura.

RNA), por la simetría de su cápsida (icosaédricos o helicoidales) y el número de capsómeros, por su tamaño, por su carácter envuelto o desnudo y en función de su huésped natural. Otras características fundamentales para la clasificación son el tipo inmunológico (serotipo)

y el genogrupo definido por la secuencia de determinados fragmentos del genoma.

Las familias y géneros de los virus se denominan con una sola palabra latina que acaban en «...viridae» y «...virus», respectivamente, se escriben en cursiva y con la inicial en mayúscula, como en el resto de la nomenclatura biológica (por ejemplo: familia: *Picornaviridae*, género: *Orthohepadnavirus*). El nombre de las especies se escribe en cursiva, pero sus reglas no se adaptan a las de la nomenclatura binomial², ya que el nombre de especie no comporta la inclusión del nombre del género y puede estar formado por una o más palabras, incluyendo números y acrónimos (abreviaciones). Para escribir el nombre de una especie, la inicial de la primera palabra se escribe en mayúscula, así como cualquier otra que signifique un nombre propio (por ejemplo: *Rotavirus A*, *Human parainfluenza virus 3*, *B 19 virus*, *Vesicular stomatitis Indiana virus*). Para algunos virus también se utilizan términos vernáculos particulares, como *Influenza A virus*, al que se conoce como virus de la gripe A.

El ICTV posee una base de datos en la Columbia University (ICTVdB) relativa a la nomenclatura de los virus (www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/). Se ha propuesto denominar todos los niveles taxonómicos de los virus mediante un sistema numérico decimal.

PRINCIPALES VIRUS DE INTERÉS EN MEDICINA

Los virus son los agentes que causan infecciones al hombre con más frecuencia. El pronóstico de estas infecciones varía desde formas leves, como el resfriado común, a enfermedades graves, como la rabia o el sida. Algunos virus patógenos para el hombre son de distribución universal, mientras que otros poseen una distribución geográfica restringida.

El número de medicamentos antivíricos disponible es limitado, y algunos virus adquieren fácilmente resistencias por mutaciones puntuales. Gracias a la vacunación, algunas enfermedades víricas son evitadas eficazmente (poliomielitis, sarampión, rubéola, gripe).

En la tabla 6.1, se muestran los principales virus de interés en medicina.

Entre los virus que causan infección con mayor frecuencia, se halla el grupo de los virus respiratorios. Este grupo está formado por los virus de la gripe A, B y C, el virus respiratorio sincitial (RSV) los virus parainfluenza, los adenovirus, los rinovirus y los coronavirus. Producen infecciones de las vías respiratorias altas (rinitis, faringitis y otitis) y broncopulmonares. Aunque algunos de estos virus se han asociado a determinados cuadros clínicos,

² Véase el capítulo 1. *La nomenclatura en biología*.

como los rinovirus al resfriado común (rinitis) o el virus de la gripe al síndrome gripal típico, la correlación con un cuadro clínico no es absoluta. Las infecciones del virus de la gripe y el virus respiratorio sincitial en las edades extremas de la vida, causando bronquiolitis o neumonía, suelen ser graves. El metancumovirus humano es un agente causal de infección respiratoria con un cuadro clínico semejante al del virus respiratorio sincitial. Los virus parainfluenza (tipos 1 a 4) causan infecciones respiratorias altas; el tipo 3 es el principal responsable después del RSV de bronquiolitis y neumonía en niños, y el tipo 4 causa infecciones muy benignas. Los adenovirus, que se han clasificado en diversos genotipos y serotipos (> 50 serotipos), causan cuadros clínicos muy diversos³, como queratitis (serotipos 8, 37) y conjuntivitis (11), infecciones respiratorias altas (1, 3, 4, 7 y otros serotipos), enteritis (40, 41) y cistitis (11). Los adenovirus causan enfermedad grave en los pacientes inmunodeprimidos, destacando la neumonía y la hepatitis. Algunos coronavirus se consideran agentes de enteritis, pero otros se han asociado a infección respiratoria, como el recientemente descrito agente del síndrome respiratorio agudo grave (SARS).

Algunos enterovirus, aunque tradicionalmente no se han incluido entre los virus respiratorios, causan con frecuencia infecciones respiratorias, algunas inespecíficas, como resfriado común y faringitis y otras más graves como neumonía.

El virus de la parotiditis causa una infección febril de las vías respiratorias, seguida de diseminación hemática, afectando a las parótidas, que aparecen aumentadas de tamaño, testículos, páncreas y sistema nervioso central, causando una meningoencefalitis de buen pronóstico. La vacunación ha disminuido su incidencia.

El virus del sarampión, una a dos semanas después de la infección, causa un cuadro febril con afectación de las vías respiratorias altas y fotofobia, apareciendo lesiones papulares blanquecinas características en la mucosa bucal (manchas de Koplic). Este cuadro se sigue de un exantema característico de inicio retroauricular que se extiende por todo el cuerpo. Las complicaciones más importantes, que confieren gravedad al sarampión, son la neumonía y la encefalitis postinfecciosa, que aparece en las fases avanzadas de la enfermedad, y que no hay que confundir con la panencefalitis esclerosante subaguda, que se inicia años después de la infección. El virus de la rubéola, tras dos a tres semanas de incubación, causa en los niños un exantema asociado a un cuadro de mononucleosis. La condición más grave de esta enfermedad es la infección congénita (cataratas, sordera y retraso mental). También causan enfermedades exantemáticas el herpesvirus 6, el virus B19 (quinta enfermedad) y algunos enterovirus (coxsackie y echo), el virus de Epstein-Barr, el citomegalovirus y otros, sin olvidar la escarlatina estreptocócica.

Los virus de la familia *Herpesviridae* persisten en latencia toda la vida después de la primoinfección, siendo frecuente su reactivación. Los del herpes simple (*Human herpesvirus 1* y *2* [HHV-1, HHV-2]) producen lesiones vesiculares cutaneomucosas, frecuentemente en los labios o en los genitales, y raramente meningoencefalitis. La varicela se caracteriza por ser una enfermedad febril, en ocasiones grave, con lesiones cutáneas (vesículas y pústulas) en diversos estadios simultáneos de desarrollo, causada por el virus de la varicela-zoster (*Human herpesvirus 3*; HHV-3). La reactivación de esta enfermedad causa el zoster (culebrilla), caracterizado por la aparición de vesículas muy dolorosas a lo largo del trayecto de un nervio periférico (intercostal, ciático, etc.). El virus de Epstein-Barr (HHV-4) se ha considerado el agente causal prototipo de la mononucleosis infecciosa, llamada enfermedad del beso por su mecanismo de transmisión. Se caracteriza por astenia, faringitis, exantema, poliadenomegalia y linfomonocitosis en la sangre periférica. La infección por este virus se ha asociado a tumores como el carcinoma nasofaríngeo y el linfoma de Burkitt. En los pacientes trasplantados, puede dar lugar a una enfermedad linfoproliferativa. El citomegalovirus (HHV-5) produce con frecuencia infección asintomática, infección respiratoria en niños o un cuadro de mononucleosis en mayores de 25 años, todas ellas de buen pronóstico. Cuando se reactiva en los pacientes inmunodeprimidos, causa infecciones de topografía muy variada, de localización pulmonar, intestinal o generalizada, pudiendo afectar a la retina (corioretinitis). El citomegalovirus es causa de infección congénita (sordera, retraso mental, microcefalia, calcificaciones cerebrales). El herpesvirus humano 6 (HHV-6) es el agente causal del exantema súbito (roséola, sexta enfermedad), y el HHV-8 se asocia al sarcoma de Kaposi.

El virus B19 causa en los niños un exantema característico que se inicia en las mejillas, pudiendo extenderse a brazos y piernas (quinta enfermedad). En los adultos, produce artralgias que pueden asociarse a exantema. En personas con anemia hemolítica crónica, puede desencadenar una crisis aplásica con anemia grave y persistente. También puede causar anemia fetal por infección trasplacentaria.

En el género *Enterovirus*, los poliovirus causan infección asintomática, con replicación del virus en la faringe y el tubo digestivo; en otras ocasionan un síndrome febril inespecífico, una enteritis o un cuadro de meningoencefalitis, y sólo en una pequeña proporción, entre el 1 y el 10 por cada 1.000 personas no vacunadas, se produce el síndrome paralítico por afectación de las neuronas motoras del asta anterior de la médula. La poliomielitis está prácticamente erradicada en los países desarrollados gracias a la vacunación. El resto de las especies

³ Se indican entre paréntesis los serotipos más frecuentes para cada proceso, pero también pueden causarlos otros serotipos.

Tabla 6.1
Principales virus de interés en medicina

Familia/Género	Especie	Nombre común de las especies
Virus DNA		
Desnudos:		
<i>Adenoviridae:</i>		
<i>Mastadenovirus</i>	<i>Human adenovirus (A-F)</i> ¹	Adenovirus humanos
<i>Papillomaviridae:</i>		
<i>Papillomavirus</i>	<i>Human papillomavirus</i>	Virus del papiloma humano
<i>Polyomaviridae:</i>		
<i>Polyomavirus</i>	<i>BK polyomavirus</i> <i>JC polyomavirus</i>	Virus BK Virus JC
<i>Parvoviridae:</i>		
<i>Erythrovirus</i>	<i>B19 virus</i>	Virus B19
Envueltos:		
<i>Herpesviridae:</i>		
<i>Simplexvirus</i>	<i>Human herpesvirus 1</i> <i>Human herpesvirus 2</i>	Virus del herpes simple 1 (HHV-1) Virus del herpes simple 2 (HHV-2)
<i>Varicellovirus</i>	<i>Human herpesvirus 3</i>	Virus del varicela-zoster (HHV-3)
<i>Lymphocryptovirus</i>	<i>Human herpesvirus 4</i>	Virus de Epstein-Barr (HHV-4)
<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Human herpesvirus 5</i>	Citomegalovirus humano (HHV-5)
<i>Roseolovirus</i>	<i>Human herpesvirus 6</i> <i>Human herpesvirus 7</i>	Herpesvirus humano 6 (HHV-6) Herpesvirus humano 7 (HHV-7)
<i>Rhadinovirus</i>	<i>Human herpesvirus 8</i>	Herpesvirus humano 8 (HHV-8)
<i>Poxviridae:</i>		
<i>Orthopoxvirus</i>	<i>Variola virus</i>	Virus de la viruela
<i>Parapoxvirus</i>	<i>Orf virus</i>	Virus orf
<i>Molluscipoxvirus</i>	<i>Molluscum contagiosum virus</i>	Virus del <i>molluscum contagiosum</i>
<i>Hepadnaviridae:</i>		
<i>Orthohepadnavirus</i>	<i>Hepatitis B virus</i>	Virus de la hepatitis B
VIRUS RNA		
Desnudos:		
<i>Picornaviridae:</i>		
<i>Enterovirus</i>	<i>Poliovirus</i> <i>Human enterovirus A</i> <i>Human enterovirus B</i> <i>Human enterovirus C</i> <i>Human enterovirus D</i>	Virus de la poliomielitis humana Virus coxsackie, enterovirus 71 Virus coxsackie B. Virus echo Virus coxsackie Enterovirus 68 y 70
<i>Rhinovirus</i>	<i>Human rhinovirus A</i> <i>Human rhinovirus B</i>	Rinovirus humanos Rinovirus humanos
<i>Hepatovirus</i>	<i>Hepatitis A virus</i>	Virus de la hepatitis A
<i>Parechovirus</i>	<i>Human parechovirus 1, 2</i>	
<i>Caliciviridae:</i>		
<i>Norovirus</i>	<i>Norwalk virus</i>	Virus de Norwalk
<i>Sapovirus</i>	<i>Sapporo virus</i>	Virus de Sapporo
<i>Hepeviridae</i>	<i>Hepevirus</i>	Virus de la hepatitis E
<i>Reoviridae:</i>		
<i>Rotavirus</i>	<i>Rotavirus A</i> <i>Rotavirus B</i>	Rotavirus A Rotavirus B
<i>Astroviridae:</i>		
<i>Astrovirus</i>	<i>Human astrovirus 1</i>	Astrovirus

Tabla 6.1 (continuación)
Principales virus de interés en medicina

Familia/Género	Especie	Nombre común de las especies
VIRUS RNA		
Envueltos:		
<i>Orthomyxoviridae:</i>		
<i>Influenzavirus A</i>	<i>Influenza A virus</i>	Virus de la gripe A
<i>Influenzavirus B</i>	<i>Influenza B virus</i>	Virus de la gripe B
<i>Influenzavirus C</i>	<i>Influenza C virus</i>	Virus de la gripe C
<i>Paramyxoviridae:</i>		
<i>Respirovirus</i>	<i>Human parainfluenza virus 1</i> <i>Human parainfluenza virus 3</i>	Virus parainfluenza 1 Virus parainfluenza 3
<i>Pneumovirus</i>	<i>Human respiratory syncytial virus</i>	Virus respiratorio sincitial
<i>Metapneumovirus</i>	<i>Human metapneumovirus</i>	Metaneumovirus humano
<i>Morbillivirus</i>	<i>Measles virus</i>	Virus del sarampión
<i>Rubulavirus</i>	<i>Human parainfluenza virus 2</i> <i>Human parainfluenza virus 4</i> <i>Mumps virus</i>	Virus parainfluenza 2 Virus parainfluenza 2 Virus de la parotiditis
<i>Rhabdoviridae:</i>		
<i>Lyssavirus</i>	<i>Rabies virus</i>	Virus de la rabia
<i>Coronaviridae:</i>		
<i>Coronavirus</i>	<i>Human coronavirus 229E</i> <i>Human coronavirus OC43</i> <i>SARS coronavirus²</i>	Coronavirus humano
<i>Flaviviridae:</i>		
<i>Flavivirus</i>	<i>Yellow fever virus</i>	Virus de la fiebre amarilla
<i>Hepacivirus</i>	<i>Hepatitis C virus</i>	Virus de la hepatitis C
<i>Togaviridae:</i>		
<i>Alphavirus</i>	<i>Sindbis virus</i>	Diferentes virus causantes de encefalitis el hombre
<i>Rubivirus</i>	<i>Rubella virus</i>	Virus de la rubéola
<i>Arenaviridae:</i>		
<i>Arenavirus</i>	<i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i> <i>Lassa virus</i>	Virus de la coriomeningitis linfocitaria Virus de la fiebre de Lassa
<i>Deltavirus</i>	<i>Hepatitis delta virus</i>	Virus de la hepatitis D
<i>Filoviridae:</i>		
<i>Marburgvirus</i>	<i>Lake Victoria marburgvirus</i>	Virus Marburg
<i>Ebolavirus</i>	<i>Zaire virus</i>	Virus Ebola
<i>Bunyaviridae:</i>		
<i>Orthobunyavirus</i>	<i>Bunyamwera virus</i>	Virus bunyamwera
<i>Hantavirus</i>	<i>Hantaan virus</i>	Virus Hantaan
<i>Retroviridae:</i>		
<i>Lentivirus</i>	<i>Human immunodeficiency virus 1</i> <i>Human immunodeficiency virus 2</i>	Virus de la inmunodeficiencia humana 1 Virus de la inmunodeficiencia humana 2
<i>Deltaretrovirus</i>	<i>Human T-lymphotropic virus 1</i> <i>Human T-lymphotropic virus 2</i>	Virus HTLV 1 Virus HTLV 2

Todos los virus DNA son bicatenarios (ds), excepto los parvovirus, que son monocatenarios (ss); por el contrario, todos los virus RNA son monocatenarios (ss), excepto los reovirus, que son bicatenarios.

La taxonomía de los virus varía con frecuencia. La recogida en esta tabla se ha tomado de: Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on taxonomy of viruses. <http://phene.cpmc.columbia.edu/ICTVdB>.

¹ El género *Mastadenovirus* incluye seis especies de virus que pueden afectar al hombre: *Human adenovirus A* hasta *Human adenovirus F*.

² *Severe acute respiratory syndrom coronavirus*.

pertenecientes al género *Enterovirus*, *Human enterovirus A, B, C y D*, que engloban los antiguos coxsackie y echo, causan una patología muy variada según la especie y el serotipo, que puede resumirse en conjuntivitis hemorrá-

gica, herpangina (enfermedad faríngea vesicular), pleurodinia y enfermedades del sistema nervioso central, incluyendo meningitis y enfermedad paralítica diferente de la poliomiéltis, cuadros exantemáticos, así como

miocarditis y pericarditis e infecciones respiratorias, según se ha señalado anteriormente.

Las gastroenteritis víricas están causadas por los rotavirus, que son de predominio invernal, los calicivirus (géneros *Norovirus* y *Sapovirus*), adenovirus F (serotipos 40, 41), astrovirus y coronavirus.

Los virus causantes de hepatitis se han denominado con las letras A hasta E. Pertenecen a familias diferentes (Tabla 6.1). Su vía de transmisión es distinta (oral: A y E; parenteral: B, D y C). El virus de la hepatitis D sólo puede replicarse asociado al B; es decir, en coinfección. Las hepatitis causadas por los virus A y E tienen buen pronóstico y no evolucionan a la cronicidad; los virus de las hepatitis B y C pueden persistir en replicación activa causando enfermedad crónica que puede abocar a cirrosis y/o hepatocarcinoma (véase el capítulo 20. *Hepatitis*).

Los papilomavirus infectan la piel o las mucosas causando verrugas cutáneas (verruga común, plana plantar), papilomas laríngeos, orales o verrugas anogenitales, como el condiloma acuminado y displasia cervical (uterina), que puede abocar al cáncer genital. Determinados genotipos se asocian a una u otra patología; en el cáncer de cérvix, se suelen encontrar los genotipos 16 y 18. Los poliomavirus BK y JC permanecen latentes después de la primoinfección asintomática y en pacientes con sida causan infecciones graves del tracto urinario (BK) o del sistema nervioso central (JC) causando una leucoencefalopatía multifocal progresiva.

El virus de la rabia tiene su reservorio en los animales salvajes; se trasmite por la mordedura de un animal infectado a través de la saliva. Después de un período de incubación largo (2-12 meses), se inicia un cuadro clínico con fiebre, náuseas, cefalea y astenia, que dura unos pocos días; después sigue con espasmos faríngeos, dolor muy intenso en la deglución de líquidos que comporta hidrofobia y parálisis que acaba en coma. La enfermedad tiene una elevadísima mortalidad.

Entre los virus transmitidos por artrópodos (*arbovirus*, *artropod borne virus*) los miembros de tres familias *Flaviviridae*, *Togaviridae* y *Bunyaviridae* pueden causar infección al hombre. Los cuadros clínicos más característicos son: 1) síndrome febril con o sin exantema, 2) artromialgias con o sin fiebre, 3) encefalitis y 4) fiebres hemorrágicas generalmente asociadas a hepatitis; estas dos últimas en general de pronóstico grave.

Entre los *Flavivirus* (*Flaviviridae*) destacan la encefalitis japonesa, la encefalitis del valle de Murray, la encefalitis rusa de primavera-verano, la encefalitis de San Luis, la encefalitis por garrapatas y la encefalitis del oeste del Nilo; así como las fiebres hemorrágicas causadas por el virus de la fiebre amarilla y el dengue. En el género *Alphavirus* de la familia *Togaviridae* hay que señalar los

agentes de las encefalitis equina del este y del oeste y la encefalitis de Venezuela y en la familia *Bunyaviridae* hay que destacar en el género *Bunyavirus* la encefalitis de la Crosse y en el género *Flebovirus* la fiebre por flebotomos (síndrome febril).

En estas familias hay miembros que no se mantienen ni transmiten por artrópodos como el virus de la rubéola y el de la hepatitis C (Tabla 6.1).

Otros virus *Arenaviridae* y *Bunyaviridae* tienen su reservorio en roedores y alcanzan al hombre por vía aérea como el virus de Lassa (*Arenavirus*) y los virus de Hantaan y Sin nombre (*Hantavirus*, familia *Bunyaviridae*).

Los virus de Margburg (*Marburgvirus*) y de Ebola (*Ebolavirus*) de la familia *Filoviridae* causan fiebres hemorrágicas con hepatitis muy graves; no se conoce su reservorio ni su vía precisa de transmisión.

Los retrovirus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2 causan el sida. Son virus RNA que se replican mediante un intermediario de DNA (cDNA) sintetizado por una DNA polimerasa RNA dependiente (transcriptasa inversa). Este DNA se integra permanentemente en el genoma celular y a partir de él se efectúan las copias de RNA vírico que darán lugar a los viriones maduros.

Los virus del herpes simple, varicela-zóster, de la rubéola, citomegalovirus, el virus de la inmunodeficiencia humana y el virus B19 se han asociado a infección congénita.

Algunos virus, como el de la viruela, han sido erradicados gracias a la vacunación; otros, como los de la poliomielitis y el sarampión, están en vías de erradicación.

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

Tradicionalmente, el diagnóstico de las infecciones víricas se ha considerado complejo debido a la imposibilidad de efectuar un examen directo por microscopía convencional y porque el aislamiento de los virus debe realizarse en líneas celulares, cuyo mantenimiento es laborioso y requiere experiencia. Por otra parte, la serología aporta resultados tardíos, ya que, para poder efectuar el diagnóstico de modo inequívoco, se requiere la comparación del resultado de dos sueros: uno obtenido en una fase precoz de la enfermedad y otro en el período de convalecencia.

Este contexto tradicional ha ido modificándose por la aplicación de técnicas de examen microscópico relativamente asequibles y eficaces, como la inmunofluorescencia, que constituye una técnica de examen directo del material clínico a través de la detección de los antígenos víricos en las células infectadas, así como por la introducción progresiva de otras pruebas para la detección de antígenos (inmunoenzimáticas y otras); además, la utilización de sondas y, sobre todo, de técnicas de amplifi-

cación genómica ha incrementado las posibilidades de diagnóstico y permite suplir, en parte, el cultivo celular.

Sin duda, uno de los campos donde las técnicas de amplificación genómica han sido más útiles es el diagnóstico virológico, tanto para la detección de un virus como para su cuantificación, dato que resulta útil para determinar el estado actual y el pronóstico de las infecciones causadas por el virus de la inmunodeficiencia humana, el citomegalovirus, el virus de Epstein-Barr y los virus de la hepatitis (véase el capítulo 9).

A pesar de las limitaciones propias de la tecnología tradicional, hay ocasiones en que el aislamiento de un virus en cultivo celular posee interés porque no existen otras técnicas asequibles para su detección, porque la rapidez del resultado lo hace eficiente (herpes simple), porque permite estudiar las características antigénicas del virus (gripe) o para disponer de la cepa en estudios de sensibilidad (citomegalovirus), tipado y epidemiología.

Por último, la introducción de pruebas serológicas para la detección de inmunoglobulinas de fase aguda (IgM, IgA, IgG de baja afinidad) ha facilitado la obtención de resultados serológicos precoces (por ejemplo, hepatitis), que resultan eficaces en el contexto del diagnóstico, según se presenta en el capítulo 8.

La toma de las muestras para estudio virológico debe efectuarse según el cuadro clínico y el procedimiento diagnóstico que vaya a utilizarse. En las faringitis, conjuntivitis, úlceras cutáneas, etc., la muestra debe tomarse de la lesión con un escobillón después de limpiar y eliminar el exudado si existe, con el objeto de recoger el máximo número de células. Este material debe introducirse en un tubo con medio de transporte como la solución salina de Hank o Earle, y, si no es posible, deben utilizarse escobillones con un medio de transporte para virus⁴. El material del aspirado nasofaríngeo o el lavado broncoalveolar ha de sembrarse de inmediato o guardarse en la nevera sin medio de transporte o conservante. Los líquidos orgánicos (líquido cefalorraquídeo, pericárdico, amniótico, etc.) se ponen en un tubo estéril con tapón de rosca sin medio de transporte ni conservante y se mantienen en la nevera hasta su procesamiento. En todo caso, las muestras deben procesarse lo antes posible.

En la tabla 6.2 se indica el material clínico y las técnicas de estudio en los síndromes más frecuentes de etiología vírica (véase además el capítulo 12).

Examen directo

Microscopía óptica

Las tinciones citológicas convencionales, como la hematoxilina-eosina, permiten la observación de los cuerpos de inclusión en las células de las muestras clínicas.

Así sucede en las muestras de orina, en las que puede detectarse el citomegalovirus en las células del tracto urinario o en las lesiones vesiculares cutaneomucosas donde puede visualizarse el virus del herpes simple o el de la varicela. Sin embargo, este procedimiento en la práctica sólo se ha introducido para el diagnóstico de la infección cutánea por virus herpéticos (Técnica de Tzanck); en la actualidad se prefieren las técnicas microscópicas de inmunofluorescencia por su mayor sensibilidad y su mayor especificidad.

Microscopía de fluorescencia

La utilización de anticuerpos marcados con fluorescencia dirigidos contra los antígenos de un virus permite observar mediante el microscopio de fluorescencia las células de los tejidos infectadas con el virus. Es una técnica de detección de antígeno, y a la vez un examen microscópico directo. Aparte de los virus HHV 1, 2 y 3, esta técnica permite detectar eficazmente los virus de la gripe, virus respiratorio sincitial, parainfluenza y adenovirus en las muestras respiratorias, y el citomegalovirus en la sangre⁵ (Tabla 6.2). Las células presentan fluorescencia con un patrón característico para los diferentes virus detectados (Figs. 6.2 y 6.3).

Microscopía electrónica

La disposición de microscopios electrónicos de manejo relativamente sencillo ha permitido el diagnóstico rápido de infecciones vesiculares como el herpes, la varicela, y, sobre todo, de las infecciones intestinales por rotavirus, calicivirus y otros virus enteropatógenos. El tratamiento con anticuerpos específicos de algunas muestras, en particular las heces, antes de observarlas al microscopio electrónico, facilita la aglutinación y agregación de las partículas víricas y, por tanto, su visualización (inmunomicroscopía electrónica). Estas técnicas de microscopía electrónica no se han introducido en la rutina de los laboratorios de microbiología clínica, pero se utilizan en centros especializados (Figs. 6.4 y 6.5).

Cultivo

Aislamiento en cultivos celulares

Los virus no pueden multiplicarse en medios de cultivo convencionales como los utilizados en bacteriología y sólo se multiplican en el interior de las células. Por ello, para conseguir el aislamiento y la propagación de un virus a partir de una muestra clínica, ésta debe inocularse a cultivos celulares, que son células vivas mantenidas *in vitro*, y en algún caso al embrión de pollo, al ratón lactante u otros animales. Los cultivos celulares son el sistema empleado habitualmente para el aislamiento de los virus en los laboratorios de microbiología clínica.

⁴ Existen escobillones en el comercio con medios adaptados al transporte de virus (véase el capítulo 12).

⁵ Diversas compañías disponen de reactivos para IF: Bartels y Trinity Biotech, Biotest Diagnostic Corporation, Chemicon International Inc. Dako Corporation, Diagnostic Products Corporation.

Tabla 6.2
Tipo de muestra según la localización de la infección, el virus sospechado y las técnicas de diagnóstico utilizadas

Localización	Virus asociado	Método diagnóstico	Método alternativo	Muestras
Piel y mucosas:				
Exantemas vesiculares	HHV 1, 2	CC	IF	Líquido vesicular
	HHV3 (Varicela-zoster)	IF/CC		Líquido vesicular
	Enterovirus (Sd. boca-mano-pie)	CC		Líquido vesicular, exudado faríngeo, heces
Exantemas maculopapulares	Enterovirus	CC		Líquido vesicular, heces
	Sarampión	IF	S	Exudado faríngeo
	Rubéola	S	CC	Suero, exudado faríngeo
	B19, HHV6	S		Suero
Enantemas (herpangina)	Enterovirus	CC		Exudado de la lesión
	HHV 1, 2	CC	IF	Exudado de la lesión
Mucositis orales	HHV 1, 2	CC	IF	Exudado de la lesión
Lesiones genitales	HHV 1, 2	CC	IF	Exudado de la lesión
	V. del papiloma	PCR		Raspado cervical o biopsia
Ojos:				
Queratoconjuntivitis	Adenovirus	CC	IF	Exudado conjuntival
Conjuntivitis hemorrágica	Enterovirus	CC		Exudado conjuntival
Queratitis herpética	HHV 1,2	IF o CC		Raspado corneal
Coriorretinitis	HHV-5 (Citomegalovirus)	CC, S-V		Sangre
Uveitis	HHV 1, 2, 3	PCR		
Aparato respiratorio:				
Gripe	V. de la gripe	IF, CC	PCR	Aspirado moco nasofaríngeo
				Exudado faríngeo, exudado nasal
Bronquiolitis	V. respiratorios	IF, CC	PCR	Aspirado moco nasofaríngeo
Neumonía	V. respiratorios	IF/CC	PCR	Exudado faríngeo, lavado alveolar,
				biopsia pulmonar. Aspirado nasofaríngeo
Pacientes previamente sanos	Enterovirus	CC		
Pacientes inmunodeprimidos	Además de los anteriores			
	HHV-5 (Citomegalovirus)	CC, S-V		Lavado alveolar, biopsia pulmonar
Otros diagnósticos en niños	V. respiratorios	IF + CC		Aspirado moco nasofaríngeo
Pleurodinia	Enterovirus	CC		Exudado faríngeo, heces
Sistema nervioso:				
Encefalitis y mielitis	HHV 1, 2	PCR	CC ¹	LCR, Biopsia cerebral
	Enterovirus	CC/PCR ²		LCR, exudado faríngeo, heces, orina
	HHV-3 (Varicela-zoster)	PCR		
	HHV-4 (Epstein-Barr)	PCR + S		
	HHV-6	PCR + S		

Tabla 6.2 (continuación)

Tipo de muestra según la localización de la infección, el virus sospechado y las técnicas de diagnóstico utilizadas

Localización	Virus asociado	Método diagnóstico	Método alternativo	Muestras
Sistema nervioso (cont.):				
Meningitis, meningoencefalitis	Enterovirus V. de la parotiditis HHV 1, 2 HHV-3 (Varicela-zoster)	CC/PCR ² CC/IF PCR PCR	CC ¹	LCR, exudado faríngeo, heces, orina LCR, orina, exudado faríngeo LCR, Biopsia cerebral LCR
Sistema cardiovascular:				
Pericarditis	Enterovirus	CC		Líquido pericárdico, exudado faríngeo, heces, orina
Miocarditis	Enterovirus	CC		Exudado faríngeo, heces, orina
Aparato digestivo:				
Gastroenteritis	Rotavirus, adenovirus, calicivirus, astrovirus	L, EIA, PCR		Heces
Esofagitis o colitis en inmunodeprimidos	HHV-5 (Citomegalovirus) HHV 1, 2 Adenovirus	CC, S-V CC CC/IF		Biopsia esofágica Biopsias colon y sigma
Hepatitis	V. hepatitis A-E	S, PCR		
Infección congénita:	HHV-5 Enterovirus Rubéola B19 HHV 1, 2, 3	CC, S-V CC S S, PCR CC, PCR	PCR S-V/PCR	L. amniótico Orina del neonato Sangre fetal y materna para serología Sangre fetal y materna para serología L. amniótico L. amniótico

¹ Solo en muestras obtenidas por biopsia. El cultivo virológico del LCR tiene muy poco rendimiento. PCR solo en LCR.² Solo en LCR.CC: cultivo celular; S-V: *Shell-vial*; IF: inmunofluorescencia; EIA: Detección de antígeno por enzimoimmunoanálisis; L: Detección de antígeno por técnica de látex; S: Serología; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa u otras técnicas de amplificación.

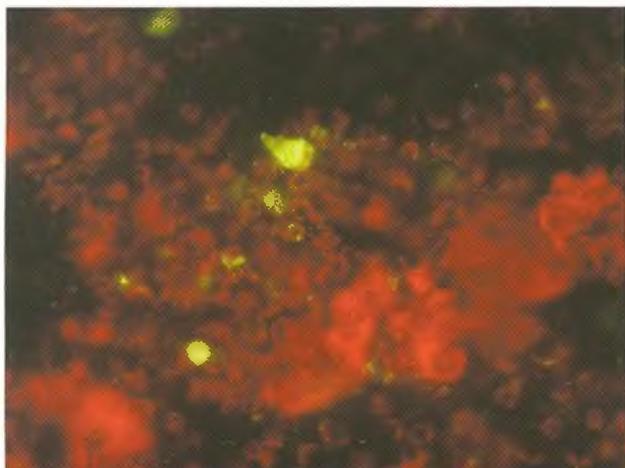


Figura 6.2. Examen por inmunofluorescencia directa (IFD).

Examen de una muestra respiratoria por IFD mediante anticuerpos monoclonales frente a virus respiratorio sincitial.

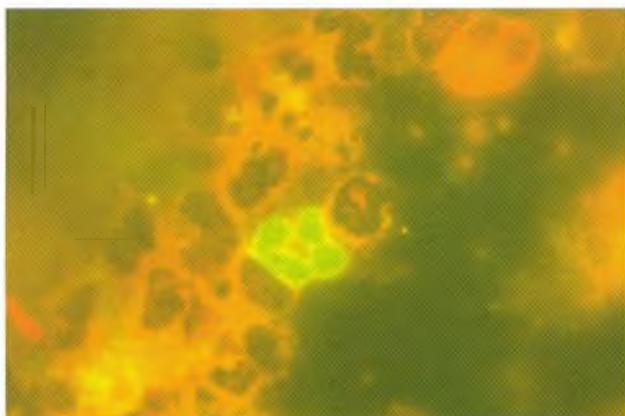


Figura 6.3. Detección de antígeno de HHV-5 (citomegalovirus).

La utilización de anticuerpos monoclonales, marcados con fluoresceína, frente a antígenos de HHV-5 permite detectar los núcleos de los leucocitos de la sangre periférica infectados por este virus.

Cultivos celulares

Las células se propagan en frascos o en tubos que contienen medios nutritivos líquidos que permiten su multiplicación y mantienen su viabilidad. Los cultivos celulares pueden ser primarios o de línea. En los cultivos primarios las células se obtienen directamente a partir de órganos como el riñón, el pulmón y otros, procedentes de animales adultos por trituración del órgano, se introducen en un frasco plano o en tubos en los que se adosan a la pared, bañadas por el medio nutritivo que les permite persistir como células vivas durante varios días. Este tipo de células no puede propagarse a partir de este cultivo inicial y deben obtenerse cada vez a partir de los órganos de los que provienen.

Las líneas celulares están formadas por células (células de línea) que se obtienen por primera vez por un procedimiento semejante al anterior, pero pueden propa-

garse indefinidamente, lo que permite mantenerlas en el laboratorio de modo continuo sin que sea necesario obtenerlas cada vez del órgano de origen (líneas continuas). Las células de línea se mantienen en frascos planos, como las primarias, pero si se tratan con tripsina, se desprenden de la pared del frasco y se pueden repartir a otros frascos o a tubos con un medio de cultivo adecuado, en los que se multiplican hasta formar una capa homogénea que recubre toda la superficie del nuevo frasco o tubo. De esta manera, por tratamiento con tripsina y resiembras sucesivas se puede propagar continuamente la línea celular (Fig. 6.6). Las líneas continuas suelen originarse a partir de células neoplásicas humanas de diversos orígenes, como el pulmón, la laringe o el cérvix uterino. Algunas células embrionarias con morfología fibroblástica, como las pulmonares, pueden propagarse como líneas continuas durante un número limitado de pases (40-50), por lo que se denominan semicontinuas.

Los medios nutritivos para el cultivo de las células son de dos tipos: 1) medios de crecimiento, que aportan



Figura 6.4. Rotavirus.

Aspecto de los rotavirus observados por microscopía electrónica con forma de virus icosaédrico desnudo.

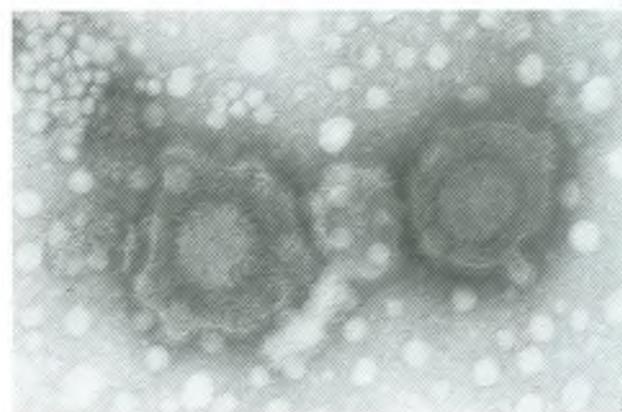


Figura 6.5. Herpesvirus.

Viriones de herpesvirus observados por microscopía electrónica. Puede verse la nucleocápsida icosaédrica y la envoltura.

Dra. N. Rabella. H. de Sant Pau.



Figura 6.6. Frascos y tubos para cultivos celulares.

Las células se hallan adosadas al plástico y bañadas por el medio de cultivo. En los laboratorios de virología clínica los frascos se utilizan generalmente para la propagación de las células de línea que se reparten a los tubos para sembrar en ellos las muestras clínicas.

sustancias para la multiplicación de las células, y 2) medios de mantenimiento que sustituyen al anterior cuando las células ya se han multiplicado y han formado una monocapa sobre la pared del frasco o tubo (Figs. 6.7 y 6.8). Su fórmula es una solución isotónica de sales minerales, glucosa, vitaminas y aminoácidos tamponada con pH entre 7,2 y 7,4 a la que se añade suero bovino fetal (véase Medios de cultivo).

La mayoría de las líneas celulares pueden obtenerse en el comercio o en colecciones como la ATCC y otras. Algunas de ellas se encuentran a la venta en tubos preparados para su uso. Las células más utilizadas en virología clínica se recogen en la tabla 6.3.

Inoculación e incubación de los cultivos celulares

Las muestras clínicas que se toman para aislar los virus en los cultivos celulares pueden proceder de territorios estériles, como la sangre, el aspirado de médula ósea, el líquido cefalorraquídeo o pericárdico, el líquido de una vesícula cerrada y otros; este material se inocula directamente a los tubos que contienen las células. Por el contrario, las muestras procedentes de zonas con flora

comensal, como el moco o exudado nasofaríngeo, el aspirado broncoalveolar, la orina, el exudado cervical uterino y las heces, deben tratarse con antibióticos antibacterianos y antifúngicos antes de inocularlas.

Existen diversas alternativas respecto a las líneas celulares a utilizar según el virus investigado (Tabla 6.3). Una vez seleccionadas las líneas celulares, el volumen de muestra a inocular en los tubos con la monocapa celular (tubos 16 x 100 mm) es de alrededor de 0,3 ml, tanto para las muestras procesadas con antibióticos como para las que no lo requieren.

Una vez inoculados, los tubos se incuban en la estufa a 33 °C o a 35-37 °C dependiendo de los virus que se pretende aislar, en posición estática las primeras 24 horas para favorecer el contacto de las partículas víricas de la muestra con la monocapa celular, y posteriormente se colocan en un tambor giratorio en el que los tubos ruedan, lo que permite una mejor conservación de las células y que, en el caso de multiplicación vírica, los viriones liberados se extiendan e infecten de una forma más rápida al resto de la monocapa.

Alternativamente, las muestras pueden inocularse por la técnica del *shell-vial*. El *shell-vial* es un tubo redondo convencional, de unos 18 x 80 mm, con el fondo plano, en el que hay un cubreobjetos circular de 12 mm de diámetro sobre el que se encuentra adherida la monocapa celular. Tras la inoculación de la muestra, el tubo se centrifuga durante 40 minutos a 700 g, procediéndose después a su incubación. La ventaja de esta técnica se debe a que 1) la centrifugación facilita y acelera la infección de las células y 2) se puede extraer fácilmente el cubreobjetos para teñirlo con anticuerpos específicos marcados con fluoresceína, lo que permite detectar la replicación vírica entre las 18 y 48 horas, mucho antes de que las células muestren ningún signo de replicación vírica (efecto citopático).

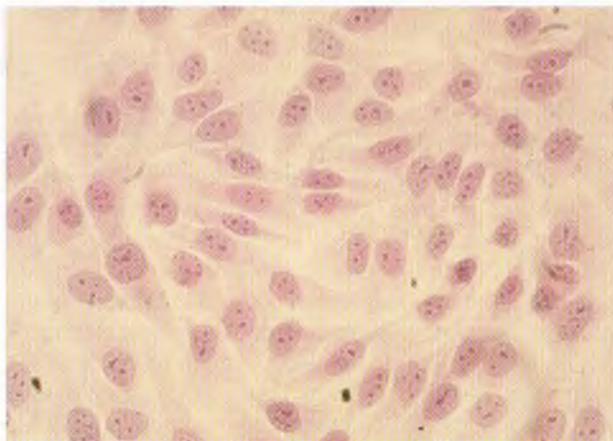


Figura 6.7. Línea celular A549.

Línea continua de células epiteliales de carcinoma de pulmón. Coloración de Harris-Shorr modificada.

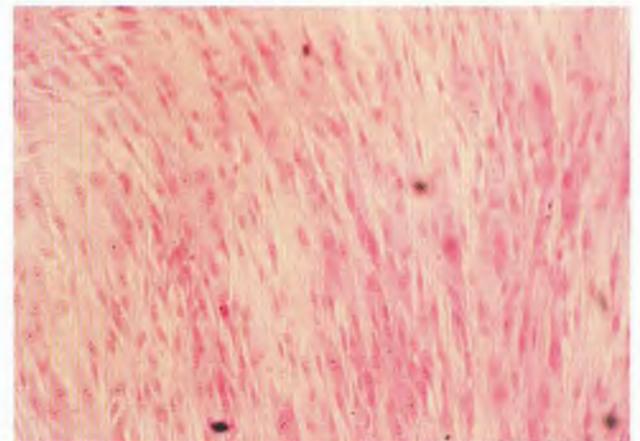


Figura 6.8. Línea celular MRC5.

Línea semicontinua de fibroblastos de pulmón embrionario humano. Coloración de Harris-Shorr modificada.

Tabla 6.3
Células utilizadas para el aislamiento de los virus

Células	Origen y características	Virus que se replican
Células primarias: RMK	Riñón de mono <i>Rhesus</i>	Virus de la gripe Virus parainfluenza Virus de la parotiditis Enterovirus
Líneas semicontinuas: MRC5	Fibroblastos de pulmón embrionario humano	HHV 1, 2 HHV-3 HHV-5 Enterovirus Rinovirus Virus respiratorio sincitial Virus BK Virus parainfluenza Adenovirus
Líneas continuas: Vero	Riñón de mono verde africano	HHV 1,2 Virus de la parotiditis Virus de la rubéola ¹ HHV-3
Hep-2	Carcinoma de laringe humano	Virus respiratorio sincitial Adenovirus Enterovirus Virus parainfluenza
A-549	Carcinoma de pulmón humano	Adenovirus Enterovirus HHV 1,2 Virus respiratorio sincitial Virus parainfluenza
RD	Rabdomiosarcoma humano	Enterovirus Adenovirus
MDCK	Riñón de perro	Virus de la gripe

Se indican las células más utilizadas para el aislamiento y propagación de algunos virus de interés en patología humana. Otras líneas celulares continuas utilizadas son la HeLa de carcinoma de cérvix humano (virus respiratorio sincitial, virus del herpes simple, adenovirus, enterovirus) y la RK-13 de riñón de conejo (virus del herpes simple y virus de la rubéola).

¹ El virus de la rubéola no produce efecto citopático.

Esta técnica se desarrolló inicialmente para la detección precoz de HHV5 (citomegalovirus) en cultivo celular y después se ha aplicado a la detección de otros virus de multiplicación lenta.

Lectura de los cultivos

Los cultivos convencionales se observan cada día mediante un microscopio invertido, reincubándose cuando es negativo. Cuando se produce la replicación vírica, las células sufren diversas alteraciones que permiten detectarla (Figs. 6.9 y 6.10).

Se pueden observar zonas focales de necrosis con desprendimiento de las células del tubo o del frasco y alteraciones microscópicas de las células consis-

tes en cambios en su morfología y en la formación de cuerpos de inclusión. Algunas de estas alteraciones, cuando se observan en células teñidas por el método de Harris-Shorr, orientan hacia el virus que las está causando (Fig. 6.11). En algún caso, la replicación de los virus no da lugar a alteraciones celulares directamente observables y debe detectarse de modo indirecto, como sucede en ocasiones con los virus de la gripe, que inducen en la superficie de las células la expresión de glicoproteínas hemadsorbentes, pudiendo demostrarse bañando los cultivos con hemáticos, que quedan adheridos a las células (prueba de hemadsorción).

Los tubos de *shell-vial*, no se observan al microscopio tras la incubación, sino que se procesan directamente para

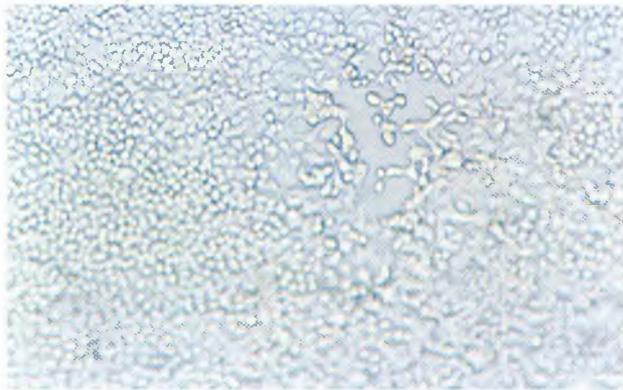


Figura 6.9. Efecto citopático de adenovirus en línea Hep-2.

Se observan células redondas aumentadas de tamaño y refráctiles que se agrupan formando racimos.

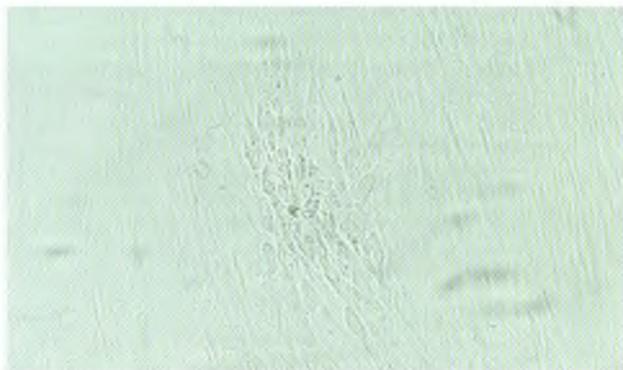


Figura 6.10. Efecto citopático de HHV-5 (citomegalovirus).

Se observan focos circunscritos de células muy aumentadas de tamaño.

la detección de antígeno. Hay que sembrar dos tubos de *shell-vial* ya que a las 24 horas de incubación, independientemente de la existencia de efecto citopático, se extrae el cubreobjetos del fondo del tubo y se tiñe mediante una técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección del antígeno del virus sospechado y a las 48 horas se repite la operación en el otro tubo (Fig. 6.12).

Identificación

La identificación de un virus aislado en un cultivo celular se efectúa basándose en los siguientes criterios: 1) las líneas celulares en las que se ha multiplicado, 2) el tiempo de aparición de las alteraciones citopáticas, y 3) el tipo y características de las mismas y de los cuerpos de inclusión.

En la tabla 6.4 se establece una correlación entre los diferentes virus y la línea celular en que se propagan.

Al teñir las células con la coloración de hematoxilina-eritrosina (coloración de Harris-Shorr modificada), los cuerpos de inclusión muestran un tamaño, una localización y una coloración (basófilos o eosinófilos) que suele ser bastante característica de cada tipo de virus. Por ello, cuando se detecta la multiplicación

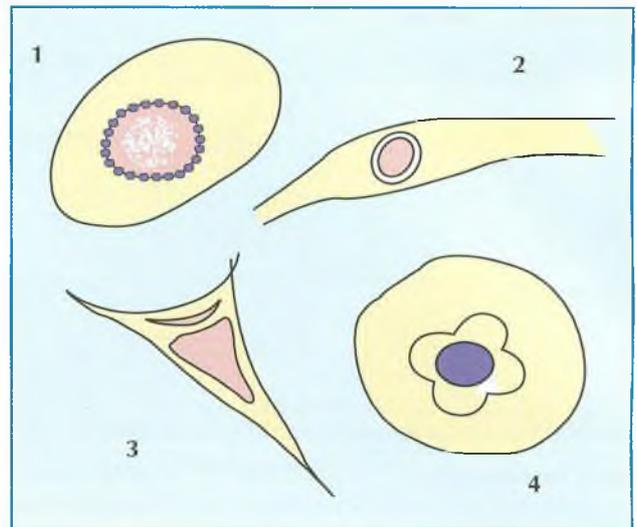


Figura 6.11. Esquema de los efectos citopáticos teñidos con la tinción de Harris-Shorr modificada.

1. HHV-1, HHV-2 (herpesvirus humano 1 y 2): se observan inclusiones intranucleares eosinófilas con marginación de la cromatina a la membrana nuclear. 2. HHV-5 (citomegalovirus): se observan inclusiones intranucleares eosinófilas que están separadas de la membrana nuclear por un halo claro que le confiere el aspecto de «ojo de buho». 3. Picornavirus: se observa una inclusión intracitoplasmática eosinófila que empuja al núcleo hacia un extremo. Al mismo tiempo la destrucción del núcleo se manifiesta por la adquisición de una coloración picnótica. 4. Adenovirus: se observan inclusiones intranucleares basófilas y retracciones entre la inclusión y la membrana nuclear que le confiere el aspecto llamado de margarita.

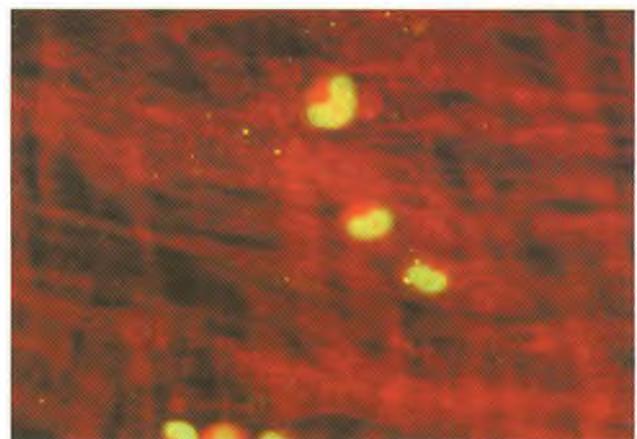


Figura 6.12. Shell vial.

La tinción del cubreobjetos con la monocapa de células MRC-5 con anticuerpos monoclonales frente a un antígeno precoz de HHV-5 (citomegalovirus) permite detectar la presencia del virus antes de la aparición del efecto citopático.

del virus en las células, debe realizarse un pase a un *shell-vial* o a un tubo de Leighton, en cuyo interior también hay una laminilla con células bañadas por el medio de cultivo. Tras la replicación del virus en las células de la laminilla, ésta se saca del tubo para teñirla y observar con detalle los cuerpos de inclusión (Figs. 6.13-6.16).

Tabla 6.4
Líneas celulares a inocular según el tipo de muestra y el virus que se sospecha. Tiempo de incubación

Muestra	Líneas a inocular	Virus que se sospecha	Línea en que se multiplica	Días de incubación
Líquido vesicular o escobillón	A-549	HHV 1, 2	A-549, Vero, MRC-5	7 días
	MRC-5	HHV-3	A-549, MRC-5	3 semanas
		Enterovirus	A-549, RC-5, RP	14 días
Exudado conjuntival	A-549	HHV-3	A-549, MRC-5	3 semanas
	MRC-5	HHV 1, 2	A-549, Vero	7 días
	RD	Adenovirus	A-549, HEp-2	14 días
		Enterovirus	MRC-5, RD, A-549	14 días
Exudado oral (mucositis)	A-549	HHV 1, 2	Vero, A-549	7 días
Moco nasofaríngeo	MDCK	V. de la gripe A i B	MDCK	14 días
	HEp-2	V. respiratorio sincitial	HEp-2, MRC-5, A-549	14 días
	A-549	V. parainfluenza	HEp-2, A-549, MRC-5	14 días
	MRC-5	Adenovirus	A-549, HEp-2	14 días
		Enterovirus	MRC-5, A-549, HEp-2	14 días
Lavado broncoalveolar y tejido pulmonar		Además de los anteriores:		
		HHV 1, 2	A-549	7 días
		HHV-5	MRC-5	4 semanas
		HHV-3	MRC-5, A-549	3 semanas
Exudado faríngeo	MRC-5	Enterovirus	MRC-5, RD, A-549	14 días
	RD	Adenovirus		14 días
	A-549			
LCR y tejido cerebral	A-549	HHV 1, 2	A-549, Vero	14 días
	MRC-5	Enterovirus	MRC-5, RD, A-549	14 días
	RD	Virus de la parotiditis	Vero	14 días
	Vero			
Líquido pericárdico	MRC-5	Enterovirus	MRC-5, RD, A-549	14 días
	RD			
	A-549			
Exudado genital	A-549	HHV 1, 2	A-549, Vero	7 días
	MRC-5	HHV-5 (en cuello uterino)	MRC-5	4 semanas
Orina	A-549	HHV-5	MRC-5	3 semanas
	Vero	Adenovirus	A-549	14 días
	MRC-5	Virus de la parotiditis	Vero	14 días
	RD	Enterovirus	MRC-5, RD, A-549	14 días
Aspirado de médula ósea	MRC-5	HHV-5	MRC-5	6 semanas
Sangre	MRC-5	HHV-5	MRC-5	6 semanas
Heces	A-549	Adenovirus	A-549	14 días
	MRC-5	Enterovirus	A-549, MRC-5, RD	14 días
	RD	Reovirus	MRC-5	14 días

La inoculación se efectúa según los protocolos técnicos 6.2 y 6.3

Las líneas MRC-5 y A-549 son las líneas «mínimas» que deberían incluirse siempre. Cuando se investiga exclusivamente citomegalovirus (HHV5) basta con inocular la MRC-5. Algunos virus requieren líneas específicas así los virus de la gripe (MDCK), el virus respiratorio sincitial y parainfluenzae (Hep-2), parotiditis (Vero) y algunos enterovirus (RD).

Actualmente, en los laboratorios de virología clínica, para identificar los virus aislados por cultivo celular, no suelen utilizarse las tinciones de hematoxilina-eosina u otras convencionales ni la hemadsorción u

otras técnicas inmunológicas clásicas, como las de neutralización o fijación del complemento, sino que la identificación se lleva a cabo mediante anticuerpos fluorescentes específicos, observando con el microscopio de

fluorescencia, tal como se efectúa en el examen directo (Fig. 6.17).

Cuando se observa un efecto citopático y no se produce reactividad con los anticuerpos fluorescentes utilizados, debe sospecharse la presencia de un efecto inespecífico por toxicidad sobre las células. Éste, en algún caso, puede descartarse por su aspecto o, alternativamente, mediante un pase a otro cultivo celular, donde la sustancia tóxica quedará muy diluida, por lo que no se producirá efecto citopático; en cambio, si la causa era un virus no identificado, se reproducirá el efecto. En este caso se puede remitir a un centro especializado.

Inoculación a animales de experimentación

Algunos virus, como el de la gripe, se aislaban hasta hace poco tiempo por inoculación del material clínico al

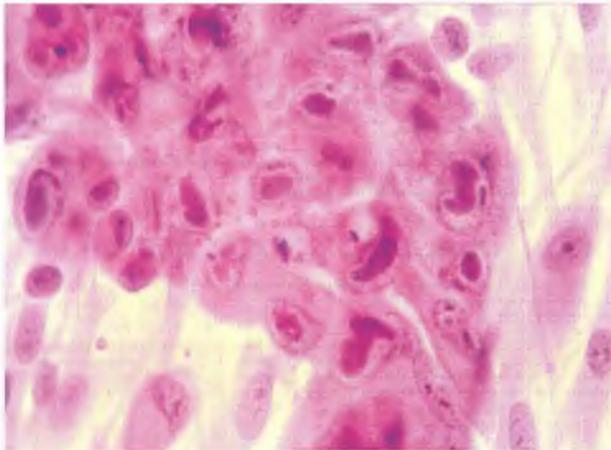


Figura 6.13. Efecto citopático de HHV-5 (citomegalovirus).

Pueden observarse las inclusiones intranucleares eosinófilas separadas de la membrana nuclear por un halo claro característico del efecto citopático causado por el HHV-5.

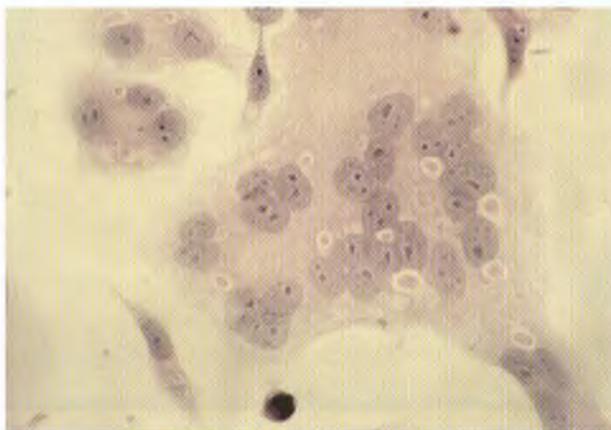


Figura 6.14. Efecto citopático de los paramixovirus.

Se observa un sincitio o célula gigante formado por varios núcleos que comparten el citoplasma e inclusiones eosinófilas intracitoplasmáticas rodeadas de una zona incolora que las separa del material citoplasmático.

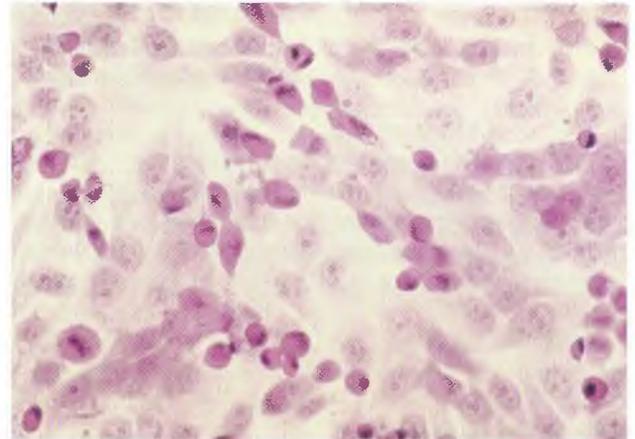


Figura 6.15. Efecto citopático de los picornavirus.

Se observa la inclusión eosinófila intracitoplasmática y el núcleo picnótico en un extremo de la célula característico de los picornavirus.

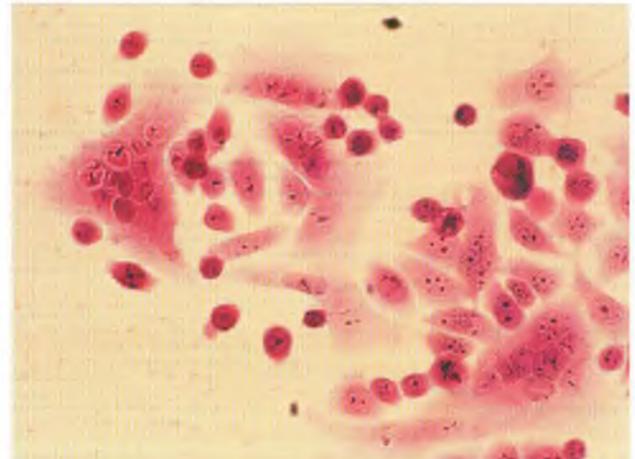


Figura 6.16. Efecto citopático de HHV-2 (herpesvirus humano 2).

Se observa el efecto citopático de HHV-2 en una línea continua de células epiteliales.

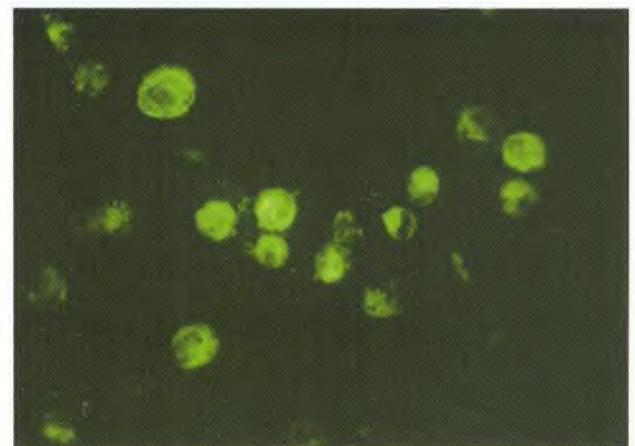


Figura 6.17. Identificación de los virus por fluorescencia.

Confirmación por técnica de inmunofluorescencia de la presencia de antígenos de HHV-1 (herpesvirus humano 1) en un cultivo celular con el efecto citopático característico.

embrión de pollo de un huevo fecundado de 10 días. Hoy se dispone de células primarias, como la RMK de riñón de mono, o continuas, como la MDCK de riñón de perro, que permiten su aislamiento.

Las técnicas de inoculación al animal de experimentación se han empleado para el aislamiento de virus que no se propagan bien en cultivos celulares o en el embrión de pollo (por ejemplo, la inoculación intracerebral al ratón lactante se utiliza para el aislamiento de algunos serotipos de enterovirus), pero estas técnicas no se emplean en los laboratorios de microbiología clínica para diagnóstico virológico convencional, y menos desde que existe la posibilidad de detectar los enterovirus mediante amplificación genómica.

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO Y MOLECULAR

Ya se ha señalado la importancia de la detección de antígenos víricos específicos tanto en las muestras clínicas para diagnóstico como en cultivos celulares para la identificación del virus.

Existen otras técnicas inmunológicas que permiten la detección de antígenos víricos en las muestras clínicas, como son las de aglutinación de partículas de látex, de enzimoanálisis (EIA) o la inmunocromatografía, entre otras.

La técnica de látex se utiliza para la detección de rotavirus y adenovirus en las heces. La técnica de EIA, aplicada sobre membrana o en micropocillos con diversos niveles de automatización, se utiliza para la detección de un gran número de virus, como el rotavirus, calicivirus, astrovirus, adenovirus, virus respiratorio sincitial, virus de la gripe, virus de la hepatitis B o virus de la inmunodeficiencia humana, ya que son técnicas sencillas, con una metodología homogénea que evita la complejidad del examen directo y del cultivo celular (Fig. 6.18). La inmunocromatografía se ha introducido para la detección del antígeno de virus respiratorio sincitial, gripe A y B, rotavirus y adenovirus causantes de gastroenteritis. Constantemente se introducen nuevas técnicas inmunológicas para la detección de estos virus y otros. En el capítulo 8 se detallan estas técnicas (Fig. 6.19).

Las sondas genéticas, que se han utilizado en técnicas de hibridación *in situ* para detectar el genoma de virus como papilomavirus y otros, actualmente tienen aplicaciones muy limitadas.

Las técnicas de amplificación no sólo permiten diagnosticar una infección vírica a través de la detección del genoma del virus, sino también cuantificar la viremia, que en ocasiones posee valor pronóstico. La amplificación de los virus RNA por PCR requiere el paso pre-



Figura 6.18. Detección de antígeno del virus respiratorio sincitial.

La técnica de EIA sobre membrana, en *dot*, permite detectar el antígeno del virus en un aspirado nasofaríngeo (véase el capítulo 8).

vio de RNA a DNA mediante una transcriptasa inversa (RT-PCR). Otras técnicas, como el NASBA, permiten amplificar directamente virus RNA.

El diagnóstico de las infecciones del sistema nervioso central por herpesvirus, de las infecciones por virus de la hepatitis y del sida, así como de las infecciones por HHV5 y HHV4 (EBV) son áreas en las que las técnicas de amplificación son muy utilizadas.

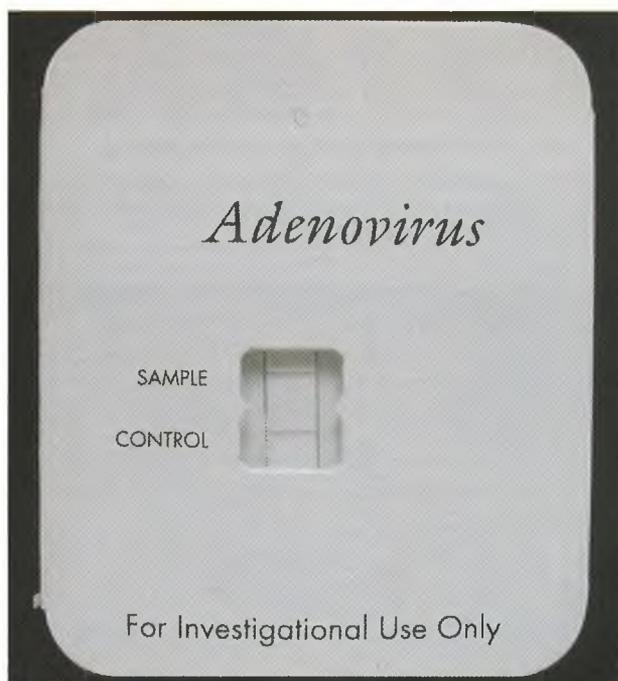


Figura 6.19. Detección de antígeno de adenovirus por inmunocromatografía.

Detección de antígeno de adenovirus en una muestra fecal por técnica de inmunocromatografía. Puede observarse arriba la banda de reacción positiva y abajo la de control de migración.

En general, la laboriosidad del diagnóstico virológico clásico ha hecho que la virología sea un área donde las nuevas técnicas de detección de antígeno y de amplificación han encontrado un campo fértil para su aplicación. En el capítulo 9 se describen con algún detalle las técnicas genéticas aplicadas al diagnóstico clínico.

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Durante muchos años, en los laboratorios no especializados las únicas técnicas utilizadas para el diagnóstico virológico han sido las serológicas, mediante pruebas de fijación del complemento, aglutinación pasiva y, posteriormente, de enzimoimmunoanálisis.

Estas pruebas aportan resultados tardíos al requerir dos sueros, uno obtenido en la fase precoz de la enfermedad y otro en el período de convalecencia, que deben procesarse en paralelo para demostrar un incremento del título en el segundo suero de cuatro veces o más respecto al primero.

La técnica tradicional de fijación del complemento aún se utiliza para el diagnóstico retrospectivo de la infección por virus respiratorios por su aceptable sensibilidad y especificidad. La técnica puede realizarse de un modo semiautomatizado, lo que facilita su desarrollo.

La introducción de técnicas de inmunofluorescencia o enzimoimmunoanálisis que permiten la detección en la primera muestra de suero de las inmunoglobulinas de la clase M, características de las infecciones en fase aguda, ha aportado mayor eficiencia diagnóstica a las técnicas serológicas.

Mediante la detección de IgM pueden diagnosticarse con sensibilidad, especificidad y notable precocidad la hepatitis A, la hepatitis B, la infección reciente por HHV5, HHV 6, rubéola, virus B 19 y HHV4, entre otras. En el capítulo 8 se revisan las técnicas serológicas.

MEDIOS DE CULTIVO. DESCRIPCIÓN

Las células se multiplican adecuadamente en el tubo de ensayo si encuentran unas condiciones similares a las existentes en el órgano de origen. Estas condiciones se con-

siguen con un medio líquido rico en sustancias nutritivas asimilables por las células que tiene en cuenta, además de los ingredientes, otros factores, como el pH, la osmolaridad, la presencia de iones inorgánicos, la fuente de carbono y la presencia de gases como O₂ y CO₂ en un equilibrio adecuado. Estos medios se preparan en una campana de flujo laminar para evitar su contaminación. Una vez preparados, se conservan en la nevera un máximo de siete días en ausencia de luz, por lo que es adecuado protegerlos con un papel de estaño para prevenir su alteración.

Las células, que se introducen en el frasco en una cantidad determinada, se multiplican hasta cubrir totalmente la superficie del tubo o frasco, a la que se adosan formando una monocapa. Para la formación de la monocapa, se utiliza un medio (medio de crecimiento) con igual composición sea cual sea la línea celular. Para el mantenimiento de las células, una vez formada la monocapa, se desecha el medio de crecimiento y se incorpora un medio de mantenimiento, con menos suero bovino.

Nota: los tubos y frascos de vidrio deben lavarse y aclararse según protocolos muy rigurosos en cuanto a procedimientos, detergente, aclarado y pH residual, ya que, si quedan restos tóxicos o pH inadecuado después del lavado, las células no se multiplican. En la actualidad suelen utilizarse tubos o frascos de plástico comerciales y ya preparados para su uso que eluden este problema.

Medio de crecimiento

Medio mínimo esencial de Eagle⁶ sin bicarbonato ni glutamina (10 x), 100 ml; L-glutamina (200 mm) 10 ml; aminoácidos no esenciales 10 ml; suero bovino fetal 100 ml; Hepes pH 7,4 30 ml; solución de antibióticos: penicilina 200.000 UI; estreptomina 200 mg; neomicina 30 mg. Añadir agua destilada estéril para obtener 1 l de medio. Ajustar el pH a 7,2-7,4 con hidróxido sódico 1 N.

Medio de mantenimiento

Medio basal de Eagle⁶ sin bicarbonato ni glutamina (10 x), 100 ml; L-glutamina (200 mm) 10 ml; suero bovino fetal 25 ml; Hepes pH 7,4 30 ml; solución de antibióticos: penicilina 200.000 UI; estreptomina 200 mg; neomicina 30 mg. Añadir agua destilada para obtener 1 l de medio. Ajustar el pH a 7,2-7,4 con hidróxido sódico 1 N.

Nota: todos los reactivos indicados pueden hallarse en el comercio, incluyendo el medio de Eagle ya preparado.

⁶ El medio mínimo esencial de Eagle y el medio basal de Eagle contienen una solución equilibrada de sales (como la solución de Earle), aminoácidos esenciales y vitaminas, y según su formulación puede incorporar glutamina.

PARÁSITOS HUMANOS. CONCEPTO

Bajo el concepto de parásito se incluye a todos los seres que viven asociados a otro causándole perjuicio o enfermedad, pero en medicina, tradicionalmente, este nombre se ha reservado a los protozoos y los helmintos que viven temporal o permanentemente en el hombre, la mayoría de los cuales le causan enfermedad¹. Los artrópodos, que también son estudiados por la parasitología médica, deben su importancia a su capacidad para actuar como vectores de transmisión de algunos microorganismos.

Protozoos

Los protozoos pertenecen al reino *Protoctista*. Son microorganismos unicelulares eucariotas con un tamaño que oscila entre 3 y 100 μm . Carecen de pared celular rígida y son móviles. Tienen un metabolismo heterótrofo, obteniendo los nutrientes orgánicos por absorción o por fagocitosis. Se reproducen asexualmente, por división simple o múltiple, o sexualmente y algunos alternan ambos ciclos reproductivos. Aunque todos comparten las características estructurales y fisiológicas de las células eucariotas, su morfología y ciclo vital son muy variados en los diferentes grupos.

Los protozoos son muy sensibles a los agentes físicos y químicos, por lo que para pasar de un hospedador a otro a través del medio ambiente, adquieren una forma quística de resistencia. La forma vegetativa activa en el hospedador se denomina trofozoito, para diferenciarla de los quistes.

Los protozoos, por su tamaño, pueden visualizarse fácilmente mediante el microscopio óptico, y presentan, en general, suficientes diferencias estructurales como para poder ser identificados por las características morfológicas mediante observación microscópica.

La clasificación se basa en sus características morfológicas y fisiológicas y de reproducción. En los últimos años también se han utilizado como criterio taxonómico diversos datos aportados por la biología molecular.

Los principales grupos de interés médico incluyen:

Las amebas (*Sarcodina*). Son protozoos con movimiento ameboide, con división binaria y sin reproducción sexual, como la entamoeba parásita del tubo digestivo del hombre.

Los flagelados (*Mastigophora*), con uno o más flagelos característicos de las células eucariotas, se reproducen por división binaria asexual. Hay parásitos del tubo digestivo, como la giardia y de las vías genitales, como las tricomonas y también de los órganos profundos, como las leishmanias y los tripanosomas.

Los apicomplexa (*Apicomplexa*) son parásitos intracelulares de pequeño tamaño que poseen una estructura apical para la penetración a las células (de ahí su nombre). Alternan fases de reproducción asexual y sexual. Los criptosporidios, el toxoplasma y los plasmodios son los principales representantes de este grupo.

Otros grupos de interés en medicina son los ciliados (*Ciliophora*) y los microsporidios (*Microspora*).

En la tabla 7.1 se señalan los principales protozoos de interés en medicina y en la figura 7.1 sus características morfológicas.

Helmintos

Con el término helminto suele hacerse referencia genérica a los animales invertebrados que tienen aspecto de gusano; en parasitología médica se emplea para referirse a dos grupos de vermes: los platelmintos (gusanos planos) y los nematodos (gusanos redondos); en ambos existen especies parásitas del hombre (Figs. 7.2 y 7.3).

Los helmintos adultos se reproducen sexualmente poniendo huevos de los que se originan larvas, que a través de diversos estadios (L1 a L4) que se suceden en uno o en diferentes huéspedes, según la especie, alcanzan el estado adulto. La gran mayoría de los helmintos parásitos del hombre son visibles macroscópicamente en su estadio adulto; en tanto que los huevos y las larvas son microscópicos. En general, la morfología de los adultos, de los

¹ En parasitología, se denomina hospedador al ser vivo –incluyendo el hombre– que alberga a un parásito.

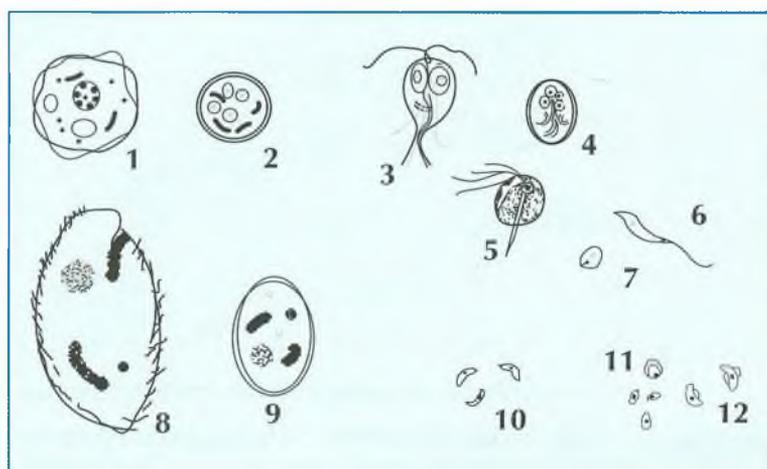


Figura 7.1. Aspectos morfológicos generales de los protozoos.

Los protozoos de mayor interés en medicina pertenecen a tres grupos, las amebas, los flagelados y los apicomplexa. Los ciliados y los microsporidios poseen menos interés por su menor incidencia.

En el grupo de las amebas, los trofozoitos, cuyo tamaño varía de 5-60 μm , son móviles y presentan una forma muy variada debido a la emisión de pseudópodos, que pueden ser romos y anchos o alargados, como dedos de guante. Los trofozoitos de las amebas son típicamente uninucleados y el núcleo vesiculoso se caracteriza por tener un cariosoma de posición central o subcentral; en el género *Entamoeba*, los gránulos cromatínicos se disponen periféricamente en la cara interna de la membrana nuclear. En el citoplasma se distinguen vacuolas digestivas y otros elementos fagocitados. Los quistes son esféricos u ovalados, de 5-20 μm de tamaño y tienen una cubierta rígida y poco aparente. Pueden ser uni o plurinucleados, dependiendo de la especie y del grado de madurez. En su citoplasma es frecuente observar unos corpúsculos bastoniformes (cuerpos cromidiales). *Entamoeba histolytica*: 1. trofozoito, 2. quiste.

Los flagelados se caracterizan porque sus trofozoitos están provistos de flagelos, que desaparecen en los estadios de vida intracelular de

huevo y de las larvas permite la identificación del helminto a nivel de género o incluso de especie.

Los helmintos de interés en medicina pertenecen a dos grandes grupos, los platelmintos y los nematodos.

Los platelmintos (*Plathelminthes*) son vermes muy primitivos; tienen el cuerpo aplanado, algunos carecen de tubo digestivo y cuando existe es ciego. Son hermafroditas, salvo escasas excepciones. Algunos son de vida libre, pero la mayoría son parásitos de los vertebrados. Entre los platelmintos parásitos humanos, como las tenias, la fasciola, y los esquistosomas, existen importantes diferencias de forma y tamaño, que oscila entre metros (algunas tenias), centímetros (fasciola) y milímetros (esquistosomas), así como de fisiología (Fig. 7.2).

Los nematodos (*Nematoda*) son gusanos redondos, de tamaño muy variable (de mm a cm), que pueden tener vida libre o ser parásitos de otros invertebrados y vertebrados, incluyendo al hombre. Tienen el cuerpo recubierto por una cutícula, un tubo digestivo completo con

algunas especies. Los flagelos se originan siempre en pequeñas estructuras citoplasmáticas denominadas blefaroblastos, en ocasiones están asociados a otras organelas, tanto en su base (cinetoplasto) como formando membranas ondulantes cuyo número y disposición es muy variado en las distintas especies. El tamaño de los trofozoitos oscila entre 5 y 40 μm . Los quistes (6-20 μm) son de forma oval uni, bi o multinucleados. Tan sólo los flagelados que son parásitos intestinales tienen una forma quística. *Giardia lamblia*: 3. trofozoito, 4. quiste. *Trichomonas vaginalis*: 5. trofozoito. *Leishmania*: 6. promastigote, 7. forma amastigota.

En los ciliados la movilidad se lleva a cabo por medio de cilios, presentes sólo en los trofozoitos, son relativamente cortos y numerosos y se originan de pequeños gránulos basales en todo el contorno del parásito. Algunos ciliados son multinucleados y otros, como *Balantidium coli*, tienen dos núcleos, uno grande, macronúcleo, y otro pequeño o micronúcleo. *B. coli* es el único ciliado patógeno para el hombre; en la forma trofozoica tiene aspecto

piriforme y un tamaño muy grande (40-150 x 25-100 μm). En su región apical se observa un citostoma y el macronúcleo que es de forma arriñonada. Los quistes son esféricos y con una doble cubierta. *Balantidium coli*: 8. trofozoito, 9. quiste.

Los apicomplexa son parásitos intracelulares por lo menos durante los estadios de multiplicación asexual. Los trofozoitos están provistos de una estructura apical característica que les permite entrar activamente en el interior de las células huésped. Se mueven por deslizamiento. En su ciclo biológico se suceden tres fases, una de multiplicación asexual o agamogónica, otra de diferenciación de los gametos, que termina con su fusión para formar un cigoto y una tercera, la esporogónica, durante la cual, y a partir de divisiones del cigoto, se forman los esporozoitos. *Toxoplasma gondii*: 10. trofozoitos. *Plasmodium*: 11. trofozoitos, 12. gametos.

Los microsporidios son protozoos de tamaño muy pequeño. En el interior de una espora densa y retractil se halla el trofozoito (esporoplasma) y un filamento polar, el cual se dispara explosivamente, clavándose en una célula del hospedador, pasando el esporoplasma a través del filamento hasta el interior de la célula donde se multiplica (no se representa en la figura).

boca y ano, sistema excretor y sistema nervioso. Presentan separación de sexos con diferencias morfológicas entre ambos, siendo las hembras de mayor tamaño que los machos.

Entre los nematodos, hay parásitos humanos tan importantes como los estrongiloideos, ascáridos, oxiúridos, uncinarias, filarias y triquina. En la figura 7.3 se representa la anatomía general de los nematodos.

Los ciclos vitales de los parásitos son regulares y están inexorablemente prefijados. Algunos parasitan a un hospedador único (parásitos monoxenos) y otros requieren varios hospedadores para completar su ciclo vital (parásitos heteroxenos). Cuando el ciclo vital comporta la parasitación de más de un hospedador, aquel en el que tiene lugar la reproducción sexual se denomina hospedador definitivo y en el que tiene lugar la reproducción asexual, intermediario.

Los nombres científicos de los protozoos y de los helmintos se adaptan a las reglas de la nomenclatura binomial².

² Véase el capítulo 1. La nomenclatura en biología.

Parasitosis humanas

Las parasitosis humanas, tanto las causadas por protozoos como por helmintos, por razones prácticas, se han clasificado en parasitosis de cavidades abiertas, que hacen referencia a las del tubo digestivo y de la vagina, y parasitosis hemotisulares (o hemohísticas), que afectan a los tejidos y órganos, como la piel, el hígado, el pulmón, la sangre, la médula ósea y otros.

Los parásitos presentan a veces un único estadio biológico y morfológico y una única localización en un solo huésped, como las tricomonas, que causan vaginitis y

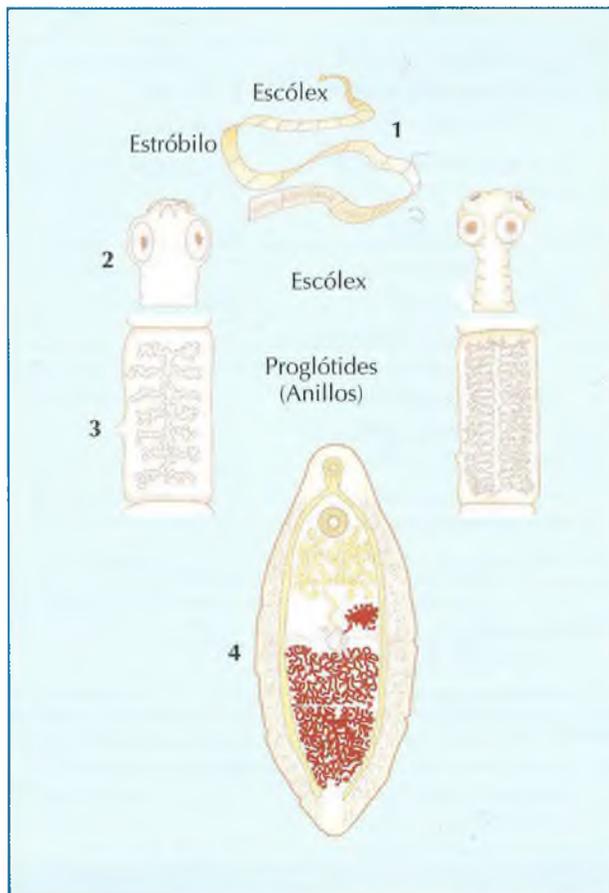


Figura 7.2. Aspectos morfológicos generales de los platelmintos.

En la parte superior de la figura se observan las características de los cestodos o tenias humanas que, en su forma adulta, presentan un aspecto acintado y segmentado (1). Tienen un escólex (cabeza) (2) con órganos de fijación y un cuello corto, a partir del cual se originan los segmentos o proglótides, cuyo conjunto da lugar al estróbilo. Los segmentos próximos a la cabeza son inmaduros. Los anillos sexualmente maduros, que poseen órganos de ambos sexos (hermafroditas), ocupan el tercio medio del estróbilo y los anillos distales son los grávidos (3). Su tamaño oscila desde unos pocos milímetros a varios metros.

Abajo pueden observarse las características de los trematodos, platelmintos que tienen el cuerpo no segmentado, son aplanados dorsoventralmente, tienen aspecto foliáceo y son hermafroditas (4). Otros trematodos como los esquistosómidos se apartan de este morfotipo porque tienen sexos separados; los machos aunque de forma plana, repliegan los bordes del cuerpo adoptando un aspecto pseudocilíndrico y las hembras son cilíndricas.

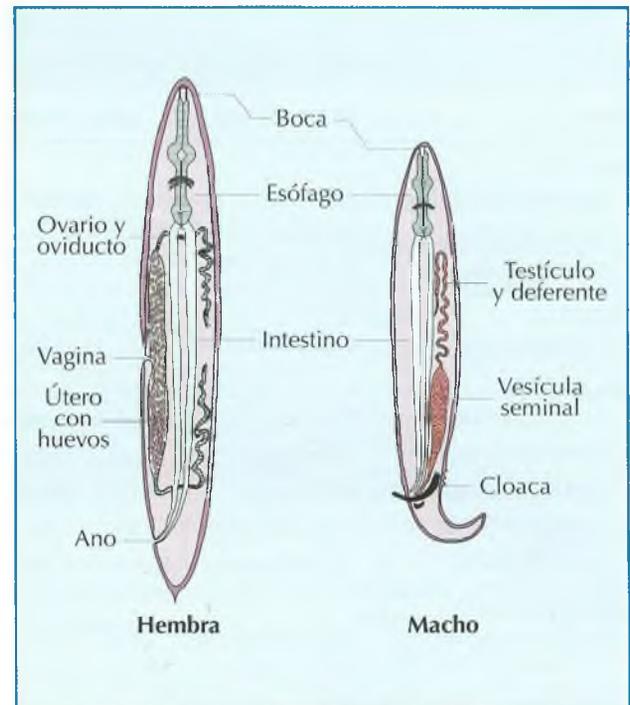


Figura 7.3. Aspectos morfológicos generales de los nematodos.

Los nematodos son de cuerpo cilíndrico con simetría bilateral. Su tamaño varía desde unos pocos milímetros a algunos centímetros. Están provistos de un tubo digestivo completo con la boca situada apicalmente y el orificio anal de localización ventral o subterminal que en los machos desemboca en una cloaca donde también se encuentra el conducto eyaculador. El aparato genital es usualmente simple; en los machos existe un único tubo u órgano sexual que funciona a la vez como productor de espermatozoides y como canal eyaculador; en las hembras, su tubo ovárico-uterino es doble o incluso múltiple. Las espículas y el gubernáculo del macho son órganos copuladores internos.

uretritis en los humanos; pero en otras ocasiones un parásito presenta diversos estadios, cada uno de los cuales se localiza en huéspedes diferentes, desarrollando por tanto, complejos ciclos evolutivos. Con ello se pretende señalar que los ciclos vitales de los parásitos pueden ser muy sencillos o extraordinariamente complejos, por lo que requieren una descripción individualizada.

Es importante conocer el estadio evolutivo y la localización de los parásitos en el hombre para poder comprender los síntomas de las parasitosis, tomar las muestras adecuadas para el diagnóstico y poder reconocer morfológicamente el parásito.

Cabe destacar que es imprescindible conocer la distribución geográfica de los parásitos, ya que algunos son de distribución universal, como la giardia o la tricomonas, en tanto que otros son de distribución geográfica restringida, como los plasmodios o los esquistosomas. Es importante que los médicos de países sin parasitosis endémicas propias de áreas tropicales, cuando atiendan a viajeros o a población inmigrante procedente del trópico, piensen en los procesos infecciosos propios de los países de origen (<http://www.cdc.gov/travel/diseases.htm>).

Tabla 7.1
Principales protozoos de interés en medicina

Protozoo	Hospedador ¹	Transmisión	Patología	Distribución
Amebas:				
<i>Entamoeba histolytica</i>	Hombre	Feco-oral	Colitis, absceso hepático	Restringida
<i>Entamoeba dispar</i>	Hombre	Feco-oral	No patógena	Universal
<i>Blastocystis hominis</i>	Hombre	Feco-oral	Dudosa	Universal
Ciliados:				
<i>Balantidium coli</i>	Cerdo (Hombre)	Feco-oral	Enteritis, colitis	Restringida
Flagelados:				
<i>Giardia intestinalis</i>	Hombre	Feco-oral	Enteritis	Universal
<i>Dientamoeba fragilis</i>	Hombre	Feco-oral	Enteritis (colon)	Universal
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Hombre	Sexual	Vaginitis, uretritis	Universal
<i>Leishmania</i> (Tabla 7.2)	Perro (Hombre)/Insectos	Insectos	Leishmaniasis ²	Restringida
<i>Trypanosoma</i> (Tabla 7.3)	Varios (Hombre)/Insectos	Insectos	Tripanosomiasis ²	Restringida
Apicomplexa:				
<i>Toxoplasma gondii</i>	Gato ^{HD} /ratón, vaca ^{HI} , etc. (Hombre)	Oral y feco-oral	Asintomática. Toxoplasmosis ²	Universal
<i>Plasmodium</i> (Tabla 7.4)	Hombre ^{HI} /Insecto ^{HD}	Picadura	Paludismo ²	Restringida
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Mamíferos (Hombre)	Feco-oral	Enteritis, colangitis en inmunodeprimido	Universal
<i>Isospora belli</i>	Hombre	Feco-oral	Enteritis, diarrea del viajero	Universal
<i>Cyclospora cayentanensis</i>	Mamíferos? Hombre?	Feco-oral	Enteritis, diarrea del viajero	Universal?
Microspora:				
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	Vertebrados e invertebrados	Feco-oral	Enteritis en inmunodeprimidos	Universal
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	Vertebrados e invertebrados	Feco-oral	Enteritis en inmunodeprimidos	Universal

¹ Cuando se señala un único hospedador, el ciclo del parásito es monoxeno. Cuando se señalan varios hospedadores separados por una barra (/) el ciclo del parásito es heteroxeno. En paréntesis se indica el hospedador menos frecuente para diferenciarlo del hospedador natural. A veces uno de los hospedadores es un insecto que actúa además como vector (por ejemplo, plasmidios, leishmania, etcétera).

² Incluye diversos procesos patológicos y cuadros clínicos (véase texto).

^{HD}: hospedador definitivo; ^{HI}: hospedador intermediario.

PROTOZOOS DE INTERÉS EN MEDICINA

Amebas

Entre las amebas sólo *Entamoeba histolytica* es patógena para el hombre. Se transmite a través de sus formas quísticas por vía feco-oral causando una enterocolitis invasora con clínica variable; pero en su forma característica, conocida como disentería amebiana, la diarrea se acompaña de moco y sangre por las ulceraciones de la mucosa intestinal. Este protozoo puede alcanzar el hígado a través de la vena porta formando abscesos.

Las especies de *Acanthamoeba* y otras amebas de vida libre se han reconocido como patógenas para el hombre. Pueden causar meningoencefalitis, tanto en el hues-



Figura 7.4. Leishmaniasis cutánea zoonótica (botón de oriente).

La leishmaniasis cutánea se caracteriza por la formación de un nódulo que puede alcanzar varios milímetros de diámetro con un fondo infiltrado que puede o no ulcerarse.

Tabla 7.2
Patología, distribución y diagnóstico de las leishmanias patógenas para el hombre

Complejo/Especie	Patología/Clínica	Distribución geográfica ¹	Diagnóstico
<i>Leishmania donovani</i> complex <i>L. donovani</i> ²	Leishmaniasis visceral (Kala-azar) Leishmaniasis dérmica post Kala-azar	Subcontinente indio (Bangladesh, India, Nepal Pakistán), península arábiga, África Oriental y China	1. Diagnóstico directo Observación microscópica Tinción de Giemsa o similares Leishmaniasis cutánea: Exudados o improntas de biopsias de lesiones cutáneas Leishmaniasis visceral: Frotis de aspirados o biopsias medulares Detección de antígeno en orina Útil en leishmaniasis visceral Cultivo Medio bifásico de NNN. Medio líquido de Schneider. Inoculación en hámster Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (PCR) En fase experimental (no comercializadas) 2. Diagnóstico serológico Útil en leishmaniasis visceral De poco valor en leishmaniasis cutánea De valor limitado en leishmaniasis mucocutánea Intradermoreacción Útil en leishmaniasis cutánea
<i>L. infantum</i>	Leishmaniasis visceral y cutánea (Fig. 7.4)	Países de la cuenca mediterránea	
<i>L. chagasi</i>	Leishmaniasis visceral y cutánea	América central y norte de América del Sur	
<i>Leishmania tropica</i>	Leishmaniasis cutánea antroponótica o urbana (botón de oriente)	Europa Oriental, Asia Central y focos aislados en África	
<i>Leishmania major</i>	Leishmaniasis cutánea zoonótica o rural (botón de oriente)	Norte y centro de África y Asia occidental incluyendo la península arábiga	
<i>Leishmania aethiopia</i>	Leishmaniasis cutánea, leishmaniasis cutánea difusa (lepromatosa)	Etiopía, Kenya	
<i>Leishmania mexicana</i> complex <i>L. mexicana</i>	Leishmaniasis cutánea (úlceras del «chiclero») y cutánea difusa (ocasional)	Sur de Texas, México Centroamérica y norte de América del sur	
<i>L. amazonensis</i>	Leishmaniasis cutánea difusa (lepromatosa)	Cuenca amazónica (norte de Brasil)	
<i>L. venezuelensis</i>	Leishmaniasis cutánea	Venezuela	
<i>Leishmania braziliensis</i> complex <i>L. braziliensis</i>	Leishmaniasis mucocutánea (espundia), cutánea	América latina (Brasil y Venezuela)	
<i>L. peruviana</i>	Leishmaniasis cutánea	Valles andinos (Perú y Argentina)	
<i>Leishmania guyanensis</i> complex <i>L. guyanensis</i>	Leishmaniasis cutánea (<i>pian-bois</i>) (metástasis en sistema linfático, recuerda una esporotricosis)	América del sur a excepción Argentina y Chile	
<i>L. panamensis</i>	Leishmaniasis cutánea («úlceras de Bejuco») (metástasis en el sistema linfático con nódulos secundarios) y mucocutánea	Panamá, Costa Rica Colombia	

El género *Leishmania* se divide en dos subgéneros *Viannia*, que incluye las especies de *L. braziliensis* complex y *L. guyanensis* complex y el subgénero *Leishmania*, que incluye el resto de especies. Se diferencian porque sus vectores pertenecen al género *Lutzomyia* y *Phlebotomus*, respectivamente.

La prevalencia de la leishmaniasis humana es de 12-14 millones. La incidencia de la leishmaniasis cutánea es de $1,5 \times 10^6$ casos/año y de la visceral 5×10^5 casos/año.

¹ Para ver la distribución detallada y actualizada de las leishmaniasis humanas, consultar <http://www.cdc.gov/travel/diseases.htm>.

Aunque el estado inmunitario del paciente condiciona la forma clínica (cutánea o sistémica) probablemente también la condiciona la especie de leishmania involucrada; así, mientras las especies del complejo donovani pueden dar lugar a leishmaniasis visceral y cutánea. *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopia* se caracterizan por presentar sólo clínica cutánea y las especies de los complejos braziliensis y guyanensis, por su tendencia a producir metástasis en tejidos mucosos originando la leishmaniasis mucocutánea.

² Especie fundamentalmente antroponótica.

Tabla 7.3
Patología, distribución y diagnóstico de los tripanosomas patógenos humanos

Especie	Patología/Clínica	Distribución geográfica ¹	Diagnóstico
<i>Trypanosoma brucei</i> subsp. <i>rhodesiense</i>	Tripanosomiasis africana aguda Chancro en el lugar de inoculación. Fiebre, linfadenopatías, cefalea, insomnio, pericarditis, encefalitis de aparición temprana ² y coma	Este y Sudeste de África tropical	1. Diagnóstico directo. Observación microscópica: Fase inicial y hemolinfática: examen en fresco o tras tinción del exudado del chancro, aspirado de adenopatías, sangre, <i>buffy coat</i> , médula ósea Fase tardía (SNC): examen en fresco o tras tinción del sedimento del LCR Inoculación: La inoculación en rata o ratón sólo es útil para la subsp. <i>rhodesiense</i>
<i>Trypanosoma brucei</i> subsp. <i>gambiense</i>	Enfermedad del sueño Chancro en el lugar de inoculación. Tripanosomiasis africana subaguda o crónica. Encefalitis progresiva (somnolencia)	Oeste y centro de África tropical	2. Diagnóstico serológico. No existen kits comercializados
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Enfermedad de Chagas Fase aguda. Lesión en el lugar de la inoculación (chagoma, edema palpebral) con estadio precoz asintomático (99%) o con fiebre, molestias generales, linfadenopatías, hepatoesplenomegalia, miocarditis y meningoencefalitis Fase crónica. Se manifiesta años o décadas después de la infección inicial (33%): lesión miocárdica, megacolon, megaesófago, etcétera. En pacientes con sida la evolución es grave y atípica	Se extiende desde el Río Grande en México hasta el río de Plata en Argentina. La mayor incidencia se observa en México, Centroamérica, Colombia y Ecuador	1. Diagnóstico directo (sólo fase aguda). Observación microscópica: Examen en fresco: sangre con EDTA, <i>buffy coat</i> . Tinción a partir de una extensión o gota gruesa Cultivo: Medio de NNN. Inoculación al ratón. Xenodiagnóstico por infección del reduído a partir de la ingesta de sangre del paciente y observación de las heces a partir de las 4 semanas 2. Diagnóstico serológico De elección en la fase crónica
<i>Trypanosoma rangeli</i> ³	Tripanosomiasis americana benigna Generalmente es asintomática	México, Centroamérica y Sudamérica	Diagnóstico diferencial con <i>T. cruzi</i>

Excepto en *Trypanosoma brucei* subsp. *gambiense*, que se transmite de persona a persona a través del vector, el resto de tripanosomas alcanzan al hombre desde su reservorio animal.

La prevalencia de la tripanosomiasis africana es de 3-5 x 10³ casos y la incidencia de *T. brucei* subsp. *gambiense* es de 2 x 10⁴ casos/año. La prevalencia de *T. cruzi* es de 16-18 x 10⁶ casos con 5 x 10⁴ muertes/año.

¹ Para ver la distribución detallada y actualizada de las tripanosomiasis humanas, consultar <http://www.cdc.gov/travel/diseases.htm>.

² La rápida evolución mortal de la enfermedad, en ausencia de tratamiento, hace que, aunque haya síntomas de afectación del SNC, no se produzca el cuadro típico de somnolencia, propio de la encefalitis subaguda causada por *T. brucei* subsp. *gambiense*.

³ La mayoría de los autores lo consideran no patógeno para el hombre. No se han encontrado formas amastigotas en el huésped vertebrado. Su distribución es coincidente con la de *T. cruzi*.

ped normal como en el inmunodeprimido, así como queratitis, que con frecuencia es confundida con la herpética, bacteriana o micótica.

Blastocystis hominis se ha clasificado entre las amebas. Se halla con frecuencia en las heces humanas y se considera su posible capacidad enteropatógena.

Flagelados

Entre los flagelados hay especies que causan enteritis, como *Giardia lamblia* (*G. intestinalis*), que se transmite mediante ingestión de quistes por vía fecal-oral (Fig. 7.21). *Trichomonas vaginalis* es un flagelado que causa vaginitis, y uretritis en el varón, se multiplica por

división simple y se transmite por contacto directo sexual, por lo que carece de forma quística (Fig. 14.8).

Leishmania y *Trypanosoma* son dos flagelados que causan infecciones sistémicas; cuando se hallan en localización intracelular en los macrófagos u otras células no forman flagelos (formas amastigotas). Las leishmanias, desde su reservorio natural constituido por roedores salvajes y cánidos, entre otros, son transmitidas por flebotomos al hombre, al que producen una infección cutánea local, conocida en el viejo mundo como botón de oriente (Fig. 7.4). En ocasiones, desde la puerta de entra-

da cutánea, los protozoos son trasladados por los macrófagos a órganos ricos en tejido retículo-endotelial, como la médula ósea, el hígado, el bazo y los ganglios linfáticos, produciendo un cuadro de leishmaniasis visceral caracterizado por hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia e hipergammaglobulinemia con afectación del estado general y fiebre. La especie que se encuentra en Europa occidental es *L. infantum* (Fig. 7.5). En América central y Sudamérica la especie causante de la leishmaniasis visceral es *L. chagasi*, considerada como idéntica a la especie *L. infantum*, autóctona de la cuenca Medite-

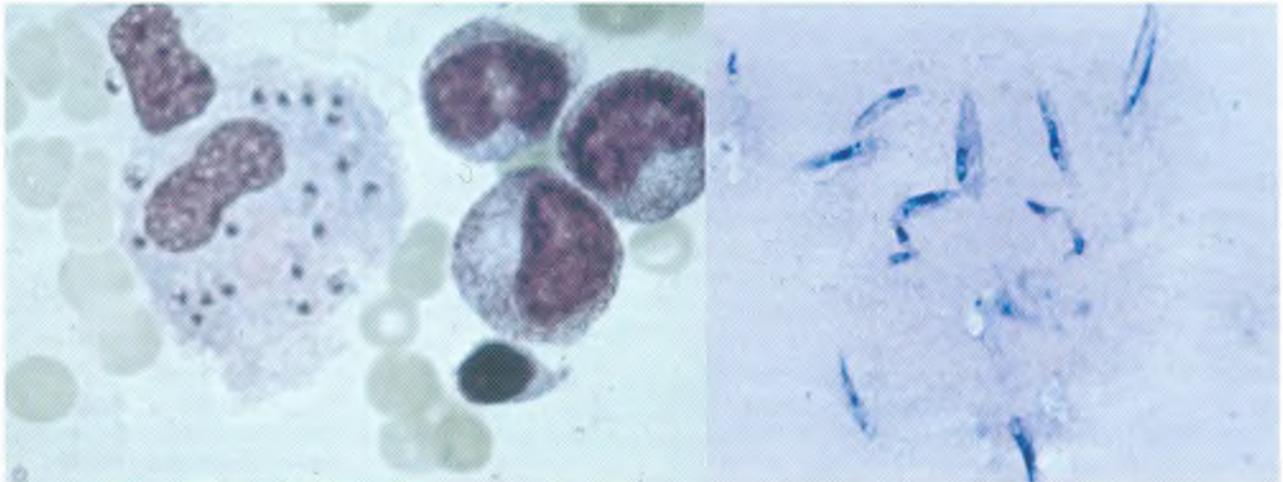


Figura 7.5. Morfología de las leishmanias.

Examen microscópico mediante tinción de Giemsa. La figura de la izquierda corresponde a un aspirado de médula ósea en el que se visualizan formas amastigotas de leishmania. Se localizan en el interior de un macrófago y puede observarse una libre. Son pequeños corpúsculos ovales de 3-5 μm en los que se distingue el núcleo y el cinetoplasto (x1000).

En la figura de la derecha, se observan, varias formas promastigotas de leishmania procedentes del medio de cultivo NNN. Son flagelados de aspecto fusiforme de 7-15 μm de largo y en ellas se observa el núcleo y el cinetoplasto (x1000).

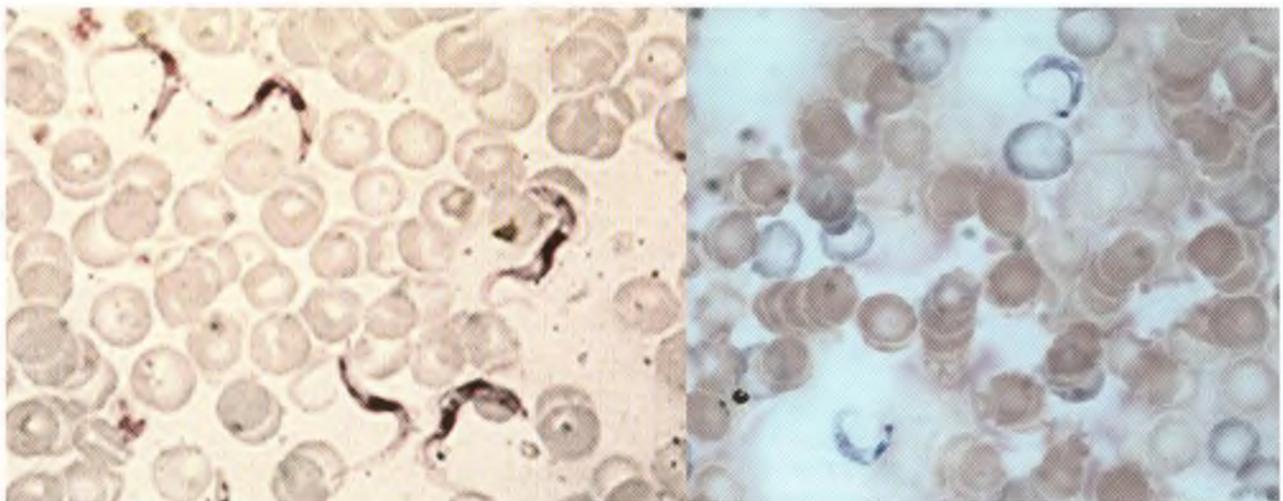


Figura 7.6. Tripanosomas en una extensión sanguínea.

La figura de la izquierda es una tinción de Giemsa de una extensión de sangre periférica donde se observan formas tripomastigotas de *T. brucei*. Son formas alargadas de 20-30 μm de tamaño con un cinetoplasto pequeño poco visible. En la figura de la derecha se observan formas tripomastigotas de *T. cruzi* en una tinción de Giemsa de un frotis sanguíneo. Las formas parasitarias tienen de 16-20 μm de largo con una forma de C o S y se caracterizan por su extremo posterior fino y su gran cinetoplasto muy visible en el extremo opuesto (x1000).

Tabla 7.4
 Patología, distribución y diagnóstico de los plasmodios patógenos humanos

Especie	Patología humana	Distribución geográfica ¹ Resistencia a los antipalúdicos	Diagnóstico
<i>Plasmodium falciparum</i>	Accesos febriles ² que repiten cada 48 horas (fiebre terciana maligna) o fiebre irregular. Cefalea, anemia normocítica por hiperhemólisis, hipoglicemia, vómitos y diarreas. Son posibles las complicaciones neurológicas (paludismo cerebral: convulsiones, obnubilación, coma), renales (fallo renal agudo) y pulmonares. Fallo multiorgánico	África subsahariana, sudeste asiático, Haití, República Dominicana y Oceanía Resistencia: Cloroquina: en todas las zonas palúdicas, excepto en América central al oeste del canal de Panamá, México, Haití y República Dominicana y en parte de Oriente Medio (excepto Arabia Saudí, Irán, Omán y Yemen) Multiresistencia: en Sudeste asiático (Tailandia, Camboya, Myanmar)	1. Diagnóstico directo Observación microscópica Tinción de Giemsa o tinciones similares de sangre obtenida en el pico febril. Frotis sanguíneo: de elección para hacer el diagnóstico específico de especie. Permite cuantificar la parasitemia Gota gruesa: útil en parasitemias bajas. Imprescindible realizar cuando el frotis sanguíneo es negativo
<i>Plasmodium vivax</i>	Abscesos febriles que repiten cada 48 horas (fiebres tercianas), anemia, vómitos, diarrea y esplenomegalia. Posibilidad de recidivas hasta los cuatro años (por persistencia hepática)	América central, Oriente Medio (Irak e Irán) y subcontinente indio Resistencia: Cloroquina: en Papúa Nueva Guinea, Irian Jaya (Indonesia), casos aislados en Brasil Guatemala, Guyana, India y Myanmar Primaquina: en sudeste asiático, Asia suroccidental y Pacífico, Somalia y Guatemala	Detección de antígeno Sangre con EDTA Sensibilidad parecida a la de la gota gruesa Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (PCR) Sangre con EDTA Es la técnica diagnóstica de mayor sensibilidad. Permite identificar cualquier especie de plasmodio e infecciones mixtas. Su uso es limitado, se emplea fundamentalmente en centros especializados
<i>Plasmodium ovale</i>	Accesos febriles que repiten cada 48 horas (fiebres tercianas), anemia, vómitos, diarrea y esplenomegalia. Posibilidad de recidivas hasta los cuatro años (por persistencia hepática)	Predomina en África subsahariana, aunque con baja prevalencia Resistencia: No se han descrito resistencias	
<i>Plasmodium malariae</i>	Accesos febriles que repiten cada 72 horas (fiebres cuartanas) con bajas parasitemias con frecuencia asintomáticas Síndrome nefrótico de etiología inmune	En todas las regiones tropicales y subtropicales aunque con baja prevalencia Resistencia: Cloroquina: en Sumatra e Indonesia	2. Diagnóstico serológico No permite diferenciar especies de plasmodios ni la infección actual de la pasada ³

La prevalencia del paludismo es de 250-300 x 10⁶ casos (92% en África subsahariana, 6% en Asia/Oceanía y 2% en América). La mortalidad se sitúa entre 7 x 10⁵ y 2,5 x 10⁶ defunciones/año.

¹ Para ver la distribución detallada y actualizada de los plasmodios humanos, consultar <http://www.cdc.gov/travel/diseases.htm>.

² Los accesos febriles se caracterizan por un periodo frío (malestar general, cefaleas, mialgias y escalofríos intensos), periodo caliente o febril (rubefacción facial, piel seca y fiebre hasta 41° C) y periodo de lisis (sudación, abatimiento y somnolencia).

³ La presencia de anticuerpos es indicativa de infección, pero no permite diferenciar el episodio actual del pasado. La confirmación de una infección actual sólo es posible en personas que, con clínica compatible, han viajado por primera vez a un país endémico de paludismo o, en caso de viajes múltiples, si se detecta seroconversión (serología previa al último viaje negativa).

rránea. Otras especies, como *L. mexicana* y *L. braziliensis*, causan leishmaniasis mucocutánea, caracterizada por ocasionar lesiones graves de piel y mucosas. En la tabla 7.2 se describe la patología, distribución y diagnóstico de las leishmanias patógenas humanas.

Los tripanosomas africanos, desde su reservorio humano (*T. brucei* subespecie *gambiense*) o en diversos herbívoros (*T. brucei* subespecie *rhodesiense*), son trans-

mitidos al hombre por moscas (glossinas) produciendo un chancre en el lugar de inoculación, seguido de una fase hemolinfática (fiebre y poliadenomegalias). La infección por la subespecie *gambiense* tiene un curso subagudo con un cuadro de encefalitis (enfermedad del sueño). La infección por *T. brucei* subespecie *rhodesiense* presenta un curso agudo y muy grave con afectación de diversos órganos, produciéndose en general la muerte antes

de que puedan aparecer signos de encefalitis subaguda (somnolencia). El tripanosoma americano (*T. cruzi*), desde su variado reservorio animal (perros, gatos, armadillos y diferentes roedores), es transmitido al hombre por chinches gigantes (redúvidos), causando la enfermedad de Chagas, caracterizada en su fase aguda, cuando es sintomática (1%), por un chancro cutáneo de inoculación, fiebre y miocarditis. En una tercera parte de los casos se cronifica y puede aparecer una cardiopatía asociada a insuficiencia cardíaca y afectación de diversos órganos (megaesófago, megacolon, etc.). En la tabla 7.3 se describe la patología, distribución y diagnóstico de los tripanosomas patógenos humanos (Fig. 7.6).

Apicomplexa

Entre los apicomplexa —que son los únicos protozoos de interés en medicina, con una fase de reproducción sexual— se hallan *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Isospora* y las cuatro especies de *Plasmodium* patógenas para el hombre.

Toxoplasma gondii tiene como reservorio natural a los felinos, en cuyo epitelio intestinal se multiplica; con las heces, se eliminan ooquistes que pueden ser ingeridos por diversos animales, como ratones, pájaros y el ganado de abasto, infectándolos. Tras la infección se forman quistes en diversos tejidos (músculos, sistema nervioso central, etc.). En esos quistes tisulares hay bradizoitos que son trofozoitos en latencia. La toxoplasmosis humana puede adquirirse por la ingesta de ooquistes eliminados por los gatos o de carne de animales de abasto con quistes tisulares. La enfermedad es una infección sistémica que puede ser asintomática o dar lugar a un cuadro de mononucleosis benigna (fiebre, poliademomegalia, exantema y linfomonocitosis en la sangre periférica). El parásito, que persiste en forma de quistes tisulares en diversos tejidos después de la primoinfección, puede reactivarse en los pacientes inmunodeprimidos ocasionando un cuadro sistémico grave (cerebritis difusa, tumoración endocraneana, corioretinitis, neumonía, miocarditis y otras). Cuando la primoinfección se produce en una mujer embarazada, el parásito puede atravesar la placenta y producir infección congénita.

La criptosporidiosis humana es una zoonosis con un amplio reservorio animal, de distribución universal, producida fundamentalmente por dos especies: *Cryptosporidium parvum* y *C. hominis*, que se multiplican en el epitelio intestinal. Las formas infectivas son los ooquistes eliminados con las heces. La transmisión se realiza directamente por vía feco-oral entre personas o por contacto con animales contaminados, e indirectamente por fómites o por ingesta de alimentos o agua

contaminada. En adultos sanos suele cursar de forma asintomática o con cuadros intestinales leves y de corta duración. En niños la clínica es más evidente, cursando con molestias abdominales, diarrea, anorexia, fiebre y pérdida de peso. La diarrea puede prolongarse hasta un mes; en pacientes inmunodeprimidos como en el sida es muy grave, por la gran pérdida de fluidos (4 a 6 l/día) y su tendencia a la cronicidad. En enfermos con inmunodepresión muy grave, la infección puede extenderse a otros epitelios además del intestinal, asociándose a colangitis, pancreatitis, bronquitis y neumonía.

Los plasmodios causantes del paludismo son transmitidos de persona a persona por mosquitos anofelinos, que son su hospedador definitivo, en tanto que el hombre es el hospedador intermediario. Al ser inoculados al hombre, inicialmente se multiplican en las células hepáticas y después en los hematíes de la sangre, desde donde son ingeridos por los mosquitos, en los que tiene lugar la reproducción sexual. La fusión de los gametos da lugar a un ooquiste en el que se forman los esporozoitos (trofozoitos) que son inoculados a un nuevo huésped a través de la picadura (Figs. 7.7 y 7.8). El paludismo se caracteriza por la fiebre, que aparece en forma de accesos palúdicos regulares³, anemia y hepatoesplenomegalia. No obstante, en personas con cierta inmunidad frente al parásito, el patrón febril periódico puede estar desdibujado. Es importante distinguir entre los plasmodios con persistencia hepática: *Plasmodium vivax* y *P. ovale*, que pueden causar recidivas, de *P. malariae* y *P. falciparum*, que no persisten en el hígado y, por tanto, no dan lugar a recidivas, aunque este último es responsable de las formas más graves de paludismo (Fig. 7.9). La malaria es endémica en áreas tropicales y subtropicales de altitud inferior a 1.500 m, donde reside el 41% de la

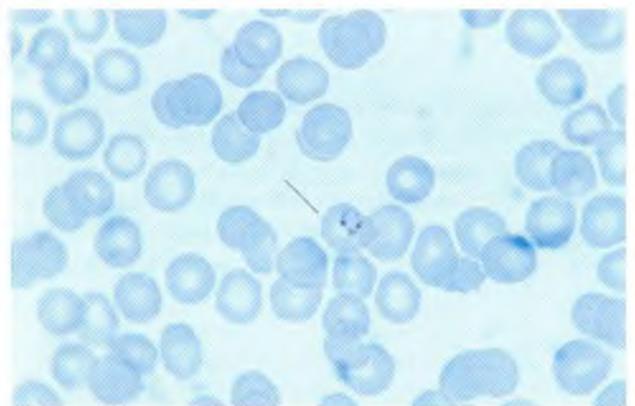


Figura 7.7. *Plasmodium* en extensión sanguínea.

Tinción de Diff-Quick de una extensión fina de sangre periférica. En la figura se observa una forma en anillo con dos núcleos que corresponde a un trofozoito joven de *P. falciparum*.

³ *P. vivax* y *P. ovale* cada tres días: acceso febril —día libre— acceso febril, en *P. malariae* cada cuatro días y en *P. falciparum* no existen períodos regulares.

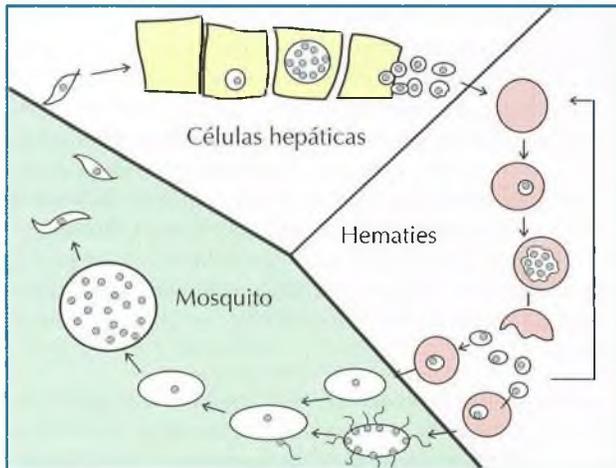


Figura 7.8. Ciclo biológico de los plasmodios.

El ciclo de los plasmodios es dioxeno, en el hombre se produce la fase de reproducción asexual y en el mosquito la sexual. Los esporozoitos, introducidos en la sangre por la picadura de un mosquito del género *Anopheles*, alcanzan el hígado y penetran en las células hepáticas donde por división múltiple (esquizogonia exoeritrocitaria) forman numerosas células hijas denominadas merozoitos. Transcurridos unos 8 días o más, los merozoitos pasan a la sangre y penetran en los hematíes. En los hematíes los trofozoitos presentan una vacuola central y el núcleo situado excéntricamente, con aspecto de anillo. Los parásitos destruyen la hemoglobina y elaboran un pigmento hemático oscuro. Después de acumularse todo el pigmento en el centro eritrocitario, se produce una esquizogonia (división múltiple) que da lugar a varios merozoitos jóvenes y el hematíe resulta destruido. Los parásitos jóvenes quedan libres y penetran en otros hematíes para iniciar un nuevo ciclo de esquizogonia. Cuando la enfermedad se prolonga aparecen en la sangre formas sexuales diferenciadas (gametos). Los gametos al ser ingeridos por el mosquito que pica al paciente palúdico, pasan a su estómago y se fusionan para formar el cigoto, iniciando la reproducción sexual. El cigoto por división múltiple (esporogonia) da lugar a los esporozoitos, que, de la cavidad abdominal del mosquito migran hacia su glándula salival y son inoculados al hombre mediante la picadura.

Los esporozoitos de *P. vivax* y *P. ovale* al penetrar en las células hepáticas y multiplicarse dan lugar a los merozoitos que pasarán a los hematíes para proseguir el ciclo descrito; pero también darán lugar a hipnozoitos que permanecen latentes en los hepatocitos, hasta que meses o años después puede iniciar una nueva esquizogonia y una recidiva de la enfermedad.

población mundial. Se estima que entre 700.000 y 2,7 millones de personas mueren de malaria al año, siendo en el 75% de los casos niños africanos. *P. falciparum* es la especie predominante en el continente africano y se considera resistente a la cloroquina en todo el África subsahariana (Tabla 7.4).

Ciliados

Entre los ciliados sólo *Balantidium coli* es patógeno para el hombre. Su reservorio es el tubo digestivo de los cerdos, causando enteritis al hombre cuando éste ingiere las formas quísticas. La infección humana se da en países cálidos y no es propia de los países templados (Tabla 7.1.).

Microsporidios

Los microsporidios⁴ son protozoos parásitos intracelulares obligados caracterizados por la producción de esporas como formas de resistencia. Excepcionalmente causan infecciones oportunistas a los pacientes con sida, dando lugar a manifestaciones muy diversas según las especies implicadas, aunque la diarrea es la más frecuente.

En resumen, entre los protozoos más importantes, la giardia, la tricomonas, el toxoplasma y los microsporidios son de distribución universal, en tanto que otros, como *E. histolytica*, los tripanosomas, los plasmodios y balantidium, presentan una distribución restringida a determinadas áreas climáticas y geográficas (tabla 7.1).

HELMINTOS DE INTERÉS MÉDICO

Como se ha señalado anteriormente, los helmintos de interés en medicina se clasifican en dos grandes grupos, los gusanos planos o platelmintos (cestodos y trematodos) y los gusanos redondos o nematodos. En la tabla 7.5 se recogen sus principales características.

Platelmintos

Las tenias adultas (cestodos) parasitan la luz del tubo digestivo de los animales, que constituyen su huésped definitivo. Están formadas por una pequeña cabeza o escólex seguida de un número variable de segmentos o anillos (proglótides) (Fig. 7.2).

Taenia solium y *T. saginata*, de varios metros de longitud, tienen al hombre como huésped definitivo, parasitando su intestino y causando molestias abdominales vagas. En las heces se eliminan cadenas de proglótides grávidas y huevos libres (Figs. 7.10 y 7.11). Estas parasitosis se adquieren por el consumo de carne de cerdo

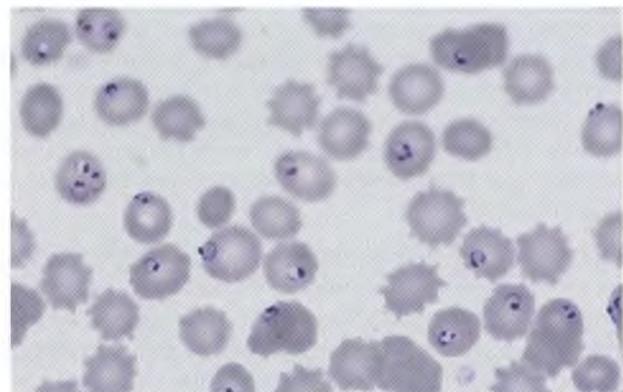


Figura 7.9. *Plasmodium falciparum*.

Tinción de Diff-Quick de una extensión fina de sangre periférica. En la figura se observa un elevado índice de parasitemia por *P. falciparum*. Se puede observar parasitación simple en algunos hematíes, carácter típico de esta especie.

⁴ Géneros: *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, *Microsporidium*, *Nosema* y *Pleistophora*.

Tabla 7.5
Principales helmintos de interés médico

Helminto	Hospedador ¹	Transmisión	Patología	Distribución ²
Platelmintos:				
cestodos:				
<i>Taenia saginata</i>	Hombre ^{HD} /bóvidos ^{HI}	Oral	Subclínica, molestias intestinales	Universal
<i>Taenia solium</i>	Hombre ^{HD} /cerdo ^{HI}	Feco-oral/oral	Subclínica, molestias intestinales Cisticercosis (larva)	Restringida
<i>Echinococcus granulosus</i>	Perro ^{HD} /mamíferos ^{HI} (hombre)	Feco-oral	Hidatidosis ³	Universal
<i>Echinococcus multilocularis</i>	Zorro ^{HD} /roedores ^{HI} (hombre)	Feco-oral	Equinococosis alveolar	Restringida
Platelmintos:				
trematodos:				
<i>Fasciola hepatica</i>	Rumiantes (hombre) ^{HD} /caracoles ^{HI}	Oral	Dolor abdominal, urticaria, obstrucción biliar	Universal
<i>Schistosoma</i> (Tabla 7.6)	Hombre ^{HD} /caracoles ^{HI}	Cutánea	Esquistosomiasis ³	Restringida
Nematodos:				
<i>Trichuris trichiura</i>	Hombre	Feco-oral	Molestias intestinales	Universal
<i>Trichinella spiralis</i>	Hombre/cerdo	Oral	Diarrea, edema facial, mialgias y fiebre	Universal
<i>Enterobius vermicularis</i>	Hombre	Feco-oral	Prurito anal	Universal
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Hombre	Feco-oral	Molestias intestinales. Síntomas respiratorios (S. de Loeffler)	Universal
<i>Toxocara canis</i>	Perro (hombre)	Oral	<i>Larva migrans</i> (hepática, ocular, pulmonar)	Universal
<i>Strongyloides stercoralis</i>	Hombre	Feco-oral, cutánea	Molestias intestinales, neumonitis	Universal
<i>Necator americanus</i>	Hombre	Cutánea	Molestias intestinales, anemia	Restringida
<i>Ancylostoma duodenale</i>	Hombre	Cutánea	Molestias intestinales, anemia	Restringida
Filarias (Tabla 7.7)	Hombre ^{HD} /insecto ^V	Picadura	Filariasis ³	Restringida

¹ Cuando se señala un único hospedador, el ciclo del parásito es monoxeno. Cuando se señalan varios hospedadores separados por una barra (/), el ciclo del parásito es heteroxeno. En paréntesis se indica el hospedador menos frecuente para diferenciarlo del hospedador natural. A veces uno de los hospedadores es un insecto que actúa además como vector.

² www.cdc.gov/travel/diseases.htm.

³ Incluye diversos procesos patológicos y cuadros clínicos.

^{HD}: hospedador definitivo; ^{HI}: hospedador intermediario; ^V: vector.

(*T. solium*) y de bovino (*T. saginata*) cuando contienen larvas enquistadas en el tejido muscular (cisticercos), ya que estos animales, que se infestan al ingerir los huevos eliminados por el hombre, son sus huéspedes intermediarios. En el caso de *T. solium*, si el hombre ingiere accidentalmente huevos, actúa como huésped intermediario, en lugar de huésped definitivo y, al igual que en el cerdo, se liberan las larvas en el intestino, lo atraviesan y pasan a enquistarse en los tejidos (cisticercosis).

Echinococcus granulosus es una tenia de pequeño tamaño (2-11 mm) que parasita el tubo digestivo del perro (huésped definitivo). Los huevos son eliminados por las heces y, cuando son ingeridos por huéspedes intermediarios (herbívoros como ovejas, cabras, bóvidos y otros) y accidentalmente por el hombre, la larva (oncosfera) atraviesa el tubo digestivo y por vía portal puede localizarse en el hígado, en el pulmón u otros órganos, donde forma quistes de gran tamaño (0,5-20 cm) de

cuyas membranas se originan las larvas. La infección puede ser asintomática o dar una clínica propia de la ocupación de espacio (quiste hidatídico) (Figs. 7.12 y 7.13). Cuando los cánidos se alimentan de vísceras de animales con quistes con larvas viables se cierra el ciclo del parásito al alcanzar en su tubo digestivo la forma adulta.

Fasciola hepatica es un helminto plano de alrededor de 1 cm de longitud y forma lanceolada que se localiza en las vías biliares del ganado ovino y bovino (Fig. 7.14). Sus huevos se eliminan con las heces; de ellos surgen las larvas, que desarrollan un ciclo vital complejo en caracoles acuáticos para acabar formando quistes en la vegetación (berros), cuyo consumo por los animales o el hombre da lugar a la liberación de una larva. Ésta atraviesa el intestino, llega a la cavidad peritoneal y penetra en el hígado, alcanzando la forma adulta, que se localiza en la vía biliar. El cultivo artificial de estos vegetales para consumo humano ha hecho desaparecer la fasciola de áreas donde era endémica.

A diferencia de los platelmintos señalados hasta ahora, que son hermafroditas, los esquistosomas son platelmintos que presentan diferenciación sexual. Los adultos, de alrededor de un centímetro de tamaño, se hallan situados en las ramas del sistema venoso portal, y desde allí pasan a los plexos venosos mesentéricos periintestinales (*Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* y *S. intercalatum*).



Figura 7.10. Tenia adulta.

Tenia eliminada después de un tratamiento antiparasitario. Tiene un aspecto acintado y segmentado. Los anillos o proglotides cercanos al escólex (cabeza) son más cortos que los anillos grávidos, que se localizan más distalmente y que pueden desprenderse aisladamente o en cadenas más o menos largas eliminándose con la defecación. Examinando exclusivamente las características macroscópicas de los proglotides no se puede diferenciar entre *Taenia solium* y *T. saginata*, tiene que observarse las características del útero de los anillos grávidos.

T. solium de 2-10 m de longitud, tiene un escólex globuloso con cuatro ventosas y dos coronas de ganchos. Sus anillos grávidos se caracterizan por presentar pocas ramas uterinas laterales (< 13) bastante ramificadas que dejan libre gran parte del parénquima del anillo. *T. saginata* de 4-15 m de longitud, tiene un escólex sólo con cuatro ventosas y sus anillos grávidos se caracterizan por la presencia de abundantes ramas uterinas laterales (> 13), de base fina que se bifurcan y que ocupan gran parte del parénquima del anillo (Fig. 7.2).

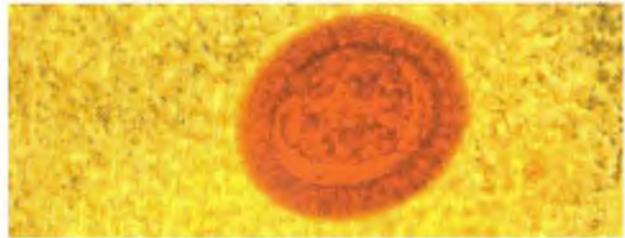


Figura 7.11. Huevo de tenia.

Huevo de forma esférica con estriación radial en su cubierta y un embrión en su interior.



Figuras 7.12 y 7.13. Quiste hidatídico.

En la figura superior se observa un quiste hidatídico extraído quirúrgicamente de un pulmón, y en la inferior se observa un gancho rostellar libre en el contenido quístico (arena hidatídica) (x1000).



Figura 7.14. *Fasciola hepatica*.

Forma adulta de *F. hepatica* que tiene una longitud de 1,5-3 cm por 1,5 cm de ancho, es plana, con forma de hoja y con un cono cefálico bien visible en la figura (Fig. 7.2).

Tabla 7.6
Patología, distribución y diagnóstico de los esquistosomas patógenos humanos

Especie	Patología /Clínica	Distribución geográfica ¹	Diagnóstico
<i>Schistosoma haematobium</i>	Fase de invasión: Asintomática, dermatitis urticariforme Fase de estado: Síndrome miccional, hematuria, calcificaciones vesicales, hidronefrosis, papilomas vesicales, cáncer vesical	África, Oriente Medio, islas del Océano Índico (Madagascar, Zanzíbar y Pembra) e India (en vías de extinción)	1. Diagnóstico directo Observación microscópica Identificación microscópica de huevos (a partir de las 6-8 semanas postinfección). Orina (<i>S. haematobium</i>). Se debe recoger la primera micción de la mañana después de un ligero ejercicio y orina de 24 horas que se deja sedimentar, se centrifuga y el sedimento se observa al microscopio. Heces (<i>S. mansoni</i> , <i>S. japonicum</i> , <i>S. mekongi</i> y <i>S. intercalatum</i>). 2. Diagnóstico serológico La sensibilidad del ELISA para <i>S. mansoni</i> y <i>S. haematobium</i> es elevada e inferior para <i>S. japonicum</i> . La sensibilidad y especificidad del inmunoblot es del 95% y 99% respectivamente y superior al ELISA para las tres especies de esquistosomas, por lo que puede ser utilizado como prueba confirmatoria. La presencia de anticuerpos es indicativa de infección por esquistosoma pero no se correlaciona con el estado clínico de la infección.
<i>Schistosoma mansoni</i>	Fase de invasión: Asintomática, dermatitis urticariforme, fiebre y eosinofilia (síndrome de Katayama ²) Fase de estado: Cuadro disentérico, colitis, granulomas hepáticos, fibrosis con hipertensión portal presinusoidal, glomerulonefritis	Islas del Caribe (Antigua, República Dominicana, Guadalupe, Martinica, Montserrat, Santa Lucía), Sudamérica (Brasil, Venezuela, Surinam), África del este y subsahariana y Oriente Medio (Irán, Irak, Arabia Saudí, Siria, Yemen). Madagascar y valle del Nilo	
<i>Schistosoma japonicum</i>	Parecida a <i>S. mansoni</i> , aunque debido al pequeño tamaño de los huevos, la diseminación por vía sanguínea es más frecuente, produciendo metástasis cerebrales (crisis epilépticas)	Extremo Oriente	
<i>Schistosoma mekongi</i>	Parecida a <i>S. mansoni</i>	Focos en el sudeste asiático	
<i>Schistosoma intercalatum</i>	Parecida a <i>S. mansoni</i>	Focos en África central y del este	

La prevalencia mundial de la esquistosomiasis es de 200-250 x 10⁶ casos.

¹ Para ver la distribución detallada y actualizada de los esquistosomas humanos, consultar <http://www.cdc.gov/travel/diseases.htm>.

² El síndrome de Katayama se caracteriza por fiebre, urticaria, tos irritativa, dolor abdominal, hepatoesplenomegalia y eosinofilia.



Figura 7.15. Huevos de esquistosoma.

En la figura de la izquierda se observa un huevo de *Schistosoma haematobium*, eliminado por la orina, con el típico espolón terminal y en la de la derecha, se visualiza un huevo de *S. mansoni* eliminado por las heces, con un prominente espolón lateral. Las características morfológicas más destacadas de estos huevos son la posesión de espículas (espolones) polares o laterales y su gran tamaño (150 µm de longitud) (Fig. 7.22) (x400).

tum) o perivesicales (*S. haematobium*) para deponer los huevos. Los huevos depositados en el interior de estas vénulas salen de ellas y atraviesan los tejidos, a los que lesionan, para alcanzar el tubo digestivo (*S. mansoni*, *S. japonicum* y *S. intercalatum*) o la vejiga urinaria (*S. haematobium*), siendo eliminados con las heces y la orina respectivamente para seguir un complejo desarrollo larvario en caracoles de agua dulce, que liberan una larva infectante (cercaria) que atraviesa activamente la piel del hombre (Fig. 7.15). La enfermedad es de curso muy prolongado y su cuadro clínico varía según el helminto involucrado. Aunque estas infecciones son extremadamente frecuentes en los países tropicales, han sido erradicadas de los países desarrollados. En la tabla 7.6 se describe la

patología, distribución y diagnóstico de los esquistosomas patógenos humanos.

Nematodos

Los áscaris (*Ascaris lumbricoides*) son parásitos monoxenos del hombre. Las hembras tienen un tamaño de 20 a 40 cm, y los machos de 15 a 30 cm. Cuando se ingieren los huevos, las larvas salen en el intestino delgado y pasan a los capilares, alcanzando por la circulación venosa y a través del corazón, el pulmón, en donde salen de los capilares a los alvéolos para ascender por la vía respiratoria y ser deglutidas, llegando al intestino delgado, donde alcanzan el estadio adulto (Figs. 7.16 y 7.17).

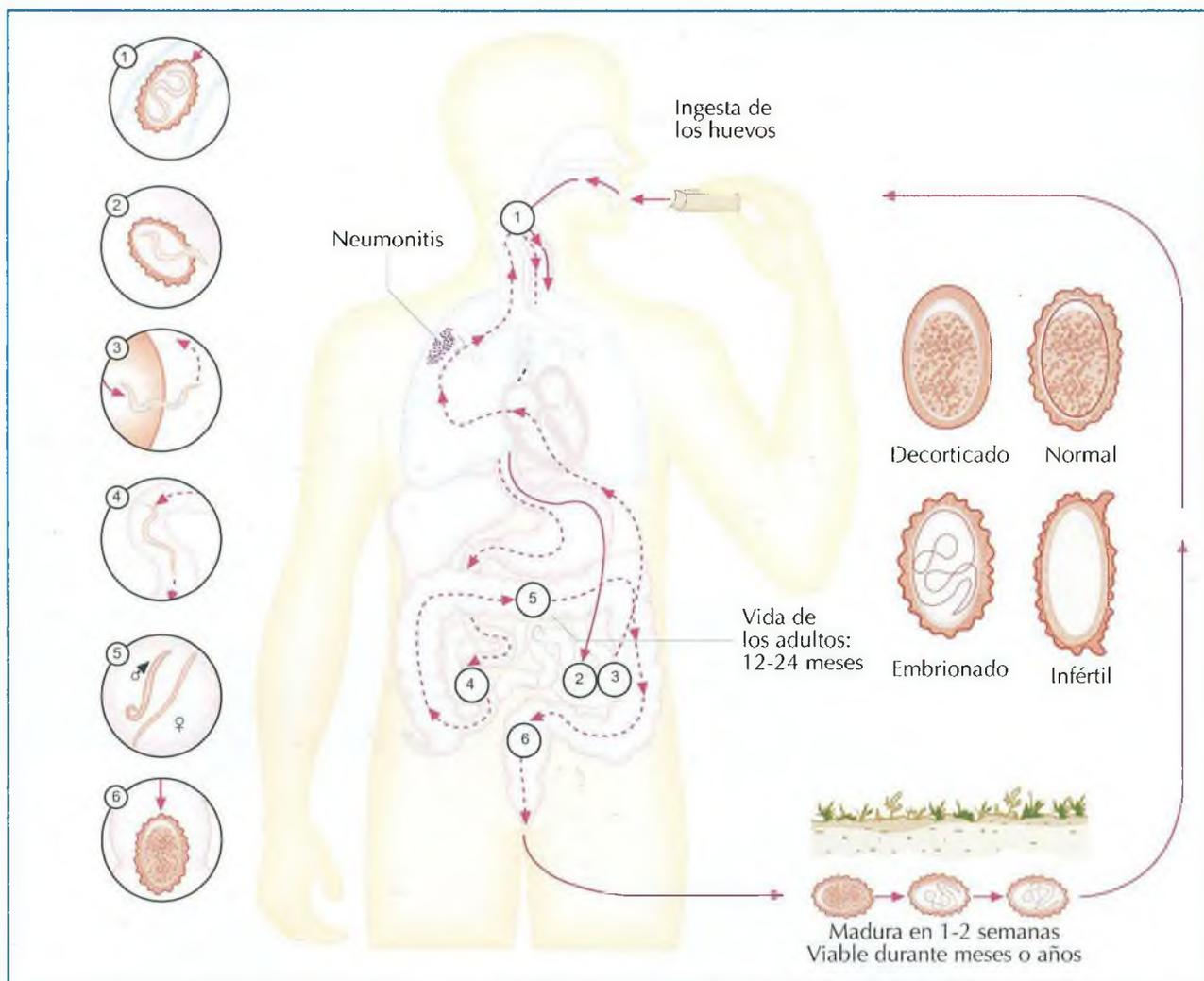


Figura 7.16. Ciclo biológico de *Ascaris*.

Cuando se ingieren huevos embrionados de *A. lumbricoides* (1), pierden la cubierta en el intestino y las larvas quedan en libertad (2). Atraviesan la pared intestinal (3), entran en la vena porta y, vehiculadas por la sangre, en el plazo de unos siete días alcanzan el pulmón, penetran en los alvéolos, ascienden por la tráquea para ser deglutidas y localizarse de nuevo en el tubo digestivo (4) donde maduran a adultos (5). Los vermes adultos viven fundamentalmente en el yeyuno, sin adherirse a la pared, manteniéndose en la luz intestinal gracias a su característico tono muscular. Su vida media es de uno a dos años, produciendo cada hembra grávida unos 200.000 huevos diarios. Los huevos se eliminan por las heces (6) y las larvas se desarrollan en su interior en una a tres semanas en suelos húmedos y templados. Se requieren dos meses para que se desarrollen las hembras grávidas y aparezcan los primeros huevos en las heces.

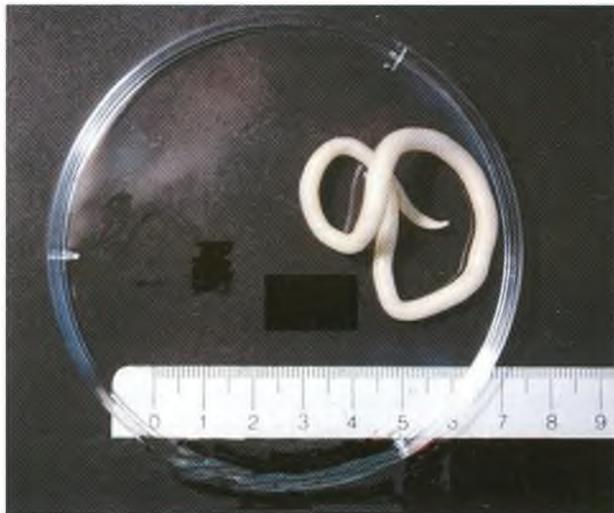


Figura 7.17. Forma adulta de *Ascaris*.

Adulto de *A. lumbricoides*. Es un nematodo de gran tamaño, de coloración blanco marfil con tres prominentes labios en su extremo cefálico. Las hembras miden 20-40 cm de longitud. Los machos son más cortos (15-30 cm de longitud) y se caracterizan por tener su extremo caudal incurvado.

Los oxiuros (*Enterobius vermicularis*) son nematodos parásitos monoxenos del hombre que parasitan el colon. Las hembras tienen un tamaño de 8 a 12 mm de longitud y los machos de 2 a 5 mm; se les conoce como lombriz intestinal pequeña (Fig. 7.18). Las hembras bajan a poner los huevos en los márgenes del ano durante la noche, causando prurito, insomnio e inquietud durante el día. Los huevos, abundantísimos, difunden en el ambiente infectando fácilmente a nuevos hospedadores o autoinfectando al mismo hospedador (Figura 7.28).

Anisakis simplex, es un nematodo cuyas larvas se hallan en los peces y en los calamares. Los huéspedes definitivos son mamíferos marinos. El hombre se contamina al ingerir larvas que se encuentran en el pescado crudo o poco cocido. Las manifestaciones clínicas se caracterizan por síntomas gastrointestinales y/o reacciones alérgicas.

Strongyloides stercoralis parasita el duodeno del hombre; la estrogiloidosis se caracteriza por dolor epigástrico y anemia. La hembra elimina huevos que eclosionan precozmente, por lo que por las heces se liberan las larvas al medio ambiente. En el exterior, ambos sexos alcanzan el estadio adulto y dan una nueva generación de larvas. Éstas, en el estadio L₃, pueden penetrar a través de la piel intacta y, por vía circulatoria, llegar al pulmón ascendiendo hasta la glotis siendo deglutidas, alcanzando el duodeno, donde maduran a formas adultas, en un ciclo semejante al del áscaris.

Ancylostoma duodenale y *Necator americanus* son dos especies de nematodos que se engloban dentro del término uncinarias, cuyos ciclos vitales son esencialmen-



Figura 7.18. Formas adultas de oxiuros.

Se observan formas adultas de *Enterobius vermicularis* (oxiuros) que son helmintos redondos y filiformes, de color blanco marfil. El macho mide hasta 5 mm de largo y la hembra hasta 13 mm. Se observan con frecuencia en la región perianal de los sujetos parasitados y también pueden eliminarse con las heces.

te iguales y parecidos al de *S. stercoralis*. Se diferencian de este último, porque sus huevos no eclosionan en el intestino y se eliminan con las heces. Los huevos de las dos especies son indiferenciables entre sí.

La triquina (*Trichinella spiralis*) es un nematodo que en su estadio adulto se localiza en el interior de la mucosa del intestino delgado de diversos animales, carnívoros y omnívoros. Allí las hembras son fecundadas y ponen las larvas, que pasan a la circulación para alcanzar las fibras musculares, donde se enquistan⁵. Cuando un animal come carne con quistes, en el intestino se liberan las larvas que penetran al interior de la pared intestinal donde alcanzan el estadio adulto. El ciclo de este parásito se mantiene en la naturaleza por el canibalismo de las ratas, que además pueden ser devoradas por los cerdos, o por ciclos ferreos entre pequeños carnívoros y zorros, lobos, jabalíes, tejones y osos. Cuando el hombre come carne de un animal infectado con quistes de triquina (jabalíes, cerdo, etc.), adquiere la enfermedad, que se caracteriza por dolor muscular difuso, edemas palpebrales y eosinofilia muy intensa, como consecuencia de la formación de abundantes quistes larvarios en los músculos.

Las filarias humanas adultas se localizan en los linfáticos (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*) o en el tejido celular subcutáneo (*Loa loa*, *Onchocerca volvulus*). Las microfilarias de *W. bancrofti* y *B. malayi*, desde los linfáticos, pasan a la sangre con periodicidad nocturna, transmitiéndose por mosquitos a otro huésped. El bloqueo de los linfáticos en las formas evolucionadas causa elefantiasis de las extremidades. Las microfilarias de *Loa loa* pasan a la sangre con periodicidad diurna, desde donde son transmitidas por tabánidos (*Chrysops*). El cuadro clínico se caracteriza por eritema y edema fugaces, pudiendo observarse el tránsito de los adultos por zonas finas (párpados, conjuntiva, etc.). Las formas adultas de *O. volvulus* se agrupan para forman nódulos subcutáneos enquistados.

⁵ La triquina es un nematodo vivíparo que no pone huevos, sino que depone directamente las larvas.

dos. Las larvas no circulan por la sangre, sino por el tejido celular subcutáneo, y son transmitidas por dípteros (simúlidos). Su localización ocular produce ceguera. En la tabla 7.7 se describe la patología, distribución y diagnóstico de las principales filarias patógenas humanas.

DIAGNÓSTICO DE LAS PARASITOSIS

Visión de conjunto

En el diagnóstico parasitológico el examen microscópico directo posee una gran utilidad para la visualización de los diversos parásitos, que además pueden ser iden-

tificados con bastante precisión basándose en su morfología. Los protozoos se identifican por sus formas vegetativas (trofozoicas) o por sus quistes, y los helmintos por las formas adultas, los huevos o las formas larvianas.

El cultivo como método de diagnóstico en parasitología clínica se realiza sólo en casos excepcionales. Las pruebas para la detección de antígeno poseen también indicaciones muy concretas y limitadas, al igual que las técnicas genéticas de amplificación, que permiten detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos. Las pruebas serológicas poseen gran utilidad en las parasitosis hemohísticas, en las que es difícil obtener muestras para examen microscópico de los órganos profundos afecta-

Tabla 7.7
Patología, distribución y diagnóstico de las filarias patógenas para el hombre

Especie	Patología	Distribución ¹	Diagnóstico
Filarias linfáticas			
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Asintomática. Eosinofilia, fiebre, linfangitis, adenitis, orquitis, adenomegalias, obstrucción linfática, hidrocele, linfedema, elefantiasis	África, sudeste asiático, América del sur y central y costas del Pacífico	1. Diagnóstico directo Observación microscópica Observación de las microfilarias. Tinción de Giemsa o tinciones especiales para vainas. Sangre ² . Frotis sanguíneo. Gota gruesa. Técnicas de concentración (formol, saponina, filtración). Piel (biopsia exangüe) microfilarias de <i>O. volvulus</i> . Observación macroscópica de adultos Nódulos subcutáneos en <i>O. volvulus</i> . Detección de antígeno Sangre con EDTA: comercializado sólo para <i>W. bancrofti</i> . Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (PCR) Disponible para <i>W. bancrofti</i> y <i>B. malayi</i> .
<i>Brugia malayi</i>	Parecida a <i>W. bancrofti</i>	Asia	
<i>Brugia timori</i>	Parecida a <i>W. bancrofti</i>	Indonesia	
Filarias cutáneas/subcutáneas			
<i>Onchocerca volvulus</i>	Eosinofilia, dermatitis pruriginosa, alteraciones de la piel (piel engrosada, atrófica, cambios de pigmentación, etc.), nódulos subcutáneos (oncocercomas), linfadenopatías, manifestaciones oculares, conjuntivitis, queratitis, neuritis y atrofia del nervio óptico (ceguera de los ríos)	África tropical, focos en Latinoamérica (Brasil, Colombia, Ecuador, Guatemala, Venezuela, Sur de México) y Oriente Medio (Yemen)	2. Diagnóstico serológico Específica para <i>O. volvulus</i> y filarías linfáticas. La serología da un gran número de reacciones cruzadas y es difícil de diferenciar entre una infección actual y una pasada.
<i>Loa loa</i>	Edemas migratorios no inflamatorios (edema del Calabar) y eosinofilia	África central	
<i>Mansonella streptocerca</i>	Asintomática. Manifestaciones cutáneas, prurito, erupciones papulares, cambios en la pigmentación, eosinofilia	África	
Filarias de cavidades y tejidos profundos			
<i>Mansonella perstans</i>	Asintomática. Angioedema, prurito, fiebre, cefalea, artralgias, eosinofilia	África y este de Sudamérica	
<i>Mansonella ozzardi</i>	Como <i>M. perstans</i> , además de síntomas pulmonares y hepatomegalia	América	

La prevalencia de las filarías linfáticas es de 90-120 x 10⁶ casos y la de la oncocercosis de 17 x 10⁶ casos.

¹ Para ver la distribución detallada y actualizada de las filarías humanas, consultar <http://www.cdc.gov/travel/diseases.htm>.

² Es importante realizar la extracción de sangre de acuerdo a la periodicidad de las microfilarías en sangre. Son de periodicidad nocturna las microfilarías de *W. bancrofti*, *B. malayi* y *M. timori*. Son de periodicidad diurna las microfilarías de *L. loa*, y aperiódicas las microfilarías del resto de especies.

dos —como ganglios linfáticos, hígado u otros— sin utilizar técnicas cruentas. Sin embargo, es fácil y muy útil obtener muestras de sangre o de médula ósea para el diagnóstico por examen microscópico del paludismo y la leishmaniasis visceral respectivamente.

EXAMEN MICROSCÓPICO

Parasitosis de las cavidades abiertas

Infecciones vaginales

La única parasitosis vaginal es la causada por *Trichomonas vaginalis*, que, como ya se ha indicado, se transmite por contacto sexual, por lo que este protozoo no posee forma quística. Causa un proceso exudativo (cervicitis, vaginitis) que se diagnostica mediante examen microscópico del exudado cervical o vaginal, y por cultivo en un medio adecuado (*Técnicas de cultivo*). Aunque no es frecuente, las tricomonas pueden causar uretritis exudativa en el hombre. En este caso, el diagnóstico se realiza observando en fresco o cultivando el exudado uretral.

El examen debe realizarse poniendo en el portaobjetos una gota de solución salina fisiológica tibia (~ 35° C) y efectuando en ella la suspensión del exudado recogido con el asa bacteriológica directamente de la vagina o cérvix, observando inmediatamente al microscopio la morfología y movilidad característica de este protozoo. Si la toma no se ha efectuado cerca de un microscopio, el portaobjetos puede trasladarse al laboratorio en una cámara húmeda⁶. Alternativamente, puede sembrarse junto al paciente un medio de cultivo específico (véase más adelante).

Parasitosis intestinales

Las parasitosis intestinales están causadas por protozoos como la giardia, criptosporidium, *E. histolytica*, y por helmintos como tenias, oxiuros, áscaris y estrongiloides entre otros.

Antes de iniciar el examen microscópico de las heces es importante inspeccionarlas para descartar la presencia de helmintos visibles macroscópicamente (tenias, áscaris, oxiuros) (Figs. 7.10, 7.17 y 7.18).

El examen microscópico permite observar los protozoos en forma vegetativa (trofozoitos) o quística y visualizar los huevos depositados por los helmintos. En el caso de estrongiloides, se pueden observar sus larvas, ya que los huevos eclosionan en el intestino antes de llegar al exterior.

Las formas vegetativas de los protozoos se lisan muy rápidamente a medida que la masa fecal se enfría, por

lo que, para observarlas, deben estudiarse muestras de heces recién emitidas. En general, las heces deberían observarse antes de las dos horas de su emisión; en caso contrario deben fijarse para conservar los elementos parasitarios (Figs. 7.19 y 7.20). Por otra parte, para la detección de algunos parásitos, especialmente en infestaciones ligeras, es útil aplicar técnicas de concentración. Algunos helmintos, como los oxiuros, depositan los huevos en los márgenes del ano, donde deben buscarse mediante técnicas especiales, como la de Graham, que utiliza una cinta adhesiva.

Debido a que la eliminación de las formas parasitarias en las heces no es continua, para descartar con seguridad una parasitosis intestinal se recomienda estudiar hasta tres muestras de heces de días diferentes no consecutivos.

Fijación

Es excepcional que una muestra de heces recién emitidas se pueda estudiar antes de dos horas después de su emisión, por lo que habitualmente se prevé su reco-

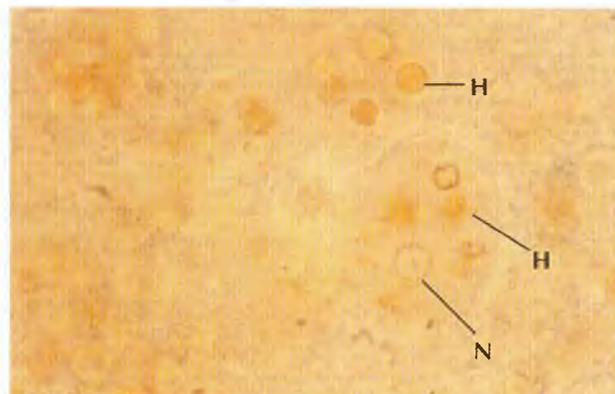


Figura 7.19. Trofozoito de *Entamoeba histolytica*.

Examen microscópico de heces fijadas con MIF. Se observa un trofozoito de *E. histolytica* de un paciente con disentería amebiana. Tiene una forma irregular y un núcleo (N) con cromatina periférica uniformemente distribuida. En el citoplasma se distinguen formas coloreadas que corresponden a hematíes fagocitados en diferentes estadios de digestión (H) (x1000).



Figura 7.20. Quiste de *Entamoeba histolytica*.

Examen microscópico de heces fijadas en MIF. Se observa un quiste maduro, esférico con tres núcleos bien visibles y un cuarto núcleo que se encuentra en diferente plano, por lo que para su visualización es necesario un cambio de foco (x400).

⁶ Puede prepararse una cámara húmeda, poniendo el portaobjetos en el que se ha depositado el exudado con el cubreobjetos en una placa de Petri vacía con un algodón húmedo y tapada para que se mantenga la humedad hasta la observación microscópica.

gida en una solución fijadora o se fijan inmediatamente después de su llegada al laboratorio.

Existen muchos métodos de fijación, cada uno con diferentes ventajas o inconvenientes, en general relacionados con la posibilidad de aplicar posteriormente tinciones específicas, técnicas de detección de antígeno y de amplificación genética. Entre los más utilizados está el tradicional que utiliza formol; el que emplea mertiolato, yodo y formol (MIF) (Fig. 12.3) y otros como el basado en el acetato sódico, ácido acético y formol (SAF).

La fijación con formol o mediante el fijador de SAF permite, además de la conservación de los parásitos, efectuar técnicas de concentración a partir de la muestra fijada y tinciones específicas, como la de Ziehl Neelsen modificada, y la tricrómica. También permite aplicar algunas técnicas de detección de antígeno.

Las heces fijadas con MIF pueden observarse directamente, ya que el yodo y la eosina colorean los elementos parasitarios; además, las muestras pueden ser sometidas también a posteriores procesos de concentración y a tinciones permanentes, aunque para este último propósito es menos adecuado que el formol.

Algunas soluciones para la fijación de las heces se encuentran comercializadas⁷.

Examen en fresco

El examen en fresco de una pequeña cantidad de heces diluida en solución salina permite la visualización

de las formas vegetativas y quísticas de los protozoos, y en su caso los huevos de helminto. Sin embargo, en una preparación sin colorear muchas veces no se consigue visualizar con precisión los protozoos. De una manera muy sencilla, aunque útil, puede ponerse una gotita de lugol, que colorea los parásitos facilitando su observación. Como se ha señalado el examen también puede realizarse directamente a partir de heces fijadas con formol o MIF, en este último caso los elementos parasitarios aparecen ligeramente coloreados (Fig. 7.21).

Técnicas de concentración

El examen directo de las heces frescas o fijadas es muchas veces insuficiente para la detección de quistes de protozoos y particularmente de huevos de helmintos, sobre todo cuando se hallan en número escaso. Por ello se recurre normalmente a métodos de concentración que permitan detectar infestaciones ligeras.

En las figuras 7.22 y 7.23 se muestran las características morfológicas de los huevos de algunos helmintos de interés en patología humana.

Las técnicas de concentración se pueden clasificar en dos grandes grupos: métodos físicos y fisicoquímicos (difásicos). Los métodos físicos se basan únicamente en la diferencia de densidad entre los elementos parasitarios y el resto de materiales contenidos en las heces. A grandes rasgos, estos métodos consisten en mezclar una porción de heces con un líquido de densidad adecuada, de tal manera que los elementos parasitarios se separen del resto de materiales, bien por flotación, bien por sedi-

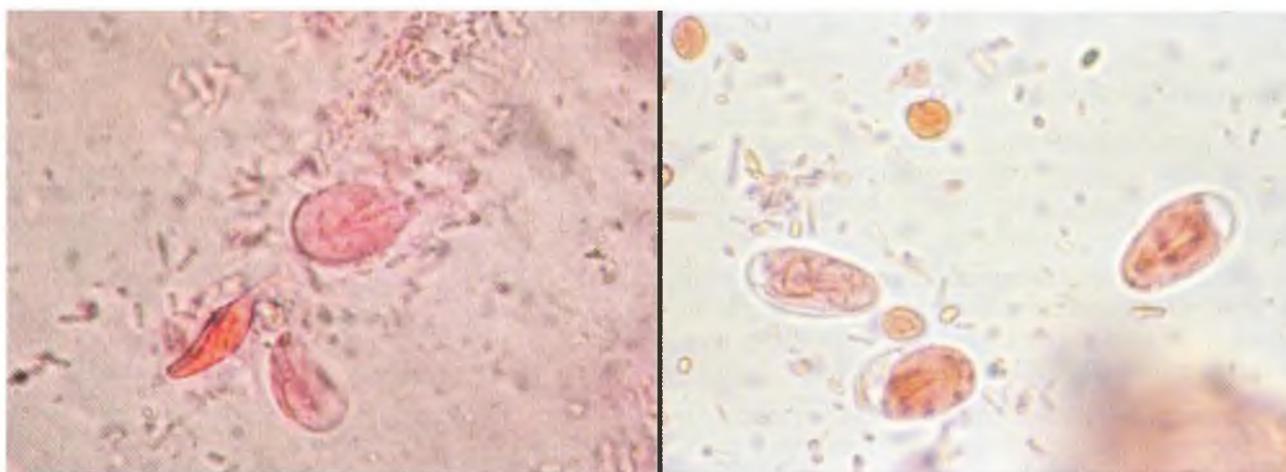
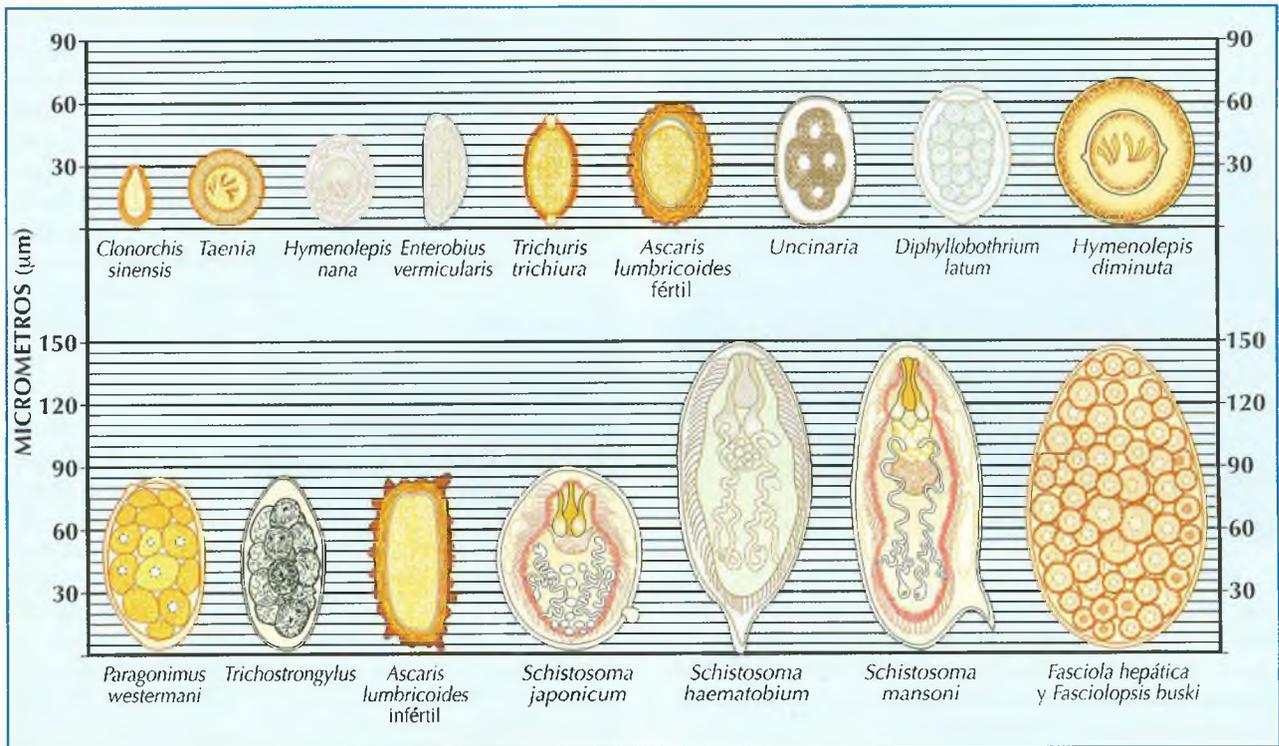


Figura 7.21. *Giardia intestinalis*.

Examen microscópico de heces fijadas en MIF. En la figura de la izquierda se observan tres formas trofozoicas de *G. intestinalis*. El trofozoito que se observa en la parte superior, se ve de frente, tiene forma piriforme y se le adivina el disco ventral con los dos núcleos. Las otras dos formas se observan de perfil y presentan aspecto aplanado de cuchara (x1000). En la figura de la derecha se observan tres quistes de *G. intestinalis*. Tienen forma oval y la pared es hialina y destaca por su refringencia al quedar la forma parasitaria retraída en su interior, dejando un espacio entre las dos. Los núcleos son parcialmente visibles (x1000).

⁷ Intersep, Ltd; Scientific Device Laboratory; Durviz SL; entre otras firmas comerciales dispone de diversos reactivos para fijación y concentración de muestras fecales.



Figuras 7.22. Morfología y tamaño de los huevos de helminto.

Las helmintosis intestinales se diagnostican generalmente por la detección de huevos en las heces. La morfología de los huevos y su tamaño son los aspectos fundamentales que hay que tener en cuenta para su identificación. En esta figura se muestra el tamaño absoluto y comparativo de los huevos de helminto de interés en medicina.

Es importante observar las características de la cubierta externa del huevo, para determinar: si es lisa o abollonada, la presencia o no de opérculo, de espolones o espinas.

La mayoría de los huevos de helminto poseen una cubierta lisa, bien marcada, refringente, excepto en los de áscaris que es mamelonada y de tamaños relativamente grandes (60-90 x 40-50 µm) (Figs. 7.23 y 7.26).

Existen huevos operculados, con una tapadera a modo de casquete en uno de los polos por donde se libera el embrión (Fig. 7.23). En algunos huevos el opérculo es pequeño con forma de copa (clonórquidos), en otros es mayor, pero poco visible (*Fasciola hepática*, *Diphylobothrium latum*).

Los huevos de *Schistosoma* son de gran tamaño y presentan una espina o espolón muy visible en el polo posterior (*S. haematobium*, *S. intercalatum*) o lateral (*S. mansoni*, *S. japonicum*) (Figs. 7.15 y 7.23). *S. japonicum* es el de menor tamaño, de forma oval y su espolón lateral es muy poco perceptible.

Los huevos de las dos especies de tenias más importantes que parasitan al hombre en su forma adulta (*T. solium* y *T. saginata*) no se diferencian entre sí. Tienen forma esférica con una estriación radial en la cubierta y en el interior un embrión con ganchos (Fig. 7.11). Los huevos de *Enterobius vermicularis* son muy característicos, poseen una cara plana (en grano de café) y con frecuencia puede observarse el embrión (Figs. 7.23 y 7.28).

Los huevos de *Trichuris trichiura* tienen forma de limón con un tapón refringente en cada polo (Fig. 7.27).

Los huevos de las uncinarias (*hookworms*), como anquilostoma y necator, son muy parecidos y no es posible diferenciarlos. Poseen una cubierta fina de contorno oval que encierra de 4-8 blastómeros (Fig. 7.23).

mentación, según la técnica. Entre los más utilizados está el método de flotación, que emplea sulfato de zinc (técnica de Faust).

En los métodos físico-químicos se asocia la acción disolvente de los reactivos empleados, que forman dos fases no miscibles, en una de las cuales se localizan preferentemente los parásitos, y en la otra los restos fecales. De entre ellos, el más universal es el método de formol-éter (técnica de Ritchie) (Fig. 7.24), que puede utilizarse tanto en heces frescas como fijadas en formol. Básicamente se trata de diluir las heces directamente en formol al 10%, tamizar y agregar unos mili-

litros de éter etílico, emulsionar por agitación vigorosa y examinar, tras centrifugación, el sedimento donde se concentran los quistes de protozoos y los huevos de helminto.

Para las heces fijadas con MIF se puede utilizar la técnica de concentración de Blagg (MIF concentración). Es muy parecida a la técnica de Ritchie, y su principal diferencia radica en que, en lugar de éter etílico, se utiliza éter sulfúrico.

La técnica de Kato no es una técnica de concentración en sentido estricto, sino que clarifica el material fecal facilitando la visualización de los huevos de los helmin-

tos presentes en un volumen de heces mucho mayor del que es posible examinar en un frotis directo convencional. El método consiste en depositar una capa de heces relativamente gruesa sobre un portaobjetos sobre la que se hace actuar una solución acuosa de glicerina y verde de malaquita. La glicerina clarifica, transparentando el material fecal, con lo que se facilita la observación microscópica de los huevos de helminto, que quedan contrastados gracias a la acción del verde de malaquita. Presenta, sin embargo, el inconveniente de no facilitar la visualización de otros elementos parasitarios (quistes de protozoos y larvas de helmintos). Esta técnica es muy útil por ser sensible, fácil de realizar y económica en material y tiempo (Fig. 7.25).

En las figuras 7.22, 7.23 y 7.25 a 7.28 se muestran algunos huevos de helminto característicos.

Técnica de Graham

Es raro encontrar huevos de oxiuros en las heces. Es más fácil detectarlos mediante la técnica de Graham. Esta técnica se basa en aplicar en los márgenes del ano una cinta adhesiva, tipo celo, por la mañana, antes de defecar, que posteriormente se adhiere a un portaobjetos y se observa al microscopio.

Tinciones

Tradicionalmente se ha utilizado la tinción de hematoxilina férrica (Heidenhein) para observar detalles finos de los parásitos (protozoos) que permitan su identifi-

cación precisa. Es una tinción permanente de compleja realización, por lo que es poco utilizada. En la actualidad se emplea la tinción tricrómica de Wheatley, que es una variante del Gomori. Esta tinción puede emplearse en heces frescas y fijadas por formalina, SAF o MIF. El principal problema reside en que las muestras fijadas por estas técnicas se adhieren con dificultad al portaobjetos. Existen reactivos comercializados por diferentes compañías que fijan las heces sin presentar posteriores problemas de adherencia a los portaobjetos, pudiéndose teñir posteriormente mediante el método tricrómico⁸.

Cryptosporidium parvum es un pequeño protozoo (3-5 μm) que no se visualiza fácilmente en fresco ni tras fijación-coloración con MIF ni con las tinciones parasitológicas habituales (Gomori, tricrómica). Para su observación en heces frescas o fijadas, se prepara directamente o tras concentración con formol-éter una extensión de heces que se teñirá con la tinción de Ziehl-Neelsen modificada o con la tinción fluorescente de auramina (Fig. 7.29). Con estas tinciones también se tiñen de manera específica otros protozoos, como *Cyclospora cayentanensis* (8-10 μm) e *Isoospora belli* (10-20 μm). No obstante, ambos protozoos pueden visualizarse en un examen en fresco sin necesidad de realizar una tinción permanente (Fig. 7.30).

Para la detección de *C. parvum* también se ha preconizado el empleo de técnicas de inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales.

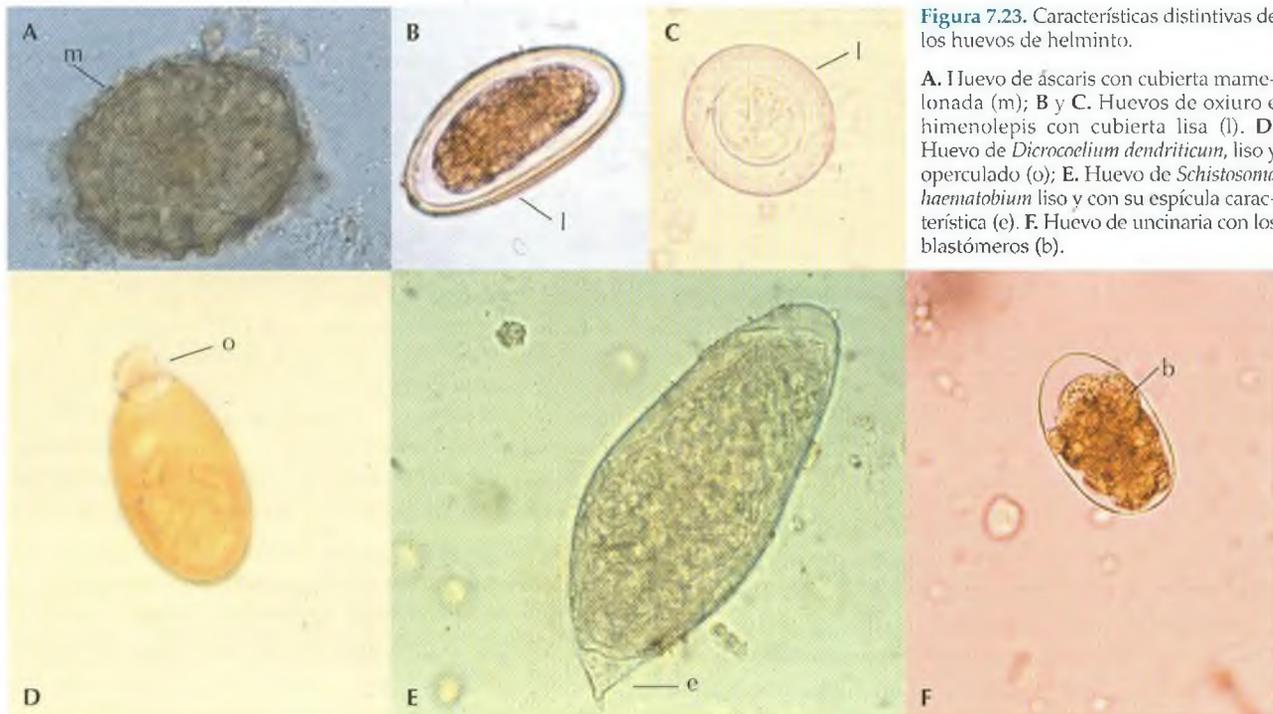


Figura 7.23. Características distintivas de los huevos de helminto.

A. Huevo de áscaris con cubierta mame-lonada (m); B y C. Huevos de oxiuro e himenolepis con cubierta lisa (l). D. Huevo de *Dicrocoelium dendriticum*, liso y operculado (o); E. Huevo de *Schistosoma haematobium* liso y con su espícula característica (e). F. Huevo de uncinaria con los blastómeros (b).

⁸ ECOFIX y ECOSTAIN de Meridian Diagnostics Inc.

Figura 7.24. Concentración de muestra fecal.

En la figura se observa un tubo con heces en el que se ha realizado la técnica de concentración de Ritchie. Después de la centrifugación el contenido del tubo se reparte en cuatro capas que de arriba abajo corresponden a la capa de éter con grasas, la capa de residuos lipofílicos, la capa acuosa y el sedimento donde se localizan los elementos parasitarios y que es la parte a examinar.



Los microsporidios (0,8-4 μm) se observan tras la tinción de la muestra fresca o preferentemente concentrada con un método tricrómico que tiñe las esporas de un color rosado.

En resumen, la identificación morfológica de los protozoos intestinales se basa en la observación microscópica de la muestra fresca, teñida o concentrada, para observar las formas vegetativas y quísticas. El diagnóstico de las helmintosis intestinales se basa en la observación de los vermes macroscópicos en las heces (tenias, oxiuros y áscaris) y en la detección microscópica de las larvas y de los huevos. Para su identificación es fundamental atender a su forma y tamaño.



Figura 7.25. Técnica de Kato.

En la figura se observa un frotis grueso de heces de color verdoso preparado, según la técnica de Kato, para su observación microscópica. Arriba se ve una placa de Petri con láminas de papel de celofán embebidas en una solución de glicerina-verde malaquita, que son las que se depositan durante 30-60 minutos sobre la extensión gruesa de heces. Estas láminas deben de haber permanecido en esta solución un mínimo de 24 horas antes de ser utilizadas.



Figura 7.26. Huevo de áscaris.

Puede observarse una larva de áscaris saliendo del huevo.

Parasitosis sistémicas

Cuando los parásitos que se localizan en los órganos profundos tienen una fase hemática persistente o regular, como sucede en el paludismo, en la tripanosomiasis y en las filarías, debe tomarse una muestra de sangre en el momento adecuado para cada una de las infecciones y practicar extensiones y una gota gruesa sobre un portaobjetos, que se observará en el microscopio tras tinciones adecuadas, como la de Giemsa, o mediante Diff-Quik®.

En las parasitosis que afectan a órganos o tejidos profundos, pero carecen de una fase hemática sostenida, como la toxoplasmosis, la leishmaniasis, la hidatidosis, la triquinelosis o la *larva migrans* (toxocarosis), el diagnóstico puede efectuarse mediante biopsia seguida de estudio histológico para observación del parásito, pero habitualmente se realizan técnicas serológicas o de amplificación genética.

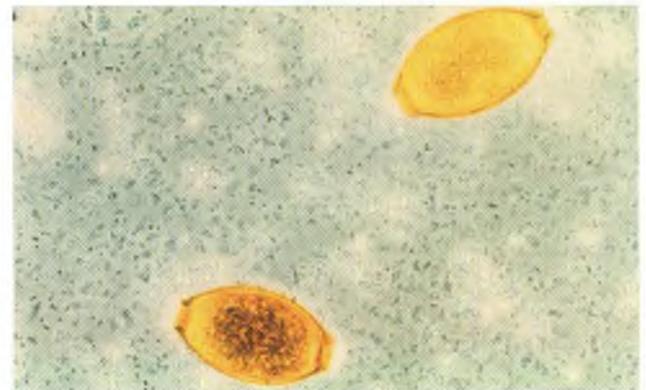


Figura 7.27. Huevos de *Trichuris trichiura*.

Examen microscópico de heces concentradas con la técnica de Kato. Se observan dos huevos de *T. trichiura* que se caracterizan por su forma de limón con un tapón refringente y saliente en cada polo ($\times 400$).



Figura 7.28. Huevos de oxiuros.

Examen microscópico de heces fijadas en MIF. En la imagen se observan huevos de oxiuros. En la oxiuriasis es raro encontrar estos huevos en las heces y es más fácil visualizarlos mediante la técnica de Graham. Se caracterizan por su pared gruesa y refringente y por presentar una cara plana (en grano de café), pudiéndose observar en su interior el embrión (Fig. 7.22) ($\times 400$).

Examen parasitológico de la sangre

Para efectuar un frotis sanguíneo o una gota gruesa, la sangre se obtiene por punción venosa.

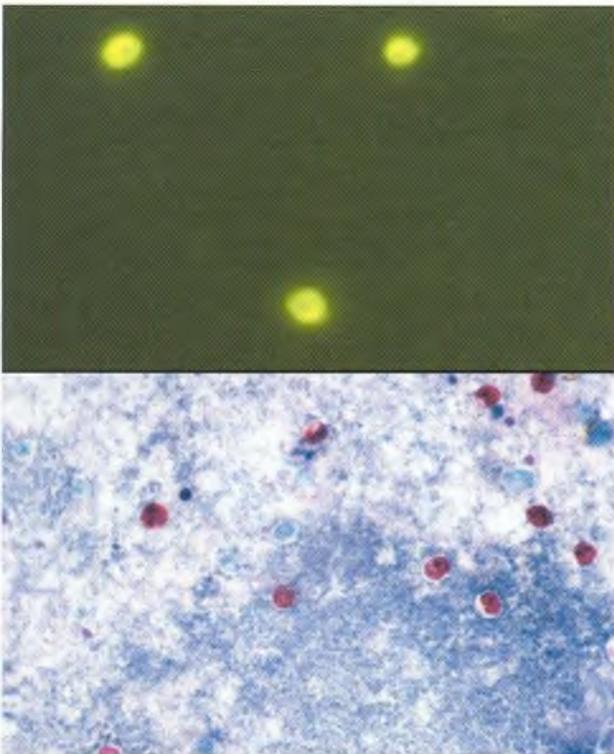


Figura 7.29. *Cryptosporidium*.

En la figura superior se observan ooquistes de *Cryptosporidium* en una extensión de heces fijadas con formol, previa concentración y teñidas con la auramina. En la figura inferior se observan ooquistes en una extensión de heces teñidas con la tinción de Ziehl-Neelsen modificada. Los quistes se tiñen de color rojo, mientras que las levaduras se tiñen de color azulado. En el diagnóstico de la criptosporidiasis intestinal pueden utilizarse ambas tinciones. Se puede hacer un screening de las muestras de heces mediante la tinción con auramina y después se reconfirma el diagnóstico realizando la tinción de Ziehl sobre las extensiones que hayan sido positivas.



Figura 7.30. Larva de *Strongyloides* e *Isospora belli*.

Examen microscópico de heces fijadas con MIF. Se puede observar dos parásitos distintos, un nematodo y un protozoo. El nematodo es la larva rabditiforme de *Strongyloides stercoralis* (Ss) y el protozoo es un ooquiste inmaduro de *Isospora belli* (Ib) que tiene un aspecto ovoide algo piriforme y un tamaño medio de $25 \times 15 \mu\text{m}$. En su interior se visualiza un esporoblasto que al madurar dará lugar a los esporozoitos.

Frotis sanguíneo

Una vez obtenida la sangre, la forma más sencilla de observarla es realizar un frotis o extensión sobre un portaobjetos de forma semejante a las preparaciones para estudio hematológico y teñirla mediante la tinción de Giemsa o Diff-Quik® (Fig. 7.31). Su observación al microscopio permite la visualización de las formas parasitarias en los casos en que la infestación sea elevada o moderada (Fig. 7.32). En aquellos casos en que haya pocos parásitos en la sangre, debe recurrirse a la gota gruesa. Como normalmente se desconoce el grado de infestación, se aconseja realizar ambas técnicas, frotis y gota gruesa, simultáneamente.

Método de la gota gruesa

Consiste en la obtención de preparaciones de sangre más gruesas que las obtenidas en una extensión ordinaria, lo que se logra depositando en un portaobjetos una o dos gotas de sangre que se desfibrinan para que no coagulen, mediante rotación continuada con el canto de otro portaobjetos limpio. Posteriormente, se procede a hemolizar los hematíes mediante agua destilada y después se tiñe la preparación (Fig. 7.33). Ello permite examinar mayor cantidad de sangre en un período de tiempo más reducido, lo que presenta dos ventajas: 1) facilita el hallazgo de parásitos en aquellos casos en que su número es muy reducido y 2) simplifica el examen de gran número de muestras de sangre en el curso de campañas sanitarias (paludismo, filariasis, etcétera). Sin embargo, posee el inconveniente de una mayor dificultad en la observación de las formas parasitarias, funda-

mentalmente en las intraeritrocitarias palúdicas, cuya identificación a nivel de especie es algunas veces imposible mediante el empleo de esta técnica. Los estromas de los hematíes hemolizados presentes en la preparación inducen muchas veces a confusión al observador no familiarizado con la técnica (Figs. 7.34 y 7.35).

La morfología de los plasmodios en las extensiones sanguíneas se muestra en la figura 7.36.

En el caso de sospecha de filariasis con ciclo hemático, además del frotis y gota gruesa, es conveniente observar con el microscopio a 100 aumentos una gota de sangre en fresco, ya que permite localizar las filarias por su movimiento o realizar técnicas específicas de concentración. Para concentrar, se precisa sangre extraída con anticoagulante (EDTA), se mezcla en un tubo 1 ml de sangre con 9 ml de formol al 2% o saponina, que hemoliza los hematíes. Se centrifuga suavemente y se observa el sedimento para visualizar las microfilarias (Figs. 7.37, 7.38 y 7.39).

Examen parasitológico de la orina

Las infecciones del plexo venoso vesical por las formas adultas de *Schistosoma haematobium* no constituyen una parasitosis urinaria; sin embargo, los huevos puestos por las hembras en las vénulas del plexo vesical se abren camino a través de los tejidos, llegan a los uréteres o vejiga urinaria y son eliminados con la orina. Por tanto, la esquistosomiasis vesical se diagnostica observando en el sedimento de la orina recogida durante 24 horas los huevos de este trematodo, que poseen morfología característica. Los huevos de *S. mansoni* y *S. japonicum* se eliminan con las heces y se investigan en ellas mediante técnicas de concentración (Figs. 7.19, 7.22 y 7.23).

Biopsia

La biopsia o aspirado de médula ósea es muy empleado en el diagnóstico de la leishmaniasis visceral y la biopsia cutánea (*punch* o raspado del borde de la lesión) en el de la leishmaniasis cutánea. En ambos casos las muestras deben teñirse por el método de Giemsa o Diff-Quik®.

La biopsia exangüe —pequeña biopsia cutánea superficial— se emplea para realizar el diagnóstico de la oncocercosis. Las microfilarias de *O. volvulus* se encuentran en la dermis y, para no confundirlas con otras microfilarias que se encuentran en la sangre, debe evitarse el sangrado en la toma de muestra. Para ello se aconseja tomar, con unas pinzas, una pequeña parte de la superficie cutánea y cortar con bisturí o tijera el fragmento pinzado (dermis y epidermis). Se coloca el fragmento (de 3-4 mm) en una placa de Petri o un vidrio de reloj que contenga una pequeña cantidad de suero fisiológico, se lleva el recipiente a 37° C y se espera de 15 a 30 minutos. En este

tiempo, las microfilarias surgen del fragmento cutáneo y se concentran en el suero fisiológico, que se observa en fresco al microscopio con pocos aumentos (x100, x400). Para conseguir una buena rentabilidad, se aconseja realizar varias biopsias, preferentemente de la región deltoidea o subespinal.

TÉCNICAS DE CULTIVO

En la práctica diaria, y en el contexto del diagnóstico clínico, el cultivo sólo se emplea para el aislamiento de las tricomonas a partir de exudado vaginal o uretral en el medio de Roiron o el de Diamond⁹. Dada la limi-

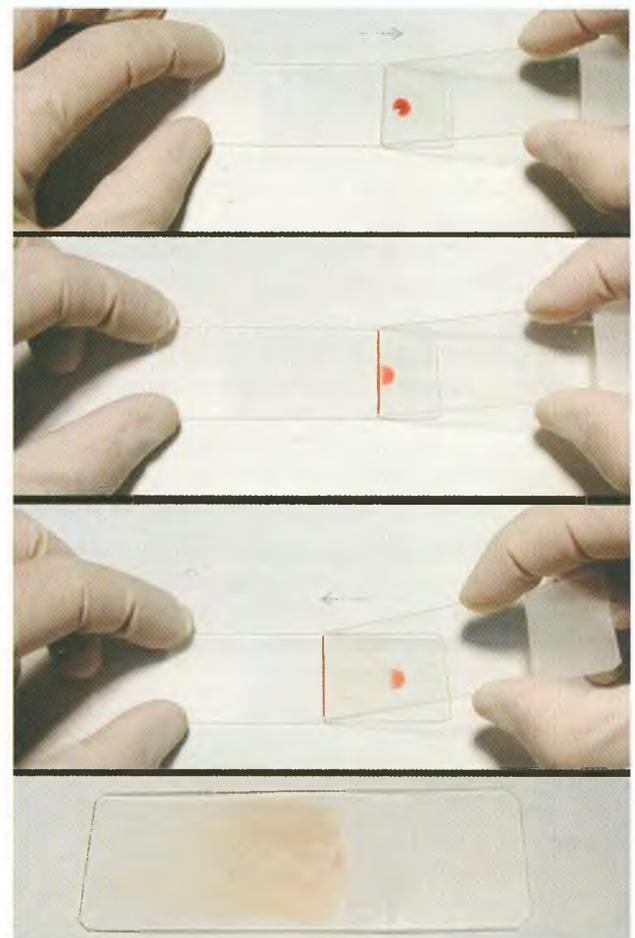


Figura 7.31. Preparación de una extensión sanguínea.

En las imágenes se observa la colocación e inclinación de los portas así como la dirección en que deben moverse para realizar una extensión fina de sangre periférica. Es preferible que las extensiones sean preparadas directamente a partir de sangre capilar o venosa ya que todos los anticoagulantes tienen algún efecto adverso sobre la morfología de los plasmodios. La intensidad de este efecto adverso depende del tiempo transcurrido desde la extracción, así como del estadio del parásito y del tipo de anticoagulante empleado. Si fuese necesario usar anticoagulante, EDTA es el más inocuo de todos. Es aconsejable esperar unas tres horas antes de teñir la extensión con el fin de que esté bien seca.

⁹ Reactivos para Diagnóstico SL.

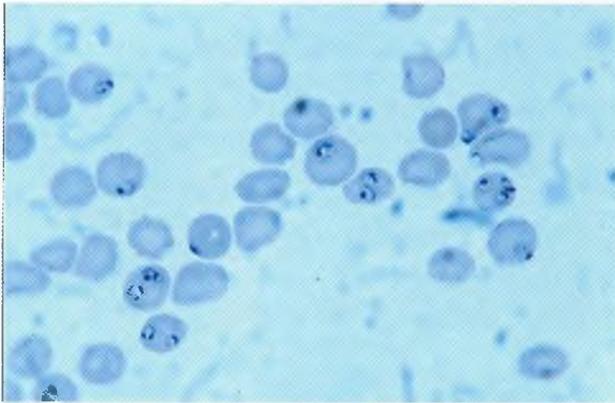


Figura 7.32. *Plasmodium* en extensión sanguínea.

Extensión fina de sangre periférica de un paciente con paludismo por *P. falciparum* con un índice de parasitación muy elevado (Diff-Quick; $\times 100$).

tada viabilidad de las tricomonas tomadas con escobillón, es muy útil sembrar directamente en estos medios una muestra acabada de recoger con asa o con escobillón. No crea ninguna dificultad y permite la recuperación de tricomonas y candidas.

El cultivo también se utiliza para el aislamiento de las leishmanias en el Kala-azar a partir de la médula ósea, y en el botón de oriente a partir de la lesión cutánea, empleándose el medio de Novy-McNeal-Nicolle (NNN), y para el aislamiento de toxoplasma a partir de tejidos o líquidos orgánicos parasitados mediante su inoculación a cultivos celulares (fibroblastos humanos, línea MRC5) o al ratón.

El cultivo es un método adecuado para el diagnóstico de las infecciones por amebas de vida libre, a partir de muestras del sistema nervioso central (meningitis), muestras oculares e incluso lentes de contacto y su líquido de conservación (queratitis).



Figura 7.33. Preparación de una gota gruesa.

Para realizar la gota gruesa, se depositan de una a dos gotas de sangre en un porta y usando la esquina de otro porta, se extiende la sangre uniformemente con un movimiento circular en un área de unos 2 cm de diámetro. Esta rotación que tiene como objeto desfibriar la sangre debe mantenerse durante varios minutos hasta que se forma un acúmulo de fibrina que se extrae al retirar el porta. El grosor final de la gota apenas debe permitir leer a su través, letra impresa. Es aconsejable dejarla secar 24 horas a temperatura ambiente antes de proceder a la hemólisis y tinción.

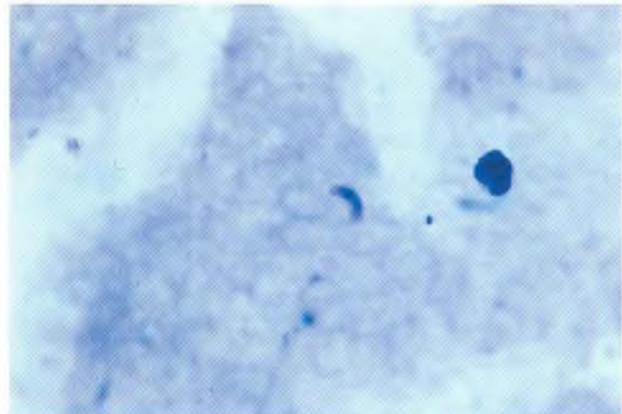


Figura 7.34. *Plasmodium* en gota gruesa.

Tinción de Diff-Quick de una gota gruesa de sangre periférica. Se observa un gametocito de *P. falciparum* ($\times 1000$).

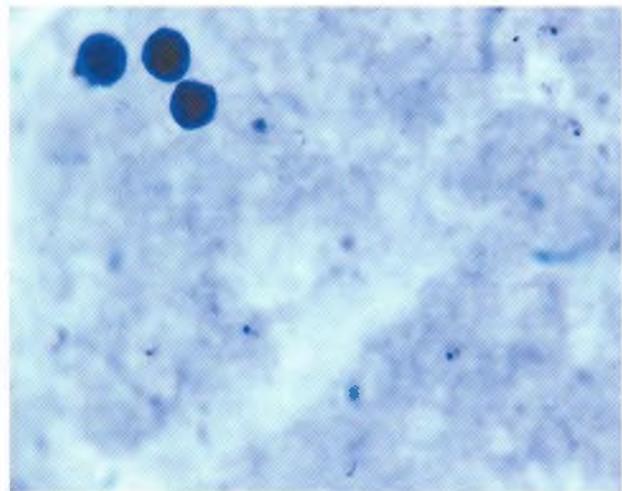


Figura 7.35. *Plasmodium* en gota gruesa.

Tinción de Diff-Quick de una gota gruesa de sangre periférica. Se observan varios trofozoitos en anillo de *P. falciparum* ($\times 1000$).

Así como el cultivo de tricomonas es muy utilizado en todos los laboratorios por ser muy sencillo y útil, y porque los medios se hallan comercializados en tubos preparados para el uso, el resto de las técnicas de cultivo queda restringido a laboratorios con un cierto nivel de especialización.

OTRAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Las pruebas de detección de antígeno son poco utilizadas en parasitología, pero la comercialización de kits diagnósticos, basados en técnicas de inmunofluorescencia, enzimoimmunoanálisis e inmunocromatografía, ha permitido su introducción progresiva en los laboratorios. Así, en los últimos años, han aparecido pruebas de detección de antígeno en la sangre para el diagnóstico de infecciones por plasmodios

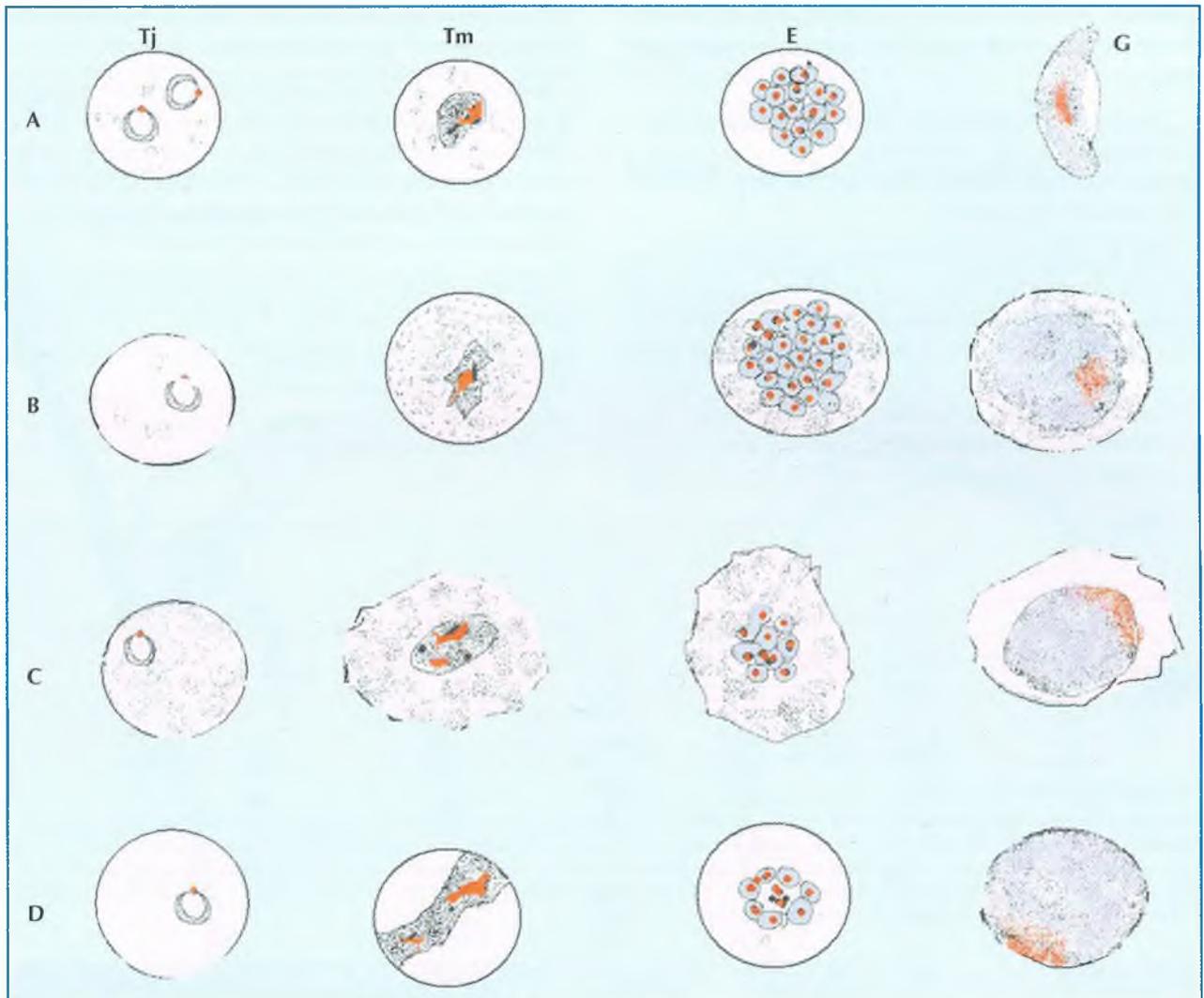


Figura 7.36. Características morfológicas de las especies de *Plasmodium*.

Se representan las diversas fases de las cuatro especies de *Plasmodium* causantes de paludismo al hombre: trofozoitos jóvenes (Tj) y maduros (Tm), esquizontes (E) y gametocitos (G).

A. *P. falciparum*. Los trofozoitos jóvenes aparecen como anillos pequeños en los que se observa una mancha de cromatina (núcleo), aunque con mucha más frecuencia que en las otras especies pueden verse dos y hasta tres anillos por hematíe. Los gametocitos presentan una forma semi-lunar característica con los extremos romos. En los hematíes de la sangre periférica sólo se observan los trofozoitos y los gametocitos. Parasitan hematíes jóvenes y viejos que no se deforman ni hipertrofian y que con frecuencia contienen escasos gránulos pigmentarios gruesos (gránulos de Maurer).

B. *P. vivax*. Los trofozoitos jóvenes forman anillos de pequeño tamaño, difíciles de distinguir entre las otras especies; los maduros son típicamente ameboides, muy irregulares, que conservan la vacuola y contienen el pigmento hemozoínico en forma de pequeños gránulos pardo-amarillentos (granulaciones de Schüffner). Los esquizontes maduros están formados por una masa moruloide irregular constituida por numerosos merozoitos (12-24) con el pigmento hemozoínico agrupado en una zona periférica. Los gametocitos redondeados u ovalados casi ocupan todo el hematíe y contiene un núcleo de gran tamaño. Suele parasitar hematíes jóvenes que se hipertrofian y deforman durante el desarrollo del parásito y cuyo citoplasma presenta las granulaciones de Schüffner.

C. *P. ovale*. Los trofozoitos jóvenes forman anillos pequeños y los maduros anillos compactos de forma oval y con gránulos de pigmento hemozoínico oscuros difíciles de distinguir de los de *P. vivax*. Los esquizontes maduros poseen 8-12 merozoitos agrupados en roseta o en una masa más o menos regular y con el pigmento central o subcentral. Los gametocitos son ovales o subovales. Con más frecuencia parasita hematíes jóvenes que adquieren una forma oval con bordes deflecados y con abundantes granulaciones de Schüffner.

D. *P. malariae*. Los trofozoitos jóvenes son anillos grandes y robustos con un gran gránulo cromatínico y los maduros con citoplasma compacto, tienen con frecuencia el aspecto de bandas transversales en el hematíe parasitado. Los esquizontes maduros son pequeños y poseen un escaso número de merozoitos (8-9) que se disponen en roseta con gránulos de hemozoína pardo-oscuros centrales. Los hematíes parasitados mantienen su tamaño y aspecto.

y filarias; en la orina para el diagnóstico de la leishmaniasis y en las heces para el de criptosporidium, giardia y amebas.

En el caso del paludismo, la inmunocromatografía es una técnica sensible y específica. Esta prueba no exige de practicar extensiones y gota gruesa para identificar con precisión la especie.

En la amebiasis la detección de antígeno por técnica de ELISA tiene una utilidad evidente, ya que, además de la detección del parásito, permite diferenciar entre dos especies morfológicamente indistin-

guibles, *E. histolytica*, ameba patógena humana de *E. dispar*, ameba comensal del tubo digestivo.

Las técnicas de biología molecular que permiten detectar y amplificar secuencias específicas de ácidos nucleicos aplicadas al diagnóstico de las enfermedades parasitarias están aún en fase experimental. Tan sólo existen kits comercializados para el diagnóstico de la toxoplasmosis y el paludismo.

La sencillez y eficacia de las técnicas convencionales de examen directo en el diagnóstico parasitológico, así como su bajo coste, hacen que, a excepción de

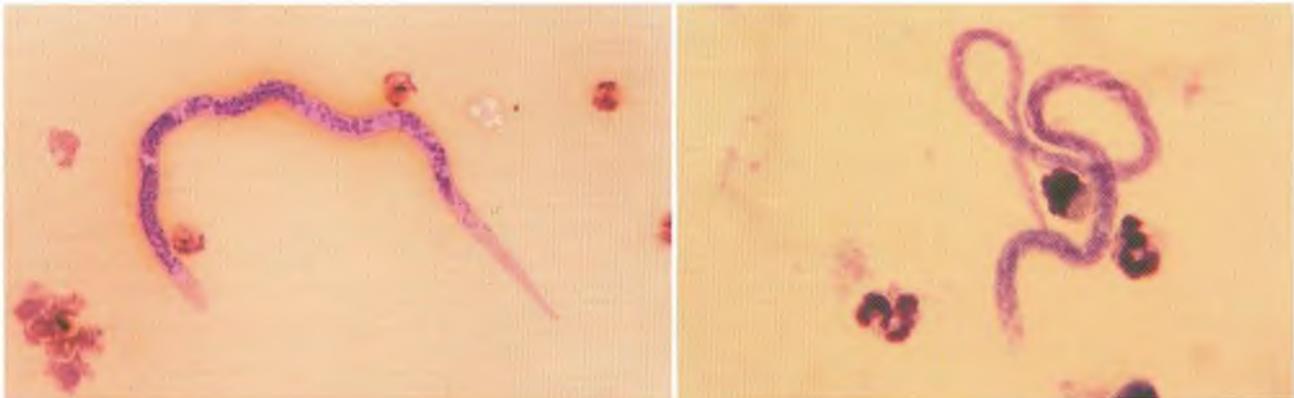


Figura 7.37. Microfilarias.

La figura de la izquierda corresponde a una tinción de Hematoxilina de Mayer de una gota gruesa de sangre periférica donde se observa una microfilaria que por sus características morfológicas corresponde a una *Loa loa*. Presenta una vaina envolvente muy bien visible en los extremos y los núcleos somáticos llegan hasta su extremo caudal. La figura de la derecha es una tinción de Giemsa de una gota gruesa de sangre periférica donde se observa *Mansonella perstans*, una microfilaria sin vaina envolvente, no patógena para el hombre pero que se diagnostica con mucha frecuencia y muchas veces asociada a otra microfilaria (x400).

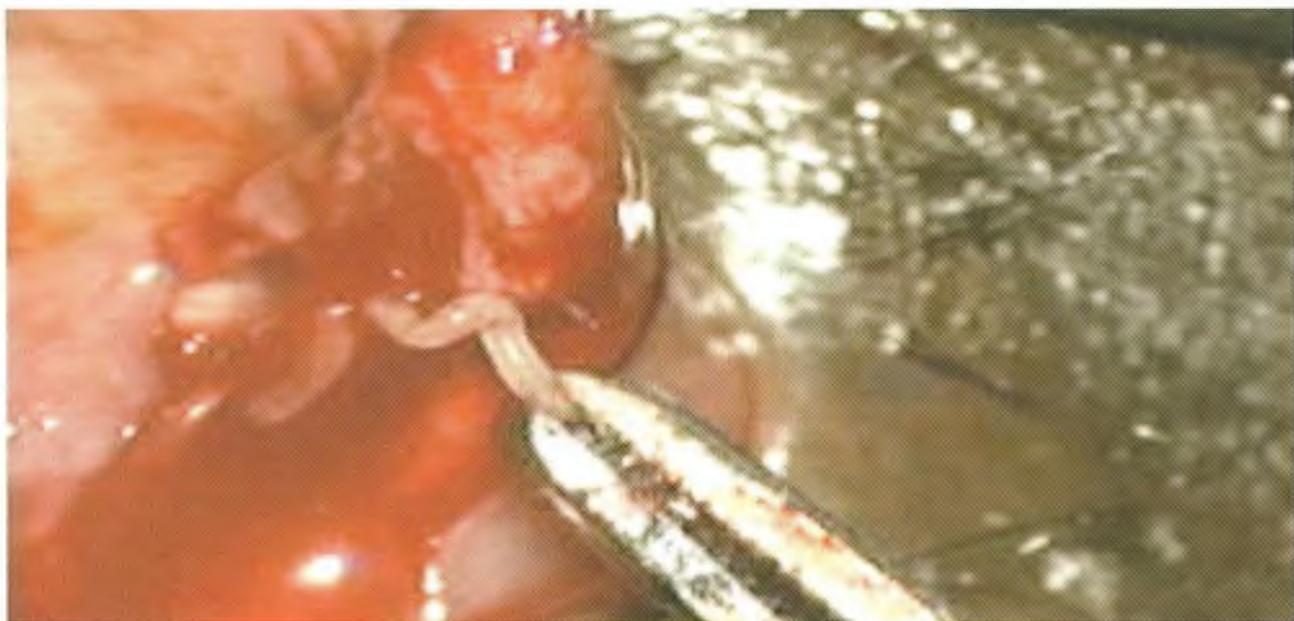


Figura 7.38. Extracción subconjuntival de *Loa loa*.

La filaria adulta *Loa loa* (3-4 cm) fue extraída de un paciente que presentaba una migración subconjuntival por este nematodo. La filaria en movimiento o quieta, produce sensación de cuerpo extraño con hiperemia, fotofobia y lagrimeo.

las infecciones comentadas, tanto las pruebas de detección de antígeno como las de amplificación estén menos introducidas que en otras áreas de la microbiología.

Técnicas serológicas

La serología es la base del diagnóstico de las parasitosis sistémicas sin fase hemática persistente, como la toxoplasmosis, la leishmaniasis y la tripanosomiasis americana entre las protozoosis y la hidatidosis, la cisticercosis, la triquinosis y la *larva migrans* entre las helmintosis. Sin embargo, también se aplica al diagnóstico de algunas hemoparasitosis, como el paludismo y la esquistosomiasis, y al de parasitosis de cavidades abiertas, que pueden causar invasión tisular local, como la amebiasis, en la que la serología es muy útil.

Los fundamentos y las técnicas utilizadas para el diagnóstico serológico de estos parásitos se describen en el capítulo 8.

ARTRÓPODOS DE INTERÉS MÉDICO

Los artrópodos poseen interés en medicina por producir exoparasitosis, como las picaduras de los insectos, que desencadenan una reacción alérgica, produciendo lesiones locales importantes con repercusión sistémica, las miasis producidas por larvas de mosca o la sarna causada por sarcopites. Sin embargo, los artrópodos poseen interés, sobre todo, por ser hospedadores y vectores de microorganismos causantes de infecciones al hombre. Pueden ser vectores pasivos o

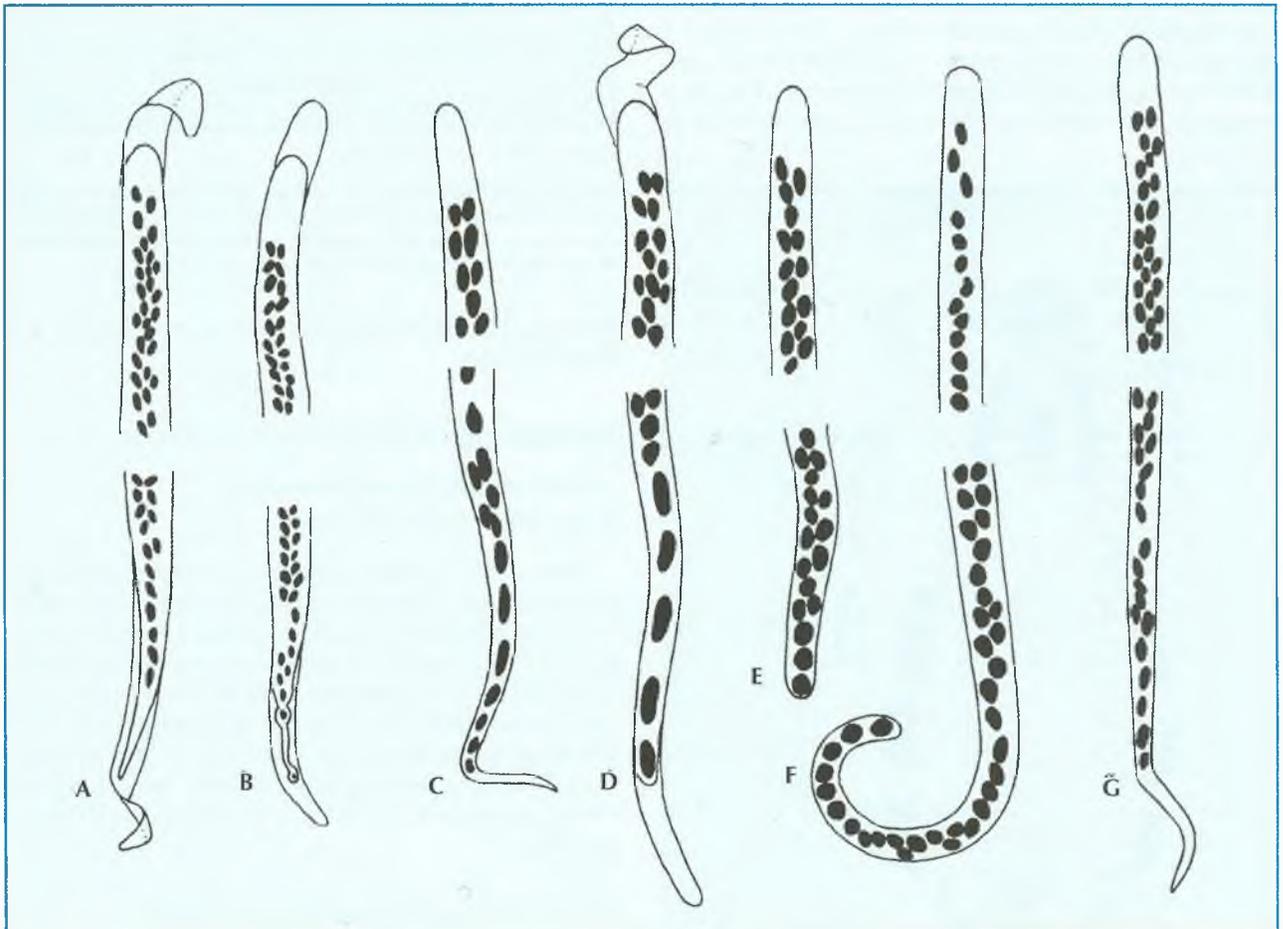


Figura 7.39. Identificación de las microfilarias.

Para la identificación de las microfilarias es importante tener en cuenta la presencia o ausencia de vaina envolvente y el aspecto y disposición de las últimas células o núcleos somáticos en su extremo cefálico y caudal. Las microfilarias con vaina son: **A.** *Wuchereria bancrofti*, **B.** *Brugia malayi* y **C.** *Loa loa*. Las microfilarias sin vaina son: **D.** *Onchocerca volvulus*, **E.** *Mansonella perstans*, **F.** *Mansonella streptocerca* y **G.** *Mansonella ozzardi*.

W. bancrofti tiene los últimos núcleos somáticos en una fila simple que no alcanza el extremo caudal. *B. malayi* tiene los tres últimos núcleos separados y el último, muy pequeño, aislado en el extremo caudal. Ambas microfilarias son de periodicidad nocturna. *L. loa* tiene los núcleos que llegan hasta el extremo caudal y es de periodicidad diurna. *O. volvulus* no tiene ciclo parasítico, sino que circula por la dermis y se distingue por su extremo caudal algo incurvado, en el que los últimos núcleos no llegan a su extremo. *M. perstans*, *M. ozzardi* y *M. streptocerca* tienen un interés más reducido por no ser patógenas para el hombre.

mecánicos, cuando el artrópodo es un transportador simple en el que el agente infeccioso no evoluciona ni se multiplica, o un vector activo, cuando el artrópodo es un hospedador en el que desarrolla una etapa imprescindible del ciclo vital del parásito.

Los artrópodos de interés médico son los insectos y los arácnidos. Los insectos, que incluyen a los mosquitos, moscas, piojos, pulgas y chinches, tienen el cuerpo dividido en tres regiones: cabeza, tórax y abdomen, poseen antenas, tres pares de patas en el estado adulto y dos pares de alas en la mayoría de los órdenes (Fig. 7.40). En los arácnidos, entre los que se incluyen los ácaros (garrapatas, ácaros de la sarna y otros) se distingue una región anterior o gnatosoma donde se hallan las piezas bucales, y el idiosoma, que constituye el verdadero cuerpo de forma globulosa y con cuatro pares de patas en las formas adultas (Fig. 7.41). Las garrapatas en su forma adulta son visibles macroscópicamente y se clasifican en dos grandes grupos, los ixódidos o garrapatas duras que tienen un escudo dorsal y los argásidos o garrapatas blandas carentes de escudo. Los otros ácaros de importancia médica como el agente causal de

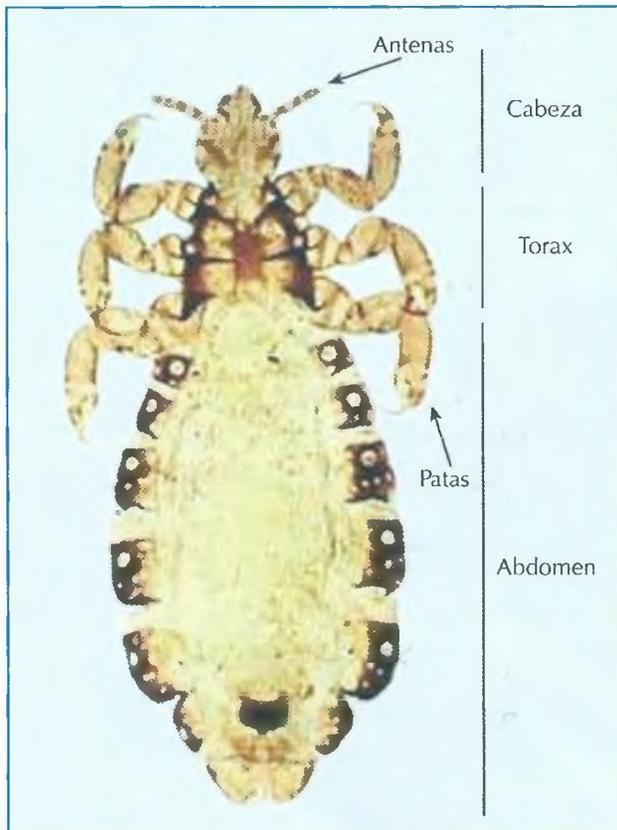


Figura 7.40. Esquema de un insecto.

Los insectos son artrópodos antenados con el cuerpo dividido en tres regiones: cabeza en la que se hallan las antenas, ojos y piezas bucales, torax, con tres segmentos torácicos y tres pares de patas, y abdomen, primitivamente con 11 segmentos que se hallan reducidos en la mayoría de las especies.

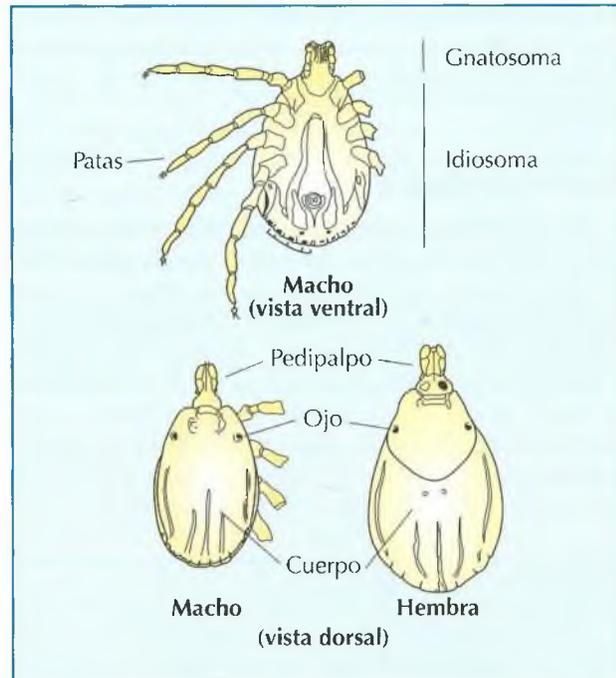


Figura 7.41. Esquema de un ácaro.

Los ácaros son artrópodos quelicerados, en los que se distingue únicamente dos regiones, un gnatosoma, o región donde se hallan las piezas bucales y el idiosoma o verdadero cuerpo, habitualmente globuloso y con cuatro pares de patas en las formas adultas.

la sarna (*Sarcoptes scabiei*) o los ácaros del polvo son microscópicos.

MEDIOS DE CULTIVO. DESCRIPCIÓN

Medio modificado de Diamond

(para el cultivo de tricomonas)

Este medio se halla comercializado, preparado para su empleo. Se formula con 20 g de triptona y 10 g de extracto de levadura, 5 g de maltosa, 1 g de cisteína y 0,2 g de ácido ascórbico en un volumen de un litro de agua destilada. Se esteriliza a 115° C durante 20 minutos y se ajusta el pH a 7,4. Posteriormente, se añade 100 ml de suero de caballo. Para evitar el sobrecrecimiento de la flora comensal, se adiciona: estreptomycin 0,04 g, penicilina G 1.000.000 U y anfotericina B 0,003 g por litro.

Medio de Novy-McNeal-Nicolle (NNN)

(para el cultivo de leishmanias)

Para su realización se prepara un litro de solución salina fisiológica y se disuelven 10 gramos de agar-agar. Tras repartir en tubos, se esteriliza por el calor. Cuando se alcance la temperatura adecuada (~ 50° C), se añadirá sangre de conejo al 15%. A continuación se solidifica de forma inclinada. Al enfriar se produce una pequeña cantidad de líquido de condensación, por lo que en

realidad constituye un medio bifásico. Los promastigotes crecen en el líquido de condensación.

Añadir a la superficie del medio, antes de su inoculación, unas gotas de suero bovino fetal y de 0,5 a 1 ml de una solución de antibióticos que contiene 20.000 UI/ml de penicilina y 20 mg/ml de estreptomicina.

Existe un medio comercial líquido (Schneider's *Drosophila* Medium. SDM. Gibco). En el momento de la siembra, para cada muestra ha de prepararse un tubo con 2,5 ml del medio SDM y 0,7 ml del suero bovino fetal. El medio debe conservarse en nevera, y el suero fraccionado, en el congelador.

LA RESPUESTA INMUNITARIA

La respuesta inmunitaria constituye un mecanismo de defensa antiinfecciosa de los vertebrados que se desencadena frente a las proteínas o polisacáridos microbianos, que son reconocidos como extraños (antígenos). Tiene dos ramas efectoras: 1. la humoral, que da lugar a la producción de anticuerpos y 2. la celular, que consiste en la activación de diversas células con funciones defensivas, como los macrófagos y las células citocidas (véase el capítulo 21).

Cuando se inyecta experimentalmente a un animal vertebrado una proteína o un polisacárido, los linfocitos B reconocen a través de sus receptores de superficie ese antígeno y maduran a células plasmáticas, las cuales producen y liberan los anticuerpos que se unen específicamente al antígeno que ha inducido su producción y sólo a él. En efecto, los anticuerpos reconocen específicamente una pequeña zona de la macromolécula antigénica llamada epítipo o determinante antigénico (Fig. 8.1).

Tanto en los animales como en el hombre, la mayoría de los anticuerpos producidos por las células plasmáticas, fundamentalmente en el bazo y en los ganglios linfáticos, pasan a la sangre constituyendo la fracción y de las globulinas del plasma o inmunoglobulinas (Ig).

Las inmunoglobulinas están formadas por dos cadenas pesadas y dos ligeras, que conforman una estructura de tres ramas, semejante a una Y; las dos ramas que se unen al antígeno (Fab) son iguales entre sí y la tercera (Fc) es diferente. Esta última posee diversas propiedades biológicas, como activar el complemento o unirse a las células fagocitarias (Fig. 8.1).

Los anticuerpos o inmunoglobulinas en función de las diferencias del fragmento Fc pueden dividirse en cinco clases: IgM, IgA, IgG, IgE e IgD, siendo las más importantes la IgM, IgA e IgG (Fig. 8.1). Las dos primeras se producen en la fase inicial del estímulo antigénico, pero al persistir éste, las inmunoglobulinas que se van produciendo cambian de la clase M a la G.

El antígeno y su anticuerpo son dos estructuras complementarias y especulares, como una llave y su cerradura; es decir, si se dispone de un antígeno determina-

do, se puede detectar la presencia de sus anticuerpos en el suero, y, si se dispone de un anticuerpo, se puede detectar su antígeno en una muestra clínica. Estas dos afirmaciones constituyen la base de las pruebas inmunológicas para la detección de los antígenos microbianos y de los anticuerpos. Estas últimas también se denominan pruebas serológicas, puesto que se realizan con muestras de suero.

Las reacciones inmunológicas pueden realizarse en tubos de ensayo convencionales, de vidrio o plástico, de 12×100 mm o en pequeños pocillos (micropocillos) de 8 mm de diámetro por 12 mm de profundidad de placas de plástico, coloquialmente denominadas placas de «microtiter».

Es muy importante señalar la enorme cantidad de técnicas inmunológicas con sus numerosísimas variantes que se han descrito para realizar las pruebas de detección de antígeno y las pruebas serológicas. Algunas variantes técnicas surgen para mejorar las anteriores y otras para eludir métodos o reactivos patentados. Resulta imposible describir, aun brevemente, todas ellas, por lo que sólo se hará referencia a algunas de las más utilizadas.

DETECCIÓN DE ANTÍGENOS MICROBIANOS

La detección del microorganismo causante de una infección puede hacerse por examen microscópico y por cultivo, pero también detectando antígenos específicos del microorganismo mediante pruebas inmunológicas.

Algunas técnicas para la detección de antígeno se han mostrado muy útiles para el diagnóstico, bien como técnicas rápidas, que después son confirmadas por otras, o incluso como técnicas de referencia por su elevada eficacia. Muchas de estas técnicas son indiscutiblemente más rápidas, sencillas, económicas e incluso más sensibles que el cultivo de algunos microorganismos, como las clamidias o los virus y algunas están automatizadas. Este tipo de técnicas, junto con las de amplificación de ácidos nucleicos constituyen los métodos que vertebran en la actualidad los laboratorios de virología.

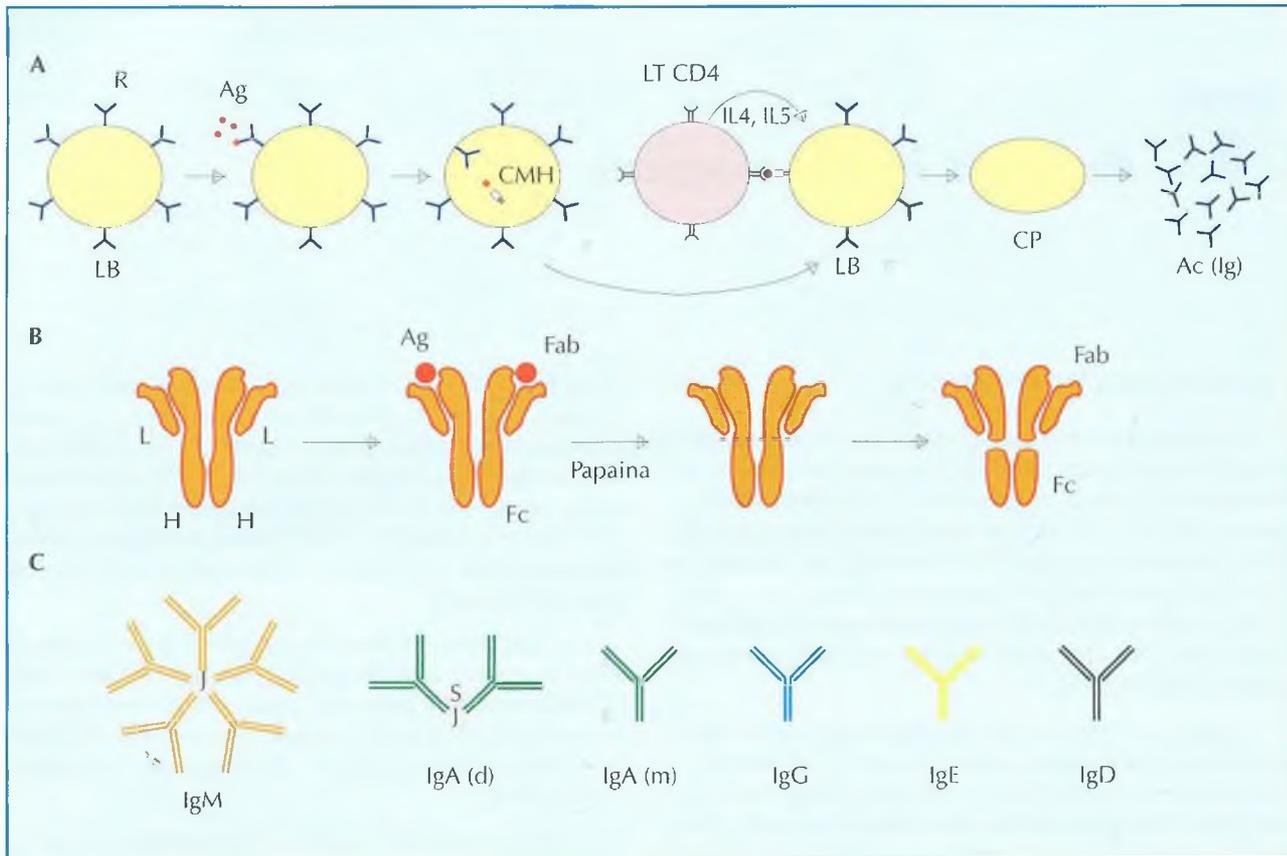


Figura 8.1. Producción y características de los anticuerpos.

A. Los linfocitos B (LB) poseen anclados a su membrana receptores, idénticos a inmunoglobulinas, que reconocen a los antígenos. Cada linfocito tiene receptores (R) para un antígeno diferente. Cuando un linfocito B a través de sus receptores se une a su antígeno específico (Ag.) lo internaliza, lo procesa y lo presenta en su superficie en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH). El antígeno presentado es reconocido por receptores específicos de los linfocitos T CD4 que liberan un conjunto de linfocinas (IL4, IL5) que hacen madurar al linfocito B a célula plasmática (CP), la cual produce gran cantidad de anticuerpos (Ac) dirigidos contra el antígeno original.

B. Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) se asemejan a una Y. Están formados por dos cadenas pesadas idénticas entre sí (H) y dos ligeras también idénticas (L). En los extremos de las dos ramas superiores se halla una región denominada Fab que es la que reconoce y reacciona con el antígeno; la tercera rama forma una región que se denomina Fc. El fragmento Fc puede separarse del resto de la molécula cuando se trata con papaína.

C. En la zona Fc existen diferencias que permiten dividir las inmunoglobulinas en varias clases: IgM, IgA, IgG, Ig E, Ig D. Las IgM están formadas por cinco monómeros, las IgA por dos (d) o uno (m), según se halle en las mucosas o en el suero y las IgG, IgE, e IgD por uno. Las IgM e IgA poseen una estructura adicional, el polipéptido J, que participa en su polimerización y las IgA secretadas una pieza secretora, S.

Una característica de las pruebas de detección de antígeno es que, salvo excepciones, se investiga un único microorganismo en cada prueba; como son caras y algunas laboriosas, debe establecerse una cuidadosa evaluación clínica del paciente para solicitar la prueba dirigida a la detección del microorganismo que con mayor probabilidad está produciendo la infección en ese paciente. No es posible, por razones técnicas y económicas, realizar una batería indiscriminada de pruebas sin una selección y jerarquización de las mismas.

Este tipo de técnicas tienen en común que todas requieren un anticuerpo (antisuero) para detectar un antígeno específico del microorganismo buscado, pero la reacción se efectúa según procedimientos muy diferentes de aglu-

tinación, inmunofluorescencia, enzimoanálisis o inmunocromatografía, algunos de los cuales son fácilmente automatizables, y otros, por el contrario, son manuales.

Obtención de antisueros

La mayoría de los antisueros para la detección de antígenos se hallan comercializados, generalmente formando parte de un kit listo para el empleo.

Los antisueros obtenidos de animales inmunizados con un antígeno son policlonales, ya que se trata de una mezcla de anticuerpos de clases diferentes (IgM, IgG, etcétera) al estar producidos por diferentes células plasmáticas del animal¹.

¹ Células que producen anticuerpos dirigidos al mismo determinante antigénico, pero cada una de diferente clase (IgG, IgM, IgA, etcétera).

Los anticuerpos también pueden producirse *in vitro* mediante hibridomas. Las células plasmáticas normales que producen los anticuerpos no se pueden cultivar *in vitro*. Sin embargo, si una célula plasmática normal, que produce un anticuerpo de una determinada clase (por ejemplo, IgM) dirigido contra un determinado antígeno, se fusiona con una célula plasmática tumoral no productora de anticuerpos, la célula recombinante posee las características de la célula tumoral, por lo que se puede cultivar indefinidamente *in vitro* y, además, produce el anticuerpo de la célula plasmática normal, por lo que puede obtenerse gran cantidad de anticuerpos en el medio de cultivo. Las células resultantes de la fusión constituyen los hibridomas, porque son híbridos de las dos células originales. Los anticuerpos que producen se denominan monoclonales porque pertenecen a la misma clase de Ig y están dirigidos contra el mismo determinante antigénico.

Los anticuerpos así producidos, lógicamente, siempre son iguales y poseen una gran especificidad. En ocasiones comportan alguna limitación, como puede ser una baja afinidad por el antígeno o la dificultad para establecer puentes entre antígenos particulados, por lo que no suelen utilizarse en reacciones de aglutinación o precipitación.

Todos los anticuerpos pueden fijarse a través de su fragmento Fc al fondo de un pocillo de plástico o a la superficie de una tira de nitrocelulosa o a la superficie de una membrana o de partículas inertes, como látex, gelatina, oro coloidal y otras.

Marcado de las inmunoglobulinas

Al fragmento Fc de una inmunoglobulina pueden unirse químicamente diversas sustancias, como enzimas, moléculas fluorescentes, lumínicas o radioactivas, lo que permite marcar los anticuerpos (Fig. 8.2).

Las enzimas unidas a los anticuerpos, al actuar sobre un sustrato, lo transforman en un producto de diferente color; entre las más utilizadas, se encuentran la β -galactosidasa, la fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rábano, aunque existen otras. El sustrato más utilizado para la β -galactosidasa es el o-nitrofenil-galactopiranosido, que vira de incoloro a amarillo; para la fosfatasa es el p-nitrofenil fosfato, que pasa a color amarillo, y para la peroxidasa es el agua oxigenada, siendo el oxígeno producido por acción de la enzima el que actúa oxidando un segundo sustrato, que cambia de color, como la o-fenilendiamina (color amarillo), el ácido 5-aminosalicílico (color marrón) o la 3, 3', 5, 5' tetrametilbencidina (azul, que vira a amarillo al parar la reacción)².

Otra alternativa consiste en unir a los anticuerpos sustancias fluorescentes o lumínicas. Tanto los marcadores fluorescentes como los lumínicos emiten luz, que puede ser observada y cuantificada por un fluorímetro o

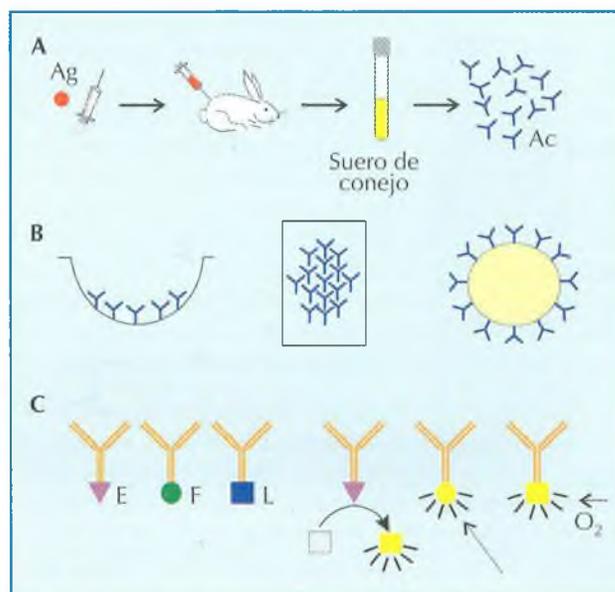


Figura 8.2. Las inmunoglobulinas como reactivos.

A. Al inocular un conejo, u otro animal de experimentación, con un antígeno (Ag), produce anticuerpos (Ac) que pueden purificarse y concentrarse a partir del suero.

B. Estos anticuerpos pueden fijarse por su región Fc al fondo de un pocillo de plástico, a la superficie de una tira de nitrocelulosa o recubrir con ellos partículas esféricas de látex de unas micras de tamaño.

C. La región Fc puede marcarse con enzimas (E), sustancias fluorescentes (F) o quimioluminiscentes (L). Las enzimas al actuar sobre un sustrato químico incoloro lo transforman en coloreado; las sustancias fluorescentes bajo la energía aportada por una radiación producen luz y las quimioluminiscentes por una reacción química, generalmente una oxidación, también producen luz. Estas Ig marcadas sirven para detectar tanto a los antígenos como a otros anticuerpos.

luminómetro. La diferencia estriba en que las sustancias fluorescentes producen luz cuando son excitadas por una radiación incidente (ultravioleta o luz del espectro visible), en tanto que las segundas emiten luz por acción de una reacción química, generalmente una oxidación (quimioluminiscencia).

Entre las sustancias fluorescentes con las que se marcan los anticuerpos están el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, la umbeliferona y los lantánidos. Es interesante señalar que en algunas sustancias fluorescentes, al ser esterificadas, queda inhibida su fluorescencia; así sucede, por ejemplo, con el fosfato de umbeliferona; en este caso, un anticuerpo marcado con una enzima como la fosfatasa hidroliza el éster y restaura la fluorescencia. Puede verse, por tanto, que una sustancia fluorescente puede utilizarse como marcador directo de un anticuerpo o ser sustrato de una enzima que marca el anticuerpo.

Son sustancias lumínicas el luminol, el isoluminol, los ésteres de acridina o el adamantil dioxietano y sus

² Las enzimas actúan continuamente sobre sus sustratos, de manera que, cuanto más tiempo transcurre hay más sustrato hidrolizado y más color. Para poder cuantificar y comparar las reacciones, la actividad de la enzima se para a un tiempo predeterminado, mediante sosa u otro reactivo. El reactivo para parar la reacción, al modificar el pH puede cambiar el color del catabolito formado.

derivados. Las tres primeras se utilizan para marcar directamente los anticuerpos; cuando se añade agua oxigenada con una peroxidasa, el O₂ naciente oxida estas sustancias y emiten luz. Otras, como el adamantil 1,2-dioxietano aril fosfato y derivados, hacen de sustrato a una enzima como la fosfatasa alcalina, que descompone el dioxietano para formar moléculas lumínicas. Cabe señalar que el luminol y sus derivados pueden ser sustratos lumínicos del O₂ del agua oxigenada, hidrolizada por enzimas como la peroxidasa de rábano, con la que se han marcado los anticuerpos. Estos marcadores lumínicos son hasta 10 veces más sensibles que los colorimétricos.

Recientemente, se ha introducido una técnica denominada inmuno-PCR consistente en marcar el anticuerpo mediante un fragmento de DNA que después podrá ser amplificado aportando una extraordinaria sensibilidad. El DNA puede unirse al Fc a través de un enlace químico, o bien el anticuerpo puede biotinilarse, añadiéndose posteriormente avidina y por último el DNA biotinilado, por lo que a cada anticuerpo se unen tres fragmentos de DNA. Los marcadores radiactivos han sido superados en sensibilidad por los que se acaban de señalar, que se han impuesto debido al menor riesgo en su utilización.

Técnicas de detección de antígeno

Esquemáticamente, puede decirse que si en una muestra clínica, como el líquido cefalorraquídeo, una secreción respiratoria u orina, está presente un determinado microbio, al añadir los anticuerpos marcados específicos contra él se fijarán al microbio y se producirá el efecto o la señal correspondiente, como aglutinación, cambio de color de un sustrato, fluorescencia o luz, dependiendo del marcador utilizado; si, por el contrario, el microbio buscado no está presente en la muestra, los anticuerpos no podrán unirse a él y no se producirá la señal. A continuación se describen las técnicas más utilizadas para la detección de antígenos microbianos.

Aglutinación indirecta o pasiva

Cuando a una suspensión celular homogénea de bacterias, hematíes, etc., (antígenos particulados) se añaden anticuerpos específicos, al tener éstos dos o más lugares reactivos (Fab), hacen de puente entre las partículas uniéndolas entre sí y aglutinándolas (formando grumos)³. Sin embargo, cuando los antígenos no forman parte de células sino que son proteínas o polisacáridos libres (antígenos solubles), los anticuerpos reaccionan con ellos, pero no puede visualizarse la aglutinación porque los grumos formados son muy diminutos.

Para superar esa dificultad, se recurre a las técnicas de aglutinación facilitada, consistentes en utilizar anticuerpos adheridos por su Fc a partículas grandes de látex (poliestireno de 1-5 µm) u otras partículas inertes, que facilitan la observación de la aglutinación al formarse grumos de gran tamaño, como los formados con antígenos celulares (particulados). Estas pruebas de aglutinación en las que los anticuerpos se hallan unidos a grandes partículas se denominan de aglutinación indirecta o facilitada. Permiten la detección de antígenos solubles pero también pueden emplearse para la detección de antígenos particulados (bacterias, hongos y virus).

Con estas técnicas, en una muestra clínica puede detectarse un antígeno mediante una prueba sencilla de aglutinación en portaobjetos. Por ejemplo, en el líquido cefalorraquídeo puede detectarse un meningococo del grupo C utilizando anticuerpos antimeningococo C unidos a partículas de látex, observándose la reacción tanto si el polisacárido C se halla formando parte de la cápsula de un meningococo intacto como si el meningococo está lisado y el polisacárido se halla como una macromolécula libre⁴. En efecto, al mezclar en un portaobjetos una gota de LCR con una gota de partículas de látex cuya superficie está recubierta de anticuerpos antimeningococo, el antígeno, (polisacárido C) hará de puente aglutinando las partículas y formando grumos visibles macroscópicamente. Cuando el antígeno no está presente, la suspensión de látex permanece con su aspecto habitual, lechoso y homogéneo. Estas pruebas de aglutinación pueden realizarse en tan sólo unos minutos (Fig. 8.3).

Otro de los soportes utilizados para la aglutinación facilitada son células de *Staphylococcus aureus*, en cuya superficie se encuentra la proteína A, que fija avidamente las IgG por su Fc, actuando el estafilococo inactivado como una partícula inerte de látex, ya que tiene un tamaño semejante. El tiempo de caducidad de este reactivo es menor que el de látex, y las reacciones inespecíficas son más frecuentes (reacciones con inmunocomplejos de la muestra).

Las técnicas de aglutinación facilitada suelen ser menos sensibles que las de enzimoanálisis, por lo que, salvo excepciones, no son adecuadas para la detección de antígenos víricos, que acostumbra a estar en menor cantidad que los bacterianos.

Inmunofluorescencia

Las pruebas de inmunofluorescencia (IF) permiten la observación, mediante un microscopio de fluorescencia, de los microorganismos al haberse fijado a ellos anticuerpos específicos marcados con fluoresceína u otra sustancia fluorescente.

³ Las IgG tienen dos ramas reactivas (Fab), pero las IgM son pentámeros con 10 ramas reactivas (Figura 8.1).

⁴ En ocasiones en esas muestras clínicas los microorganismos pueden hallarse fragmentados o lisados por acción de los antibióticos u otras causas, por lo que no pueden cultivarse, aunque persisten los antígenos como fragmentos o macromoléculas microbianas. Algunos antígenos microbianos son eliminados con la orina desde focos de infección alejados, como el pulmón o el sistema nervioso central.

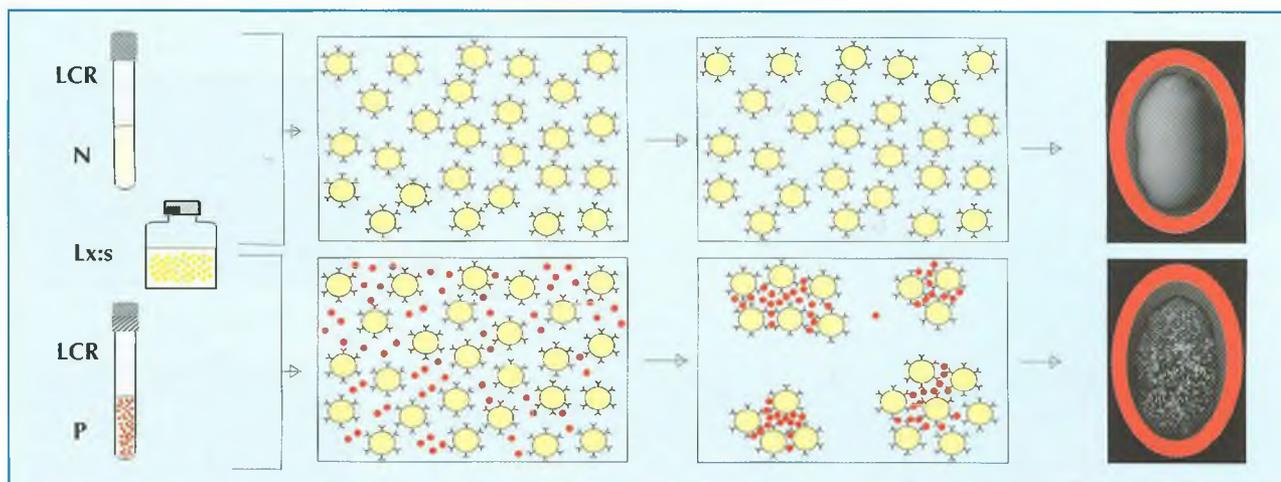


Figura 8.3. Detección de antígeno. Prueba de latex.

En el comercio pueden obtenerse suspensiones de partículas de látex recubiertas de anticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos microbianos (Lx:s; látex sensibilizado). Estas suspensiones tienen un aspecto lechoso homogéneo. Cuando se enfrenta una suspensión de látex con anticuerpos a una muestra clínica, como el líquido ceforraquídeo (LCR), un extracto de heces u otra, si en la muestra no está el microorganismo buscado, no se produce la aglutinación y por tanto la suspensión del látex permanece homogénea. Por el contrario, si en la muestra está el microorganismo contra el que van dirigidos los anticuerpos, se producirá una aglutinación de las partículas de látex visible macroscópicamente. La aglutinación se produce porque cada microorganismo posee muchas copias del antígeno en su superficie y los anticuerpos poseen como mínimo dos puntos de unión (Fab), por lo que se establece un retículo que da lugar a la formación de grumos.

En la figura puede observarse el aspecto de la aglutinación efectuada sobre una placa o portaobjetos de una muestra negativa (N) y de una muestra positiva (P).

Esta técnica también se utiliza para pruebas serológicas, enfrentando partículas de látex recubiertas por un antígeno al suero del paciente. Si en el suero hay anticuerpos se produce aglutinación.

Si se efectúa en un portaobjetos una extensión de un esputo, de un lavado nasofaríngeo u otra muestra respiratoria, podrá detectarse una bacteria como la legionela utilizando anticuerpos anti-legionela marcados con fluoresceína. Si la legionela está en el esputo, los anticuerpos fluorescentes se fijan a ella recubriéndola, y, al observar la preparación con un microscopio de fluorescencia, la bacteria se ve brillante (fluorescente) contra un fondo oscuro (Fig. 8.4).

Aunque por su tamaño los virus no pueden observarse directamente por microscopía convencional, cuando se están multiplicando en una célula, se sintetiza una gran cantidad de proteínas víricas que se localizan en el citoplasma o el núcleo. Mediante anticuerpos específicos para esas proteínas víricas marcados con fluoresceína, se detectan las células infectadas, y, por tanto, se «visualiza» indirectamente el virus con el microscopio de fluorescencia. De este modo, puede detectarse el virus de la gripe, el virus respiratorio sincitial o los virus parainfluenza en las células de un lavado nasofaríngeo o un frotis faríngeo o el virus del herpes simple o de la varicela en una extensión de una lesión cutánea (Fig. 8.4).

La técnica que acaba de ser descrita es la de la inmunofluorescencia directa (IFD). Existe un procedimiento alternativo para no tener que marcar cada uno de los dis-

tintos anticuerpos, consistente en detectar los diferentes antígenos con su anticuerpo específico no marcado (IgG) y a continuación revelarlo mediante un anticuerpo anti-IgG marcado. Así, con un solo anticuerpo marcado, se pueden revelar los diferentes anticuerpos específicos no marcados. Este método se denomina inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Fig. 8.4).

Enzimoimmunoanálisis

Las pruebas inmunoenzimáticas se basan en la existencia de sustancias químicas (sustratos) que por acción de una enzima son transformadas en un producto coloreado que emite luz o fluorescencia; la intensidad del color y de la radiación lumínica o fluorescente puede cuantificarse mediante un instrumento de medida.

De entre las muchas aplicaciones, una de las más generalizadas es la que permite detectar el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) en la sangre mediante anticuerpos marcados con una enzima en una prueba de enzimoimmunoanálisis (EIA)⁵.

La prueba discurre según el siguiente proceso: imágínesse un pequeño pocillo de plástico en cuya base se han fijado anticuerpos (Ac) dirigidos contra el antígeno que se desea detectar. Cuando en la muestra que se introduce en el pocillo se halla el antígeno del microbio bus-

⁵ Las pruebas de enzimoimmunoanálisis se conocen como EIA: *Enzyme Immuno Assay*. Una variante, en la que uno de los reactivos se ha fijado a una superficie, se denomina *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA.

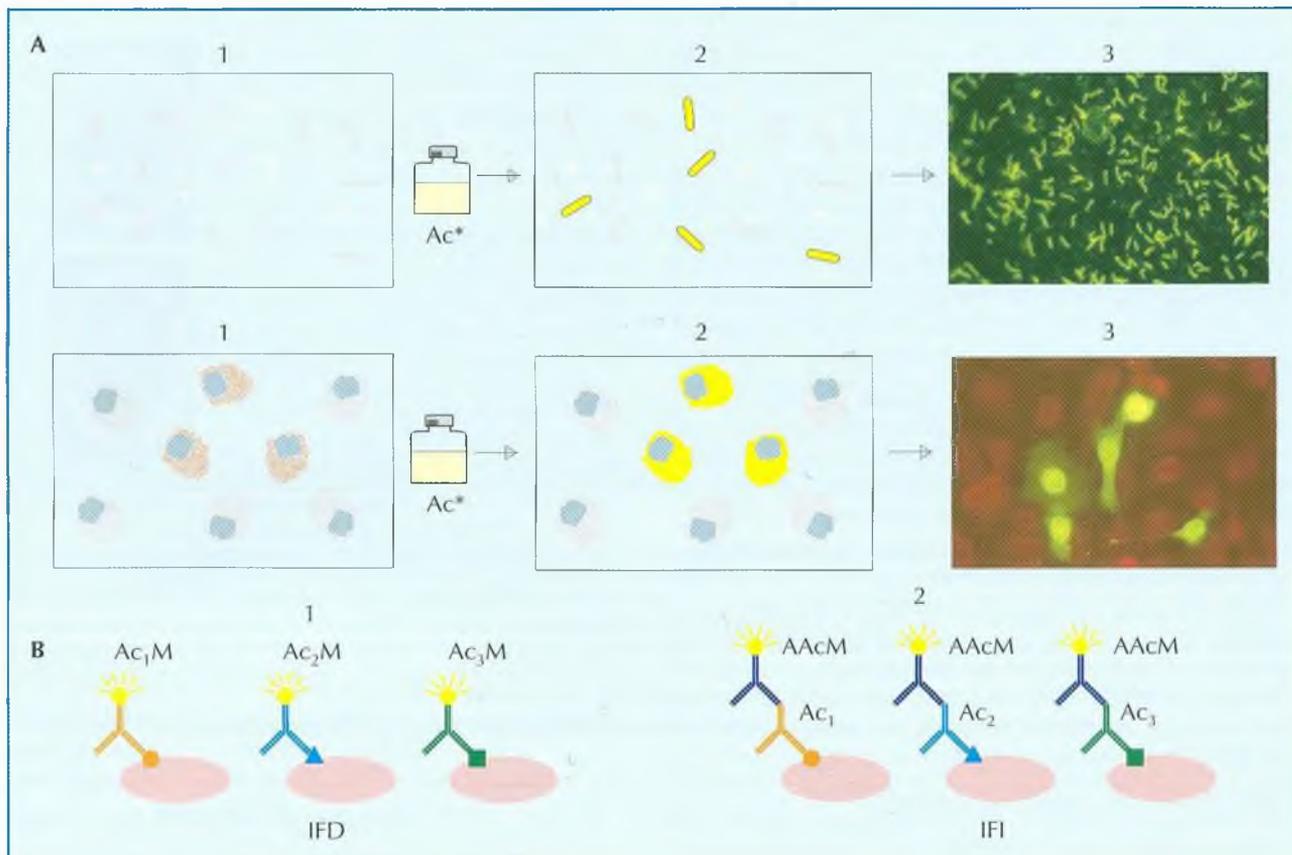


Figura 8.4. Inmunofluorescencia (IF).

A. Si se practica en un portaobjetos una extensión de una muestra respiratoria, como un esputo, lavado broncoalveolar, etc. (1) y la extensión se baña con una suspensión de anticuerpos marcados con una sustancia fluorescente (Ac*), dirigidos contra un determinado microorganismo, en este ejemplo frente a *Legionella pneumophila*; cuando la bacteria se halla presente en la muestra, los anticuerpos se fijarán a ella y las bacterias podrán observarse con el microscopio de fluorescencia como elementos brillantes (2). Si el microorganismo no está presente los anticuerpos son arrastrados por el lavado no detectándose fluorescencia. Obsérvese el aspecto real de una prueba de IF positiva para legionela (3).

B. Los virus por su tamaño no pueden observarse directamente por microscopía convencional; pero, durante su replicación en las células se forman acúmulos de las proteínas que constituirán sus estructuras (capsómeros, etc.) (1) que pueden detectarse mediante anticuerpos marcados con sustancias fluorescentes (2). Obsérvese el aspecto real de células infectadas por del virus de la gripe A mediante inmunofluorescencia (3).

C. Para detectar los diferentes microorganismos debe disponerse de anticuerpos contra cada microorganismo y marcar cada uno de ellos. Para obtenerlos, debe inocularse cada microorganismo a un animal de experimentación, extraerlos, purificarlos y posteriormente, marcar cada anticuerpo, Ac₁, Ac₂,...etc. con un marcador fluorescente, lumínico o enzimático (1). Esta estrategia resulta muy laboriosa y cara, por lo que se preparan anticuerpos sin marcar contra los diferentes microorganismos y se revelan mediante una única anti IgG humana marcada AAcM que se unirá a cualquier IgG humana, por lo que servirá de marcador universal (2). Cuando el marcador es una molécula fluorescente, en el primer caso se habla de inmunofluorescencia directa (IFD) y en el segundo indirecta (IFI).

cado (Ag), los anticuerpos de la placa lo fijan (Ac-Ag). A continuación se añade un anticuerpo dirigido contra el antígeno, igual al fijado en la placa, pero marcado con una enzima (Ac^E) que se fija al antígeno (Ac-Ag-Ac^E). Posteriormente, se añade el sustrato incoloro, que es transformado por la enzima, apareciendo un color cuya intensidad es medida mediante un colorímetro (Ac-Ag-Ac^E → sustrato incoloro = producto coloreado). Cuando en la muestra no existe el antígeno buscado, el Ac^E no es retenido en el pocillo y es eliminado mediante lavado, por lo que al añadir el sustrato no es hidrolizado y, como consecuencia, no se produce color (Fig. 8.5).

Algunas pruebas de EIA para la detección de antígenos se hallan disponibles en el comercio en formatos muy

prácticos. Los anticuerpos se hallan fijados a una pequeña membrana de nitrocelulosa y siguiendo un proceso semejante al anterior, la prueba puede completarse en 10 a 20 minutos tras una manipulación muy sencilla (Fig. 8.5). Existen reactivos comercializados con estas técnicas para la detección de diversos microorganismos, en particular virus (Fig. 6.18).

Pruebas de inmunocromatografía

Recientemente se han introducido técnicas sencillas de inmunocromatografía para la detección de antígenos. La prueba se realiza en una pequeña tira de nitrocelulosa con tres zonas clave: una, abajo, en la que hay anticuerpos de conejo (Ac, IgG) contra el antígeno buscado,

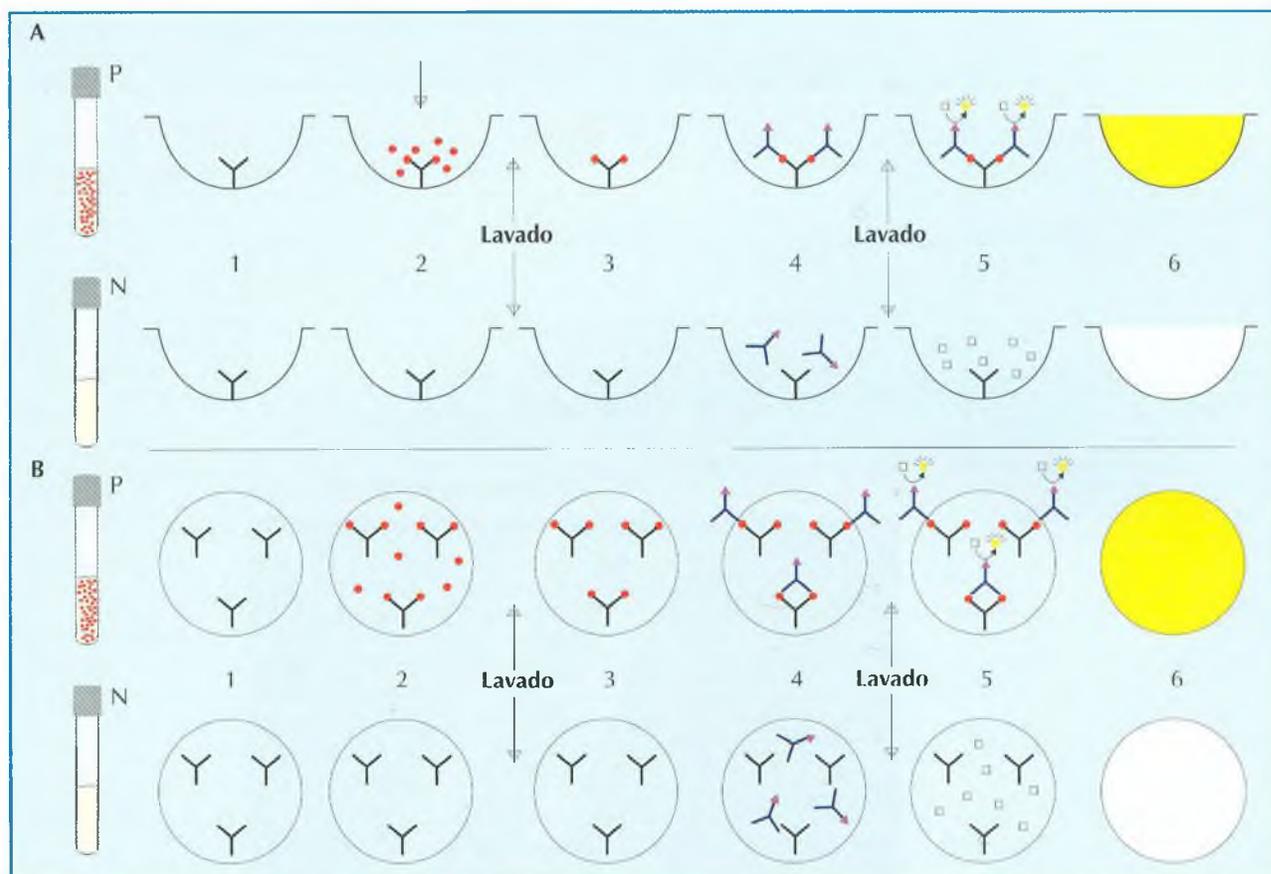


Figura 8.5. Detección de antígeno por técnica de inmunoenzimática (EIA).

La prueba de EIA para la detección de antígenos microbianos, sigue un protocolo parecido, tanto cuando se realiza en micropocillos tipo «microtiter» (A) como cuando se realiza en la superficie de una membrana de nitrocelulosa (B).

A. Técnica en micropocillos. Se fija al fondo del pocillo de plástico el anticuerpo dirigido contra el antígeno que desea detectarse (1). Se añade la muestra clínica a estudiar: la muestra positiva, P contiene el microorganismo buscado y la negativa, N no lo contiene. El microorganismo es captado por el anticuerpo (2). Se lava para eliminar todos los elementos no fijados (3). Se añade un anticuerpo contra dicho antígeno marcado con una enzima (Δ). En la muestra P el anticuerpo marcado es retenido por el antígeno y en la N es eliminado por el lavado (4). Al añadir el sustrato incoloro, en P es transformado en un sustrato coloreado por acción de la enzima, en tanto que en N permanece incoloro (5). El color puede ser leído por un luminómetro y su intensidad es proporcional a la cantidad de antígeno (6).

B. Técnica sobre nitrocelulosa, cuando los anticuerpos se fijan sobre una membrana de nitrocelulosa en forma de una gota (en inglés *dot*), el antígeno es captado por ellos y revelado con un anticuerpo marcado y un sustrato cromogénico, por un proceso idéntico al señalado arriba para los pocillos.

marcados con una partícula de oro coloidal (Ac^*); en ese lugar se deposita el producto líquido (LCR, orina, etc.). En la mitad de la tira hay una banda de anticuerpos de conejo (Ac) fijados a la nitrocelulosa dirigidos contra el mismo antígeno, y, más arriba, otra banda con anticuerpos dirigidos contra las IgG de conejo. Al añadir la muestra en la parte inferior, la reacción tiene lugar según el siguiente proceso: si el antígeno buscado está en la muestra, reaccionará con los anticuerpos marcados, y los complejos $Ag-Ac^*$, formados en un contexto fluido, migran hacia arriba por capilaridad y son captados en la segunda zona, en la que se hallan fijados a la nitrocelulosa anticuerpos contra el antígeno ($Ac-Ag-Ac^*$); allí, al quedar captados y muy concentrados los complejos iniciales, se observa la banda de los anticuerpos marcados con el oro coloidal. En la tercera zona (superior) hay anticuerpos fijados a la nitrocelulosa, dirigidos contra los anticuerpos de conejo; esta

banda es un control para confirmar la correcta migración de los anticuerpos y debe ser siempre positiva, ya que capta la migración de los anticuerpos marcados (Ac^*), que, por su gran exceso, siempre están presentes hayan o no reaccionado previamente con su antígeno (Fig. 8.6).

Aplicaciones clínicas

En el comercio hay disponible un gran número de reactivos para la detección de antígeno de numerosos microorganismos, existiendo la posibilidad de escoger diversas técnicas para la detección de un mismo microorganismo (aglutinación, IFD, IFI, EIA, inmunocromatografía, etcétera).

Para realizar estas pruebas, en algunas ocasiones conviene hervir las muestras, en otras concentrarlas por filtración, pero en algunos casos estos procedimientos pue-

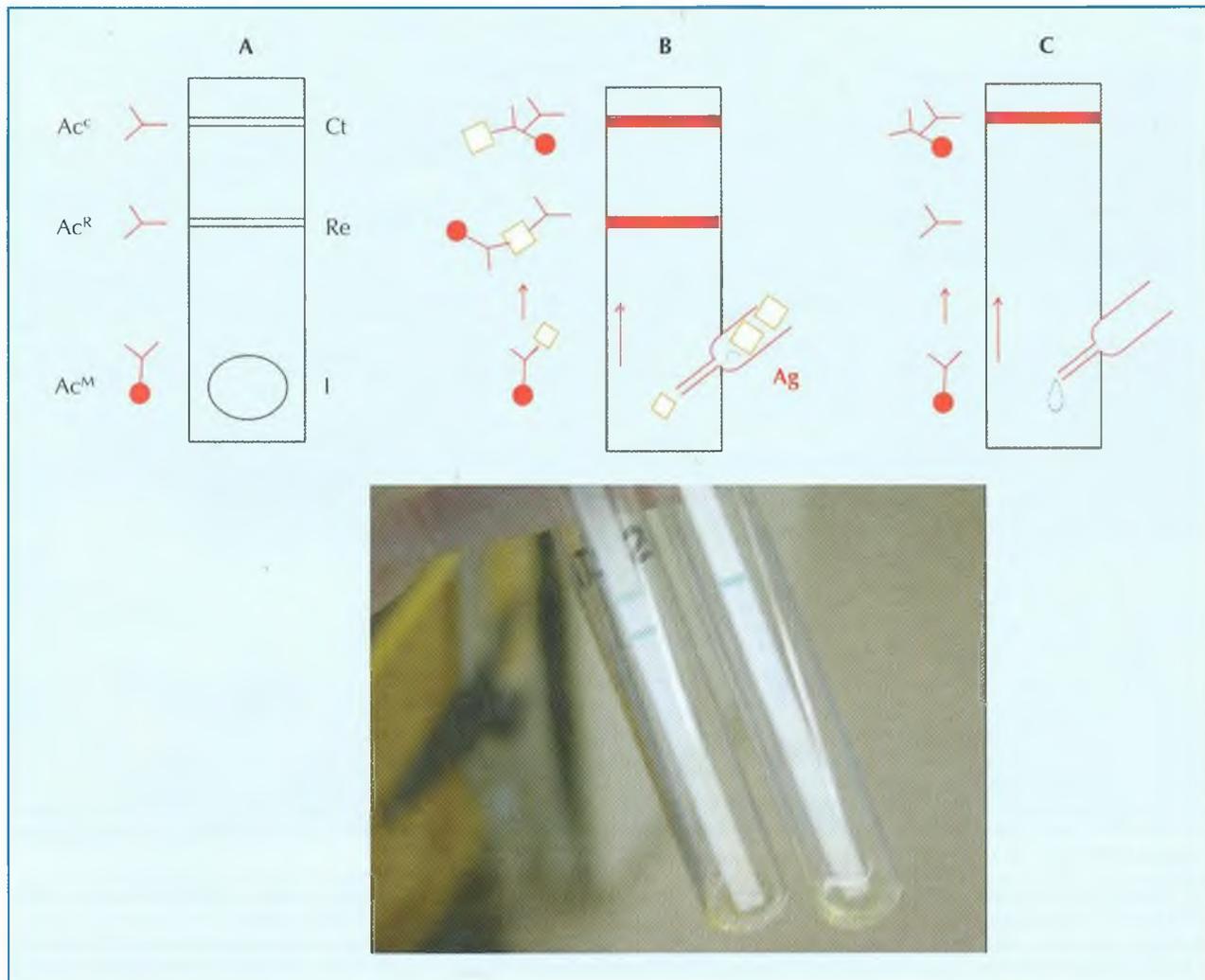


Figura 8.6. Prueba de inmunocromatografía para detección de antígeno.

La prueba se realiza en una tira de nitrocelulosa a la que se fijan diferentes anticuerpos.

A. En la parte inferior de la tira (I) se hallan en forma libre anticuerpos de conejo dirigidos contra el antígeno buscado, a los que se ha fijado un marcador como el oro coloidal (Ac^M). En la zona Re se han fijado a la tira anticuerpos de conejo (sin marcar) contra el mismo antígeno (Ac^R). Más arriba, en la zona Ct se fijan a la tira anticuerpos de cabra dirigidos contra los de conejo (Ac^c). Para desarrollar la prueba se sumerge la tira en la muestra clínica, en la que se desea detectar la presencia de antígeno, como se observa en el ejemplo, o, alternativamente, se deposita con una pipeta unas gotas de la muestra en la parte inferior (I) de la tira.

B. En caso de positividad, el anticuerpo marcado que ha reaccionado con el antígeno migra por capilaridad hasta que llega a la zona de reacción (Re), en la que los anticuerpos fijados en esa zona, Ac^R , reaccionan con el antígeno y retienen al complejo migrante. Éste queda muy concentrado, pudiéndose observar por acción del oro coloidal una banda coloreada. Siempre existe un exceso de anticuerpos marcados Ac^M que sobrepasa la zona Re para alcanzar la zona de control (Ct), en la que los anticuerpos fijados (Ac^c) reaccionan y retienen a los anticuerpos migrantes, observándose una banda de migración correcta.

C. Se muestra la dinámica de una prueba negativa; no hay banda en Re (reacción), pero sí en Ct (control).

Abajo se muestra una detección de rotavirus positiva (izquierda) y negativa (derecha). Se han sumergido las tiras en una solución de heces en un tampón.

den estar contraindicados; por ello, cuando se utiliza un reactivo comercializado, deben seguirse las indicaciones del fabricante de una manera muy estricta y no olvidar introducir los controles necesarios. Estos dos aspectos son de extraordinaria importancia.

Los antígenos microbianos se buscan en la muestra clínica obtenida del foco de infección, como es el LCR

en la meningitis o el esputo en la neumonía, pero, en ocasiones, los antígenos microbianos pasan a la sangre desde el foco de infección y se buscan en ella, como en el caso de las hepatitis y el sida. En otros casos, desde la sangre se eliminan con la orina, en la que se investiga su presencia, como en las neumonías causadas por neumococo o la legionela. En la tabla 8.1 se señalan algunos de los reactivos y pruebas que están comercializados para

Tabla 8.1
Pruebas de detección de antígeno

BACTERIAS		
Microorganismo/Antígeno	Técnica: Compañía	Muestra
<i>Streptococcus pyogenes</i>	IC: Abbott, BD Biosciences, Binax Inc.	Exudado faríngeo
Neumococo	IC: Binax Inc. Látex: bioMérieux	Orina, LCR
<i>Haemophilus influenzae</i> Ag capsular	Látex: bioMérieux	LCR
Meningococo Ag capsular	Látex: bioMérieux, BD Biosciences	LCR
<i>Chlamydia</i> Ag común	EIA: bioMérieux, Boule Diag. IC: biokit SA, BLK	Exudado uretral Exudado endocervical
<i>Helicobacter pylori</i>	IC: Meridian Diagnostics EIA: Connex, Meridian Diagnostics	Heces
<i>Clostridium difficile</i> Toxina A	EIA: BD Biosciences, bioMérieux, Meridian Diagnostics, Remel, Trinity Biotech EIA membrana: Biosite Diagnostics Inc, Meridian Diagnostics, Oxoid Inc. IC: Meridian Diagnostics	Heces
Toxina A/B	EIA: TechLab Inc.; Meridian Diagnostics; IVD Research Inc., Wampole Laboratories IC: Meridian Diagnostics.	
<i>E. coli</i> verotoxigénica	EIA: IVD Research Inc.	Heces
<i>Campylobacter</i>	EIA: IVD Research Inc., Alexon Trend	Heces
Legionela	IC: Binax Inc. EIA: Binax Inc., Biotest Diagnostic Corporation, Trinity Biotech, IVD Research Inc., Wampole Laboratories	Orina
HONGOS		
Criptococo Cápsula Glucuronoxil manano	Latex: Bio-Rad laboratories Inc., Fumoze, Meridian Diagnostics EIA: Meridian Diagnostics	LCR, suero
<i>Aspergillus</i> Galactomanano	EIA: Bio-Rad Laboratories Inc.	Suero
<i>Candida</i> Mananos	EIA: Bio-Rad Laboratories Inc.	Suero
<i>Pneumocystis jiroveci</i>	IF: Meridian Diagnostics	Lavado broncoalveolar Espudo inducido
VIRUS		
V. de la gripe A	IFI: Bio -Rad Laboratories Inc., Chemicon International Inc EIA:BD Biosciences IC: Binax Inc.	Moco nasofaríngeo Exudado faríngeo LBA
V. de la gripe B	IFI: Chemicon International Inc. EIA:BD Biosciences IC: Binax Inc.	Moco nasofaríngeo Exudado faríngeo LBA

Tabla 8.1
Pruebas de detección de antígeno (continuación)

VIRUS (continuación)

Microorganismo/Antígeno	Técnica: Compañía	Muestra
V. respiratorio sincitial	IFD: bioMérieux IFI: Chemicon International Inc. EIA: Abbott, BD Biosciences IC: Binax Inc.	Moco nasofaríngeo/LBA
V. parainfluenza 1,2 y 3	IFI: Chemicon International Inc.	Moco nasofaríngeo/LBA
Adenovirus	IFI: Chemicon, International Inc. IC: Binax Inc.	Moco nasofaríngeo/LBA
V. de la varicela-zoster	IFD: Chemicon International Inc.	Muestra vesicular/úlceras
V. del herpes simple	IFD: Chemicon International Inc. IFI: Biotech, Diagnostics Products Corp., Trinity Biotech	Muestra vesicular/úlceras
Citomegalovirus pp65	IFI: Chemicon International Inc.	Sangre con heparina de Li
V. del sarampión	IFI: Chemicon International Inc.	Moco nasofaríngeo
V. de la parotiditis	IFI: Chemicon International Inc.	Moco nasofaríngeo
Hepatitis B HBsAg y HBeAg	EIA: Abbott, BioRad Laboratories Inc., DiaSorin, Roche, Ortho -Clinical Diagnostics IC: Binax Inc., biokit SA	Suero
Hepatitis C HCV coreAg	EIA: Ortho-Clinical Diagnostics	Suero
HIV p24	EIA: bioMérieux; BioRad Laboratories Inc; Innogenetics.	Suero
Rotavirus Ag grupo (VP6)	Látex: biokit SA, bioMérieux, Meridian Diagnostics. EIA: Meridian Diagnostics, BioMérieux, IVD Research Inc. IC: Meridian Diagnostics, biokit SA	Heces
Adenovirus (enteritis) Ag grupo/ADV 40,41	Látex: biokit SA. (Ag de grupo) EIA: Meridian Diagnostics. IVD Research Inc. (ADV 40,41) IC: Meridian Diagnostics. biokit SA (ADV 40,41)	Heces
Astrovirus	EIA: DAKO Corporation	Heces
PROTOZOOS		
Giardia	IF: Cellabs EIA: Alexon Trend, Cellabs, TechLab Inc., Wampole Laboratories, IVD Research Inc. IC: Alexon-Trend, Meridian Diagnostics.	Heces
<i>Cryptosporidium parvum</i>	IF: Cellabs EIA: Alexon-Trend, TechLab Inc. IVD Research Inc, Wampole Laboratories, IC: Meridian Diagnostics, Remel.	Heces
<i>Entamoeba histolytica</i>	EIA: Alexon Trend, Cellabs, TechLab Inc., Wampole Laboratories, IVD Research Inc.	Heces
<i>Giardia/Cryptosporidium</i>	EIA: Alexon Trend, IVD Research Inc. IC: BD Biosciences, Meridian Diagnostics IF: Cellabs; Meridian Diagnostics. IVD Research Inc.	Heces
<i>Giardia/Cryptosporidium</i> <i>/E. histolytica</i>	IC: Biosite Diagnostics Inc.	Heces

Tabla 8.1
Pruebas de detección de antígeno (continuación)

PROTOZOOS (continuación)		
Microorganismo/Antígeno	Técnica: Compañía	Muestra
<i>Plasmodium falciparum</i> HRP-2	IC: Amrad-ICT, BD Biosciences, Binax Inc., Omega Diagnostics Ltd.	Sangre con EDTA
<i>Plasmodium</i> spp LDH y aldolasa	EIA: Cellabs IC: Binax Inc., Flow Inc.	
<i>Leishmania</i>	Látex: Innogenetics	Orina
<i>Wuchereia bancrofti</i>	IC: Binax Inc. EIA: Cellabs	Sangre con EDTA

LBA: Lavado broncoalveolar. IF: Inmunofluorescencia. IFI: Inmunofluorescencia indirecta. IFD: Inmunofluorescencia directa. EIA: Enzimoimmunoanálisis. IC: Inmunocromatografía.

la detección de antígenos. No hay que olvidar que la rapidez de los cambios en este campo fácilmente deja obsoleta cualquier lista.

Infecciones respiratorias

La legionela puede detectarse por inmunofluorescencia (IF) en una muestra respiratoria, pero para el diagnóstico de las neumonías causadas por legionela y pneumococo es preferible utilizar las técnicas de detección de antígeno en orina por inmunocromatografía o EIA. Estas pruebas requieren una cierta experiencia para su lectura e interpretación. La inmunocromatografía también está disponible para la detección de virus respiratorios (gripe A, B y virus respiratorio sincitial). Las pruebas de inmunofluorescencia en muestras respiratorias son muy empleadas para el diagnóstico de las infecciones causadas por los virus respiratorios convencionales —gripe, respiratorio sincitial, parainfluenza y adenovirus. Existe un antisuero polivalente que permite el estudio simultáneo de estos virus en una prueba única, aunque en caso de positividad hay que repetirla con antisueros individualizados. Es de esperar la rápida introducción de reactivos para la detección de coronavirus.

Existen pruebas, como la inmunocromatografía y las de EIA sobre membrana de nitrocelulosa para la detección de virus respiratorio sincitial y virus de la gripe, que suelen utilizarse para el cribado de estas infecciones; pero no permiten evaluar la calidad de la muestra, a diferencia de lo que sucede con la IF, que permite constatar la existencia de un número suficiente de células del epitelio ciliado evidenciando que es apta para estudio.

Infecciones gastrointestinales

La infección por *Helicobacter pylori* se ha diagnosticado por diferentes métodos, como la tinción de Gram,

el cultivo o la prueba del aliento⁶, pero también existen pruebas de EIA para la detección de antígeno en heces, que tienen una buena sensibilidad y especificidad.

La detección de las toxinas A y B de *Clostridium difficile* en las heces también se puede efectuar por diversas técnicas, entre ellas las de EIA, que están automatizadas. Son preferibles las pruebas capaces de detectar ambas toxinas.

La detección de los virus causantes de enteritis, como rotavirus, adenovirus 40 y 41, calicivirus y astrovirus, puede efectuarse en las heces mediante diferentes métodos (aglutinación indirecta, EIA e inmunocromatografía).

También existen pruebas para la detección de giardia y criptosporidios en heces, pero no superan en rapidez y sensibilidad, ni mucho menos en el coste, a las pruebas convencionales de examen microscópico. Sin embargo, es útil diferenciar entre *Entamoeba histolytica* y otras amebas no patógenas, como *E. dispar*, a través de la detección de antígeno específico mediante pruebas de EIA.

Infecciones de transmisión sexual

La detección de antígeno se utiliza fundamentalmente para el diagnóstico de las infecciones por *Chlamydia trachomatis* mediante pruebas de EIA, inmunocromatografía o inmunofluorescencia. También se ha utilizado para la detección del treponema de la sífilis en el chancro mediante técnica de IF.

Meningitis

Las meningitis causadas por meningococo de los grupos A y C, neumococo, *Haemophilus influenzae* y criptococo pueden diagnosticarse mediante la detección de los

⁶ Permite detectar en el aliento CO₂ isotópico a partir de urea marcada con C¹³ y C¹⁴, que es ingerida e hidrolizada por la ureasa del microorganismo.

antígenos específicos respectivos. Para todos ellos existen en el comercio reactivos de aglutinación facilitada cuya sensibilidad no es muy superior al examen directo, pero que permiten confirmar la identificación presuntiva del microorganismo efectuada a través del Gram, lo que, dada la gravedad de estas infecciones, es verdaderamente útil.

Infecciones mucocutáneas

En las lesiones cutáneas y mucosas –vesiculares o ulceradas– la detección de antígeno por IF permite diagnosticar y diferenciar entre las causadas por el virus del herpes simple y el de la varicela.

Hepatitis y sida

Las pruebas de detección de antígeno en las hepatitis van dirigidas a la detección del antígeno de superficie (HBs Ag) y el antígeno e (HBe Ag) del virus de la hepatitis B. Actualmente se está evaluando la utilidad de la detección del antígeno del core de la hepatitis C. En el sida se detecta el antígeno p24 del virus de la inmunodeficiencia humana (véanse los capítulos 20 y 22).

Infecciones sistémicas

En varias infecciones generalizadas, la detección de antígeno puede ser un método de diagnóstico útil; así sucede en la parotiditis y el sarampión con el uso de muestras nasofaríngeas estudiadas por técnica de inmunofluorescencia y en las infecciones por citomegalovirus en muestras de la capa leucocitaria de la sangre, utilizando también técnicas de IF.

Para el diagnóstico de las infecciones generalizadas o pulmonares por *Candida* y *Aspergillus* también se han utilizado técnicas de detección de antígeno, que poseen una sensibilidad aceptable pero una menor especificidad; algunas, como la detección de galactomanano de *Aspergillus*, poseen un aceptable valor predictivo negativo cuando se utilizan de modo seriado en una población seleccionada.

Así mismo, estas técnicas se han utilizado para el diagnóstico de la leishmaniasis generalizada (Kala-azar) en muestras de médula ósea por IF y del paludismo (*Plasmodium falciparum*) en muestras de sangre por EIA; sin embargo, su sensibilidad no supera la conseguida con la observación microscópica. Recientemente, se ha introducido una prueba de inmunocromatografía para la detección simultánea de *P. falciparum* y *P. vivax* que posee buena sensibilidad y especificidad.

En ocasiones un hemocultivo positivo para neumococo puede mostrar en la tinción de Gram unas estruc-

turas no identificables, pero, si se piensa en esa posibilidad, mediante una prueba de detección de antígeno, en particular de látex, puede obtenerse en pocos minutos un resultado positivo.

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Las pruebas serológicas constituyen un método de diagnóstico indirecto al detectar en el suero del paciente los anticuerpos formados frente al microorganismo causante de la infección.

Para detectar los anticuerpos, se enfrenta *in vitro* una muestra de suero del paciente al microorganismo que se sospecha que está causando la infección para ver si se produce una reacción antígeno-anticuerpo que constata la presencia de anticuerpos frente al microorganismo. La reacción antígeno-anticuerpo puede evidenciarse por distintas técnicas semejantes a las descritas para la detección de antígeno. Un aspecto importante es que la mayoría de estas pruebas permiten cuantificar, de un modo más o menos preciso, los anticuerpos existentes en el suero.

Las pruebas serológicas tienen una complejidad intrínseca variable. El tiempo requerido para su realización también es variable, pero la mayoría están automatizadas. Ello no obsta para que la elección de las pruebas y de las técnicas más adecuadas para el diagnóstico en cada caso, así como la interpretación de los resultados, deba depender directamente de un especialista experimentado.

Las pruebas serológicas, como ocurría en el caso de la detección de antígeno, requieren disponer de una hipótesis diagnóstica relativamente precisa, ya que el suero del paciente, por razones técnicas y económicas, no puede enfrentarse arbitrariamente a los numerosos microbios que pueden causar infección al hombre, sino a uno o unos pocos de entre los que, con mayor probabilidad, puedan estar causando la infección que se trata de diagnosticar. Así mismo, la interpretación de los resultados no debe desvincularse de los datos clínicos y epidemiológicos del enfermo, como en cualquier otro ámbito del diagnóstico microbiológico.

Dinámica de la producción de anticuerpos

A los pocos días de producirse una infección empiezan a formarse anticuerpos frente a los antígenos del microorganismo infectante. Primero se forman anticuerpos de la clase M (IgM). En los estadios iniciales de la infección, junto a las IgM también existen títulos plasmáticos detectables de IgA y aparecen las primeras inmunoglobulinas de la clase G (IgG), que son de baja afinidad para el antígeno, a diferencia de las que aparecerán posteriormente, que serán de elevada afinidad⁷.

⁷ Aunque las IgA diméricas se eliminan con las secreciones y se concentran en las mucosas, existe siempre un nivel plasmático de IgA monomérica.

Entre tres y cinco semanas después de iniciada la infección se produce el máximo nivel de anticuerpos (IgM + IgA + IgG). Al cabo de varios meses, entre tres y seis, los niveles de IgM e IgA disminuyen y después desaparecen, pero se mantiene un nivel detectable de IgG que persiste durante años o incluso toda la vida.

De lo que se acaba de indicar, se deduce que la existencia de anticuerpos frente a un microorganismo no significa necesariamente que el paciente esté padeciendo en ese momento una infección causada por ese microorganismo, ya que los anticuerpos detectados frente a él pueden ser IgG residuales de una infección ocurrida hace años; en este caso, el título (cantidad) de anticuerpos suele ser bajo.

Por el contrario, alrededor de las tres semanas después de iniciada la infección junto a la presencia de IgM e IgA suele haber títulos muy altos de IgG, que indican con elevada probabilidad la existencia de una infección actual. En ocasiones, después de pasada una enfermedad, pueden persistir durante bastante tiempo títulos relativamente altos de IgG; por ello, para diagnosticar una infección actual o reciente, tiene más valor la detección de un título alto de IgM que de IgG, ya que las IgM suelen desaparecer entre los tres y seis meses después de iniciada la infección, aunque hay excepciones.

Pero, sin duda, el resultado más inequívoco se obtiene cuando se extrae una muestra de suero muy precozmente, al inicio de la enfermedad, y otra muestra tres semanas después, constatándose en esta segunda muestra un incremento al menos cuatro veces mayor en el título de anticuerpos totales con respecto a la primera muestra. En algunos casos (por ejemplo, legionela), sólo se produce un título elevado de IgG entre cinco y seis semanas después de iniciada la infección. El gran valor de la demostración de un incremento del título de anticuerpos para el diagnóstico de la enfermedad se debe a que, en ocasiones, y dependiendo del microorganismo (por ejemplo, toxoplasma), las IgM también pueden persistir relativamente elevadas hasta un año o más después de la infección, en tanto que el incremento (más de cuatro veces) del título de anticuerpos totales siempre se asocia a infección en curso, excepto en situaciones verdaderamente excepcionales.

Como se acaba de indicar, el resultado de la comparación de los títulos de dos sueros es el más específico, pero este resultado es tardío, ya que el segundo suero debe extraerse tres a cinco semanas después del primero. La puesta a punto de técnicas que permitan conocer, no sólo la cantidad de anticuerpos, sino también su clase, aun teniendo en cuenta las limitaciones señaladas más arriba, permite diagnosticar la enfermedad activa mediante un solo suero obtenido en la fase precoz de la enfer-

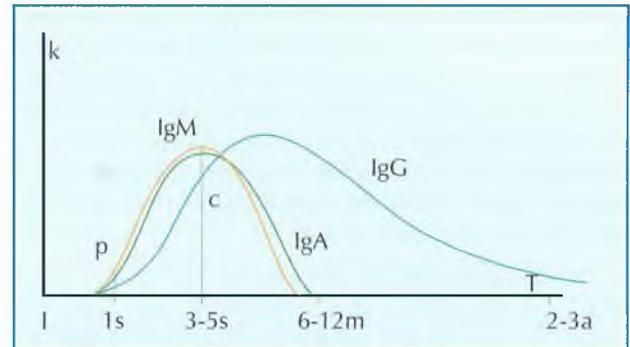


Figura 8.7. Dinámica de la formación de anticuerpos.

Representación esquemática de la producción de anticuerpos. K: cantidad de anticuerpos. T: tiempo. I: momento de la infección. Se muestran las IgM, IgG e IgA.

Entre tres y cinco semanas después de iniciada la infección se produce el máximo nivel de anticuerpos. Los niveles de IgM e IgA disminuyen para desaparecer, pero se mantiene un nivel detectable de IgG que persiste durante años o incluso toda la vida. En algún caso las IgM pueden persistir hasta un año o más.

Aunque la detección de IgM o de un título de IgG alto, es significativo de infección reciente, la demostración más inequívoca de infección actual es el incremento al cuádruplo del título de IgG de una muestra de suero tomada entre las tres y cinco semanas de iniciada la infección (c), en comparación con otra tomada lo más precozmente posible (p).

medad, cuando se detectan en él anticuerpos de la clase M, A y/o de la clase G de baja afinidad. En la figura 8.7 se representan estos datos.

Clases de antígenos

Los antígenos naturales están constituidos por los microorganismos íntegros o extractos antigénicos, más o menos purificados, obtenidos de ellos; los antígenos recombinantes se obtienen por ingeniería genética, introduciendo el gen que codifica la proteína antigénica en un microorganismo (bacteria o levadura) que lo expresa, y los péptidos sintéticos se obtienen por síntesis química. En la actualidad, la mayoría de los antígenos utilizados en serología se hallan comercializados. Estos antígenos se presentan en muy diversos formatos según la técnica que se utilice y el grado de automatización de la misma. El modo de conservación y la caducidad de estos reactivos vienen indicados por el fabricante.

Muestras de suero

Los anticuerpos se determinan en una muestra de suero del paciente. Para ello, en adultos deben extraerse entre 5 y 10 ml de sangre, dejar que coagule a temperatura ambiente, lo que suele suceder en 20 minutos⁸, y separar el suero centrifugando 10 minutos a 1.000-1.200 g. Existen en el mercado tubos como el modelo BD Vacutainer® SST⁹ (Becton Dickinson) o S-Monovette® (Sarsstedt, Inc.) que incorporan productos como polvo de síli-

⁸ El frío retarda la coagulación y puede perjudicar la muestra para alguna determinación.

⁹ SST: Serum separation tube.

ce o vidrio que acelera la coagulación y una gelatina inerte que facilita la retracción del coágulo.

Una vez separado el suero, puede mantenerse en la nevera (4-6° C) durante una semana, pero es preferible guardarlo congelado a -20° C, lo que permite conservarlo durante años si se evita su descongelación y congelación repetidas. Si se ha fraccionado, puede utilizarse una alícuota sin descongelar las demás.

En las infecciones del sistema nervioso central (SNC) puede ser útil tomar una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) para estudio serológico, siendo imprescindible comparar el resultado con el obtenido en una muestra de suero tomada simultáneamente. La presencia de anticuerpos frente a un determinado microorganismo en el LCR, particularmente si su título es superior al del suero, significa la existencia de una infección del SNC, ya que los anticuerpos del plasma no pasan la barrera hematoencefálica.

En la embarazada, los anticuerpos maternos de la clase G pasan la barrera placentaria y se hallan en la sangre del recién nacido cumpliendo una función protectora; pero los anticuerpos de la clase M no atraviesan la placenta, por lo que la existencia de IgM frente a un microorganismo en el suero fetal o de un recién nacido indica su producción por el feto, y por tanto que ha padecido una infección por ese microorganismo.

En campañas sanitarias, para estudios de seroprevalencia u otros, puede tomarse una muestra de saliva para efectuar con ella pruebas serológicas. De entre los diversos sistemas de torundas para la recogida de saliva comercializados, OraSure (OraSure Technologies) es el único aprobado por la *Food and Drug Administration*, en EE UU. En cualquier caso, se requiere adaptar el desarrollo de la prueba y la interpretación de los resultados a ese tipo de muestra.

Automatización

En la actualidad, muchas pruebas serológicas están altamente automatizadas, de tal modo que, partiendo del tubo primario en el que se ha extraído la sangre del paciente, puede llegarse a un resultado validado e impreso en pocas horas y sin participación manual, únicamente supervisando el proceso, siendo imprescindible la incorporación de los controles y/o los calibradores necesarios para constatar la validez de cada prueba.

En todo sistema automatizado es importante saber si se trata de un modelo cerrado en el que sólo pueden utilizarse reactivos concretos, en general de una marca determinada, o de un sistema abierto susceptible de procesar reactivos de muy diferentes compañías.

Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas más utilizadas son las de aglutinación, inmunofluorescencia (IF) y enzimo inmuoanálisis (EIA).

Algunas pruebas detectan con más facilidad una clase de anticuerpos que otras, como sucede con la aglutinación, que detecta preferentemente las IgM, o la fijación de complemento las IgG; sin embargo, como todas las pruebas serológicas detectan con mayor o menor sensibilidad todas las clases de Igs, se considera que los resultados de cualquiera de estas pruebas hacen referencia a *anticuerpos totales*. Como se expone más adelante, existen procedimientos técnicos que permiten detectar de modo específico las diferentes clases de inmunoglobulinas presentes en el suero.

Pruebas para la detección de anticuerpos totales

Pruebas de aglutinación directa

En estas pruebas se utilizan antígenos particulados; es decir, el antígeno forma parte de la superficie de microorganismos de gran tamaño (bacterias y protozoos). El antígeno se prepara como una suspensión del microorganismo, la cual tiene un aspecto lechoso y homogéneo. Al enfrentarla al suero del paciente, si en él hay anticuerpos frente a los antígenos las partículas microbianas aglutinan. Cuando la prueba se realiza en un tubo de ensayo, se produce un patrón de aglutinación característico (con el sobrenadante transparente) y al resuspender el sedimento se forman abundantes grumos. Cuando la reacción se ha practicado en micropocillos (placas tipo «microtiter»), el patrón de aglutinación es diferente: un sedimento amplio y granulado significa reacción positiva (aglutinación) y un botón puntiforme central, reacción negativa. Estas pruebas pueden requerir hasta 18 horas de incubación.

Para cuantificar los anticuerpos del suero, las reacciones de aglutinación se practican en una serie de tubos o micropocillos, en cada uno de los cuales se pone la misma cantidad de suspensión antigénica, pero en el primero se añade suero puro, en el segundo, el suero diluido a la mitad en solución salina (1/2), en el tercero, diluido a la cuarta parte (1/4), y así sucesivamente hasta diluciones elevadas, de 1/5.000 o más, para determinar la mayor dilución (menor cantidad de suero) en la que aún se evidencia aglutinación. El título de anticuerpos es la dilución más alta del suero en la que se detecta la aglutinación. Algunas pruebas de aglutinación, como las utilizadas para el diagnóstico de la brucelosis o la toxoplasmosis, son muy sensibles y específicas (Fig. 8.8).

La aglutinación también puede realizarse directamente sobre un portaobjetos, enfrentando la suspensión bacteriana al suero del enfermo; para facilitar la lectura, las bacterias pueden colorearse como en el rosa de Bengala, método empleado para el diagnóstico serológico de la brucelosis. Esta técnica en concreto resulta sencilla, rápida (minutos), sensible y específica.

Algunos anticuerpos de la clase IgG son poco aglutinantes porque tienen un pequeño tamaño y las partículas (antígenos) que se unen a cada uno de los brazos reac-

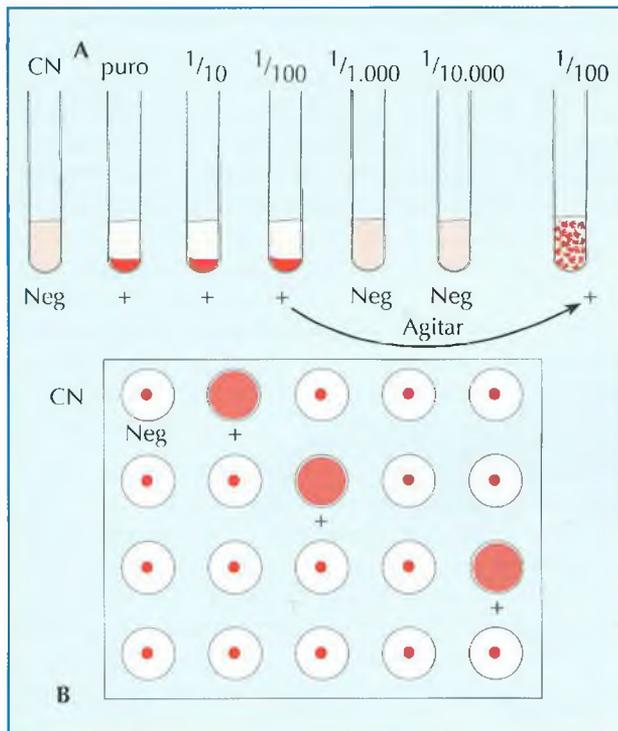


Figura 8.8. Serología. Aglutinación directa.

Al enfrentarse en un tubo una suspensión microbiana al suero de un paciente, si en el suero hay anticuerpos contra los antígenos de los microorganismos, estos quedan unidos entre sí por los anticuerpos formando grumos que aglutinan en el fondo del tubo. Esta reacción puede realizarse en tubos de ensayo convencionales y en micropocillos.

Para conocer la cantidad de anticuerpos existentes en el suero se enfrenta la suspensión antigénica a diversas diluciones del suero en solución salina (suero puro, diluido al 1/10, al 1/100, 1/1000, etcétera).

A. Aglutinación en tubo: el primer tubo de control, sin suero, es negativo (CN); en él la suspensión es homogénea. Los tres tubos siguientes son positivos y se observa la aglutinación (sedimentación) de las bacterias. Los dos siguientes son negativos. El último tubo es el positivo al 1/100 que se ha agitado para visualizar la suspensión de los grumos.

B. Aglutinación en micropocillo. En cada pocillo se ha puesto un suero diferente; por tanto, cada suero se estudia a una única dilución. Obsérvese el patrón de aglutinación positivo y negativo.

Neg: negativo. +: positivo.

tivos (Fab) quedan muy próximas entre sí. Si estas partículas poseen una carga eléctrica elevada, se repelen enérgicamente debido a su proximidad, impidiendo la aglutinación; lo que no sucede con la IgM por su mayor tamaño. Las IgG también pueden ser no aglutinantes cuando tienen las ramas Fab cerradas, y no pueden hacer de puente entre las partículas antigénicas. Como en los dos casos anteriores, los anticuerpos se unen al antígeno, pero no forman puentes; una Ig de cabra anti-IgG humana permite establecer el puente y producir la aglutinación. Esta técnica es la prueba de Coombs.

Pruebas de aglutinación pasiva o indirecta

Los antígenos solubles, que son macromoléculas libres, por su pequeño tamaño no pueden aglutinar

directamente, pero pueden fijarse a la superficie de partículas como látex, gelatina, liposomas, hematíes, polipéptidos o partículas de sílice o carbón de un tamaño entre 1 y 7 μm que actúan como soportes inertes, lo que permite evidenciar la aglutinación macroscópicamente. Estas reacciones se pueden realizar tanto sobre un portaobjetos como en pocillos de placas de «microtiter». En el primer caso, suelen ser técnicas cualitativas, como por ejemplo, la técnica de látex empleada para detectar anticuerpos, frente a la rubéola o el RPR (*rapid plasma reagin*), prueba no treponémica empleada para el cribado de la sífilis, que emplea partículas de carbón como soporte de un antígeno cardiolipídico. Al igual que en la aglutinación directa, las pruebas cuantitativas suelen realizarse en pocillos, como en el caso de la hemaglutinación pasiva (hematíes con antígeno treponémico) para el diagnóstico de la sífilis, o la aglutinación indirecta empleada para detectar anticuerpos frente al micoplasma, que utiliza como soporte partículas de gelatina coloreadas.

Pruebas de fijación del complemento

La reacción entre un antígeno y un anticuerpo, especialmente de la clase G, comporta fijación del complemento, lo que permitió en 1901 el diseño de una prueba serológica muy ingeniosa y útil según el protocolo que se señala a continuación.

En un tubo o pocillo se pone el suero del paciente y el antígeno microbiano frente al que se investiga la presencia de anticuerpos (primer sistema). Se añade una cantidad precisa de complemento. Si en el suero del paciente existen anticuerpos, estos reaccionan con el antígeno y fijan todo el complemento. Si no hay anticuerpos contra el antígeno microbiano, el complemento no queda fijado, sino que permanece libre.

Para revelar la reacción, se añaden hematíes de carnero unidos a anticuerpos antihemátide de carnero, denominados hemolisina (segundo sistema). En ausencia de complemento, los hematíes no son lisados por la hemolisina; si el suero del paciente tenía anticuerpos y por tanto la reacción del primer sistema ha sido positiva, el complemento es totalmente fijado y consumido y no hay hemólisis en el segundo sistema. Si la primera reacción ha sido negativa por ausencia de anticuerpos frente al antígeno microbiano, el complemento libre es fijado por el segundo sistema (hematíes-hemolisina) y se produce la lisis de los hematíes, que es fácilmente observable a simple vista. El título de anticuerpos en esta prueba se determina mediante diluciones progresivas del suero. Aunque esta prueba es de gran complejidad, ha alcanzado un notable nivel de automatización y lectura cinética. (Seramat System; Diesse Diagnostica Senese SPA).

Pruebas de neutralización

Las pruebas de neutralización se basan en el bloqueo de la acción citopática de un virus o una toxina

re una línea celular por la acción protectora de los anticuerpos específicos. Para su desarrollo, se enfrenta el virus (o la toxina bacteriana) al suero de un paciente en el suero existen anticuerpos se unen al virus o a la toxina, neutralizándolos, y, al inocular la mezcla al sistema celular, no se producen lesiones citolíticas. Por el contrario, si no hay anticuerpos contra el virus (o la toxina), al inocular la mezcla a un sistema celular adecuado, se produce un efecto citopático característico. La cantidad de anticuerpos protectores puede determinarse realizando la prueba con varias diluciones del suero.

Este tipo de pruebas no suele utilizarse para el diagnóstico de una infección, sino para conocer si la persona está protegida frente a un determinado virus o a una toxina, por haber pasado la enfermedad o por haber sido vacunada (gripe, difteria, etcétera).

Pruebas que permiten detectar la clase de inmunoglobulina

Las pruebas de aglutinación, fijación de complemento y neutralización que acaban de ser descritas, no permiten discriminar la clase de anticuerpo que se está detectando, ya que, tanto las IgM como las IgG, aunque con diferente eficacia, dan lugar a estas reacciones.

La determinación de la clase de anticuerpo del suero de un paciente que ha reaccionado con el antígeno puede efectuarse utilizando inmunoglobulinas marcadas que se unen a las distintas clases de anticuerpos.

La obtención de estas inmunoglobulinas (anticuerpos) es posible porque el fragmento Fc es diferente en cada clase de Ig, permitiendo la obtención en un animal como el conejo o la cabra— de anticuerpos dirigidos contra las diferentes clases de Ig humanas. En efecto, si se dispone de un antígeno humano de las clases IgM e IgG, puede inocularse a un animal el Fc de la IgM, y a otro el de la IgG, obteniéndose en el primero anticuerpos dirigidos contra las Ig de la clase M, y en el segundo contra las de la clase G. Una anti-IgM humana obtenida en un conejo conoce todas las IgM de todas las personas, sea cual sea la especificidad antigénica de las IgM humanas, pero reconoce las IgG, IgA, IgE o IgD. De la misma manera, las anti-IgG humanas obtenidas en un animal sólo reconocerán las Ig humanas de clase G, pero no las de las otras clases (Fig. 8.9).

Si los anticuerpos anti-IgG, anti-IgM o anti-IgA humanos, obtenidos en un animal y purificados, se marcan en la región Fc con una enzima, una sustancia fluorescente o quimioluminiscente, se dispone de un sistema para detectar específicamente la presencia de IgG, IgM o IgA en las reacciones serológicas según los procedimientos que se señalan a continuación¹⁰.

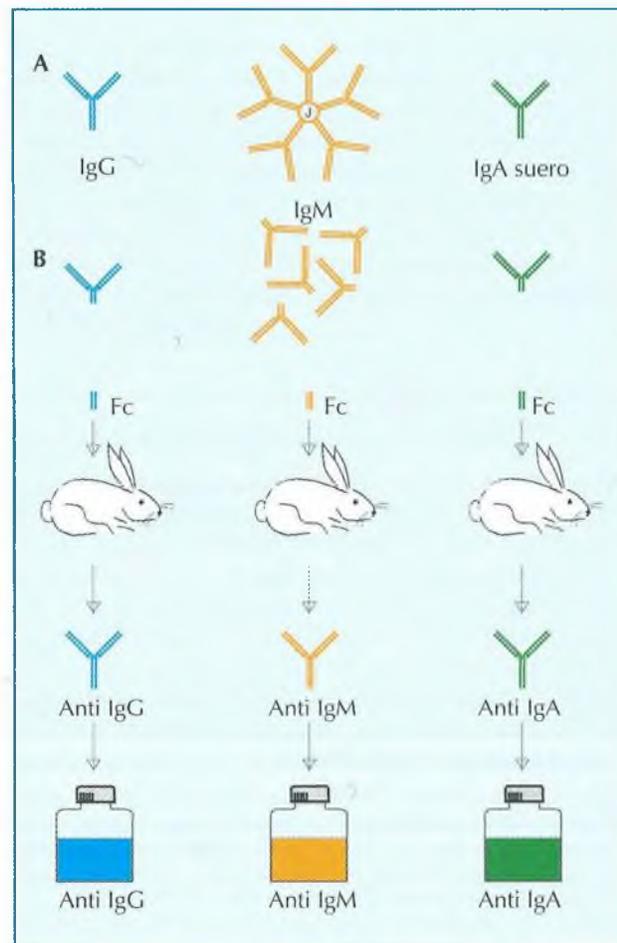


Figura 8.9. Detección de la clase de Ig.

Las pruebas serológicas se basan en la detección de anticuerpos del paciente dirigidos contra un determinado antígeno microbiano. Muchas de ellas no permiten conocer la clase de anticuerpos involucrados en la reacción, así sucede en las pruebas de aglutinación o de fijación del complemento. Para conocer el anticuerpo involucrado en la reacción serológica se aprovecha las diferencias entre las clases de Ig, que permiten obtener anticuerpos específicos contra cada una de ellas. Después pueden marcarse, como se ha mostrado en la figura 8.2, lo que permite detectar su presencia.

A. Las inmunoglobulinas humanas se diferencian por el fragmento Fc en cinco clases IgM, IgA, IgG, IgD, IgE (Figura 8.1).

B. El fragmento Fc se puede cortar con papaína y utilizarlo como antígeno para obtener en un conejo, una cabra u otro animal anticuerpos específicos contra una clase determinada de Ig humana (IgM, IgA, IgG, etcétera). Los anticuerpos se marcan con una enzima u otro marcador.

Pruebas de enzimoimmunoanálisis (ELISA)

Las pruebas de ELISA utilizadas en serología se basan en el mismo principio que las de detección de antígeno. En el ELISA indirecto se fija en el fondo de un pocillo el antígeno microbiano y se añade el suero de un paciente, lavándose después el pocillo; si el suero poseía anticuerpos contra ese antígeno, éstos se habrán fijado a él, arrastrándose mediante lavado el resto de las inmunoglobulinas existentes en el suero.

¹⁰ Véase más arriba, Marcado de las inmunoglobulinas.

A continuación se añaden anticuerpos dirigidos contra la IgG humana, que se han obtenido en el conejo y se han marcado con una enzima (anti-IgG^E). Si las IgG del suero del paciente se han fijado al antígeno, los anticuerpos de conejo marcados (anti-IgG^E) se unirán a ellas. Si el suero del paciente carece de anticuerpos contra el antígeno, los anti-IgG^E no podrán fijarse y serán arrastrados y eliminados por el lavado. Al añadir el sustrato incoloro, si se ha producido la reacción antígeno-anticuerpo, aparecerá color. (Ag-IgG-anti-IgG^E → sustrato incoloro = producto coloreado). Si el paciente carecía de anticuerpos contra el microbio, no se puede producir la reacción coloreada (Ag + sustrato incoloro)¹⁰ (Fig. 8.10).

Los antígenos pueden fijarse sobre membranas de nitrocelulosa para detectar la presencia de anticuerpos por una técnica rápida, consistente en bañar la membrana con el suero del paciente y revelar los anticuerpos fijados mediante anticuerpos marcados con una enzima, añadiendo posteriormente un sustrato. Se trata por tanto de una reacción de ELISA convencional, practicada sobre una membrana cuyo desarrollo puede completarse en un breve período de tiempo (Fig. 8.11).

Otra manera de desarrollar la reacción es la técnica del ELISA competitivo. El antígeno se fija a la fase sólida

(pocillos, bolas de plástico, etc.), como en el caso anterior, y se añade el suero del paciente y una cantidad conocida de anticuerpos contra el antígeno marcados con una enzima. La cantidad de anticuerpos marcados que se fijarán al antígeno (y que por tanto no serán arrastrados por el lavado) será proporcionalmente inversa a la cantidad de anticuerpos existentes en el suero del paciente, ya que



Figura 8.11. Serología. EIA en membrana.

Se han comercializado pruebas de EIA para estudio serológico (detección de anticuerpos). En ellas el antígeno está fijado a una membrana de nitrocelulosa. La prueba es sencilla de realizar y rápida, pudiendo obtenerse resultados en 15-30 minutos.

El control negativo (izquierda) se evidencia al añadir el suero del paciente, ya que en la línea horizontal hay anticuerpos antiglobulina humana, que captan las Ig del suero específicas para él, si están presentes (derecha). Los anticuerpos captados se revelan con una anti-IgG marcada con una enzima y la posterior adición de un sustrato. Por tanto, la línea horizontal aparece siempre y la vertical sólo si el suero es positivo. El desarrollo de la reacción es idéntico al señalado en la figura 8.10.

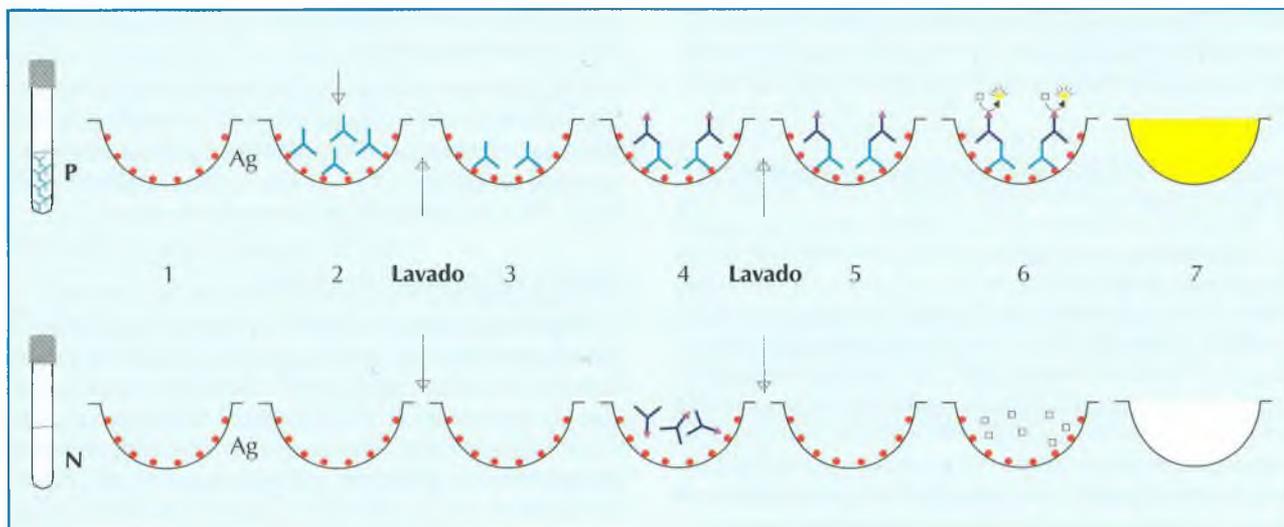


Figura 8.10. Serología. Técnica de enzimoanálisis (EIA).

Las técnicas de EIA se hallan entre las más utilizadas en serología y, en general, poseen un desarrollo semejante a las utilizadas para la detección de antígeno. Habitualmente estas pruebas se diseñan para detectar los anticuerpos de la clase IgG, ya que los resultados obtenidos con estos anticuerpos, desde el punto de vista cuantitativo, en la práctica, son equivalentes a la determinación de anticuerpos totales.

Arriba se muestra un suero positivo (P) para un determinado antígeno y abajo un suero negativo (N). 1) El pocillo lleva fijado el antígeno (Ag). 2) Se añade el suero del paciente. Arriba los anticuerpos se unen al antígeno, abajo no hay anticuerpos para ese antígeno. 3) Al lavar se eliminan todos los anticuerpos excepto los fijados al antígeno. 4) Se añade una anti-IgG humana marcada con una enzima (Δ), que arriba se fija a los anticuerpos unidos al antígeno que son en su gran mayoría IgG. Abajo no hay anticuerpos a los que unirse. 5) La anti-IgG no fijada es eliminada por el lavado. 6) Al añadir el sustrato, la enzima lo transforma en un compuesto coloreado. 7) La intensidad del color es proporcional a la cantidad de anticuerpos del suero.

¹⁰ La detección de los anticuerpos de la clase IgG, en la práctica y desde el punto de vista cuantitativo, tiene el mismo significado que la detección de «anticuerpos totales».

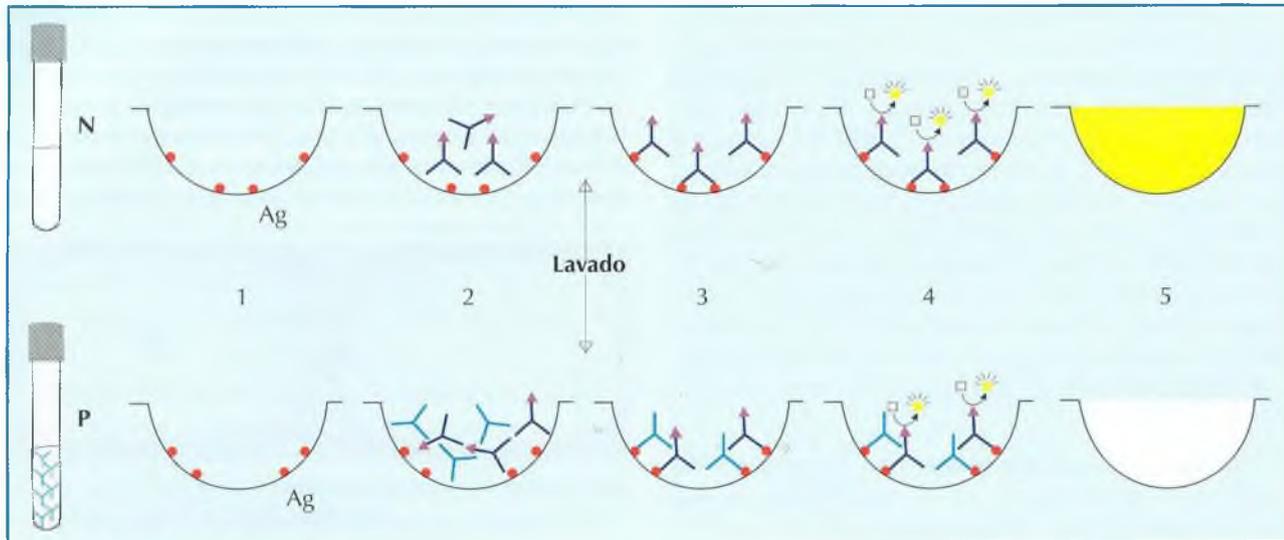


Figura 8.12. Serología. EIA competitivo.

En esta técnica, la cantidad de anticuerpos existentes en el suero del paciente se determina evaluando la capacidad que tienen para bloquear la fijación al antígeno de una cantidad conocida y fija de anticuerpos contra ese antígeno, marcados y añadidos simultáneamente con el suero del paciente.

En la hilera de arriba se muestra un suero negativo (N) y en la de abajo uno positivo (P). 1) En los pocillos se halla fijado el antígeno (Ag). 2) Se añade el suero del paciente y simultáneamente los anticuerpos contra el antígeno, marcados (Δ). 3) Arriba, como no hay anticuerpos en el suero del paciente, todos los anticuerpos marcados se fijan al antígeno. Abajo, el número de anticuerpos marcados fijado es menor, porque muchos antígenos han sido bloqueados por los anticuerpos del suero del paciente. 4) Al añadir el sustrato la señal es muy intensa arriba y menos intensa abajo. Por tanto, hay una relación inversa entre la cantidad de anticuerpos del paciente y la de anticuerpos marcados que se pueden unir al antígeno (a menos señal más anticuerpos del paciente y viceversa).

éstos también se fijarán al antígeno compitiendo con los anticuerpos marcados para unirse a él. Esta prueba suele tener mayor sensibilidad que su equivalente ELISA indirecto (Fig. 8.12).

Pruebas de enzimoimmunoanálisis para detección de IgM e IgA

Si se realiza una prueba de ELISA indirecto como la descrita en el apartado precedente, pero el anticuerpo marcado que se utiliza en la reacción es una anti-IgM humana, obtenida de un conejo o de una cabra, marcada con una enzima (anti-IgM^E), se detectará y cuantificará la presencia de IgM en el suero del paciente según la siguiente reacción: Ag-IgM-anti-IgM^E \rightarrow sustrato incoloro = producto coloreado. Si, por el contrario, los anticuerpos del suero del paciente frente a ese antígeno son de la clase IgG o no existe ningún anticuerpo frente a él, los anti-IgM^E no serán fijados, por lo que serán arrastrados por lavado. El sustrato permanece incoloro por ausencia de la enzima y la reacción es negativa (Fig. 8.13).

Por un procedimiento semejante pueden detectarse los anticuerpos de la clase IgA utilizando una anti-IgA marcada.

En estas reacciones enzimáticas la intensidad del color depende de la cantidad de anticuerpos marcados (anti-IgG^E, anti-IgM^E o anti-IgA^E), y ésta, a su vez, de la cantidad de anticuerpos del suero fijados al antígeno; por tanto, la lectura de la intensidad de color mediante un

colorímetro permite determinar la cantidad relativa de anticuerpos del paciente.

Los anticuerpos que revelan estas reacciones también pueden marcarse directamente con sustancias fluorescentes o lumínicas o con enzimas que actúan sobre sustratos dando lugar a un producto fluorescente o lumínico (Véase Marcado de las inmunoglobulinas).

Pruebas de inmunofluorescencia

Si se toma un portaobjetos y en tres zonas de su superficie se deposita una suspensión de un microorganismo, cada una de ellas puede bañarse con una dilución diferente de suero de un paciente (diluciones al 1/10; al 1/100 y al 1/500). Después de lavar el porta, se añade una solución de anticuerpos de conejo anti-IgG humana marcados con un producto fluorescente (anti-IgG^f).

Al observar al microscopio de fluorescencia, en los lugares donde se ha producido una reacción antígeno-anticuerpo (porque en el suero había anticuerpos, IgG, contra el microbio depositado), se verán los microorganismos fluorescentes debido a que el microorganismo (antígeno) se halla recubierto por la IgG del paciente, a la que se ha fijado la anti-IgG^f fluorescente. Si existen muchos anticuerpos, el suero diluido al 1/500 aún será positivo; si existen pocos, sólo será positiva la dilución al 1/100 o al 1/10. Si no hay anticuerpos en el suero, la reacción será negativa a todas las diluciones.

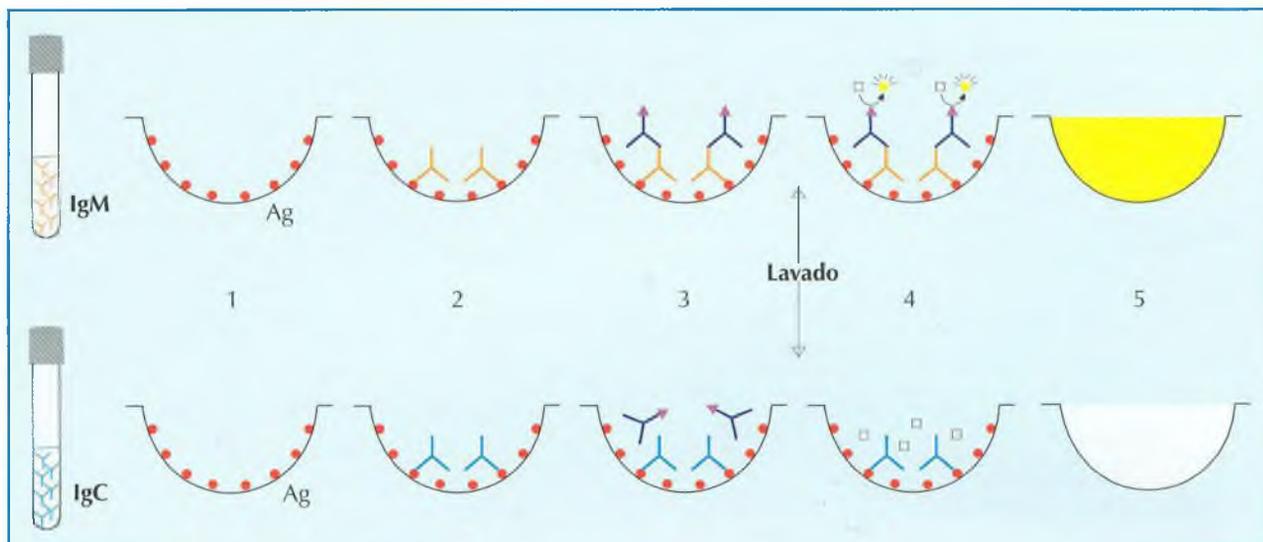


Figura 8.13. Serología. Determinación de la clase de inmunoglobulina (IgM, IgA).

En un proceso semejante al descrito en la figura 8.10, si el anticuerpo marcado es una anti-IgM o una anti-IgA humanas, obtenidas en un conejo o cabra, podrá determinarse la presencia específica de estas Ig en el suero del paciente.

En el ejemplo, se muestra arriba un suero con IgM para un antígeno y abajo otro suero con IgG para ese mismo antígeno. 1) Antígeno fijado a la placa (Ag). 2) Se añade el suero de los pacientes. Arriba las IgM específicas se unen al antígeno y abajo las IgG. 3) Se añade la anti-IgM marcada con una enzima, que se une a las IgM del paciente de arriba, pero no a las IgG del de abajo, por lo que en el primer caso no se arrastran al lavar, en tanto que abajo son arrastradas por el lavado. 4) Al añadir el sustrato la enzima lo transforma en un compuesto coloreado, cuya intensidad está en relación directa a la cantidad de IgM del paciente.

Si, alternativamente, los anticuerpos marcados son específicos para la IgM humana (anti-IgM^h), sólo aparecerán fluorescentes los microorganismos cuando en el suero del paciente existan IgM contra el antígeno microbiano estudiado. Por un procedimiento semejante, utilizando anti-IgA^f, también puede detectarse la presencia de IgA.

Métodos para incrementar la señal

Existen diversos métodos para incrementar la señal de estas reacciones; entre ellos, uno de los más utilizados es el sistema biotina-avidina, que sustituye al marcado directo de los anticuerpos con enzimas o sustancias fluorescentes. La biotina es una vitamina que puede unirse de modo covalente a los anticuerpos como los marcadores tradicionales. La avidina es una proteína que se encuentra en la clara de huevo y en los estreptococos (estreptavidina); se une a la biotina con una elevadísima afinidad, en la proporción de cuatro moléculas de biotina por una de avidina. Una técnica bastante utilizada, siguiendo los pasos de un ELISA indirecto, consiste en marcar con biotina la inmunoglobulina, que reaccionará con los anticuerpos del paciente, y añadir avidina marcada con una enzima u otro marcador (A^M) que se fija a la biotina. También puede añadirse avidina no marcada y después biotina marcada (B^M) con una enzima o una sustancia fluorescente, lumínica u otro marcador, uniéndose tres moléculas marcadas a cada avidina (Ag-Ac-Ac: B-Av-3 B^M). Este último método parece preferible

porque produce menos señal inespecífica (*background*). El sistema de amplificación de la señal puede usarse tanto para las técnicas de detección de antígeno previamente descritas como en las pruebas serológicas (Fig. 8.14).

La posibilidad de marcar las inmunoglobulinas con un pequeño fragmento de DNA permitirá amplificarlo por PCR, incrementando extraordinariamente la señal. Esta tecnología, introducida muy recientemente, se ha aplicado para la detección de antígeno en las infecciones causadas por VIH y en la hepatitis. El incremento de la sensibilidad de la técnica en estos ensayos ha sido espectacular (Fig. 8.15).

Especificidad de las reacciones. Técnicas de captura

En ocasiones, una prueba serológica para detectar las IgM frente a un antígeno microbiano puede dar un resultado negativo falso, debido a que en el suero del paciente existe un gran exceso de IgG, en relación a la IgM, contra ese mismo antígeno. En ese caso, las IgG se unen al antígeno saturándolo e impidiendo la unión de las IgM cuyo número es menor y son arrastradas en el lavado, siendo el resultado negativo a pesar de la existencia en el suero de IgM específicas contra el antígeno (Fig. 8.16).

En otras circunstancias pueden obtenerse resultados falsos positivos. Algunas personas poseen en su suero inmunoglobulinas de la clase M que reaccionan con el Fc de sus propias IgG, generalmente después que éstas

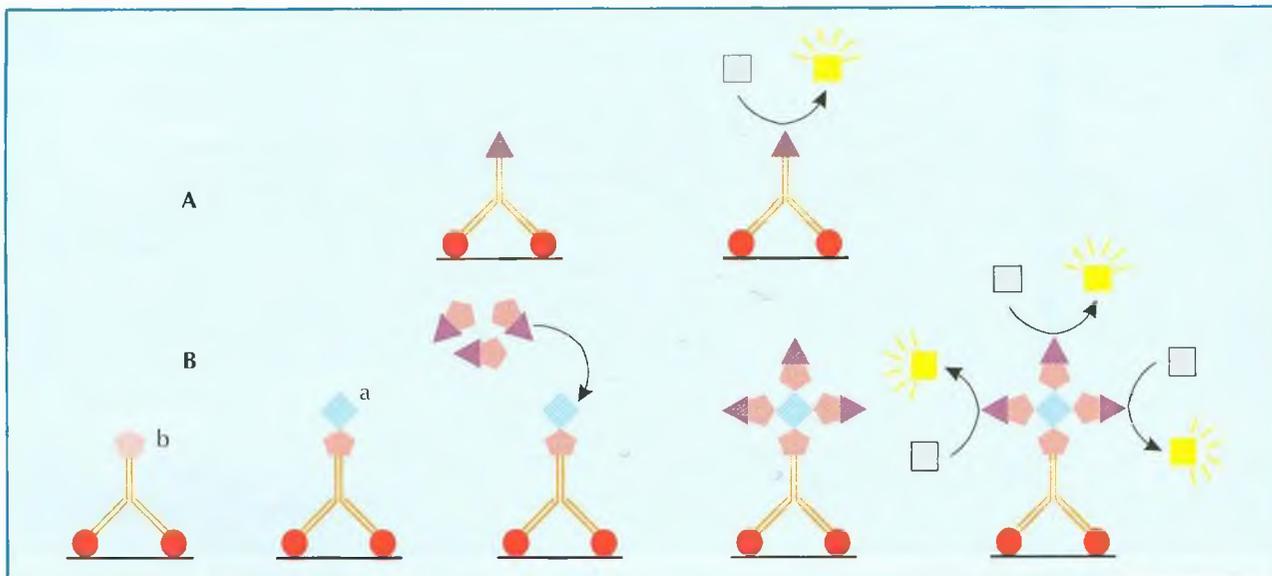


Figura 8.14. Amplificación de la señal.

A. Ig marcada con una enzima (Δ), con este tipo de marcado cada Ig posee una molécula de enzima que actúa sobre el sustrato.

B. Ig marcada con una molécula de biotina (b), se puede añadir una molécula de avidina (a) que posee cuatro puntos de unión de gran afinidad con la biotina. Posteriormente, se puede añadir biotina unida a una enzima (Δ) que encontrará tres locos libres en la avidina para unirse a ella, por lo que se incrementa la intensidad de la señal al disponer cada Ig de tres moléculas de enzima.

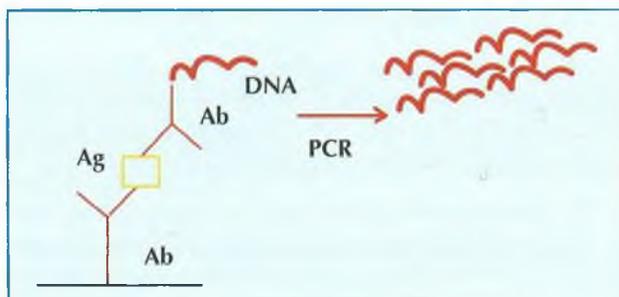


Figura 8.15. Inmuno PCR.

Si en lugar de marcar un anticuerpo con una enzima, una sustancia fluorescente o lumínica, se marca con un fragmento de DNA, éste, posteriormente, puede amplificarse mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con lo que la sensibilidad incrementa extraordinariamente.

(Véase Reacción en cadena de la polimerasa. Capítulo 9).

hayan encontrado y reaccionado con su antígeno. Estas IgM son autoanticuerpos y constituyen el denominado factor reumatoide. El factor reumatoide (IgM^{FR}) puede dar en una prueba de ELISA un falso positivo para IgM en un paciente únicamente con IgG para un determinado antígeno. En este caso, el antígeno fijado a la placa reacciona con los anticuerpos de la clase IgG específicos para él, a los que se une el factor reumatoide del suero del propio paciente (que es una IgM anti-IgG). Al añadir la anti-IgM marcada, ésta reacciona con el factor reumatoide en lugar de ser eliminada por lavado, obteniéndose un resultado positivo falso. (Ag-IgG-IgM^{FR}-Anti IgM^F → sustrato incoloro = producto coloreado) (Fig. 8.16).

Tanto los falsos negativos como los falsos positivos pueden evitarse eliminando previamente las IgG del suero mediante anticuerpos anti-IgG que precipitan las IgG¹². En el caso específico del factor reumatoide puede precipitarse con IgG agregada. En la actualidad, el método más utilizado para evitar estos problemas es una técnica inmunoenzimática de captura.

La técnica de captura se basa en fijar al pocillo una anti-IgM humana, que captará todas las IgM del suero del paciente, eliminándose por lavado las inmunoglobulinas de las otras clases existentes en el suero. A continuación se añade el antígeno y, si los anticuerpos de la clase M capturados son específicos para ese antígeno, éste será fijado por ellos; si no, el antígeno será eliminado por el lavado. Al añadir seguidamente un anticuerpo marcado, dirigido contra el antígeno, si éste ha sido previamente captado, se producirá la señal (Anti-IgM-IgM-Ag-IgG^M → sustrato = color). En general, en todas estas pruebas, los anticuerpos policlonales se utilizan para la captura, y los monoclonales marcados para la señal, lo que mejora la especificidad (Fig. 8.17). Ninguna de estas pruebas puede garantizar una sensibilidad y especificidad absoluta, por lo que hay que ser muy prudente con los resultados, en particular los positivos.

Determinación de la avidéz de las IgG

Ya se ha señalado que las IgM son indicadoras de infección reciente por su aparición temprana y su desa-

¹² RF Absobent, bioMérieux, Dade Behring, Inc., Virotech.

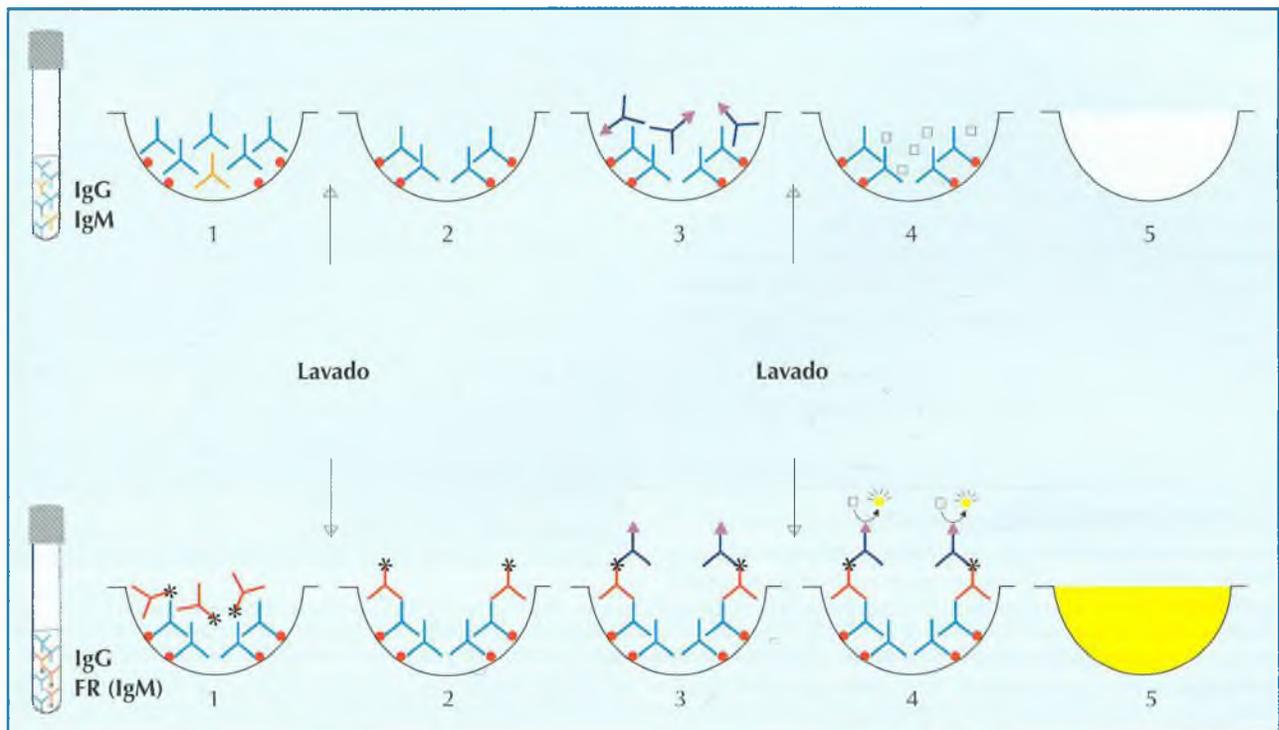


Figura 8.16. Reacciones serológicas inespecíficas.

Si en el suero de un paciente con IgG e IgM contra un mismo antígeno, existe un gran exceso de IgG, ésta puede saturar el antígeno, impidiendo la fijación de la IgM y dando un resultado falsamente negativo para IgM. Por el contrario, la presencia de factor reumatoide (que es una IgM del paciente, que reacciona con sus propias IgG) hace que un suero con IgG contra un antígeno, pero sin IgM contra él, aparezca como si tuviera IgM específica, dando un falso positivo.

En la fila de arriba, 1) el gran exceso de IgG en un suero en el que también hay IgM, bloquea al antígeno e impide la fijación de la IgM 2) que es arrastrada por el lavado. 3) La anti-IgM marcada (Δ) no encuentra IgM y 4) es eliminada al lavar (Falso negativo).

En la fila de abajo, 1) existe IgG contra el antígeno, que se fija a él; pero no hay IgM. 2) El factor reumatoide (Ig, con asterisco*), que es una IgM anti IgG, se une a la IgG que ha reaccionado con el antígeno y, posteriormente, 3) se une a él la anti-IgM humana marcada, 4) dando la señal positiva (falso positivo).

aparición precoz tras la infección (cuatro a seis meses), pero en ocasiones pueden persistir durante más tiempo y por ello se investigan otras Ig, como las IgA o las IgG de baja avidéz para evidenciar una infección actual. Las IgG, cuya síntesis se inicia también de modo muy temprano, durante un período inicial de alrededor de cuatro a seis meses poseen baja afinidad en su unión al antígeno. Para detectar estas IgG, se efectúa por duplicado una prueba de ELISA convencional como la señalada anteriormente (Véase: *Pruebas de enzimoimmunoanálisis* y Fig. 8.10) y en una de ellas, después de añadir el suero del paciente, se añade una sustancia desestabilizadora de la unión del antígeno con el anticuerpo (como la urea); las IgG de baja afinidad que han reaccionado con su antígeno se disocian por acción de la urea y son arrastradas por el lavado. Por tanto, si la prueba sin urea es positiva y se negativiza en presencia de urea, significa que los anticuerpos son de baja afinidad y, por tanto, se trata de una infección reciente, mientras que si ambas pruebas son positivas, los anticuerpos son de alta afinidad y muy probablemente se trata de una infección pasada (más de seis meses).

Pruebas que discriminan el antígeno

Cuando se realiza una prueba serológica frente a un microorganismo que posee diversas macromoléculas antigénicas y la reacción es positiva, no puede saberse contra cuál o cuáles de ellas se ha producido la respuesta inmunitaria.

En ocasiones es importante conocer contra qué antígeno o antígenos de un microorganismo se han producido anticuerpos, por ejemplo, cuando solo algunos antígenos de un microorganismo son específicos, en tanto que otros presentan reacciones cruzadas con los de otros microorganismos, o bien cuando la respuesta frente a un determinado antígeno posee significado clínico especial (criterio de gravedad, evolución a la cronicidad, pronóstico, etc.). Uno de los objetivos habitualmente perseguidos por estas técnicas es confirmar la especificidad de un resultado positivo previo obtenido en una reacción efectuada con una mezcla antigénica (prueba confirmatoria).

Existen fundamentalmente dos métodos para discriminar el antígeno frente al que se producen anticuerpos;

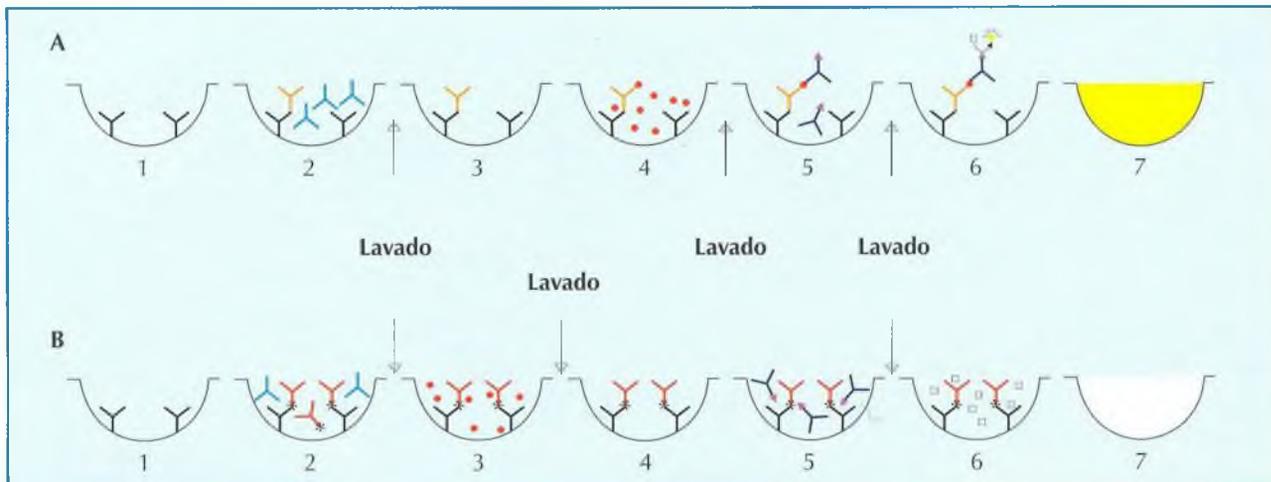


Figura 8.17. Técnica de captura.

Para evitar los falsos negativos o positivos por las razones indicadas en la figura anterior, se puede utilizar una técnica de captura como la que se señala a continuación.

A. Eliminación de un falso negativo. 1) En el pocillo se fija una anti-IgM humana obtenida en conejo. 2) Se añade el suero del paciente. 3) Se captan las IgM del suero, siendo eliminadas por el lavado el resto de las Ig, incluyendo las IgG aunque estén en abundancia. 4) Se añade el antígeno que es captado por las IgM específicas y a continuación 5) una Ig marcada con una enzima dirigida contra el antígeno, que 6) colorea el sustrato.

B. Eliminación de un falso positivo. 1) En el pocillo se ha fijado una anti-IgM humana obtenida en conejo. 2) Se añade el suero. Las anti-IgM fijan al factor reumatoide y las IgG se eliminan por lavado. 3) Se añade el antígeno; pero el factor reumatoide no lo capta y 4) es eliminado por lavado. 5) Por ello las inmunoglobulinas marcadas dirigidas contra el antígeno no se fijan y son eliminadas por el lavado. 6) al añadir el sustrato en ausencia de enzima no cambia de color.

el primero consiste en utilizar antígenos absolutamente purificados e individualizados en cualquiera de las pruebas anteriores, como las de ELISA (en el comercio se encuentran antígenos purificados, obtenidos por ingeniería genética o por síntesis), y el segundo consiste en separar los antígenos de la mezcla en la primera etapa de la reacción serológica, lo que requiere técnicas específicas, como la inmunoelectroforesis o el *Western blot*, siendo esta última la más utilizada.

Western blot

En el inmunoblot o *Western blot* los diferentes antígenos proteicos de un microorganismo, extraídos por distintos métodos, se separan por electroforesis en un gel de poliacrilamida en función de su peso molecular (véase el capítulo 10. Electroforesis de proteínas).

El gel en el que se ha practicado la electroforesis no es apto para realizar reacciones serológicas, por lo que se deposita sobre él una membrana de nitrocelulosa o nilón a la que se transfieren los antígenos y en la que pueden efectuarse las reacciones serológicas. Para ello, la tira de nitrocelulosa con los antígenos separados, transferidos y fijados se baña con el suero del paciente y los anticuerpos se fijan a sus respectivos antígenos. La reacción antígeno-anticuerpo se revela mediante una IgG de animal anti-IgG humana marcada con una enzima, de modo que al añadir un sustrato incoloro aparece una banda coloreada por la acción enzimática (Fig. 8.18).

En la actualidad se tiende a utilizar una técnica mixta; los antígenos se producen por técnica recombinante o por síntesis y se deposita cada uno de ellos directamente en bandas separadas de una tira de nitrocelulosa. Cuando son depositados y fijados sobre la membrana de nitrocelulosa antígenos obtenidos por técnica recombinante, la prueba se denomina genéricamente RIBA (*Recombinant Immuno Blot Assay*), o LIA (*Line Immunoassay*) si se utilizan antígenos sintéticos.

DETECCIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR

En las personas infectadas con microorganismos persistentes en los macrófagos, la respuesta inmunitaria corre a cargo de los linfocitos T CD4, quienes al reconocer a los antígenos microbianos en la superficie de los macrófagos producen citoquinas proinflamatorias e interferón γ , que activan a estos fagocitos, los cuales en estas condiciones destruyen los microbios patógenos (véase el capítulo 21). A diferencia de la producción de anticuerpos, esta respuesta es difícil de detectar *in vitro*. Sin embargo, cuando se inocula intradérmicamente a una persona el extracto de un microorganismo previamente inactivado, si ésta se halla infectada por el microorganismo, se activarán los linfocitos T CD4 (Th_1), que a su vez activan a los macrófagos desencadenando una reacción inflamatoria local intensa de aparición a las 36-48 horas en el lugar de la inoculación, que suele persistir entre cinco y siete días (intradérmica reacción). Por tanto, las pruebas intradérmicas permiten detectar la respuesta de tipo celular (linfocitos T CD4) frente a un antígeno microbiano.

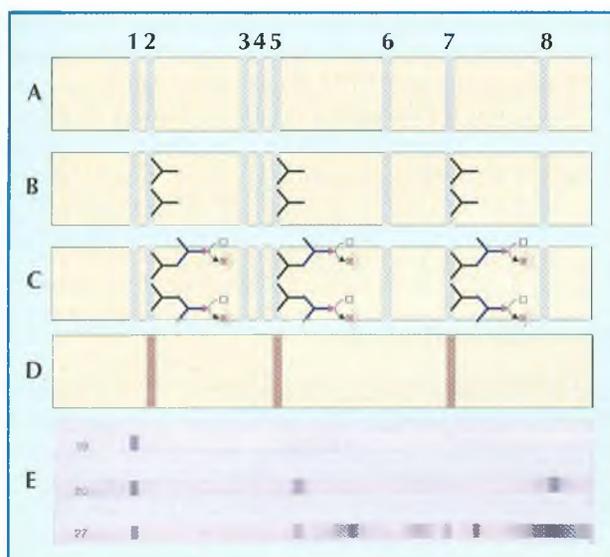


Figura 8.18. Western blot.

El *Western blot* requiere separar por electroforesis en un gel de poliacrilamida, los diferentes antígenos proteicos de una mezcla antigénica extraída de un microorganismo. Posteriormente las bandas antigénicas se transfieren a una tira de nitrocelulosa (transferencia de *Western, blotting*). La transferencia a nitrocelulosa se efectúa porque los procesos técnicos a desarrollar posteriormente es preferible efectuarlos con los antígenos fijados a esta sustancia. Estos aspectos no se recogen en esta figura, en la que se muestra la tira de nitrocelulosa con la transferencia ya efectuada.

A. Tira de nitrocelulosa con las diferentes bandas antigénicas transferidas.

B. Se baña la tira con el suero del paciente. Los diferentes anticuerpos se fijan a su fracción antigénica correspondiente.

C. La reacción antígeno-anticuerpo que se ha producido, se revela con anticuerpos de conejo antiglobulina humana, marcados con una enzima. Se lava la tira para eliminar los anticuerpos marcados no fijados y después se añade el sustrato. Si los anticuerpos con la enzima se han fijado a los humanos, hidrolizan el sustrato volviéndolo coloreado, observándose una mancha de color en la banda de reacción positiva.

D. En el ejemplo, puede verse que en el suero problema existían anticuerpos frente a las fracciones (bandas) 2, 5 y 7 y no había anticuerpos frente a los antígenos de las bandas 1, 3, 4, 6 y 8.

E. Abajo puede verse el aspecto real de una prueba de *Western blot*. Se ha introducido un suero positivo débil y dos positivos fuertes. La última banda de la derecha es el control de suero (Bioblot HIV-1 Plus. biokit S.A.).

En la actualidad también se utilizan tiras, en las que se ha depositado directamente en diferentes bandas, sin necesidad de transferencia, antígenos obtenidos por ingeniería genética o síntesis química (RIBA o LIA).

Estas pruebas sólo pueden realizarse para detectar la infección por microorganismos que despiertan una respuesta inmunitaria de tipo celular, pero no informan sobre si el microorganismo está en latencia o causando una infección activa, ya que, en ambos casos, es positiva. La prueba más empleada es la de Mantoux, que utiliza un extracto de *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculina vieja de Koch o derivados proteicos purificados —PPD— de la misma). Para realizarla se inocular intradérmicamente 0,1 ml del extracto, y, si la prueba es positiva, a las 36-48 horas aparece una pápula, debido a la infiltración de linfocitos y macrófagos, que alcanza el máximo alrededor de las 72 horas. La reacción infiltrativa desaparece a los 5-10 días. También se practican

pruebas intradérmicas para el diagnóstico de la histoplasmosis y la leishmaniasis (Fig. 4.9).

Recientemente se ha introducido una prueba que detecta *in vitro* la infección por *M. tuberculosis*. (Quantiferon®-TB Gold, Cellestis). La prueba se basa en la extracción de una muestra de sangre del paciente, que se introduce en un tubo con heparina, al que se añade PPD (antígeno proteico de *M. tuberculosis*), incubándose la mezcla durante 12-24 horas. Después, se determina en el sobrenadante de la muestra (plasma) mediante una técnica de ELISA la cantidad de INF- γ producido por los linfocitos T CD4. La sensibilidad y especificidad de esta prueba está siendo evaluada.

Control de calidad

El control de calidad es imprescindible en todas las pruebas inmunológicas, debiendo tenerse en cuenta diversos aspectos relacionados con él.

Para verificar el buen funcionamiento de los reactivos es importante introducir en cada ensayo un control positivo y uno negativo, incluso en aquellos casos que no vayan incorporados en la presentación comercializada por el fabricante. Si no se hallan incluidos en el equipo comercial y no se dispone de muestras positivas propias, cabe la posibilidad de comprar controles comercializados y estandarizados. En la actualidad existen laboratorios que disponen de una gama bastante amplia de controles positivos de diferentes microorganismos (Bio-Rad Laboratories Inc.; Cromakit).

Además, en las técnicas de aglutinación pasiva o facilitada es importante disponer de un control de partículas no sensibilizadas para verificar que la reacción de aglutinación es específica. En las técnicas de EIA automatizadas es imprescindible la incorporación de un calibrador, tanto para validar el ensayo como para cuantificar los anticuerpos en relación con estándares internacionales. Por otro lado, los sistemas automáticos van incorporando alarmas internas del propio aparato que permiten controlar la caducidad de los reactivos y el buen funcionamiento del lector del código de barras con sistema de identificación positiva de cada muestra en el momento de procesamiento, del pipeteo (presencia de burbujas, volumen insuficiente de muestra o reactivo, obturación de la sonda de aspiración, etc.), de la temperatura de incubación de la reacción o de refrigeración de los reactivos y del lector (fotómetro, luminómetro, etcétera).

Diagnóstico serológico de las enfermedades infecciosas

Durante muchos años las pruebas serológicas se han utilizado para el diagnóstico de infecciones causadas por microorganismos de difícil o imposible observación microscópica y cultivo por métodos convencionales. Empleaban técnicas que exigen disponer de dos sueros

obtenidos con tres semanas de diferencia, por lo que el resultado era tardío y generalmente sólo tenía valor retrospectivo.

La introducción de técnicas para detectar las Ig de fase aguda (IgM, IgA e IgG de baja afinidad) ha permitido disponer de pruebas basadas en una única muestra de suero que son eficientes para el diagnóstico de algunas enfermedades infecciosas, como, por ejemplo, la hepatitis A, la hepatitis B, la rubéola, la mononucleosis infecciosa, la infección por el citomegalovirus o la toxoplasmosis.

Aparte de su valor en el diagnóstico de una infección actual, las pruebas serológicas también permiten conocer si en el pasado una persona ha padecido una determinada infección. Si la infección corresponde a un virus persistente, significa que ese virus se halla en estado latente en la persona seropositiva (herpes simple, varicela, citomegalovirus, Epstein-Barr, virus de la inmunodeficiencia humana, etcétera).

La constatación de un determinado título de anticuerpos frente a un microorganismo, permite conocer el estado de inmunidad frente a él, siempre que los anticuerpos detectados correspondan a los que poseen capacidad protectora (por ejemplo, en la hepatitis B, los anti-HBs indican inmunidad, pero no los anti-HBc).

Por último, los estudios de seroprevalencia permiten conocer la distribución de una enfermedad entre la población estudiada.

La elección de una prueba según su sensibilidad y especificidad viene condicionada por el objetivo perseguido —diagnóstico *versus* seroprevalencia—. Otros factores que pueden influir en la selección serán la rapidez, la sencillez y el precio.

A continuación se indican algunos síndromes o infecciones en los que el diagnóstico serológico posee utilidad. Sólo se hace referencia a las pruebas para las que existen reactivos comercializados.

Infección estreptocócica

El diagnóstico por cultivo de las infecciones faríngeas por el estreptococo β -hemolítico del grupo A es poco específico, por lo que puede complementarse estudiando el título de antiestrepolisina O (AST O) y anti-DNAse B. Estas pruebas también son útiles para diagnosticar la etiología de un cuadro de glomerulonefritis aguda o fiebre reumática. Cuando no se dispone de dos sueros, precoz y tardío, se consideraran positivas cuando el título de la reacción sea superior al doble de la media de la población del ámbito donde se trabaja. La

anti-DNAse es más útil para el diagnóstico de las glomerulonefritis secuentes a infecciones estreptocócicas cutáneas, ya que las AST O apenas incrementan su título¹³. Los anticuerpos contra el carbohidrato A de grupo (anti-A-CHO) presentan títulos muy altos y estables en presencia de carditis reumática. En efecto, una enfermedad valvular antigua en un niño con un título de AST y anti-DNAse normal, pero anti-A-CHO elevada es, con toda probabilidad, de origen reumático.

Infecciones respiratorias

La serología ha sido muy utilizada para el diagnóstico de las infecciones broncopulmonares causadas por virus respiratorios, como los virus de la gripe, el respiratorio sincitial, parainfluenza y adenovirus; pero no existen antígenos comercializados para coronavirus. Para el diagnóstico de las neumonías también suele introducirse en esta batería los antígenos de micoplasma, clamidia y coxiela (fiebre Q). Aunque la fijación del complemento (FC) continúa siendo la prueba de referencia y su formato semiautomatizado es útil y práctico, en la actualidad se han ido introduciendo otras técnicas más sencillas, susceptibles de mayor automatización, como la aglutinación pasiva (micoplasma), el ELISA (micoplasma y virus respiratorios), inmunofluorescencia para clamidias¹⁴, coxiela y virus respiratorios. Aunque el diagnóstico de infección aguda requiere demostrar una seroconversión, la detección de un título de IgM permite efectuar un diagnóstico con bastante especificidad. Probablemente, estas pruebas serán sustituidas en el futuro por las de detección de antígeno y en particular por las genéticas, excepto para estudios epidemiológicos y retrospectivos.

Para el diagnóstico serológico de las infecciones pulmonares por micoplasma existen diversas pruebas comercializadas que incluyen, además de la de FC, las de ELISA IgG e IgM de captura, ELISA en *dot*, inmunofluorescencia, hemoaglutinación y aglutinación pasiva en diversos soportes como látex y otros. La recomendación es comparar dos sueros, aunque en general un título alto del primer suero con clínica compatible suele ser diagnóstico.

Las infecciones respiratorias por *Chlamydia trachomatis* se dan en el recién nacido y se diagnostican detectando IgM específicas por microinmunofluorescencia o ELISA con antígenos especie-específicos.

Las infecciones por *Chlamydia pneumoniae* pueden presentar cuadros agudos o corresponder a formas persistentes y no se conoce con precisión la significación de los resultados serológicos en relación a ellas, aunque la seroconversión o la presencia de títulos altos de IgM

¹³ La faringitis estreptocócica pueden dar lugar a fiebre reumática y glomerulonefritis aguda, en tanto que las infecciones cutáneas por estreptococo sólo dan lugar a esta última complicación.

¹⁴ Las pruebas de IF para *Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia pneumoniae* utilizan antígenos específicos de especie.

(> 1/16) o de IgG (> 1/512) por microinmunofluorescencia, generalmente se asocian a enfermedad aguda.

Existen kits de ELISA con antígeno lipopolisacárido y con proteínas de membrana externa recombinantes. En la actualidad poseen menor sensibilidad que el *gold standard* para el diagnóstico de las infecciones por clamidia, que es la microinmunofluorescencia. Será de gran trascendencia disponer de pruebas sensibles y específicas para *C. pneumoniae* de cara a poder definir el perfil de su patogenicidad.

La infección por legionela suele presentar características clínicas y epidemiológicas que sugieren su presencia, aunque en ocasiones el cuadro puede ser inespecífico. La técnica serológica de referencia es la inmunofluorescencia (IF). La seroconversión suele producirse de manera tardía (50% dos semanas después de iniciarse la enfermedad, 75% la tercera semana, 90% la cuarta y el resto la novena). La recomendación canónica es utilizar una técnica de IF con antígeno de *L. pneumophila* serogrupo 1. La técnica de ELISA es un excelente método de cribado con las segundas muestras (suero de convalecencia); en las positivas debe estudiarse el par de sueros por IF para confirmar la infección.

Infecciones gastrointestinales

El diagnóstico de la primoinfección por *Helicobacter pylori* puede realizarse mediante la detección de IgM por ELISA, pero las pruebas serológicas son más adecuadas para estudios epidemiológicos de seroprevalencia, en tanto que para el diagnóstico de la infección con fines clínicos y en particular para demostrar la erradicación del microorganismo es preferible utilizar el test del aliento o técnicas de detección de antígeno en las heces (ELISA). Se ha sugerido que el *Western blot* permite detectar anticuerpos contra antígenos asociados a la úlcera y el carcinoma gástrico como CagA.

El diagnóstico serológico de las infecciones por *Salmonella enterica* serovar Typhi (fiebre tifoidea) da lugar a muchos resultados falsos positivos y negativos. Para este diagnóstico se han sugerido diversas pruebas con antígeno lipopolisacárido, con antígeno Vi y detectando anticuerpos de las clases IgG, IgM e IgA. Tanto la infección aguda como el estado de portador son de difícil diagnóstico con estos métodos por las reacciones cruzadas con antígenos de otras enterobacterias.

En la práctica, para el diagnóstico de las enteritis, la serología sólo se utiliza para detectar la infección invasiva por *Entamoeba histolytica* (véase más abajo).

Brucelosis

Cuando un paciente presenta los primeros síntomas clínicos de brucelosis, ya existen anticuerpos en el suero, en particular los anti-LPS detectados por aglutinación.

El diagnóstico de brucelosis en las áreas no endémicas no suele ser difícil, ya que la población es regularmente seronegativa, y se efectúa mediante técnicas de aglutinación en tubo o bien en portaobjetos como el rosa de Bengala, prueba que con reactivos de buena calidad es exquisitamente sensible y específica. En las zonas endémicas o en personas expuestas (veterinarios) la infección asintomática o latente puede confundirse serológicamente con la enfermedad activa, excepto cuando la clínica es muy característica y existen títulos altos detectados por la técnica de aglutinación ($\geq 1/160$) y la prueba de Coombs, que detecta anticuerpos no aglutinantes. La determinación de IgM por ELISA puede ayudar al diagnóstico de la primoinfección. La inmunocromatografía (*Brucella capt*) permite determinar con gran sencillez la presencia en el suero de IgM e IgG, lo que es extraordinariamente útil en ámbitos donde no hay fácil acceso a un centro de referencia. En las reactivaciones incrementan las IgG, IgA y el Coombs, pero mucho menos o nada las IgM. Los anticuerpos anti-proteína de membrana externa parecen ser marcadores de actividad muy sensibles.

Mononucleosis

Existen varios microorganismos que en la primoinfección pueden dar lugar a un síndrome de mononucleosis, como el virus de Epstein-Barr, el citomegalovirus, el toxoplasma y el virus de la inmunodeficiencia humana entre los más comunes, pero también pueden provocar este cuadro clínico los virus de la rubéola, el herpesvirus humano 6 o una reacción medicamentosa. Para el diagnóstico de estas infecciones se utilizan técnicas que permiten detectar la presencia de IgM.

En el caso de la mononucleosis causada por el virus de Epstein-Barr (EBV), el método de elección para el diagnóstico es la serología. La determinación de los anticuerpos heterófilos por la técnica tradicional (Paul y Bunnell) o mediante un kit comercial de aglutinación o ELISA suele ser suficiente para el diagnóstico de un paciente con clínica de mononucleosis típica. Cuando el Paul y Bunnell es negativo, lo que es frecuente en niños, puede recurrirse a la determinación de anticuerpos dirigidos contra antígenos víricos específicos, como los VCA (antígenos de la cápsida) o los EBNA (antígenos nucleares del virus de Epstein-Barr). La demostración de IgM anti-VCA tiene en la práctica valor diagnóstico de infección aguda. En esta fase, la IgG anti-VCA también es positiva y el anti-EBNA negativo. En la infección pasada (latente), las IgG frente a ambos marcadores son positivas, con la IgM anti-VCA negativa. El título de IgM anti-VCA en niños puede ser bajo. Para realizar estas pruebas existen kits comercializados de IFI y de ELISA, pero los primeros se consideran la referencia. Otras situaciones clínicas causadas por el EBV requieren estudios serológicos especializados.

Infecciones por herpesvirus

El estudio serológico de las infecciones por los virus del herpes simple 1 y 2, de la varicela-zoster y citomegalovirus puede tener un objetivo diagnóstico de infección aguda, o, más frecuentemente, puede interesar conocer si el paciente está infectado y por tanto si es portador del virus, lo que tiene interés sobre todo en pacientes inmunodeprimidos para prever las complicaciones y efectuar una profilaxis si esta indicada. Existen diversas pruebas serológicas, como las de fijación de complemento, neutralización, o látex, pero en la actualidad existen en el mercado pruebas de inmunofluorescencia o ELISA comercializadas por numerosas firmas. Algunos antígenos permiten diferenciar el HHV 1 del HHV 2. La inmunofluorescencia es probablemente el *gold standard* para el serodiagnóstico de las infecciones por herpes y varicela.

La primoinfección por citomegalovirus se diagnostica mediante constatación de la seroconversión. La presencia de IgM debe evaluarse con cuidado, ya que en algún caso persisten durante mucho tiempo, pueden reaparecer en las reactivaciones y también pueden aparecer anticuerpos heterotópicos anti-CMV de la clase IgM en infecciones por virus de Epstein-Barr. Las IgG de baja afinidad en un paciente con IgM anti-CMV pueden ayudar al diagnóstico de infección actual. La infección congénita puede descartarse determinando las IgM fetales. La determinación de la seropositividad de un paciente o donante de órgano en caso de urgencia puede realizarse por pruebas de látex, que son sensibles y específicas. La serología es poco útil para el diagnóstico de las reactivaciones en pacientes inmunodeprimidos por la debilidad de la respuesta inmune y la administración de transfusiones y sueros con inmunoglobulinas. Tampoco parece útil el estudio inmunológico de líquidos oculares para el diagnóstico de la retinitis.

La primoinfección por HHV 6 —roseola— suele darse en la infancia (entre 3 y 5 años 95% seropositivos). Su diagnóstico se basa en la detección de la seroconversión o alternativamente la detección de IgG de baja afinidad. La determinación de las IgM posee poco valor por su persistencia, pero puede tener significado en ausencia de IgG. Puede reaparecer en las reactivaciones.

Parvovirus B 19

Causa enfermedades muy variadas al hombre, exantema (quinta enfermedad), artritis, crisis aplásicas, infección congénita o infección grave en pacientes inmunodeprimidos como aplasia persistente. El diagnóstico serológico de infección actual se lleva a cabo por la detección de IgM por ELISA. Es recomendable estudiar pares de sueros para evidenciar la seroconversión. La IgG

denota infección pasada. En los pacientes inmunodeprimidos el diagnóstico serológico es difícil.

Enfermedades exantemáticas

Aunque muchísimas infecciones pueden incluir un exantema en su cuadro clínico, el exantema es propio y relativamente característico de procesos como la escarlatina (*Streptococcus pyogenes*), la fiebre tifoidea (*S. enterica* serovar Typhi), las rickettsiosis, la varicela (mácula, vesícula y pústula), la rubéola, el sarampión, la roseola o exantema súbito (herpesvirus humano 6) y la quinta enfermedad (parvovirus B 19), así como de los agentes de mononucleosis señalados más arriba.

Existen diferentes pruebas serológicas para el diagnóstico de las infecciones causadas por estos microorganismos, aunque en algunos casos es preferible utilizar técnicas alternativas de diagnóstico directo (cultivo, detección de antígeno, amplificación genética).

Hepatitis

Las hepatitis están causadas por cinco virus denominados por letras A a la E. Otros virus, como el de Epstein-Barr, el citomegalovirus, el virus de la fiebre amarilla o bacterias como la coxiela, entre otros microorganismos, pueden producir afectación hepática clínica o subclínica.

El diagnóstico de las hepatitis víricas se realiza mediante pruebas serológicas. La hepatitis B también se diagnostica mediante la detección del antígeno HBsAg. En el capítulo 20 se presenta el diagnóstico de las hepatitis.

Sífilis

El diagnóstico de la sífilis es fundamentalmente serológico. Entre las pruebas que utilizan antígeno no treponémico (cardiolipina), el RPR es una prueba de aglutinación-floculación sencilla y sensible. Estas pruebas pueden dar falsos positivos, en particular en la endocarditis bacteriana subaguda, el lupus eritematoso, enfermedades hepáticas e hipergammaglobulinemia; por ello, la especificidad de las reacciones positivas debe confirmarse con una prueba treponémica; en la actualidad, por su sencillez y elevada especificidad, se recomienda la hemoaglutinación pasiva (TPHA) o la TPPA, en la que el antígeno treponémico está unido a partículas de gelatina en lugar de hemáties. Aunque tradicionalmente el *gold standard* para la confirmación eran las pruebas treponémicas de inmunofluorescencia (FTA-ABS), hoy se utilizan la TPHA o TPPA por su mayor sencillez. Las pruebas reagínicas¹⁵ (RPR, VDRL) cuantitativas son de elección

¹⁵ Las pruebas no treponémicas se denominan reagínicas porque los anticuerpos que detectan, que reaccionan con la cardiolipina, se conocen como «reaginas».

para seguir la respuesta terapéutica, ya que ninguna prueba treponémica disminuye significativamente con un tratamiento eficaz. Para el diagnóstico de la neurosífilis se requiere una prueba treponémica positiva en el suero y el VDRL (*sic*)¹⁶ positivo en el líquido cefalorraquídeo.

Las pruebas treponémicas de ELISA (IgG) poseen una buena sensibilidad y especificidad, habiéndose propuesto para el cribado y para la confirmación. Cuando se utiliza para el cribado, es útil confirmar los resultados positivos con el RPR, pudiendo utilizarse el ELISA para confirmación cuando el cribado se ha efectuado con la prueba regínica. En el recién nacido una prueba de ELISA de captura de IgM es de elección.

Para el diagnóstico de la sífilis congénita es muy importante hacer cribado materno, ya que alrededor de la mitad de los niños sífilíticos no presentan manifestaciones clínicas al nacimiento.

Leptospirosis

La prueba estándar para el diagnóstico serológico de la leptospirosis es la microaglutinación. Sin embargo, existen tests comercializados de hemoaglutinación pasiva (Focus Technologies), *dot blot* para IgM (PanBio Pty Ltd) y látex (Organon-Teknika), entre otros. En estas pruebas se detectan exclusiva o fundamentalmente anticuerpos de la clase IgM (aglutinantes) que ya suelen estar presentes durante la primera semana de la enfermedad. Es recomendable remitir los sueros a centros con experiencia en el diagnóstico serológico de esta enfermedad, al igual que en el diagnóstico de la enfermedad de Lyme, en áreas en que *Borrelia burgdorferi* no es endémica.

Infecciones por *Rickettsia*

El diagnóstico serológico de las infecciones por rickettsia requiere dos sueros, por lo que no es un método adecuado de diagnóstico, en particular para las rickettsiosis graves. La prueba de referencia es la inmunofluorescencia indirecta (IFI), pero existen muchas otras pruebas serológicas, como ELISA, látex, *dot* y *Western*. Las de IFI (bioMérieux) y ELISA en diferentes formatos (PanBio Pty Ltd) se hallan comercializadas. En la fiebre botanosa mediterránea títulos de IFI superiores a 1/40 aparecen al final de la primera semana en el 45% de los pacientes, y a las tres semanas en el 90%. Las pruebas de ELISA, incluyendo *dots* son poco específicas.

También han sido introducidas diversas pruebas para el diagnóstico de la fiebre Q. La inmunofluorescencia indirecta con antígenos de fase I y II para la detección de IgG e IgM es la prueba de referencia. También se han propuesto pruebas de ELISA IgG e IgM (PanBio Pty Ltd). El diagnóstico de la fiebre Q en los laboratorios clínicos es serológico; se recomienda la técnica de IFI y se efectúa

constatando la seroconversión o la presencia de IgM, que aparecen entre dos y cuatro semanas una vez iniciada la enfermedad. Los títulos elevados de anticuerpos frente al antígeno de fase II son indicativos de infección aguda; frente a los antígenos de fase I y fase II indican infección crónica (por ejemplo endocarditis).

Infecciones fúngicas

Las pruebas de hipersensibilidad cutánea son útiles en algunos casos. Las reacciones precoces a antígenos aspergilaes inoculados intradérmicamente (reacción inmediata en 15 minutos y reacción de Arthus en cuatro-seis horas) son indicativas de aspergilosis alérgica broncopulmonar. Las reacciones retardadas tipo Mantoux (48-72 horas) son útiles para el diagnóstico de las infecciones por histoplasma y coccidioides. Una de las limitaciones de estas pruebas es la ausencia de antígenos específicos y la dificultad para conseguir antígenos comercializados.

En los laboratorios clínicos no son comunes las pruebas serológicas para el diagnóstico de las micosis. De doce especies o grupos de hongos para los que se han descrito pruebas serológicas evaluadas, casi la mitad corresponden a hongos dimórficos que no son endémicos en Europa (histoplasma, coccidioides, blastomicos, paracoccidioides y *Penicillium marneffei*).

Las pruebas más utilizadas son la inmunodifusión (precipitación), ELISA, látex y fijación de complemento, pero su utilidad viene limitada por la falta de especificidad de los antígenos y por la lentitud de los resultados en el contexto de pacientes con inmunodepresión y por tanto pobre respuesta de anticuerpos, en los que la infección suele ser de evolución aguda o sobrealaguda. De las doce especies o grupos de hongos a que se ha hecho referencia anteriormente, cinco causan algunas infecciones que no pueden esperar a estudios serológicos para iniciar el tratamiento: la aspergilosis invasiva, la sepsis por *Candida*, la meningitis criptocócica, la pneumocistosis pulmonar y las zigomicosis.

Sida

El diagnóstico inmunológico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana se lleva a cabo mediante técnicas serológicas de ELISA, cuya positividad puede confirmarse repitiendo la prueba con otro reactivo y necesariamente mediante *Western blot* o prueba confirmatoria equivalente (RIBA, LIA). En las fases iniciales de la enfermedad, en las que aún no se ha producido una cantidad detectable de anticuerpos (ventana), el diagnóstico se realiza mediante técnicas de detección de antígeno o de amplificación del cDNA (PCR). En el capítulo 22 se presenta el diagnóstico de la infección por VIH.

¹⁶ Con el LCR no se recomienda utilizar el RPR.

Arbovirus

Las infecciones por arbovirus pueden diagnosticarse por serología, bien por seroconversión, bien por la presencia de IgM. En contextos no epidémicos, ante la sospecha de una infección por arbovirus, es mejor remitir el suero a un centro de referencia. Existen pruebas para determinar IgM para la fiebre amarilla, el dengue, la encefalitis equina del este y la del oeste y la encefalitis equina venezolana.

El diagnóstico serológico también es posible en las infecciones por hantavirus (IgM, seroconversión).

Infecciones parasitarias

El enfoque diagnóstico de las infecciones parasitarias depende del ámbito epidemiológico dada la distribución restringida de algunas de ellas. En la mayoría de los casos el diagnóstico se efectúa mediante técnicas de aglutinación, inmunofluorescencia indirecta (IFI), ELISA y, en algún caso, *Western blot*. Cuando se realizan pocas pruebas es adecuado mandarlas a un centro especializado o utilizar técnicas con reactivos de larga caducidad (inmunofluorescencia).

Por muy diversas razones se ha prestado una atención particular a la toxoplasmosis (infección congénita, infección oportunista en sida y otras inmunodepresiones). Se han diseñado muchísimas pruebas para detectar IgG, IgG de baja afinidad, IgM e IgA, como las de aglutinación directa, látex, IFI, ELISA o *Western blot*. La aglutinación directa en manos expertas es una prueba sencilla y eficaz para el diagnóstico de la primoinfección en personas inmunocompetentes, que puede completarse con la determinación de las IgM. Las IgA poseen una buena sensibilidad para detectar la infección congénita, quizás mejor que las IgM.

El quiste hidatídico por *Echinococcus granulosus* puede diagnosticarse serológicamente, aunque los anticuerpos presentan reacciones cruzadas con otras helmintosis. La localización hepática y ósea se sigue de una respuesta de anticuerpos más intensa que la pulmonar, cerebral o esplénica. Los quistes con la membrana hialina intacta dan menos respuestas inmunitaria independientemente de la localización, y en los calcificados la serología puede ser negativa. Las pruebas de ELISA y hemaglutinación pasiva (HP) pueden utilizarse como cribado, confirmando en caso de positividad por *Western blot* o inmunodifusión en gel para detectar el arco 5, que es específico. La disminución del arco 5 o de las IgE es el mejor criterio evolutivo de la curación por la cirugía, pero no es adecuado para seguir la evolución tras tratamiento con quimioterapia. Los anticuerpos detectados por HP y ELISA persisten más de cuatro años tras la curación, por lo que no son útiles para el seguimiento.

La leishmaniasis visceral produce una respuesta de anticuerpos en el 95% de los pacientes infectados, pero

la respuesta en las formas cutáneas es mínima. Las pruebas más utilizadas son las de IFI y ELISA, que utilizan mezclas antigénicas de diferentes especies, por lo que la positividad de la serología no informa sobre la especie responsable de la infección. Se pueden producir reacciones cruzadas en pacientes con enfermedad de Chagas.

La serología no es la prueba de elección para el diagnóstico de la forma aguda de la enfermedad de Chagas, pero sí permite diagnosticar las formas crónicas, sin parasitemia. Existen kits de ELISA comercializados a los que se atribuye una sensibilidad de alrededor del 95% y una especificidad elevada al utilizar antígenos recombinantes específicos, cuando se eliminan los pacientes con leishmaniasis. También se utilizan pruebas de IFI.

La serología no es una prueba recomendable para efectuar el diagnóstico de paludismo, excepto en casos clínicos y epidemiológicamente sospechosos con exámenes de sangre repetidamente negativos. Hay productos para inmunofluorescencia que incorporan antígenos de las cuatro especies, con una sensibilidad superior al 95% y elevada especificidad, pero no permiten precisar la especie causal ni diferenciar entre infección pasada y actual. Existen kits comerciales de ELISA (Cellabs).

La serología es el método de elección para confirmar un diagnóstico de cisticercosis sospechado por las técnicas de diagnóstico por la imagen (Rx, TAC, RMN). Las técnicas utilizadas son ELISA convencional o inmunoblot; ambos se hallan comercializados. El principal problema lo constituye las reacciones cruzadas con equinococos, otras tenias y filarias.

La amebiasis puede diagnosticarse mediante ELISA o IFI, que ha sustituido a la hemaglutinación pasiva en muchos ámbitos. Se detectan altos títulos de anticuerpos en el 90% de los pacientes con amebiasis extraintestinal (hepática), así como en el 70% de los que tienen afectación intestinal, y tan solo el 10% de los asintomáticos que eliminan quistes con las heces. Los anticuerpos persisten durante años una vez curada la enfermedad.

Las pruebas serológicas también son útiles para el diagnóstico de la triquinosis, larva *migrans* y esquistosomiasis.

Infecciones sistémicas

Algunas infecciones sistémicas en personas previamente sanas se expresan únicamente por afectación del estado general y fiebre; en otras ocasiones, según el agente causal, pueden producirse poliadenomegalias, exantemas, hepatoesplenomegalia u otros síntomas. En algunos casos, como la brucelosis, la fiebre tifoidea, tularemia, fiebre Q, rickettsiosis, toxoplasmosis, leishmaniasis, paludismo y otras enfermedades, en particular virasis, que pueden dar cuadros indiferenciados, cabe utilizar pruebas serológicas para su diagnóstico, aunque no siempre la serología es la técnica diagnóstica de elección.

Infecciones congénitas

Están causadas por el virus de la rubéola, el citomegalovirus, parvovirus B 19, el toxoplasma, la listeria y el treponema de la sífilis. El diagnóstico de las infecciones congénitas puede realizarse detectando anticuerpos de la clase IgM en la sangre de cordón (sangre fetal) evitando la contaminación por sangre materna o por detección del microorganismo por cultivo o amplificación genética en el líquido amniótico y/o sangre de cordón.

Estudio inmunológico en accidentes laborales en el ámbito sanitario

Los accidentes laborales ocurridos en el ámbito sanitario u otras situaciones (violaciones, etc.) que comportan el contacto con sangre o secreciones de una persona pueden ser causa de la transmisión de los virus de la hepatitis B, D, C, y del virus del sida. En estos casos, si se puede conseguir una muestra de suero de la «fuente» hay que evaluar su infectividad mediante el estudio del antígeno de superficie (HBsAg) y de los anticuerpos anti-HBc de la hepatitis B (y el antígeno e y los anticuerpos anti-hepatitis D si alguno de los anteriores son positivos), así como de los anti-hepatitis C y anti-virus de la

inmunodeficiencia humana. También hay que determinar el estado inmunológico del accidentado, evaluando la presencia de anticuerpos contra el antígeno de superficie de la hepatitis B (y anti-HBc si es negativo), anti-hepatitis C, anti-hepatitis D y anti-HIV (véase el capítulo 21).

Reactivos comercializados para el diagnóstico serológico

Existe un gran número de compañías que comercializan reactivos para serología, así como instrumentos automáticos para el desarrollo de las pruebas. Se recoge en este apartado un número reducido de ellas a modo de ejemplo. Sus catálogos y los de otras compañías no citadas, también de excelente calidad, pueden obtenerse de sus representantes o por Internet. Entre ellas: Abbott Diagnostics, Bayer Corp Diagnostic Division, bio-kit SA, bio-Merieux, Bio-Rad Laboratories Inc, DAKO Corporation, Dade Behring, Inc, DiaSorin, Fujirebio Diagnostics Inc, GenBio, Innogenetics, Meridian Diagnostics, Inc, Organon-Teknika, Ortho-Clinical Diagnostics, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc, PanBio Pty, Ltd, Remel, Roche Sigma Diagnostics, TrinityBiotech, Wampole Laboratories, Zeus Scientific Inc.

INTRODUCCIÓN

El ácido desoxirribonucleico (DNA) codifica la secuencia de los aminoácidos de las proteínas y controla su síntesis¹. El conjunto del DNA de una célula es su genoma y puede estar formado por una única pieza, como sucede en la mayoría de las bacterias, o por varios fragmentos que constituyen los cromosomas, como en las células eucariotas. Tan solo en algunos virus el genoma está formado por ácido ribonucleico (RNA) en lugar de DNA.

El DNA está formado por dos largas cadenas de nucleótidos. Los nucleótidos están constituidos por una deoxirribosa a la que se une en el carbono 1' una base nitrogenada, que puede ser una purina (guanina o adenina) o una pirimidina (citosina o timina), y en el carbono 5', un grupo fosfato que efectúa la unión con el carbono 3' del siguiente nucleótido [-P-(5'.3')-P-(5'.3')-P-(5'.3')].

Ambas cadenas están enfrentadas por las bases nucleotídicas y son complementarias debido a que frente a una guanina (G) siempre se sitúa una citosina (C) y frente a una timina (T) una adenina (A). Las bases de una cadena se hallan unidas a sus complementarias de la otra cadena a través de puentes de hidrógeno, y la suma de las fuerzas de esos puentes es la que las mantiene unidas. Las cadenas tienen en un extremo un nucleótido con un fosfato libre en 5', y, en el otro extremo, otro nucleótido con un hidroxilo en 3'. Ambas se enfrentan de manera antiparalela, de modo que el extremo 5' de una se sitúa frente al 3' de la otra. Las dos cadenas, complementarias y antiparalelas, enfrentadas y unidas por las bases, se disponen formando una doble hélice según el modelo propuesto en 1953 por Watson y Crick (Fig. 9.1).

Se denomina secuencia de un fragmento de DNA al orden en que están dispuestas las bases en ese fragmento. Por ejemplo, la secuencia de un fragmento puede ser 5'-AATGCAGGTATGCCA-3', y la de otro 5'-GATCCGTTTAGCCAT-3'.

Para conocer la secuencia de un fragmento de DNA se dispone de instrumentos capaces de secuenciar automáticamente. En la actualidad ya se ha secuenciado completamente el genoma de numerosas bacterias y otros seres vivos, habiéndose finalizado la secuenciación del genoma humano.

Existen potentes ordenadores con extensas bases de datos (bancos) que archivan millones de secuencias previamente analizadas, lo que permite comparar las secuencias obtenidas en un laboratorio con las de los bancos para identificar especies, determinar las relaciones filogenéticas, detectar mutaciones, etcétera.

La replicación del DNA requiere la apertura y separación de las dos cadenas por la acción de proteínas específicas (topoisomerasas). A continuación, una DNA-polimerasa copia sobre las cadenas en la dirección 3'-5', sintetizando las nuevas cadenas en la dirección 5'-3'². La DNA-polimerasa sólo puede empezar a actuar a partir de fragmentos bicatenarios, por lo que se sintetizan primero unos pequeños fragmentos complementarios de RNA por acción de una RNA polimerasa, ya que esta enzima puede iniciar la síntesis en fragmentos monocatenarios. Estos fragmentos de RNA serán sustituidos por DNA posteriormente (Fig. 9.2).

El ácido ribonucleico es monocatenario y tiene una composición química semejante a la del DNA, pero, en lugar de deoxirribosa, está formado por ribosa y, en lugar de timina, contiene uracilo.

En las células hay tres clases de RNA, el ribosomal (rRNA), que junto a algunas proteínas conforma la estructura de los ribosomas, el mensajero (mRNA), que es sintetizado por un proceso de transcripción en el que la RNA-polimerasa toma como molde la secuencia del DNA, lo que permite transportar la información desde el DNA hasta los ribosomas, y por último el RNA de transferencia (tRNA), que en el ribosoma acopla los diferentes aminoácidos a la cadena proteica naciente según el código marcado por el mRNA (traducción).

¹ Como los polisacáridos y los lípidos se sintetizan por la acción de enzimas (proteínas) y el catabolismo es también un gran proceso secuencial enzimático, puede comprenderse que, finalmente, toda la estructura y actividad celular está codificada en el DNA.

² En *Escherichia coli* hay tres DNA-polimerasas: I, II y III; la III es la enzima fundamental para la replicación del DNA. Como las dos cadenas del DNA son antiparalelas, la DNA-polimerasa sintetiza en una dirección deferente en cada rama (Fig. 9.2).

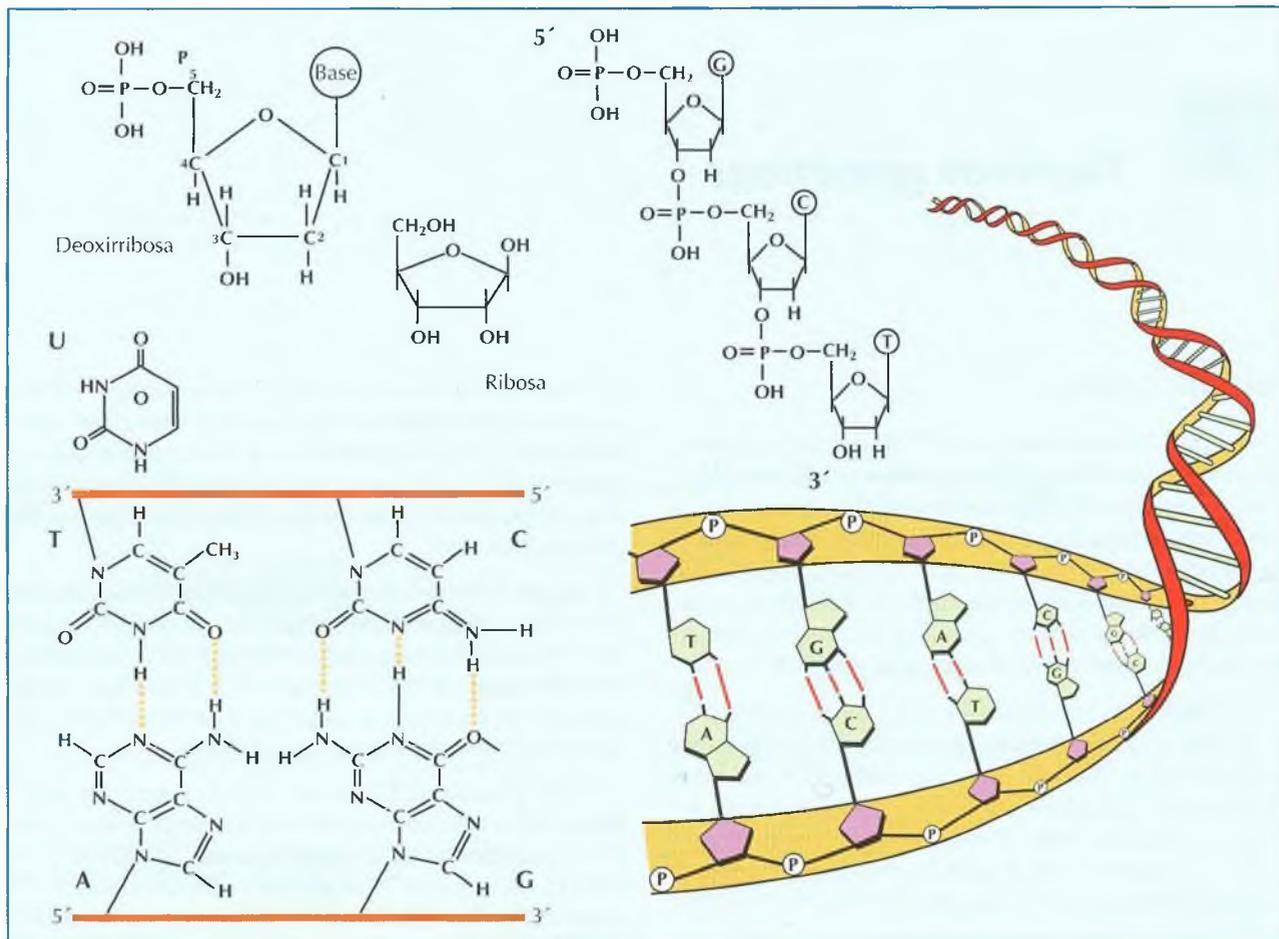


Figura 9.1. Estructura del DNA.

Los nucleótidos están formados por desoxirribosa, que lleva unida en 5' un fosfato y en 1' una base purínica o pirimidínica (guanina [G], adenina [A], citosina [C] y timina [T]).

El DNA está formado por dos cadenas complementarias. Una cadena de DNA se forma por la unión del fosfato 5' de un nucleótido con el hidroxilo en 3' de otro nucleótido. Ambas cadenas son antiparalelas ya que el extremo 5' (fosfato) de una coincide con el 3' (hidroxilo) de la otra. Las dos cadenas son complementarias puesto que la G se une siempre a la C y la T a la A, a través de puentes de hidrógeno. La estructura de las dos cadenas es helicoidal según el modelo propuesto por Watson y Crick.

El RNA es monocatenario, está formado por ribosa en lugar de desoxirribosa y uracilo [U] en lugar de timina.

La transcripción del DNA a RNA mensajero la efectúa una RNA-polimerasa DNA-dependiente (transcriptasa). En el mRNA cada tres nucleótidos codifican un aminoácido. Cuando el mRNA pasa por el lugar A del ribosoma, quedan expuestos tres nucleótidos que son reconocidos por un tRNA que lleva los nucleótidos complementarios y que porta el aminoácido que esos tres nucleótidos codifican, incorporándolo a la cadena polipeptídica naciente (traducción).

La mayoría de los virus cuyo genoma es DNA, salvo contadas excepciones, se replican por las DNA-polimerasas de las células que infectan, pero los virus RNA se replican mediante polimerasas propias (RNA-polimerasa RNA dependientes) ya que las RNA-polimerasas de las células no pueden copiar tomando el RNA como molde, sino el DNA.

Aunque el dogma central de la biología dice que la información siempre fluye del DNA al RNA y de éste a las

proteínas, algunos virus poseen una transcriptasa inversa (TI), que es una DNA-polimerasa RNA dependiente que sintetiza DNA (DNA complementario, cDNA) tomando el RNA como molde. Alguno de estos enzimas también pueden actuar degradando el RNA molde y copiando un DNA complementario del sintetizado primeramente, de manera que puede convertir el RNA monocatenario en cDNA bicatenario al actuar no solo como TI, sino también como RNAasa y DNA-polimerasa.

En la actualidad se dispone de instrumentos automáticos para sintetizar fragmentos de DNA *in vitro* con una secuencia predeterminada a voluntad.

LOS ÁCIDOS NUCLEICOS COMO ELEMENTOS DE ANÁLISIS

En los laboratorios de microbiología clínica, las técnicas genéticas se utilizan para: 1) La detección de

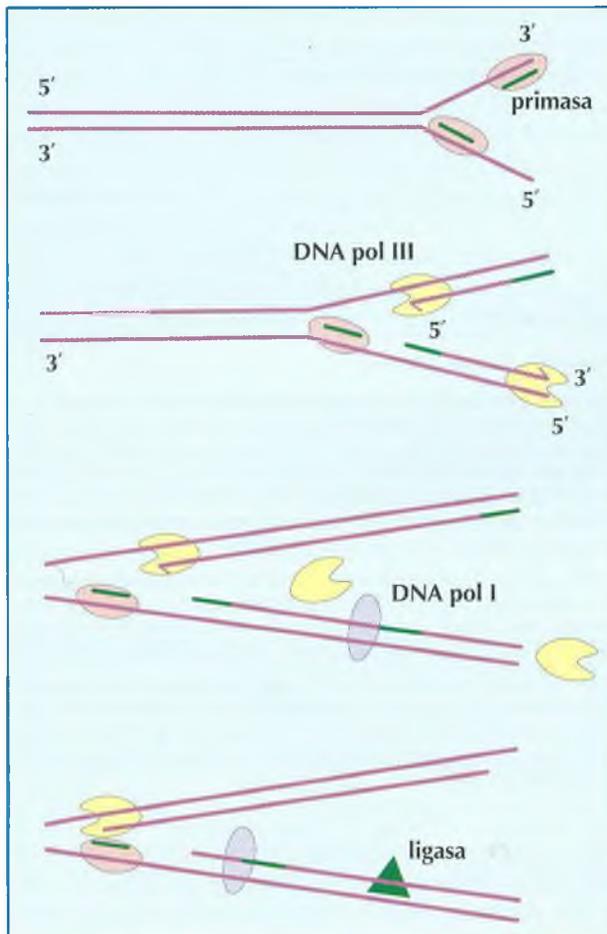


Figura 9.2. Replicación del DNA.

La replicación del DNA en condiciones naturales requiere la apertura de las dos hebras por las topoisomerasas. Se inicia con la síntesis de un fragmento de RNA (por una primasa, que es una RNA polimerasa,) a partir del cual la DNA polimerasa III va incorporando los nucleótidos para formar las nuevas cadenas, copiando sobre cada una de las cadenas antiguas. La síntesis del nuevo DNA se produce siempre en la dirección 5' a 3', copiando del molde en la dirección 3'-5', por lo que se efectúa en sentido diferente en cada cadena. En una de ellas, en la que se inicia en el extremo 3', tras la síntesis por la primasa de un pequeño fragmento de RNA inicial, la DNA polimerasa III actúa de modo continuo a lo largo de toda la cadena a medida que esta se va abriendo. En la otra cadena, la síntesis se produce de modo discontinuo a lo largo de pequeños fragmentos (fragmentos de Okazaki), al inicio de cada uno de los cuales tiene que actuar la primasa, porque en esa cadena al copiar de 3' a 5', hay que esperar a que se abra para reiniciar la síntesis en el fragmento abierto. La DNA polimerasa I, sustituye el pequeño fragmento de RNA por DNA y una ligasa une los fragmentos de DNA.

En el caso de la replicación *in vitro* (PCR, etc.), la síntesis es continua en ambas cadenas, porque ambas se han separado totalmente. (Véase figura 9.6.)

microorganismos directamente en las muestras clínicas identificando un fragmento específico del genoma del microbio. 2) La cuantificación del número de virus presentes en muestras de sangre o plasma: carga vírica. 3) La identificación de un microorganismo tras su

aislamiento por métodos convencionales. 4) La detección de factores de virulencia. 5) La determinación de resistencia a los antimicrobianos, que puede llevarse a cabo sobre el microorganismo aislado o en la muestra. 6) Estudios de epidemiología molecular que permiten comparar las cepas aisladas.

Para optimizar las técnicas preexistentes o para desarrollar técnicas nuevas que no estén protegidas por patentes, se han propuesto infinidad de variantes y novedades metodológicas sobre las técnicas genéticas preexistentes, muchas de ellas de un ingenio sorprendente. En este capítulo sólo se describen algunas de las técnicas más utilizadas para la detección, identificación y determinación de la resistencia de los microorganismos, que se hallan en el comercio. La mayoría de ellas se adscriben a dos tipos: técnicas de hibridación y técnicas de amplificación. Los métodos utilizados en epidemiología se presentan en el capítulo 10.

EXTRACCIÓN DEL DNA/RNA

Para cualquier trabajo que deba realizarse con el DNA o RNA de un microorganismo, en primer lugar deben extraerse los ácidos nucleicos. Esto comporta la lisis microbiana, la concentración del ácido nucleico, su protección frente a la degradación química o enzimática y la eliminación de los inhibidores de las reacciones que deban efectuarse posteriormente (hibridación, replicación del DNA o transcripción inversa de RNA).

Los sistemas clásicos basados en la lisis y tratamiento con proteinasa K, seguida de extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol, están siendo sustituidos por otros con diferentes procedimientos de lisis y concentración de los ácidos nucleicos, basados en la acción del tiocianato de la guanidina, surfactantes catiónicos, resinas quelantes, la sílice y las fibras de vidrio. Estas sustancias solas o generalmente unidas a otras, precedidas o no de lisis física de las células (ebullición, sonicación, etc.), enzimática (lisocima) o mediante detergentes, pueden adsorber restos celulares o inhibidores (resinas quelantes), precipitar selectivamente DNA o RNA (guanidina, surfactantes) o adsorber los ácidos nucleicos (sílice, vidrio). La separación magnética o por filtración se efectúa sobre ácidos nucleicos previamente extraídos o incluso amplificados³.

En la actualidad uno de los objetivos de las grandes compañías es la disposición de sistemas automáticos de extracción seguida de la transferencia automática de DNA o RNA a los procesos subsecuentes de amplificación u otros.

³ Poseen diferentes sistemas de extracción y aislamiento de DNA y RNA: Bio101, Inc. Biotecx Laboratories, Inc. Bio-Rad Laboratories, Inc. Bio-Ventures, Inc. Dynal, Biotech. Life Technologies, Inc. Millipore Corp, Organon-Teknika, Promega, Corp, Qiagen, Inc. Roche, etcétera.

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN

Una particularidad del DNA consiste en que cuando se calienta por encima de 90° C, las dos cadenas se separan porque se neutralizan las fuerzas de unión entre las bases (los puentes de hidrógeno entre G≡C y T=A). Este fenómeno se denomina desnaturalización. Cuando desciende otra vez la temperatura, las bases vuelven a aparearse de modo que se reenlazan con toda exactitud los fragmentos homólogos, reconstituyéndose el DNA bicatenario original en un proceso denominado renaturalización.

Si se conoce una secuencia propia y específica del DNA de un determinado microorganismo, puede sintetizarse un fragmento de DNA con la secuencia complementaria, marcándolo con una sustancia radioactiva, con un compuesto fluorescente o lumínico o con una enzima. Cuando estos pequeños fragmentos monocatenarios de DNA, de 20 a 40 bases⁴, están marcados y se emplean para la detección de su secuencia complementaria, se denominan sondas (en inglés, *probes*)⁵ (Fig. 9.3). Las sondas detectan la secuencia complementaria a la suya (diana) en el genoma de un microorganismo a través de una prueba de hibridación realizada: 1) en solución, 2) sobre un soporte sólido o 3) *in situ*.

Marcado de las sondas

Las sondas se marcan con diferentes sustancias para detectarlas cuando hibridan con su diana. Existen numerosísimas variantes y métodos diferentes de marcado. Inicialmente, se utilizaron sustancias radioactivas como el ³²P o el ³⁵S. En la actualidad se utilizan sustancias no radioactivas porque su uso no requiere las estrictas normas de seguridad de aquéllas, tienen una caducidad más larga y algunas son igual o más sensibles que las radioactivas.

Unas sustancias lumínicas interesantes son los ésteres de acridina, que se unen químicamente a la sonda marcándola, y permiten detectar la hibridación de la sonda con su diana en medio líquido, sin lavados, según se describe más abajo (véase *Hibridación en solución*).

También se utilizan enzimas como la peroxidasa de rábano, que actúa sobre el agua oxigenada liberando oxígeno que, al activar el luminol, emite luz, o la fosfatasa alcalina, que actúa sobre sustratos cromogénicos o lumínicos.

Además del marcado directo, las sondas también pueden marcarse con sustancias de captura, como la biotina o la digoxigenina, que por sí mismas no producen señal, pero pueden captar gran número de elementos marcados incrementando la señal. La biotina capta avi-

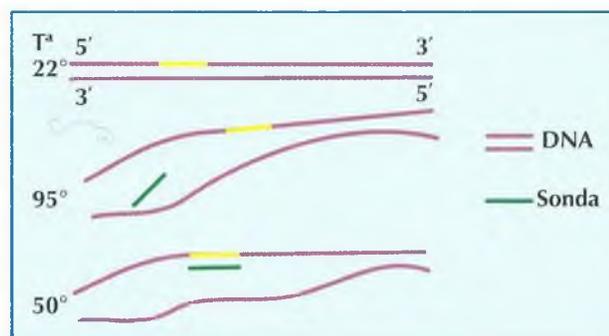


Figura 9.3. Sondas genéticas.

Las sondas genéticas son pequeños fragmentos de DNA formados por 20-50 nucleótidos (oligonucleótidos), sintetizadas en el laboratorio y cuya secuencia es complementaria de la de un fragmento genómico. Bajo determinadas condiciones la unión de la sonda a su secuencia complementaria (hibridación) es tan específica que tan solo la diferencia en un nucleótido hace que la unión no se produzca. Las sondas pueden marcarse para detectar su hibridación con la secuencia diana.

Arriba puede observarse el DNA con la secuencia a detectar. Se separan (desnaturalizan) ambas hebras por calentamiento a 95°C y se incorpora la sonda. Abajo puede observarse como la hibridación se produce al descender a la temperatura adecuada, en este caso a 50°C.

Los cebadores (*primers*) de la reacción en cadena de la polimerasa son sondas como ésta que cumplen dos funciones: 1) unirse a los extremos del fragmento específico que se desea amplificar; 2) permitir que la DNA polimerasa, que necesita fragmentos bicatenarios para iniciar la polimerización, la inicie.

dina, que puede ser saturada con varias moléculas de un marcador (enzimático o lumínico) (Fig. 8.14). Los anticuerpos anti-digoxigenina, a los que pueden fijarse diversos marcadores, se unen con gran eficacia a la digoxigenina.

La utilización de anticuerpos con diferentes marcadores que reconocen el DNA bicatenario (DNA-DNA) o el híbrido DNA-RNA también permiten detectar y cuantificar el grado de hibridación.

Hibridación en solución

En el comercio algunas pruebas de hibridación están disponibles bajo formatos en solución, en los que la hibridación se produce rápidamente (una hora o menos). En estas condiciones, la prueba resulta más práctica y sencilla que las realizadas sobre membrana. La sonda se puede marcar con un éster de acridina que emite luminiscencia al ser tratado con agua oxigenada; pero si la acridina se hidroliza mediante un álcali, pierde la capacidad de emitir luz.

Para desarrollar esta prueba, conocida como prueba de protección por hibridación (*hybridization pro-*

⁴ Se denominan oligonucleótidos las cadenas de DNA, cortas, con menos de 50 nucleótidos. A este tipo corresponden las sondas y los cebadores (ver más adelante).

⁵ Se han elaborado sondas como ácidos nucleicos peptídicos (PNA) en que la cadena, en lugar de deoxirribosa, está formada por un polipéptido, la poliglicina, a la que se unen las bases. Poseen algunas particularidades de interés por su afinidad, la rapidez de su dinámica de hibridación y su carácter hidrófobo que facilita su penetración a través de las membranas.

tection assay), desarrollada por Gen-Probe, Inc. se extrae el DNA del microorganismo, se desnaturaliza en solución en un tubo y se añade la sonda marcada con acridina; si encuentra su secuencia complementaria, se une para formar un fragmento bicatenario. A continuación, se añade un álcali, que inactiva la acridina cuando la sonda esta libre, pero en las sondas que han hibridado con su diana, y por tanto se hallan en estado bicatenario, la acridina queda protegida de la hidrólisis, por lo que la luminiscencia medida por un luminómetro corresponde a la sonda hibridada (Fig. 9.4).

Digene Corp. utiliza sondas de RNA y una técnica de captura de los híbridos DNA-RNA formados en solución con anticuerpos fijados a pocillos de placas tipo «microtiter». Los híbridos fijados se revelan con anticuerpos marcados con fosfatasa alcalina utilizando dioxetano como sustrato, que produce quimio-luminiscencia.

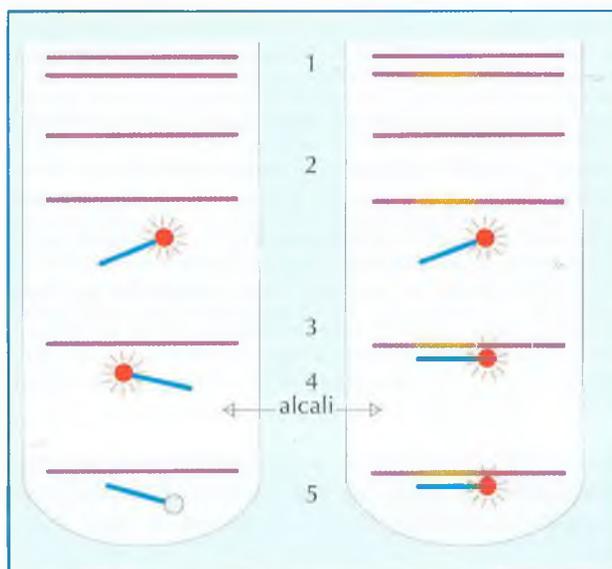


Figura 9.4. Hibridación en solución.

Imagínese que se dispone de un cultivo de un estreptococo y se desea saber si se trata de un neumococo. Para ello, se extrae su DNA y se enfrenta a una sonda específica complementaria de una secuencia propia de ese microorganismo. La prueba se desarrolla según el siguiente proceso:

- 1) En un tubo con un solvente adecuado se pone el DNA extraído de la bacteria.
- 2) Se desnaturaliza por el calor y se añade la sonda marcada con un éster de acridina, que es un marcador luminiscente.
- 3) Al bajar la temperatura si se encuentra la diana, la sonda hibrida con ella (derecha) y en caso contrario no hibrida (izquierda).
- 4) Se añade un álcali.
- 5) Éste inhibe la luminiscencia de la acridina de las sondas no hibridadas, pero la acridina de las sondas hibridadas queda protegida de la acción del álcali y emite luminiscencia (*Hybridization protection assay*).

Hibridación sobre fase sólida

Después de lisar los microorganismos de una muestra clínica o de un cultivo, se extrae el DNA que se desnaturaliza por el calor, depositándose una gota sobre una pequeña membrana de nilón o nitrocelulosa (4 x 4 cm); la muestra depositada se adsorbe y fija a la superficie (aspiración al vacío, UV, etc.). En una membrana pueden depositarse varias gotas. La membrana se sumerge en una solución de hibridación que contiene la sonda marcada y, una vez finalizada la hibridación y eliminada mediante lavado la sonda no unida, se detecta la fijada a través de su marcador. La reacción de hibridación es muy lenta y suele requerir una noche. Esta técnica se denomina genéricamente en inglés *dot blot* o *slot blot* según se deposite el material sobre la membrana como una gota circular o alargada.

Este tipo de pruebas sobre soporte sólido se utiliza sobre todo con fines de investigación. Sin embargo, existen en el comercio kits basados en las técnicas de captura por hibridación (también denominadas hibridación inversa o hibridación en sandwich), en las que las sondas se hallan fijadas a una tira de nitrocelulosa y captan de la muestra los ácidos nucleicos que interesa detectar. Para su revelado, puede utilizarse una segunda sonda marcada que actúa como señal. Con frecuencia, el DNA a hibridar ha sido amplificado previamente con cebadores que llevan un captador incorporado, como la biotina (véase más adelante) (Fig. 9.5). Esta técnica es utilizada para identificar tanto microorganismos a través de secuencias específicas como mutaciones que comportan resistencia a los antimicrobianos (INNO-LiPA; Innogenetics).

Hibridación in situ

Una sonda también puede hibridar con su DNA o RNA complementario en un corte histológico, emitiendo la señal correspondiente, y localizando por tanto al microorganismo en el contexto de un tejido; esta técnica se conoce como hibridación *in situ*.

Utilización de las sondas

A pesar de su especificidad, las sondas carecen de suficiente sensibilidad para detectar los microorganismos de una muestra clínica cuando son escasos, por lo que en la actualidad son poco empleadas para ese fin⁶. Por el contrario, constituyen un instrumento excelente para identificar un microorganismo una vez aislado por cultivo, ya que se dispone de DNA en gran abundancia. Resultan particularmente útiles para los microorganismos cuya identificación por métodos convencionales (metabólicos, serológicos) es difícil o compleja⁷. Mediante la utilización de sondas también pueden detectarse

⁶ Estreptococo del grupo A: Group A streptococcus Direct test, Gen-Probe, Inc. Gonococo y clamidia: Pace 2, Gen-Probe, Inc. Cobas Amplicar CT/NG. Roche M.S. Cándida, gardnerella y tricomonas: Affirm VPIII, Becton-Dickinson Biosciences.

⁷ AccuProbe, Gen-Probe, Inc; véase la tabla 9.1.

Tabla 9.1

Sondas comercializadas para la detección e identificación microbiana

Detección directa	Identificación
Estreptococo del grupo A	Estreptococo del grupo A y B
Gonococo	Enterococos
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Gardnerella</i>	Neumococo
<i>Candida</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Tricomonas	<i>Mycobacterium</i>
	<i>M. tuberculosis complex</i>
	<i>M. avium complex</i>
	<i>M. kansasii</i>
	Gonococo
	<i>Haemophilus influenzae</i>
	<i>Campylobacter</i>
	<i>C. jejuni</i>
	<i>C. coli</i>
	<i>C. lari</i>
	<i>Histoplasma capsulatum</i>
	<i>Coccidioides immitis</i>
	<i>Blastomyces dermatitidis</i>

Se indica algunas de las sondas comercializadas para la detección directa de microorganismos en muestras clínicas y para la identificación de microorganismos previamente aislados por cultivo. La mayoría de ellas están comercializadas por Gen-Probe Inc. y Becton Dickinson Biosciences.

genes de patogenicidad (adhesinas, proteínas relacionadas con la invasión, toxinas) y genes de resistencia, tanto cuando ésta se debe a la adquisición de material genético exógeno (plásmidos o transposones), como cuando se trata de una mutación puntual de un gen propio del microorganismo.

Cuando se trata de detectar mutaciones, la sonda debe ser capaz de unirse o no a la diana cuando existe tan solo uno o dos nucleótidos diferentes. Por ello, son de vital importancia las condiciones de desnaturalización-renaturalización (temperatura, osmolaridad, etc.) para conseguir hibridaciones muy específicas.

TECNOLOGÍA DE LOS CHIPS (ARRAYS)

La tecnología de los *arrays*⁸ se basa en la división de una pequeña superficie, generalmente de vidrio (laminas de sílice) de alrededor de un centímetro cuadrado, en numerosos cuadros imaginarios en cada uno de los cuales se fijan las sondas. Cuando cada subárea de fijación es grande, se habla de macroarrays y, cuando es pequeña, de microarrays (> 300 µm, < 200 µm). Existen varios métodos de fijación; en uno las sondas prefabri-

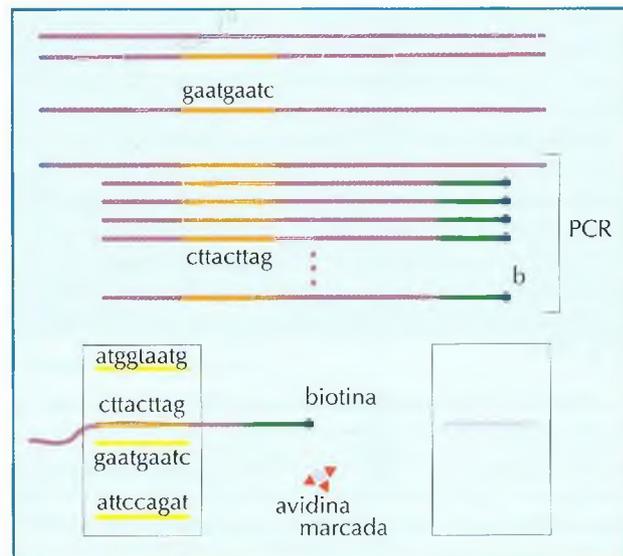


Figura 9.5. Hibridación inversa.

En una tira de nitrocelulosa pueden fijarse diferentes oligonucleótidos (sondas) en diferentes bandas, que captarán fragmentos génicos (DNA o RNA) complementarios. Por ejemplo, en una banda se puede poner una sonda complementaria de un fragmento del genoma de una bacteria o virus que presenta una determinada mutación que le hace resistente a un antimicrobiano. El DNA o RNA del microorganismo con la mutación será captado por la sonda, identificando las cepas resistentes. Diferentes bandas pueden incorporar fragmentos con diferentes mutaciones. Este método también se utiliza para la identificación microbiana.

El DNA o RNA que desea estudiarse se amplifica por PCR mediante cebadores (en verde) marcados con biotina (b). En el ejemplo, para simplificar, sólo se muestra la amplificación de una cadena. Los fragmentos resultantes de la amplificación (amplicones) llevarán en su extremo la biotina. Estos amplicones se enfrentan a las sondas situadas en la tira de nitrocelulosa. Si encuentran su secuencia complementaria se fijarán a ella (tira de la izquierda). Si no serán arrastrados por el lavado. Al añadir avidina marcada con una enzima se unirá a la biotina y dará una señal al añadir un sustrato (tira de la derecha). Véase más adelante: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

cadras (200 a 2.000 bases) se fijan utilizando robots con microcapilares. El otro método se basa en la utilización de técnicas fotolitográficas, sintetizando *in situ* los oligonucleótidos monocatenarios sonda. Por este último método pueden llegar a incorporarse en un chip hasta 250.000 oligonucleótidos.

Se han desarrollado chips bioelectrónicos con sondas elaboradas por técnicas fotolitográficas en los que la señal es la donación de un electrón por otra sonda que se une al ácido nucleico capturado, que es registrado por un sistema de electrodos. Este sistema parece muy prometedor y probablemente sea la vía para la creación del «laboratorio total» en un chip.

En la actualidad, en muchas áreas de la biología, estas tecnologías están a nivel experimental, pero una de las utilidades actuales más interesantes es la detección de RNA mensajero (mRNA) extraído de una célula a partir de un cultivo de un tejido o una muestra clínica. El mRNA se transforma mediante una transcriptasa inver-

⁸ Una traducción al castellano podría ser «cepillos genéticos» por la semejanza entre las sondas del chip y las cerdas de los cepillos.

sa en cDNA, para cuya síntesis se utilizan nucleótidos marcados con sustancias fluorescentes. Una vez captado el cDNA por la sonda fijada en el chip, puede interpretarse el resultado en función de la luminosidad de cada punto. Sus principales aplicaciones se centran en estudios de fisiología celular (detección de genes activados a través de la cuantificación del mRNA expresado por cada uno en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas). Esta tecnología ha de permitir conocer los genes que se activan en una infección: tanto los del microbio como los de las células del huésped.

No cabe duda de que estos chips también se utilizarán para la detección e identificación de microorganismos y para el reconocimiento directo de sus factores de virulencia, así como de marcadores epidemiológicos y de sus genes de resistencia en muestras clínicas («laboratorio total»). Sin embargo, dado el estadio inicial de esta tecnología, es difícil predecir su potencial real en este ámbito, aunque parece fabuloso.

La complejidad técnica e industrial de estos proyectos requiere la participación de potentes compañías y consorcios para su desarrollo y comercialización⁹.

MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN

No es difícil imaginar que la posibilidad de multiplicar *in vitro* el número de copias de un fragmento de DNA del genoma de un microorganismo, disponiendo de él en abundancia, sería de gran utilidad para cualquier tipo de estudio o manipulación de ese fragmento. Este objetivo puede conseguirse mediante las técnicas de amplificación. Alguna de estas técnicas también permite amplificar el RNA, a través de su conversión en DNA complementario (cDNA) mediante una trans-

criptasa inversa. El fragmento a amplificar se denomina diana.

Una vez amplificado un fragmento de DNA o RNA, es detectado fácilmente por una sonda, dada su abundancia y, por tanto, estas técnicas, por su elevada sensibilidad, a diferencia de las de hibridación señaladas anteriormente, son de elección para la detección e identificación de microorganismos directamente en muestras clínicas, especialmente en los casos en que los métodos convencionales son lentos, laboriosos o inexistentes.

Desde otro punto de vista, la amplificación de un fragmento de DNA puede efectuarse bajo unas condiciones técnicas que permitan su secuenciación. En la actualidad existen sistemas automatizados continuos de amplificación-secuenciación.

Por último, la disposición de abundante DNA, en particular de un gen funcional completo, facilita su clonación; es decir: su introducción en un plásmido o un bacteriófago, que a su vez se introduce en una célula (generalmente una bacteria o una levadura) en la que el gen puede expresarse (induciendo la producción de una determinada proteína, etc.) o estudiarse aislado, fuera de posibles interferencias propias de su contexto natural.

Las técnicas de amplificación copian fragmentos de los ácidos nucleicos, DNA o RNA, del microorganismo y permiten su detección después mediante sonda; pero también existen modalidades que permiten detectar un fragmento específico de ácido nucleico mediante la amplificación del DNA o RNA de la sonda o la amplificación de la señal. Aunque las tres técnicas son capaces de detectar un microorganismo, sólo la primera permite obtener fragmentos del genoma para su secuenciación o clonación (Tabla 9.2).

Tabla 9.2
Técnicas de amplificación

Método de amplificación ^a	Tipo de amplificación	Enzimas utilizadas ^b	Temperatura de reacción	Ácidos nucleicos amplificados
PCR	Secuencia diana	Taq	Cambios cíclicos	DNA
TMA NASBA	Secuencia diana	Ti, RNA pol, RNasa H	Isotérmica	RNA (DNA)
SDA	Secuencia diana	Enzimas de restricción DNA polimerasa	Isotérmica	DNA
LCR	Sonda	DNA ligasa	Cambios cíclicos	DNA
bDNA	Señal	Ninguno	Isotérmica	DNA y RNA

Se indican las técnicas comercializadas más utilizadas. Existen otras, como la captura de híbridos, que amplifica la señal, y las técnicas *clavase-invader* y *cycling probe*, que amplifican la sonda.

^a PCR: reacción en cadena de la polimerasa, TMA: amplificación basada en la transcripción, NASBA es una técnica de TMA, SDA: amplificación basada en el desplazamiento de la cadena, LCR: reacción en cadena de la ligasa, bDNA: DNA ramificado.

^b Taq: DNA polimerasa termoresistente de *Thermus aquaticus*, Ti: transcriptasa inversa, RNA pol: RNA polimerasa.

⁹ Affymetrix, Inc. Nanogen. Clinical Micro Sensor.

AMPLIFICACIÓN DE LA DIANA

Existen diversas técnicas para la amplificación de los ácidos nucleicos del genoma del microorganismo. La más utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*; PCR).

Reacción en cadena de la polimerasa

En condiciones naturales, el DNA se replica mediante DNA-polimerasas. Para ello, la doble hélice debe desnaturalizarse (abrirse) para que la DNA-polimerasa pueda iniciar su actividad copiando sobre cada una de las cadenas separadas una nueva cadena complementaria. Esto se consigue a medida que la DNA-polimerasa va incorporando consecutivamente los nuevos nucleótidos frente a los de la cadena molde, según el conocido apareamiento $G=C$; $T=A$, uniendo covalentemente mediante un enlace fosfato ($5'.3'-P-5'.3'$) cada nucleótido incorporado a la cadena creciente. Sin embargo, paradójicamente, la enzima no puede iniciar su actuación sobre un fragmento monocatenario, sino a partir de un fragmento bicatenario (véase figura 9.2).

La idea de Mullis de aplicar este principio para amplificar el DNA *in vitro* ha resultado extraordinariamente fructífera. En un tubo de ensayo se pone el DNA extraído de una célula, un virus, etc., se desnaturaliza calentando y se añaden dos cortos fragmentos de DNA monocatenario de unos 20 nucleótidos, sintetizados artificialmente, llamados cebadores (o iniciadores, del inglés *primers*), que son complementarios uno de ellos de un fragmento de una cadena y el otro de un fragmento de la otra cadena situado entre 100 y 2.000 bases de distancia del primero. Al bajar la temperatura (renaturalización), los cebadores se fijan a sus dianas, uno en una cadena y el otro en la otra cadena, delimitando un fragmento entre ellos. Simultáneamente, se añaden los cuatro nucleótidos (G, C, T, A)¹⁰ y una polimerasa termorresistente, como la *Taq*-polimerasa, obtenida de una bacteria termófila, *Thermus aquaticus*¹¹.

La amplificación del fragmento delimitado entre los dos cebadores se consigue mediante el siguiente proceso (representado en la figura 9.6):

1) Desnaturalización: las dos cadenas de la molécula original de DNA se separan por el calor a 95° C durante 15 segundos a un minuto.

2) Hibridación: la mezcla se enfría a una temperatura entre 30 y 65° C durante unos 30 segundos, temperatura que permite la hibridación, por lo que los cebadores se unen a sus secuencias complementarias,

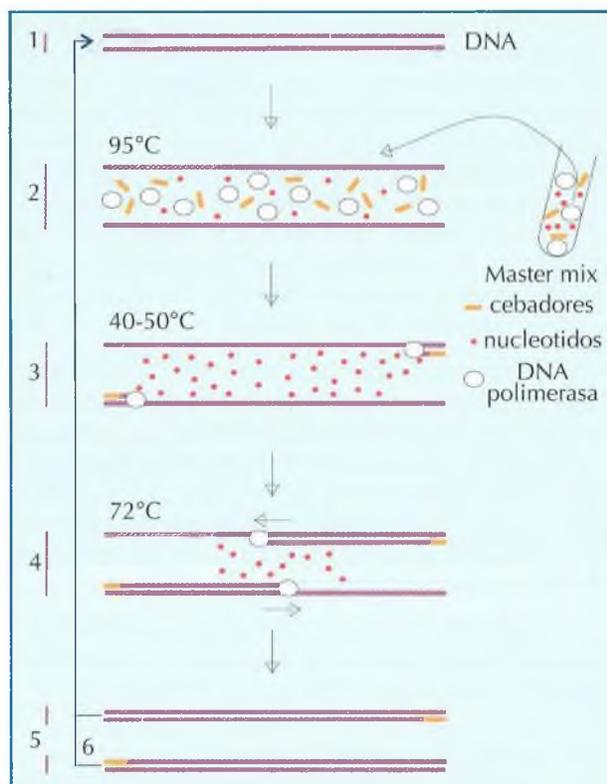


Figura 9.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación de un fragmento bicatenario de DNA comporta la definición previa del fragmento que desea amplificarse, generalmente entre 100 y 2.000 pares de bases; el diseño de dos cebadores (*primers*), uno para cada cadena, que delimitan el fragmento a amplificar; la preparación de la *master mix*, consistente en una mezcla de los cebadores, la DNA polimerasa (*Taq* polimerasa, que es termorresistente), los cuatro nucleótidos (G, A, C, T) y el tampón adecuado y requiere la disposición de un termociclador, que permita la variación de temperatura de los tubos conteniendo los reactivos.

La reacción procede según el siguiente protocolo: 1) Se extrae el DNA a amplificar del microorganismo y se incorpora a un tubo con la *master mix*, 2) se lleva al termociclador donde se eleva la temperatura para conseguir la desnaturalización (separación) de las dos cadenas del DNA, 3) se baja la temperatura hasta alcanzar la óptima para la unión de los cebadores a cada cadena (obsérvese que delimitan el fragmento a amplificar), 4) se sube la temperatura al nivel óptimo para la acción de la *Taq* polimerasa, que se une al fragmento bicatenario DNA-cebador y avanza sobre la cadena incorporando los oligonucleótidos en 3' del cebador (proceso denominado síntesis, polimerización o extensión). 5) Al final de la extensión, en lugar de la molécula de DNA bicatenaria inicial, hay dos moléculas bicatenarias, entonces 6) se inicia un nuevo ciclo que dará lugar a cuatro moléculas bicatenarias; el siguiente dará lugar a ocho y después de 30 o más ciclos existirán millones de copias del fragmento amplificado (amplicones). Después hay que detectar e identificar los amplicones formados, en un proceso que se denomina post PCR (ver figura 9.7).

Si el producto de partida es RNA en lugar de DNA debe realizarse previamente una transcripción inversa para obtener el cDNA molde, de modo semejante a lo comentado en la figura 9.10.

uno en cada hebra, ya que la renaturalización del DNA original entre sí es mínima porque los cebadores están en gran exceso.

¹⁰ Los nucleótidos se incorporan en forma de trifosfatos: deoxiguantina trifosfato (dGTP), deoxicitosina trifosfato (dCTP), deoxitimidina trifosfato (dTTP) y deoxiadenuina trifosfato (dATP).

¹¹ En realidad estos reactivos se incorporan simultáneamente en un tubo para formar la *master mix*, que es la mezcla del DNA diana, cebadores, nucleótidos y polimerasa que se someterá a amplificación.

3) Polimerización o extensión: se lleva a cabo durante 30 segundos a cinco minutos a 72° C, que es la temperatura óptima para la actividad de la *Taq*-polimerasa que se ha unido a cada uno de los fragmentos bicatenarios DNA-cebador, produciéndose las copias de ambas cadenas.

Ahora, por cada dos cadenas iniciales, ya existen cuatro. Se inicia un nuevo ciclo calentado a 95° C, para separar las cadenas recién formadas, bajando la temperatura entre 30 y 65° C para fijar los cebadores (siempre en gran exceso en la solución) y subiendo a 72° C para que actúe de nuevo la *Taq*-polimerasa.

Este proceso que tiene lugar en un instrumento automático, denominado termociclador, que va variando la temperatura según el programa señalado, se repite automáticamente a lo largo de 20 a 30 ciclos durante unas dos o tres horas hasta llegar a conseguir millones de copias.

Para la optimización de las reacciones de PCR ha de tenerse en cuenta numerosos factores, entre los que destacan el diseño de los cebadores y la selección de una temperatura de renaturalización óptima para conseguir una buena especificidad de hibridación de los cebadores con su diana, así como la concentración óptima de determinados elementos químicos de la solución, como el Cl_2Mg , y el pH adecuado¹².

Cuando el ácido nucleico inicial es RNA, como el genoma de algunos virus, la PCR requiere un paso previo consistente en la transformación del RNA en su cDNA mediante una transcriptasa inversa (DNA-polimerasa RNA-dependiente). Después puede aplicarse la técnica convencional de PCR.

Estas pruebas se desarrollan bajo formatos comercializados, en los que los fragmentos de DNA o RNA formados (amplicones) se transfieren a pocillos de placas tipo «microtiter» en los que hay fijadas sondas específicas disponiéndose de sistemas de revelado de estos híbridos. Estas pruebas comercializadas comportan la utilización de instrumentos con un elevado nivel de automatización, tanto para la extracción del ácido nucleico, como para su replicación en el termociclador y la lectura y para la posterior cuantificación de los amplicones.

La enorme utilidad y versatilidad de la PCR hace que sea también muy utilizada en forma artesanal («PCR caseras») en los laboratorios de diagnóstico; en este caso, los cebadores pueden encargarse y obtenerse en el comercio, así como el resto de reactivos. Los amplicones obtenidos son los fragmentos deseados porque los cebadores son específicos y se unen al lugar programado,



Figura 9.7. Detección de los amplicones.

Cuando la PCR se realiza con medios propios, no comercializados, la detección de los amplicones puede hacerse mediante electroforesis o con kits comercializados. El primer método —electroforesis en gel de agarosa— es muy utilizado, aunque sólo permite determinar el tamaño (masa) de los amplicones en función de la localización de las bandas que forman en el gel, reveladas con bromuro de etidio y comparadas con un control con fragmentos de DNA de diferentes pesos moleculares conocidos. Este procedimiento, que es el representado en la figura, únicamente permite suponer que los amplicones son los esperados si su tamaño es el adecuado (véase el capítulo 10. Electroforesis de DNA).

Para identificar inequívocamente los amplicones, se deben utilizar sondas, pero estas no pueden aplicarse sobre la agarosa, por lo que hay que transferir el material amplificado a un filtro de nitrocelulosa mediante una técnica de transferencia denominada *Southern blot*. Una vez transferidos pueden hibridarse con sondas específicas marcadas.

En el comercio existen sistemas más sencillos para la detección específica de los amplicones. Se basan en su fijación a pocillos de «microtiter» y su revelado con sondas marcadas (ver texto).

Al extraer los amplicones de los tubos donde se han obtenido, existe el peligro de contaminación del laboratorio.

Puede observarse los marcadores moleculares (M) y siete canales en los que se ha introducido en la parte superior el material obtenido después de amplificar por RT-PCR, el RNA obtenido de las heces de siete pacientes con enteritis, cuya sospecha etiológica era vírica. Los cebadores (*primers*) eran específicos para norovirus (virus de Norwalk). Puede observarse que tres de ellos (1, 5 y 6) son positivos y el tamaño de sus amplicones, 379 pb, es el esperado. (Los cebadores utilizados fueron Nvp 110 para la transcriptasa inversa y JV 12 y JV 13 para la PCR).

pero puede obtenerse una confirmación adicional determinando su tamaño después de una electroforesis en gel de agarosa (Fig. 9.7). En ocasiones, antes de la electroforesis, el DNA amplificado se corta mediante enzimas de restricción, formándose fragmentos que pueden observarse en el gel, lo que mejora la identificación del DNA amplificado¹³. Otra alternativa más rigurosa es el *Southern blot*, consistente en transferir, tras la electroforesis, el DNA desde el gel a una membrana de nitrocelulosa, donde el DNA puede hibridarse con sondas marcadas que permiten la identificación precisa de los amplicones.

¹² La temperatura de unión entre los cebadores y el DNA diana es variable y crítica en cada caso para que se produzca una unión específica entre ellos y el DNA. La temperatura óptima depende de la secuencia y longitud de los cebadores y de la composición del medio, entre otros factores. Si esa temperatura es demasiado baja, hay uniones inespecíficas, y, si es muy alta, pueden no unirse a su diana. Esta temperatura es muy importante y debe optimizarse para cada reacción. El calor, la baja osmolaridad y el pH alcalino facilitan la desnaturalización del DNA.

¹³ Para la descripción de la electroforesis y las enzimas de restricción véase el capítulo 10.

Esta técnica es larga y laboriosa; por ello, una alternativa más sencilla es captar el DNA amplificado mediante una sonda que se ha fijado a los pocillos de una placa de poliestireno tipo «microtiter» mediante un tampón de fijación¹⁴, con o sin irradiación. Su revelado es inmediato cuando el DNA se ha amplificado con cebadores marcados, ya que los amplicones quedan marcados (véase más adelante: Marcado de los amplicones). Alternativamente, si no se utilizan cebadores marcados, para detectar los amplicones captados por la sonda fijada en la placa, puede utilizarse otra sonda marcada. Hay compañías (Corning Inc, Science Products Division) que disponen de micropocillos con estreptavidina fijada que permite captar sondas o amplicones marcados con biotina.

Nested PCR

Para incrementar la sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa puede practicarse una PCR anidada (*nested*-PCR), consistente en la amplificación de un fragmento de DNA seguida de la amplificación, mediante otros cebadores, de un fragmento interior del primer fragmento amplificado. El desarrollo de esta PCR comporta efectuar una primera PCR en un tubo y pasar el producto de la amplificación a otro tubo al que se incorporan los nuevos cebadores para el fragmento interno que desea amplificarse junto al resto de reactivos y se procede a la segunda amplificación. La *nested* presenta algunas ventajas, como:

- 1) Gran sensibilidad.
- 2) El control de la especificidad de la primera PCR, que se confirma cuando la segunda amplificación es positiva, ya que los cebadores de ésta actúan como sondas de identificación de la primera.
- 3) La dilución de los productos de inhibición que puedan existir en la muestra inicial. Sin embargo, hay que señalar que este protocolo comporta un gran peligro de contaminación del laboratorio por los amplicones de la primera PCR al abrir el tubo. (véase más adelante: Limitaciones de la PCR).

Por otra parte, una PCR convencional bien optimizada, en muchos casos, presenta una sensibilidad equivalente a una anidada.

Se han propuesto diferentes protocolos para realizar la PCR anidada en un solo tubo sin abrir; uno de ellos se basa en la diferencia de temperatura óptima de hibridación de los dos juegos de cebadores que se incorporan simultáneamente a un único tubo, desarrollándose el primer ciclo de amplificación a una temperatura de hibridación óptima para los primeros cebadores, y el segundo ciclo a otra temperatura diferente, óptima para los segundos cebadores.

PCR múltiple

En algunas ocasiones se introducen simultáneamente en la *master mix* varios juegos de cebadores diferentes para distintos fragmentos de DNA, amplificándose simultáneamente diferentes dianas del DNA de un microorganismo.

Por ejemplo, en una bacteria puede detectarse simultáneamente un fragmento genómico específico de especie y un fragmento del gen de resistencia a un antibiótico con dos juegos de cebadores, determinando en una sola PCR la especie y la resistencia al antibiótico del microorganismo. Para realizar este tipo de PCR, debe asegurarse la compatibilidad de la temperatura de hibridación de los diferentes cebadores, así como la ausencia de hibridación entre ellos. De todas maneras, ha de tenerse en cuenta que las reacciones inespecíficas suelen ser más frecuentes que en la PCR simple.

Marcado de los amplicones

Un aspecto interesante de la PCR es que la parte inicial de un amplicón es el cebador, que ha sido expandido por acción de la polimerasa. Por tanto, si los cebadores se marcan con una enzima, una sustancia luminiscente, biotina u otro marcador, los amplicones portarán en su extremo ese marcador. Un ejemplo de su utilidad, entre muchos otros, es el que se ha señalado anteriormente en la hibridación inversa o de captura y para el revelado de las «PCR caseras» (Fig. 9.5).

Limitaciones de la PCR

Entre los problemas que plantea la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, está la presencia de inhibidores en las muestras. Diversos productos orgánicos que se hallan naturalmente en las muestras clínicas pueden inhibir la reacción. Entre ellos cabe destacar la sangre (heme), los ácidos biliares, polisacáridos del esputo e incluso sustancias como la heparina, el dodecil sulfato sódico o el cloruro de guanidina, que se utilizan en diferentes procesos de manipulación de los ácidos nucleicos; sin embargo, muchos inhibidores no han sido identificados.

También hay que tener en cuenta que sólo se pueden amplificar fragmentos de DNA de una determinada longitud más allá de la cual la polimerasa deja de actuar. El tipo de polimerasa, entre otros parámetros, condiciona la longitud del fragmento que puede sintetizarse eficazmente.

Otro problema importante son las contaminaciones, que pueden ser de dos tipos diferentes: la contaminación puntual de una muestra negativa por otra positiva durante el proceso inicial de extracción del DNA y la contaminación general del laboratorio con los amplicones de una PCR previa.

¹⁴ Acetato amónico, PBS, Tris.

Para evitar el primer tipo de contaminación, que sólo suele afectar a una muestra, basta con manipular las muestras con cuidado en la fase inicial de extracción de los ácidos nucleicos.

Para evitar el segundo tipo de contaminación, la PCR debe realizarse en dos áreas diferentes del laboratorio que estén alejadas entre sí. En la primera, el área de pre-PCR, se efectúa la extracción de los ácidos nucleicos de las muestras y se prepara la *master mix*¹⁵, y en la otra, la de post-PCR, se realiza la amplificación en el termociclador y se leen los resultados.

Existen otros métodos complementarios para evitar las contaminaciones, entre los que destaca la utilización de la uracil-N-glicosidasa, que no excluye la recomendación de utilizar dos áreas diferenciadas (pre y post-PCR) para desarrollar la reacción. El método consiste en emplear una mezcla de nucleótidos (T, C, G, A) en la que el desoxitimidin-trifosfato (dTTP) se substituye por el desoxiuridin-trifosfato (dUTP), conservándose los otros nucleótidos, dCTP, dGTP y dATP, añadiéndose una cantidad adecuada de la enzima uracil-N-glicosidasa antes de la reacción. Durante la amplificación se irán agregando los nucleótidos adecuados; sin embargo, en lugar del dTTP, se insertará el dUTP, que no se halla en ningún DNA de forma natural. Si de manera fortuita este DNA amplificado llegara a la zona de pre-PCR y contaminara algún tubo o reactivo de una nueva prueba en el que se ha añadido la uracil-N-glicosidasa, este enzima reconocería las cadenas del DNA contaminante con uracilo de la amplificación previa, pero no el DNA natural con timina que va a amplificarse, de forma que a 50° C la enzima cataliza la escisión del uracilo, degradando el DNA contaminante sintetizado con dUTP impidiendo que actúe como molde para una nueva amplificación. A continuación, la enzima se inactiva con la temperatura de desnaturalización a 95° C del primer ciclo, de forma que no puede actuar sobre las nuevas cadenas amplificadas. Con este método se han podido inactivar hasta 10⁶ moléculas de DNA.

También se pueden inactivar los amplicones mediante radiaciones ultravioletas o por acción fotoquímica con isoporalen.

PCR cuantitativa

En ocasiones no sólo interesa la detección específica del DNA o el RNA amplificado de forma cualitativa, sino también cuantificar el número de copias que existía inicialmente en la muestra clínica. Para la cuantificación suele utilizarse una técnica competitiva que consiste en incorporar a la reacción un DNA o RNA competidor, según el tipo de ácido nucleico diana a amplificar, que

tenga la misma longitud y utilice los mismos cebadores que el DNA o RNA diana (problema). La cantidad del competidor incorporada debe ser conocida, de modo que puedan determinarse al final de la amplificación las cantidades respectivas de amplicones producidos por el competidor y el problema. Dada la igualdad de condiciones de reactivos y del proceso de amplificación, así como la relación lineal entre los cocientes competidor/problema iniciales y finales, puede determinarse la cantidad inicial de ácido nucleico problema en la muestra¹⁶. En las infecciones por citomegalovirus, en el sida o la hepatitis C, la determinación del número de viriones existente (número de copias del genoma) permite efectuar un seguimiento secuencial de la concentración plasmática de virus, lo que ayuda a establecer un pronóstico sobre la enfermedad, determinar la eficacia de la terapéutica o sospechar la aparición de resistencias a los antivíricos a lo largo del tratamiento, según incremente o disminuya el número de copias en los sucesivos controles.

PCR a tiempo real

Esta clase de PCR permite la ejecución de la técnica en un tiempo muy reducido, alrededor de 30 minutos, y la cuantificación precisa y continua del DNA que se va formando, ya que, tal como indica su nombre, al mismo tiempo que va teniendo lugar la PCR, se va detectando una señal que aumenta en proporción directa a la cantidad de producto formado en cada ciclo de la reacción.

El sistema utiliza los mismos ingredientes que una PCR convencional; sin embargo, a diferencia de aquella, la muestra no se coloca en un tubo convencional, sino en un tubo o un capilar, que permiten cambiar de temperatura en un tiempo muy inferior al de los instrumentos convencionales. El fragmento amplificado suele ser más corto que en la técnica convencional. Todo ello acelera la reacción. El termociclador y el lector han de ser específicos para esta prueba.

Existen diversos métodos para la detección en cada ciclo de los amplicones formados. Uno de ellos se basa en la utilización de colorantes intercalados, como el SYBR Green I, que es una molécula fluorescente que se une al DNA bicatenario (no al monocatenario, al igual que el bromuro de etidio). Este colorante no emite fluorescencia cuando se encuentra en solución, pero sí cuando se une al DNA de doble cadena, evaluándose en cada ciclo, al final de la elongación, la intensidad de la fluorescencia, que será mayor cuanto más producto de amplificación se haya formado (Fig. 9.8).

Otro método de marcado son las sondas fluorescentes tipo «*molecular beacons*», TaqMan y otras basadas en la tecnología FRET (*fluorescent resonance energy transfer*

¹⁵ Sería deseable poder preparar la *master mix* en otra área diferente.

¹⁶ NCCLS. *Quantitative molecular methods for infectious diseases. Approved Guideline*. NCCLS document. MM6-A.2003. Wayne. Pen., 2003.

system). Esta tecnología se basa en la interacción entre sustancias fluorescentes, estimulando una la producción de luz por la otra o bloqueando la emisión lumínica de la otra.

En las sondas denominadas «*molecular beacons*», su extremo 5' está unido a un compuesto fluorescente (marcador, *reporter*), y el 3' a una molécula denominada extintora (*quencher*).

Cuando la sonda está libre, la molécula hibrida con ella misma formando una estructura de plegamiento en horquilla que acerca el extremo 5' al 3', por lo que la molécula extintora bloquea la fluorescencia del marcador situado en 5'. En el momento del ciclo de PCR en que se produce la hibridación de los cebadores a sus secuencias complementarias, la sonda también hibrida en una región central de DNA adoptando una forma alargada que aleja su extremo 5' del 3'. Entonces la fluorescencia no es bloqueada por la molécula extintora y es captada por la unidad óptica del aparato con un filtro de longitud de onda adecuada. La fluorescencia se irá incrementado con el número de ciclos y será proporcional al número de copias específicas que se vayan formando (Fig. 9.8).

Otro tipo de sondas son las TaqMan, que consisten en un oligonucleótido similar a las «*molecular beacon*», aunque su forma natural es lineal, sin plegamiento, pero, al ser más corta, la molécula extintora actúa continuamente sobre el marcador bloqueando la fluorescencia. Durante el desarrollo de la PCR en el estadio de unión de los cebadores, esta sonda se unirá a las cadenas de DNA sin emitir fluorescencia. Durante el período de elongación, la *Taq* polimerasa, al alcanzar la sonda, elimina los nucleótidos uno a uno (acción exonucleasa) para incorporar los nuevos, por lo que el nucleótido marcado queda libre en solución. Entonces el marcador libre de la acción del extintor emite la señal que es captada por la unidad óptica del aparato de forma similar a las sondas «*molecular beacons*» (Fig. 9.8).

Otra variación del sistema FRET se basa en el empleo de dos sondas para detectar los amplicones. Una de ellas está marcada en su extremo 3' con fluoróforo, y la otra en 5' por un marcador fluorescente, excitable por el fluoróforo. Ambas sondas son complementarias al DNA molde e hibridan con éste muy cerca una de otra, separadas como máximo por 5 bases. Al hallarse tan próximas entre sí, el fluoróforo excitado por luz azul excita a su vez al marcador de la segunda sonda, que emite a una longitud de onda más larga, captada por el filtro adecuado.

El SYBR Green FRET es un sistema sencillo. Este producto (SYBR Green) se intercala en el fragmento bica-

tenario formado por el DNA y la sonda, la cual lleva un marcador fluorescente que se excita por el SYBR Green, que se activa al unirse a la doble cadena DNA/sonda. Las moléculas que se unen a la pareja sonda-diana, al estar próximas al marcador, lo excitan.

Al igual que en los otros diseños de la técnica, la intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional a la amplificación producida. La computadora del instrumento registra en un gráfico la dinámica de la reacción en relación al número de ciclos, y un programa informático traduce la cinética de la emisión de fluorescencia en copias de DNA/ml tras compararla con patrones estándar (Fig. 9.9).

En resumen, las características de la PCR en tiempo real son: la rapidez, la precisión de la cuantificación al monitorizar continuamente todo el proceso y, por tanto, la zona exponencial y la ausencia de contaminaciones, porque no ha de abrirse el capilar o tubo con los amplicones en ningún momento.

Otras técnicas de amplificación de la diana

La competencia comercial limitada por las patentes y el objetivo de amplificar el genoma de algunos virus RNA de gran interés, como el VIH o el de la hepatitis C, han promovido una intensa investigación para el desarrollo de métodos de amplificación de ácidos nucleicos alternativos a la PCR, entre los que destacan los de amplificación basada en la transcripción (TAM, NASBA y otras)¹⁷ o en el desplazamiento de la cadena (SDA).

Amplificación basada en la transcripción

Ha sido una de las técnicas alternativas a la PCR para amplificar la diana, generalmente RNA¹⁸. Existen diferentes variedades de esta técnica, como NASBA, TMA y 3SR¹⁹. La técnica utiliza varias enzimas y se basa en la síntesis de cDNA mediante una transcriptasa inversa (TI) copiando el RNA diana, al que previamente se ha unido un cebador, dando lugar a un híbrido RNA-cDNA. El RNA es degradado por una RNAasa quedando una única cadena de cDNA, a la que se une un segundo cebador y sobre la que la TI copia su complementaria de DNA, formándose una doble cadena de DNA que es apta para que el tercer enzima, que es la T7 RNA-polimerasa (obtenida del bacteriófago T7), reconociendo una señal iniciadora de los cebadores transcriba numerosísimas copias de RNA, que podrán reiniciar el ciclo. La reacción comporta dos cebadores que marcan el inicio de la acción de la TI y uno de ellos, además de la T7 RNA-polimerasa (Fig. 9.10). Esta reac-

¹⁷ La transcripción es la síntesis de RNA a partir de DNA.

¹⁸ Esta técnica se ha utilizado para detectar RNA vírico, pero también RNA ribosomal bacteriano. Así mismo, permite la cuantificación de la diana.

¹⁹ *Nucleic acid sequence-based amplification* (NASBA), *Transcription-mediated amplification* (TMA), *Self sustaining sequence replication* (3SR).

ción se desarrolla a temperaturas de entre 37 y 42° C de modo isotérmico, por lo que no requiere termocicladores.

A continuación, la detección del material amplificado se puede efectuar de muy distintas maneras mediante un sistema de protección de la hibridación (HPA; *hybridization protection assay*, cuyo fundamento se detalla en el apartado Hibridación en solución) o sondas específicas mar-

Figura 9.8. PCR en tiempo real.

La PCR en tiempo real es semejante a la PCR convencional, representada en la figura 9.6.

Sin embargo, posee cuatro ventajas adicionales, 1) la rapidez, 2) la precisión en la cuantificación de los amplicones presentes en la muestra, 3) la ausencia de post PCR, ya que la identificación y el recuento de los amplicones se hace simultáneamente en el mismo tubo o capilar, mediante fluorocromos intercalados (SYBR Green) o la tecnología FRET y 4) el menor riesgo de contaminaciones.

La rapidez se debe fundamentalmente a mejoras instrumentales, puesto que para efectuar la reacción se utilizan tubos o capilares que permiten cambios muy rápidos de la temperatura y por lo tanto acortar los tiempos de cada ciclo, así como a la ausencia de post PCR.

Otro aspecto importante es la lectura continua del número de amplicones formados en cada ciclo, lo que da el nombre a la prueba (tiempo real) y permite efectuar una cuantificación muy rigurosa al explorar la zona de replicación exponencial y no sólo la final (Fig. 9.9). Para ello, se utilizan diferentes sistemas como el de los colorantes fluorescentes intercalados o las sondas tipo *molecular beacons*, TaqMan u otras basadas en la tecnología FRET (*fluorescence resonance energy transfer*). Como no hay post PCR para la detección de los amplicones, no hay que abrir los tubos y disminuye el riesgo de contaminación.

El termociclador para estas pruebas debe ser adecuado para permitir los cambios rápidos de temperatura y la lectura de la señal emitida por las sondas. A continuación se muestran los sistemas de detección de los amplicones.

A. El colorante fluorescente SYBR Green I, en solución produce un nivel de fluorescencia muy bajo, pero cuando se une al DNA de doble cadena, por el que tiene gran afinidad, emite un nivel muy elevado de fluorescencia que es cuantificado al final de cada ciclo de extensión cuando el DNA esta en forma bicatenaria, por lo que la cuantificación se produce a cada ciclo hasta el final del proceso. La unión del colorante al DNA de doble cadena es inespecífica por lo que cuantifica, pero no identifica los amplicones.

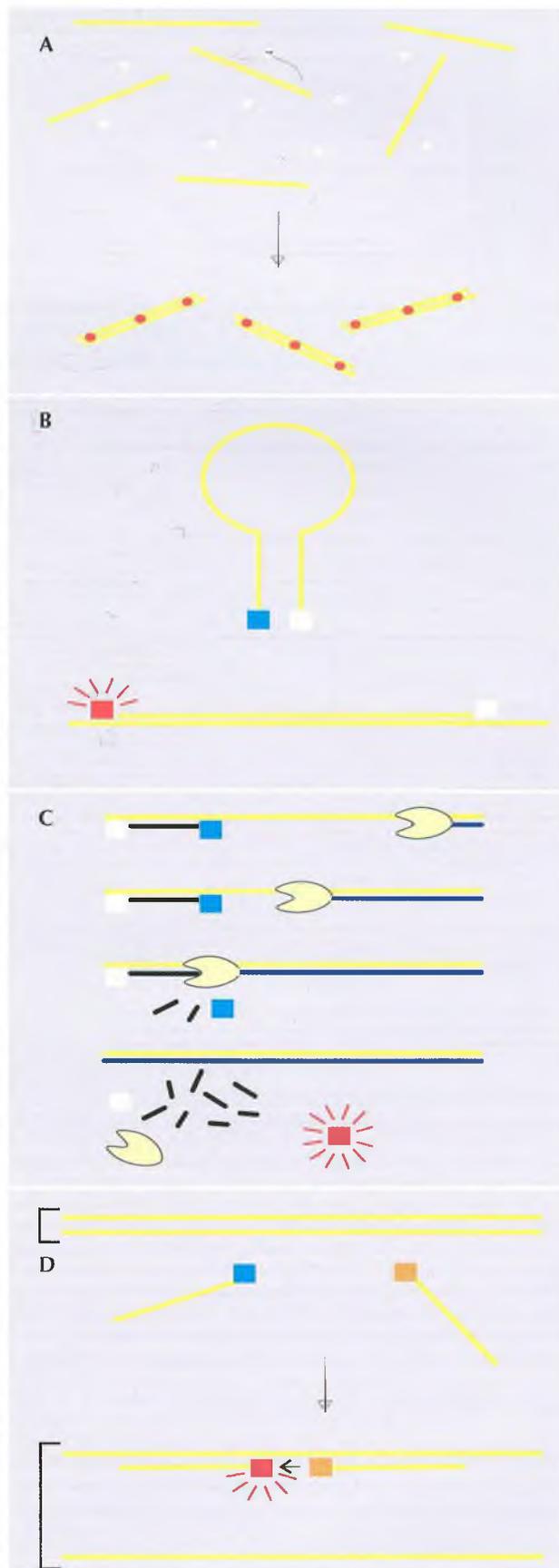
B. Los *molecular beacons* son sondas que llevan en un extremo un fluoróforo, (*reporter*, marcador), (hexaclorofluoresceína u otro) y en el otro una sustancia como la tetrametil rodamina que bloquea la fluorescencia del primero cuando está próximo a él (inhibidor, *quencher*). En solución, ambos extremos de la sonda están próximos por la existencia de dos secuencias complementarias entre sí, que hibridan formando una horquilla y en el centro posee otra secuencia complementaria de la de los amplicones.

En cada ciclo, cuando se alcanza la temperatura de hibridación de los cebadores la sonda se une a los amplicones, por lo que se separan sus extremos y la radiación fluorescente es emitida y registrada.

C. Las sondas TaqMan son cortas, por lo que la señal y el inhibidor están muy próximos y al hibridar, en la fase de fijación de cebadores, no se produce señal, pero durante el proceso de extensión, trabajando con una DNA polimerasa con actividad de exonucleasa, ésta escinde uno a uno los nucleótidos de la sonda a medida que sintetiza la nueva cadena, por lo que el nucleótido portador del fluoróforo es liberado y alejado del inhibidor, permitiendo la emisión de fluorescencia.

D. Una variante de estos sistemas FRET consiste en el empleo de dos sondas que hibridan en los amplicones una muy cerca de la otra; la primera lleva en su extremo 3' un fluoróforo que es excitado por una radiación externa y emite luz y la otra lleva en su extremo 5' un fluoróforo que recibe la energía lumínica de la primera y emite a su vez luz en otra longitud de onda. Cuando deshibridan, separándose en la solución y cesa la luminiscencia.

Todas estas sondas no sólo cuantifican sino que al dar señal únicamente cuando se unen a su fragmento complementario específico, identifican los amplicones formados.



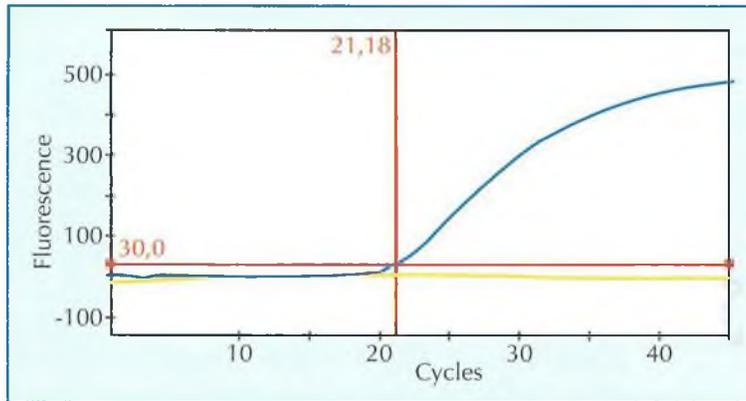


Figura 9.9. PCR a tiempo real. Curva de registro.

Se muestra la gráfica de registro de la PCR en tiempo real de un líquido cefalorraquídeo de un paciente con meningitis. En ordenadas se indica la intensidad de la fluorescencia y en abscisas el ciclo de amplificación. La línea azul corresponde a la intensidad de la fluorescencia en cada ciclo emitida por una sonda tipo TaqMan específica para *Neisseria meningitidis* (meningococo). Puede observarse que a partir del ciclo 21 se produce la fase de incremento exponencial de la señal fluorescente. (Análisis cinético de la PCR en tiempo real: *BioTechnology*, 1993, 11: 1026-1030.)

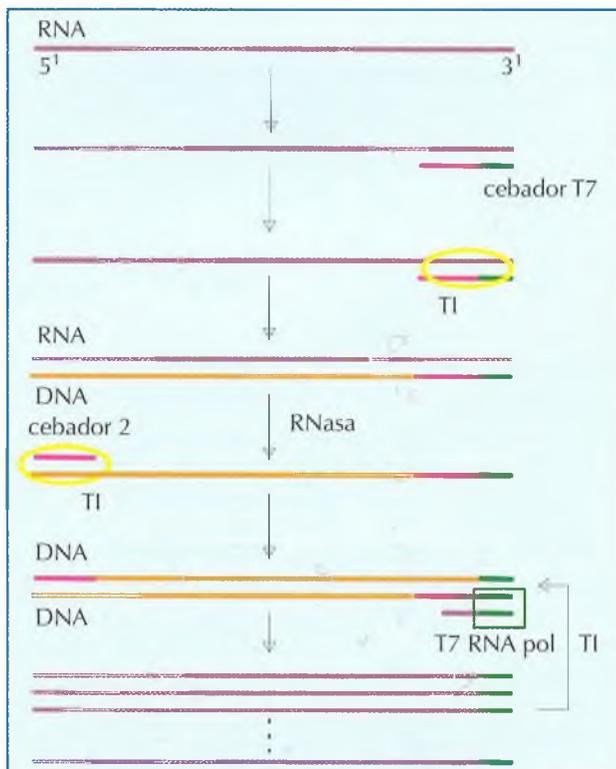


Figura 9.10. Técnicas de amplificación basadas en la transcripción.

El proceso se inicia con la unión al RNA diana de un cebador (cebador T7), que posee en un extremo una secuencia que será reconocida por la T7 RNA polimerasa obtenida del bacteriófago T7. Una transcriptasa inversa (TI), a partir de ese cebador, sintetiza DNA formando un híbrido RNA/DNA. Una RNasa destruye el RNA y la transcriptasa inversa con un nuevo cebador (cebador 2) crea una doble cadena DNA/DNA, ya que la TI también tiene función de DNA polimerasa. Si la transcriptasa inversa es la del virus de la mieloblastosis aviar no se requiere la RNasa ya que esa enzima posee también esa acción.

La T7 RNA polimerasa reconoce su extremo específico en el DNA, que ha sido introducido con los cebadores y a partir de él efectúa numerosas copias de RNA que reinician el ciclo.

cadras con diferentes sustancias. También se están utilizando las sondas empleadas en la PCR a tiempo real, especialmente los «molecular beacons», con el fin de realizar una amplificación isotérmica con lectura en tiempo real.

Existen otras técnicas de amplificación de la diana, como la SDA (*Strand displacement amplification*), que es de fácil y eficiente realización, pero conceptualmente compleja.

OTRAS TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN

Otra línea de investigación para la detección de ácidos nucleicos con fines de diagnóstico la constituyen las técnicas de amplificación de las sondas o la señal. En las primeras, en lugar de amplificarse el ácido nucleico diana del microorganismo buscado, se produce la amplificación de las sondas una vez que éstas han hibridado con su diana. Las más conocidas son la técnica de la Q β -replicasa y la de la ligasa, pero la primera no se halla comercializada. Por otra parte, existen técnicas que, en lugar de amplificar la diana o la sonda, amplifican la señal.

Amplificación dependiente de la DNA-ligasa

La prueba de amplificación de la ligasa o *ligase chain reaction* se basa en ligar y amplificar los cebadores. Se utilizan cuatro cebadores: dos para cada cadena del DNA. Los dos cebadores de una cadena son contiguos, de modo que se alinean uno junto al otro. Los cebadores de la segunda cadena se han diseñado para el fragmento de DNA complementario, al que se unen los cebadores en la primera cadena; por lo tanto, también son contiguos. Al subir la temperatura, se separan ambas cadenas de DNA; y al bajar a temperatura de hibridación, los cebadores se unen a su diana sin que apenas se produzca la renaturalización del DNA por el gran exceso de cebadores existente.

Mediante la DNA-ligasa, los dos cebadores contiguos de una cadena por un lado, y los de la otra cadena por otro lado, quedan unidos. Cuando de nuevo se sube a la temperatura de desnaturalización, se liberan los fragmentos de DNA ligados, de manera que ahora no sólo el DNA inicial es diana para los cebadores, sino que además los cebadores unidos son diana para nuevos cebadores.

La reacción se efectúa en un termociclador para alcanzar secuencialmente las temperaturas de desnaturalización, hibridación y de acción de la ligasa (Fig. 9 11).

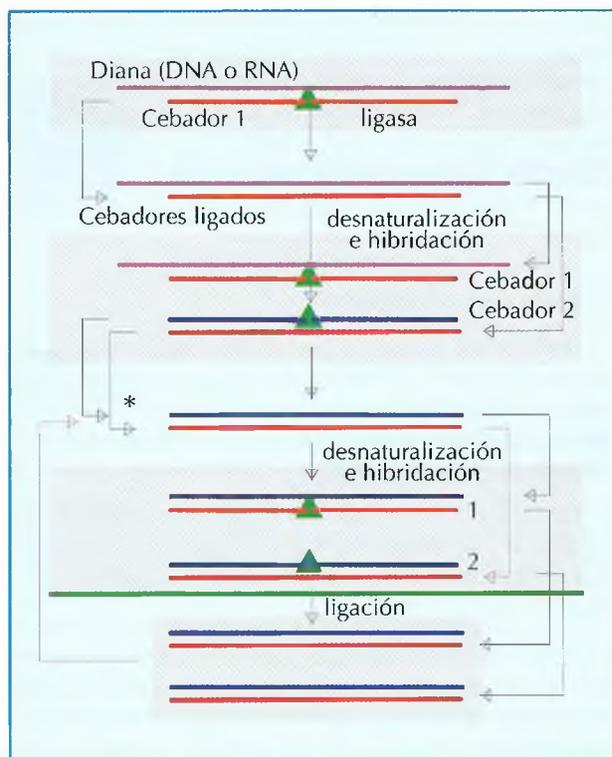


Figura 9.11. Técnicas de amplificación de la sonda.

Las principales técnicas de amplificación de la sonda son la reacción en cadena de la ligasa, (*ligase chain reaction*) la técnica de las sondas invasoras (*cleavase-invader technology*) y la de reciclado de la hibridación de las sondas (*cycling probe technology*).

En la reacción en cadena de la ligasa cuatro sondas (cebadores), dos por cada cadena, después de fijarse en las zonas diana, que se hallan muy próximas, se unen con una ligasa y sirven de dianas a nuevas sondas que prosiguen el proceso. (En la figura sólo se muestra la amplificación en una cadena de DNA. A partir del paso marcado en la figura con un asterisco *, las sondas ya forman una doble cadena como en el DNA original, constituyendo nuevas dianas para la amplificación.)

En esta técnica, que está comercializada y automatizada, es fácil que se produzcan contaminaciones, y los amplicones al ser cortos, resultan de difícil inactivación física o química.

La detección de las sondas amplificadas, se puede realizar usando sondas marcadas por cualquiera de los métodos descritos previamente.

Amplificación de la señal

bDNA

Los métodos de amplificación de señal se basan en el hecho de captar varias sondas marcadas; como el sistema de sondas compuestas o el que utiliza sondas ramificadas. Este último (*branched DNA*; bDNA) ha sido comercializado, y probablemente es el más utilizado dentro de esta categoría.

La técnica se basa en fijar sobre un soporte unas sondas de captura del DNA diana. Cuando éste ha sido capturado (si está presente), a él se unen otras sondas, y a

Tabla 9.3

Principales equipos y reactivos para la detección de microorganismos en la muestra clínica por técnicas de amplificación de ácidos nucleicos

Microorganismo	Técnica	Casa Comercial
<i>M. tuberculosis</i>	PCR	Roche
	TMA	Gen-Probe, Inc
	LCR	Abbott Laboratories
	SDA	BD Biosciences
Gonococo y clamidia	PCR	Roche
	TMA	Gen-Probe, Inc
	LCR	Abbott
	CH	Digene Corp.
VIH (cuantitativa)	PCR	Roche, Abbott Laboratories
	NASBA	bioMérieux
	bDNA	Chiron Diagnostics
	TMA	Gen-Probe, Inc.
VIH/cDNA (cualitativa)	SDA	BD Biosciences
	PCR	Roche
Hepatitis C (cualitativa)	PCR	Roche
	TMA	Gen-Probe, Inc.
Hepatitis C (cuantitativa)	PCR	Roche
	bDNA	Chiron Diagnostics
Hepatitis B (cuantitativa)	PCR	Roche
	TMA	Gen-Probe, Inc
	bDNA	Chiron Diagnostics
<i>Herpesviridae^a</i>	PCR	Pharmagen
	PCR	Real
<i>Papillomaviridae</i>	CH	Digene Corp.
Citomegalovirus (cualitativa)	PCR	Roche
	CH	Digene Corp.
	NASBA	bioMérieux
Toxoplasma ^b	PCR	Sorin

Además de los equipos preparados completamente para su uso, muchas compañías proporcionan cebadores, sondas y sistemas para la detección de los amplicones, de alta calidad, por lo que puede diseñarse en los laboratorios pruebas de amplificación con gran soporte técnico por parte de estas compañías.

No hay duda de la enorme expansión de la tecnología a tiempo real, basada en instrumentos que permiten ciclos térmicos rápidos y sondas de lectura continua (*molecular beacons*, TaqMan, etc.). La demanda está invitando a diversas compañías a producir reactivos para muy diversos microorganismos, adaptados a diferentes aparatos como AB Prism, Light Cycler, Smart Cycler, iCycler y otros. Entre las compañías que producen estos reactivos, están Roche, Artus, Qiagen Inc. Operon Tec, etcétera.

^a Incluye virus del herpes simple tipo 1 y 2, virus herpes humano 6, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr y varicela-zoster.

^b La primera parte de la reacción no está comercializada. Diversas compañías comercializan sistemas de detección.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; TMA: amplificación basada en la transcripción; LCR: reacción en cadena de la ligasa; SDA: amplificación mediada por desplazamiento de la cadena; CH: hibridación de captura; NASBA: amplificación isotérmica de secuencias de ácidos nucleicos; bDNA: DNA ramificado.

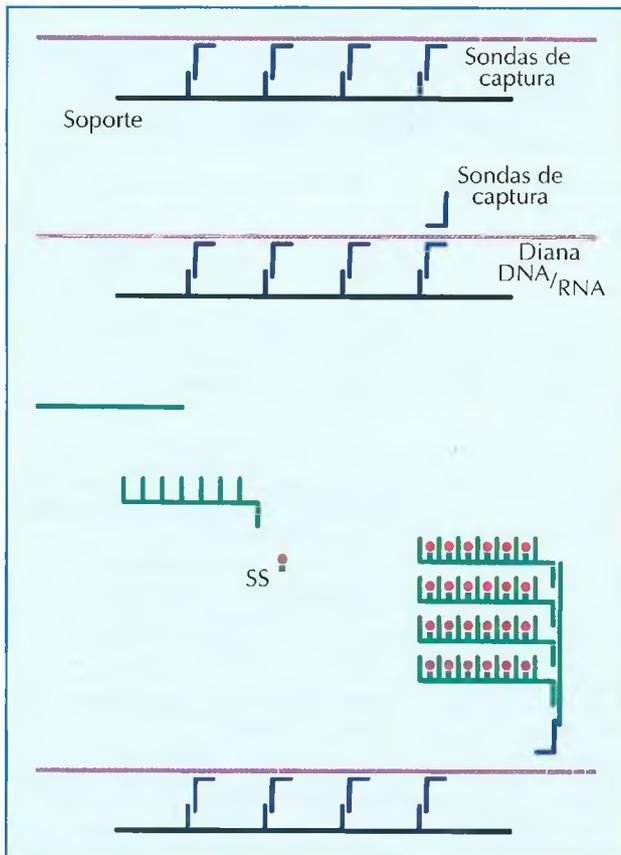


Figura 9.12. Técnicas de amplificación de la señal.

En las técnicas de amplificación de la señal, como la bdDNA (*branched DNA*), unas sondas fijadas a un soporte captan al DNA (o RNA) diana. Otra sonda se une al ácido nucleico captado, y a ésta una tercera sonda a la que se unen numerosas sondas ramificadas y a cada rama se unen pequeñas sondas de señal (SS), marcadas con fosfatasa alcalina, que al actuar sobre el adamantil dioxetano aril fosfato, emite la señal lumínica.

estas, otras que están ramificadas, uniéndose finalmente a cada una de las ramas una pequeña sonda marcada con una enzima como la fosfatasa alcalina, que activará la quimioluminiscencia de un sustrato añadido,

como el dioxietano (soporte = sonda = DNA diana = sonda = sonda ramificada = sondas con el marcador > sustrato → señal). En estas condiciones pueden llegar a fijarse hasta 3.000 sondas marcadas por diana. Este sistema, que se basa en el empleo de una larga serie de sondas, incrementa la especificidad de la prueba, ya que exige la hibridación específica de todas ellas (Fig. 9.12).

Técnicas comercializadas

Las técnicas de amplificación comercializadas se aplican en el contexto de las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana, tanto para su diagnóstico como para estudios cuantitativos con fines pronósticos y de control de tratamiento.

También son muy utilizadas en el diagnóstico de las hepatitis B y C, infección por citomegalovirus y virus de Epstein-Barr, tanto para la detección del virus como para estudios cuantitativos.

Otros virus detectados por métodos comercializados son el herpes simple, varicela, enterovirus o HTLV I y II, para alguno de los cuales existen métodos que permiten su cuantificación.

Entre las bacterias se hallan sistemas comercializados para el diagnóstico de las infecciones por *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*.

El paso progresivo de los métodos tradicionales de amplificación a los de tiempo real se acompaña de la oferta de equipos y reactivos para la amplificación y cuantificación del genoma de nuevos microorganismos, como citomegalovirus, virus de Epstein-Barr y otros.

Es previsible la inmediata oferta de reactivos para PCR en tiempo real, para la detección de muy diversos microorganismos, genes de virulencia y de resistencia.

En la tabla 9.3 se muestran algunas pruebas de amplificación comercializadas.

INTRODUCCIÓN

En los laboratorios de microbiología clínica los microorganismos suelen identificarse a nivel de especie, porque este nivel de identificación, junto a los datos de sensibilidad a los antimicrobianos, resulta suficiente, en la mayoría de los casos, para orientar el tratamiento de la infección y establecer las medidas de profilaxis adecuadas. Sin embargo, en algunas situaciones es importante subdividir una especie en grupos infraespecíficos, porque cada grupo puede presentar características diferenciales muy importantes. Así, dentro de una especie, algunos grupos son patógenos y otros no, o bien causan diferentes procesos patológicos, tal como sucede con *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Chlamydia trachomatis* y con algunos virus. En estos casos, es imprescindible no sólo identificar la especie, sino también diferenciar los grupos infraespecíficos, como se verá en los ejemplos que se señalan más adelante.

Por otra parte, ante la aparición simultánea en tiempo y lugar de infecciones causadas por una especie determinada, resulta importante saber si se trata en todos los casos de la misma cepa, ya que este dato es fundamental para confirmar que se está ante una epidemia o, por el contrario, se trata de cepas diferentes con una coincidencia temporo-espacial casual.

Existen diversos métodos que permiten subdividir (tipar) una especie en grupos infraespecíficos (tipos o variedades). Estos métodos pueden basarse en el estudio de características fenotípicas o genotípicas.

Los caracteres más utilizados para el fenotipado han sido los bioquímicos (biotipo), los antigénicos (serotipo), la lisis por bacteriófagos (fagotipo) y el patrón de sensibilidad a los antibióticos (antibiotipo). También se ha discriminado entre las cepas de una especie bacteriana en función de las diferencias en el contenido de las proteínas totales o de la envoltura.

Existe un método fenotípico de clasificación infraespecífica basado en las diferencias de movilidad electroforética de las variantes de una enzima (isoenzimas) codificadas por los distintos alelos del gen. Con esa técnica se estudia un conjunto de enzimas esenciales para la célula (*multilocus enzyme electrophoresis*, MLEE).

La introducción en los últimos años de las técnicas de genotipado, basadas en el estudio de las diferencias del genoma, ha facilitado el desarrollo de pruebas que utilizan los mismos o parecidos reactivos, pudiendo aplicarse procedimientos semejantes a microorganismos muy diferentes (bacterias, hongos, protozoos, virus). Una de las características del análisis del genoma de un microorganismo con fines de diferenciación infraespecífica es que, en principio, todos los microorganismos son tipables, a diferencia de lo que sucede con las pruebas fenotípicas, en las que, obviamente, no se puede determinar el biotipo de un virus, ya que no tiene metabolismo, o el antibiotipo de un protozoo, ya que habitualmente no se practican estudios de sensibilidad; incluso dentro de un grupo microbiano hay especies susceptibles de ser estudiadas mediante un método fenotípico determinado y otras no (por ejemplo: el biotipado).

Las características de un sistema de marcado epidemiológico (fenotípico o genotípico) se definen fundamentalmente en función de cuatro parámetros: 1) tipabilidad, que es el porcentaje de cepas que son susceptibles de ser analizadas por el sistema utilizado, 2) poder discriminativo, que es la capacidad para identificar como distintas dos cepas que realmente lo son, lo que depende del número de tipos distintos reconocidos por la prueba, 3) reproducibilidad, que se expresa como el porcentaje de cepas de una especie que dan lugar al mismo resultado al repetir la prueba, y 4) la complejidad de la prueba y la dificultad para obtener los reactivos, que también constituye un factor a tener en cuenta.

Concepto de clon

Un clon está formado por un conjunto de microorganismos que se originan de un progenitor (antecesor, ancestro) común y, por tanto, se parecen más entre sí que a los microorganismos de otro clon que, por definición, tienen un progenitor diferente.

Sin embargo, este concepto es impreciso, ya que constituyen un grupo clonal tanto microorganismos que se originaron de un ancestro común hace miles o millones de años, como por ejemplo las miríadas de bacterias que hoy forman el clon *Escherichia coli* 0157:H7, como las

(relativamente) escasas células de *Pseudomonas aeruginosa* serotipo 6 que están causando infecciones en pacientes de una UCI desde hace un mes cuando esta bacteria fue introducida —imaginemos que se introdujo una sola célula bacteriana— en ese ámbito. En el primer caso, las bacterias del clon, después de tantos años transcurridos desde su origen, aunque muestran muchos caracteres comunes que las identifican como clonales, también han tenido ocasión de que aparezcan diferencias; por el contrario, en el caso de un clon epidémico, como en el ejemplo de la pseudomonas, las bacterias en tan poco tiempo no han tenido ocasión de sufrir modificaciones y por tanto, en principio, son rigurosamente idénticas¹. Debería, por tanto, diferenciarse el concepto de «clon filogenético» de «clon epidémico».

Se denominan «marcadores» aquellos caracteres de un microorganismo que, al compararlos con los de otro microorganismo, permiten establecer las semejanzas y las diferencias entre ambos. Algunos marcadores permiten cuantificar el grado de similitud entre los microorganismos comparados.

Entre los caracteres fenotípicos, el biotipo, fagotipo y antibiotipo son marcadores epidemiológicos, en tanto que el serotipo completo de algunas bacterias —definido por varios antígenos simultáneamente— y en particular el *multilocus enzyme electrophoresis* son, sobre todo, marcadores filogenéticos (dibujan grandes linajes evolutivos).

Entre los marcadores genotípicos, algunos poseen preferentemente valor epidemiológico, como el estudio de los fragmentos de restricción y otros filogenéticos, como las variaciones en la secuencia del 16S rDNA.

MARCADORES FENOTÍPICOS

Biotipo

Permite diferenciar las bacterias de una misma especie en función de las variaciones bioquímicas detectadas mediante pruebas metabólicas (Fig. 10.1).

Un ejemplo del interés del biotipado desde el punto de vista patogénico se halla en *Y. enterocolitica*. El biotipo 4 de *Y. enterocolitica* (determinado por el estudio de ocho pruebas bioquímicas) incluye cepas patógenas para el hombre, en tanto que las cepas del biotipo 1A no son patógenas (Tablas 10.1 y 10.2). Otro ejemplo se encuentra en *E. coli*, donde las cepas productoras de gas a partir de la glucosa, lactosa positiva, lisina positiva, sorbitol negativo y β -glucuronidasa negativa son enteropatógenas por producción de verotoxinas. También tiene interés la relación entre el biotipo y el serotipo en *Salmonella* y *Shigella* (véase más adelante).

El biotipo, además de ser un marcador de patogenicidad, puede tener interés en la discriminación epidemiológica de las cepas. Las pruebas bioquímicas que permiten efectuar el biotipado con fines epidemiológicos de algunas enterobacterias se recogen en la tabla 10.3. A menudo es necesario practicar un gran número de reacciones bioquímicas (hasta 50) para lograr una buena discriminación, por lo que se han utilizado galerías comerciales con medios liofilizados que permiten estudiar fácilmente un gran número de caracteres metabólicos (API 50CH[®], bioMérieux S.A.). No obstante, muchas de estas galerías no son adecuadas porque fueron diseñadas para la identificación de las especies y no para el tipado infraespecífico con fines epidemiológicos.

En el comercio existen algunas baterías bioquímicas diseñadas específicamente para el tipado de enterobacterias que se basan no sólo en la positividad de las pruebas, sino también en su cinética (PhenePlate[®] System PhPlateAB). La codificación de los biotipos puede realizarse mediante un sistema numérico agrupando las pruebas de tres en tres². La limitada reproducibilidad de los caracteres metabólicos de las bacterias constituye una limitación del biotipado. La sencillez es una característica positiva de este método. Sólo se han diseñado y evaluado sistemas de biotipado para unas pocas especies bacterianas.

Serotipo

El serotipado se basa en la detección de los diferentes antígenos de superficie mediante una colección de

Tabla 10.1
Esquema de biotipado de *Yersinia enterocolitica*

Pruebas	Biotipos					
	1A	1B	2	3	4	5
Lipasa	+	+	-	-	-	-
Hidrólisis de la esculina	+	-	-	-	-	-
Producción de indol	+	+	(+)	-	-	-
Fermentación de la D-xilosa	+	+	+	+	-	v
Fermentación de la trealosa	+	+	+	+	+	-
Fermentación de la salicina	+	-	-	-	-	-
β -D-glucosidasa	+	-	-	-	-	-
DNasa	-	-	-	-	+	+
Pirazinamidasa	+	-	-	-	-	-

+ : positiva; (+) : positiva tardía; - : negativa; v : variable.

¹ En brotes epidémicos prolongados, puede acabar constatándose pequeñas variaciones entre las cepas.

² Las pruebas, agrupadas de 3 en 3, poseen en cada grupo de 3 cuando son positivas los valores 1,2 y 4 respectivamente y 0 cuando son negativas (1, 2, 4/1, 2, 4 /etc.). Los valores de cada grupo de tres han de sumarse para conseguir un dígito. Para 15 pruebas, un ejemplo podría ser a + + + / - - + / - - - / + + + / - + - = 5/4/0/7/2 = 54072.

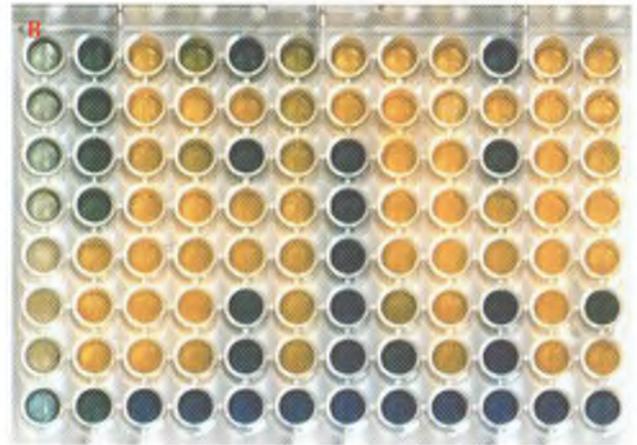
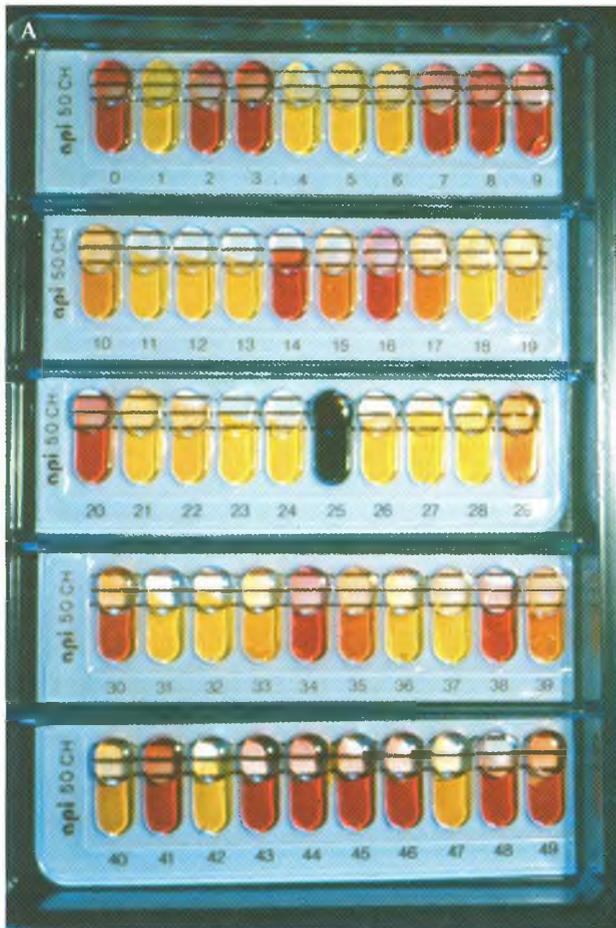


Figura 10.1. Biotipado.

El estudio de algunas pruebas bioquímicas permite diferenciar biotipos que son marcadores epidemiológicos o de patogenicidad (véase texto). El biotipo de una cepa puede determinarse estudiando las pruebas bioquímicas en medios preparados en el laboratorio o alternatively en paneles comercializados. En esta figura puede verse dos sistemas comercializados de biotipado. **A.** El API 50CH estudia la fermentación de 50 carbohidratos en dos lecturas, a las 24 y 48 horas. **B.** El Phene Plate estudia la fermentación de varios carbohidratos evaluando la cinética del crecimiento cada seis horas a lo largo de dos días.

anticuerpos específicos. Es un método muy utilizado para el tipado de bacterias capsuladas (neumococo, meningococo, *Haemophilus influenzae*, etc.) y bacilos gramnegativos (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. enterica*, *Y. enterocolitica*, *P. aeruginosa*, etc.) en los que se estudia el antígeno O (somático), el K (capsular) y el H (flagelar).

Las diferentes variantes antigénicas de una especie se denominan serovariedades o serovars. Cuando la

clasificación serológica se basa en un solo antígeno (cápsula del neumococo, de *H. influenzae*, etc.), se habla de serotipo. Cuando se utilizan dos (o más) antígenos para el tipado de una especie, uno de ellos determina el serogrupo (por ejemplo el antígeno lipopolisacárido O de *E. coli*) y cada serogrupo se puede subdividir en serotipos por los otros antígenos; por ejemplo, el capsular (K) y/o el flagelar (H) de *E. coli*. Los serogrupos de *E. coli* O2, O6, O15, etc. pueden dividirse en serotipos: O2:H1, O2:H6 O15:K52:H1, O15:H7, etc., por tanto: el serogrupo O2 de *E. coli*, en el ejemplo, incluye dos serotipos: el O2:H1 y el O2:H6.

Las salmonelas poseen diversos antígenos O denominados por números (1, 2, 3, 4, etc.), alguno de los cuales suelen expresarse simultáneamente en distintos sero-

Tabla 10.2
Correlación entre biotipo, serogrupo, reservorio y patogenicidad de las cepas de *Y. enterocolitica*

Patogenicidad	Biotipos	Serogrupo O	Reservorio	Hospedador susceptible
Cepas patógenas:				
Pirazinamidasa ⁺ , Esculina ⁺	3	<u>1, 2, 3; 5, 27</u>	Chinchillas	Chinchillas, raramente al hombre
	5	<u>2, 3</u>	Liebre	Liebre y cabras
	4	<u>3</u>	Cerdo	Hombre ¹
	2	<u>9; 5, 27</u>	Cerdo	Hombre ²
	1B	<u>4, 32; 8; 13a, 13b; 18; 20; 21</u>	Hombre	Hombre ³
Cepas no patógenas:				
Pirazinamidasa ⁺ , Esculina ⁺	1A	<u>4; 5; 6, 30; 7, 8; 7, 13; etc.</u>	Medio ambiente	Ninguno

La pirazinamidasa y la esculina son marcadores de patogenicidad. Los antígenos que forman un serogrupo se indican unidos por el subrayado.
1: Europa del sur y Canadá; 2: Europa del norte; 3: EE.UU.

Tabla 10.3
Pruebas utilizadas para el biotipado de algunas enterobacterias

Microorganismos	Pruebas
<i>Escherichia coli</i>	LDC, ODC, β -glucuronidasa, γ -glutamilttransferasa, gas en glucosa, sacarosa, rafinosa, ramnosa, lactosa, adonitol, sorbosa, salicina, sorbitol
<i>Providencia stuartii</i> y <i>P. alcalifaciens</i>	Gas en glucosa, adonitol, inositol, trealosa
<i>Providencia rettgeri</i>	Ramnosa, salicina
<i>Morganella morganii</i>	Galactosa, trealosa, glicerol
<i>Klebsiella</i> y <i>Enterobacter aerogenes</i>	Dulcitol, sorbosa, d-tartrato
<i>Enterobacter cloacae</i>	Malonato, β -galactosidasa, β -xilosidasa, gelatinasa, ODC, ADH, adonitol, lactosa, mucato, L-ramnosa, dulcitol, salicina, sacarosa, glicerol, α -metilglucósido
<i>Shigella sonnei</i>	β -galactosidasa, ramnosa, xilosa

Proteus mirabilis y *P. vulgaris*: no se han desarrollado protocolos de biotipado.

LDC: lisina decarboxilasa; ODC: ornitina decarboxilasa; ADH: arginina dehidrolasa.

grupos (Tabla 10.4). Sin embargo, presentan dos sistemas de antígenos flagelares (fases), los de la primera fase denominados con letras (a, b, c, d, etc.) y los de la segunda fase denominados con números y letras (1, 2, 3, 4, e, n, x, l, w, etc.). Cuando una célula expresa los antígenos de una fase, no expresa los de la otra (Tabla 10.4). Las células de una colonia expresan mayoritariamente una fase, por lo que la bacteria ha de cultivarse en un agar blando con un antisuero frente a esa fase para que se seleccionen las bacterias que expresan la otra (ver protocolo técnico 10.1).

Algunos serotipos de *Salmonella* poseen caracteres bioquímicos específicos, constituyendo bioserotipos (Tabla 10.5); lo mismo sucede con *Shigella* (Tabla 10. 6).

Un ejemplo de la correlación entre el serotipado y la distribución geográfica viene dado por los tres serotipos más frecuentes de *Y. enterocolitica* patógenos para el hombre, el O3, O8 y O9, dos de los cuales se hallan en Europa (O3 y O9) y uno en América del norte (O8).

Muchas otras bacterias, como el meningococo, *E. coli* enteropatógena, salmonela, brucela y clamidia poseen diferente distribución geográfica según sus serovariedades.

También existe una clara correlación entre el serotipo y la patogenicidad en *E. coli*, salmonela, *Y. enterocolitica*, *Vibrio cholerae* —en el que de los más de 100 serogrupos sólo el O1 y el O139 producen toxina colérica— y *Chlamydia trachomatis* (Tablas 10.2, 10.5 y 10.7).

En otros casos, como en el meningococo, el serotipado permite identificar las cepas hipervirulentas y orientar los programas de vacunación según el grupo prevalente circulante.

Algunas veces, el serotipado se utiliza para confirmar la identificación metabólica de una bacteria aislada por

cultivo, como en el caso de meningococo, *H. influenzae*, neumococo, estreptococos de los grupos A y B, *Listeria monocytogenes* y otras.

Aunque el serotipado también se ha utilizado con fines epidemiológicos, sus principales limitaciones son la baja tipabilidad, ya que muchas cepas no expresan los antígenos o éstos no son conocidos (no hay antisueros), y el bajo poder discriminativo, dado que algunos serotipos son tan prevalentes en un área que la gran mayoría de las cepas aisladas pertenecen al mismo serotipo; por ejemplo, los serotipos Typhimurium (4, 12: i: 1,2) y Enteritidis (9,12: g,m: -) de *Salmonella enterica* son responsables de más del 80% de los casos de salmonelosis en nuestro medio, lo que significa que decenas de cepas aisladas cada semana en una gran ciudad son del mismo serotipo y, sin embargo, no están necesariamente relacionadas.

El tipado serológico es menos utilizado en micología, pero es muy utilizado en virología, sobre todo para identificar las especies mediante la detección de antígenos específicos y también para el tipado infraespecífico. En parasitología, el serotipado también es poco utilizado, aunque en algún caso es de interés para la identificación de especie, más que para el tipado infraespecífico (diferencia entre *Entamoeba histolytica* patógena y *E. dispar* no patógena).

El serotipado también es útil para conocer las serovars prevalentes en un área y orientar campañas preventivas de vacunación cuando esos antígenos inducen la producción de anticuerpos protectores (meningococo, neumococo, *H. influenzae*, virus de la gripe y otros).

Fagotipo

La determinación del fagotipo (o lisotipo) se utiliza únicamente para el tipado de bacterias. Mediante el fago-

Tabla 10.4
Fórmula antigénica de algunos serotipos de *Salmonella enterica*

SEROTIPO	O	H	
Grupo O. 2 (A):			
Paratyphi A	<u>1</u> , 2, 12	a	-
Grupo O. 4 (B):			
Typhimurium ¹	<u>1</u> , 4 [5], 12	i	1, 2
Saintpaul	<u>1</u> , 4, [5], 12	e, h	1, 2
Heidelberg	<u>1</u> , 4 [5], 12	r	1, 2
Brandenburg	<u>1</u> , 4, 12	l, v	e, n, z15
Bredeney ¹	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	l, v	1, 7
Agona	4, 12	f, g, s	-
Derby	<u>1</u> , 4 [5], 12	f, g	-
Paratyphi B	<u>1</u> , 4 [5], 12	b	1, 2
Santiago	4 [5], 12	e, h	e, n, z15
Grupo O. 3, 10 (E₁); 3, 19 (E₄):			
Orion	3, 10	y	1, 5
Senftenberg	1, 3, 19	g, [s], t	-
London	3, 10	l, v	1, 6
Anatum ¹	3, 10	e, h	1, 6
Give	3, 10	l, v	1, 7
Meleagridis	3, 10	e, h	l, w
Grupo O. 6, 7 (C₁); 6, 8 (C₂):			
Infantis ¹	6, 7, <u>14</u>	r	1, 5
Bovismorbificans	6, 8	r	1, 5
Hadar ¹	6, 8	z10	e, n, x
Newport	6, 8	e, h	1, 2
Virchow ¹	6, 7	r	1, 2
Thompson	6, 7, <u>14</u>	k	1, 5
Montevideo	6, 7, <u>14</u>	g, m, [p], s	-
Manhattan	6, 8	d	1, 5
Goldcoast	6, 8	r	l, w
Braenderup	6, 7, <u>14</u>	e, h	e, n, z15
Livingstone	6, 7	d	l, w
Mbandaka	6, 7	z10	e, n, z15
Ohio ¹	6, 7	b	l, w
Muenchen	6, 8	d	1, 2
Blockley	6, 8	k	1, 5
Oranienburg	6, 7	m, t	-
Grupo O. 9, 12 (D₁):			
Panama	<u>1</u> , 9, 12	l, v	1, 5
Dublin	<u>1</u> , 9, 12 [Vi]	g, p	-
Enteritidis ¹	<u>1</u> , 9, 12	g, m	-
Typhi	9, 12 [Vi]	d	-
Gallinarum	<u>1</u> , 9, 12	-	-
Goettingen	9, 12	l, v	e, n, z15
Grupo O. 13, 23 (G₂):			
Havana	<u>1</u> , 13, 23	f, g, [s]	-
Grupo O. 18 (K):			
S. III _a (ONPG +)	18	Z ₄ , z ₃₂	-

Antígenos subrayados, por ejemplo, 1 en Paratyphi A 1, 2, 12: a: -, significa que dependen de un fago lisogénico que les codifica. Antígenos entre paréntesis, por ejemplo, 9, 12, [Vi] significa que son de codificación cromosómica pero que su expresión es variable.

¹ Serotipos actualmente más frecuentes en España. En otros países las cepas prevalentes pueden corresponder a otros serotipos.

Tabla 10.5
Salmonella enterica. Relación entre patogenicidad, serotipo y biotipo

Salmonelas	Serotipo	Biotipo					
		SH ₂	LDC	ODC	Gas/g	C S	
Gastroenteríticas ¹	Typhimurium	1, 4 [5], 12: i: 1, 2	+	+	+	+	+
	Enteritidis	1, 9, 12: gm: -	+	+	+	+	+
	Otros serotipos ²		+	+	+	+	+
Tifo-paratíficas	Typhi	9, 12 [Vi]: d: -	± ³	+	-	-	-
	Paratyphi A	1, 2; 12: a: -	- ⁴	-	+	+	-
	Paratyphi B	1, 4 [5], 12: b: 1, 2	+	+	+	+	+
	Paratyphi C	6, 7 [Vi]: c: 1, 5	+	+	+	+	+

Los serotipos gastroenteríticos causan enteritis (diarrea) en el hombre, en tanto que los serotipos tifo-paratíficos causan bacteriemia con cuadro séptico (fiebres tifo-paratíficas).

¹ En lactantes, ancianos y pacientes inmunodeprimidos pueden causar bacteriemia.

² Algunos de los serotipos más frecuentes se hallan recogidos en la tabla 10.4.

³ Positivo débil.

⁴ Negativo, ocasionalmente positivo débil.

SH₂: producción de ácido sulfhídrico; LDC: lisina decarboxilasa; ODC: ornitina decarboxilasa; Gas/g: producción de gas en glucosa; C S: crecimiento en citrato de Simmons.

Tabla 10.6
Bioserogrupos de Shigella

	Manitol	Indol	ODC	ONPG	Bioserogrupo
<i>S. dysenteriae</i>	-	v	-	- (+ serotipo 1)	A
<i>S. flexneri</i>	+	v	-	-	B
<i>S. boydii</i>	+	v	-	- (+ serotipo 9)	C
<i>S. sonnei</i>	+	-	+	+ (mayoría de las cepas)	D

S. dysenteriae y *S. sonnei* pueden diferenciarse presuntamente por pruebas bioquímicas (manitol y ONPG), pero *S. flexneri* y *S. boydii* deben diferenciarse serológicamente ya que son indistinguibles bioquímicamente. Salvo raras excepciones las shigelas son agasógenas.

ODC: ornitina decarboxilasa; ONPG: prueba de la β-galactosidasa; positivo: +; negativo: -; v: variable.

Tabla 10.7
Capacidad patógena de las distintas serovars de Chlamydia trachomatis

Serovar	Patología
A, B, Ba, C	Tracoma
B, D-K	Uretritis, conjuntivitis
L1, L2, L3	Linfogranuloma venéreo

tipado se estudia el perfil de susceptibilidad de una cepa a la lisis por diferentes bacteriófagos. Es una técnica que precisa de una laboriosa obtención y estandarización de los reactivos (fagos), por lo que está reservada a centros especializados. Sus aplicaciones más reconocidas son el estudio de cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, algunos serotipos de *S. enterica* y de *E. coli*. La técnica consiste en sembrar en la superficie de un medio de cultivo sólido el microorganismo a estudiar, como para realizar un antibiograma de difusión, e inmediatamente se depositan en su superficie varias gotas de diferentes bacteriófagos. Después de la incubación, se observa cuáles han produ-

cido una lisis de la bacteria (ausencia de crecimiento bacteriano en el lugar donde se ha depositado la gota de la suspensión de fago) (Fig. 10.2). Sus principales inconvenientes son los problemas de reproducibilidad y la baja tipabilidad, así como la naturaleza cambiante de la misma, al irse incrementando continuamente las colecciones de bacteriófagos para cubrir el mayor número posible de cepas problema.

Antibiotipo

La gran ventaja de la utilización del patrón de sensibilidad a los antimicrobianos con fines epidemiológicos es que el antibiograma se realiza rutinariamente en la práctica totalidad de los laboratorios de microbiología y de forma muy estandarizada, aunque limitada a algunas bacterias. El poder discriminativo del antibiotipo depende del nivel de resistencia natural de una especie concreta y del número de antibióticos que se evalúen (en algunos casos para este fin se utilizan antimicrobianos que no tienen interés tera-

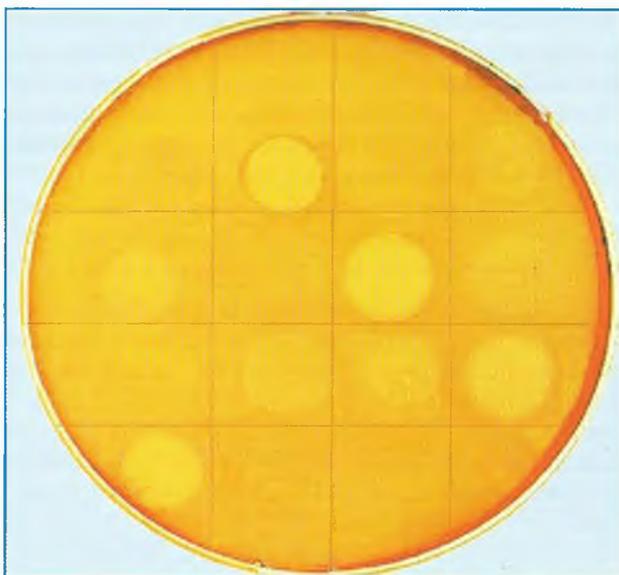


Figura 10.2. Fagotipado.

Véase la lisis (ausencia de crecimiento) producida por diferentes bacteriófagos en un cultivo de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis.

Cortesía de Centro Nacional de Microbiología (Instituto Carlos III).

péutico). En las especies con una alta tasa de resistencia natural, como *Stenotrophomonas maltophilia*, existen pocos marcadores de resistencia adquirida que permitan diferenciar las cepas. Siempre que sea posible, se utilizará la técnica de disco-difusión, que es la preferida para estos estudios (Fig. 10.3). Una limitación del antibiograma es la variación en la expresión de los genes de resistencia, así como su inestabilidad, dada la posibilidad de la pérdida o ganancia de plásmidos y otros elementos móviles portadores de estos genes. Como consecuencia de ello, con frecuencia cepas del mismo clon presentan antibiogramas distintos y viceversa.



Figura 10.3. Antibiograma.

Se muestran dos cepas de *Escherichia coli* con el mismo perfil de resistencia, aisladas con tres días de diferencia en dos pacientes sondados ubicados en la misma sala; lo que sugiere su identidad y por tanto su posible relación epidémica. Puede verse una tercera cepa de *E. coli* aislada de un paciente de la misma sala con un patrón de resistencia diferente al de las anteriores.

El antibiograma suele ser el primer dato epidemiológico que alerta de las posibles epidemias intrahospitalarias y en ocasiones extrahospitalarias como, por ejemplo, la epidemia causada por *E. coli* O15:K52:H1, detectada en Londres por el antibiograma particular de las cepas que se aislaban.

ELECTROFORESIS

La electroforesis incluye un conjunto de variantes técnicas que permiten separar moléculas en función de su tamaño y su carga eléctrica al circular por el seno de la malla microscópica de un gel repleta de un solvente. En microbiología se utilizan fundamentalmente para la separación de proteínas y ácidos nucleicos.

Electroforesis de proteínas

La electroforesis en geles de poliacrilamida (*Poliacrilamide gel electrophoresis*, PAGE) permite separar las proteínas presentes en una muestra en función de su peso molecular (tamaño).

Los geles de poliacrilamida, a pesar de su aspecto homogéneo, forman una red de canales microscópicos, repletos del líquido utilizado en su disolución. El tamaño de los canales es inversamente proporcional a la concentración de poliacrilamida. Estos canales actuarán como un cedazo frenando la migración de las proteínas en función de su tamaño, de manera que las de alto peso molecular migrarán más despacio. A la poliacrilamida se le suele añadir un detergente aniónico, el dodecil sulfato de sodio (SDS), que se une a las proteínas formando complejos a los que confiere la misma densidad de carga superficial negativa.

Los geles de poliacrilamida se hacen polimerizar entre dos placas de vidrio que se colocan en un soporte vertical.

El gel se mantiene refrigerado (para evitar distorsiones durante la electroforesis). Una vez introducidas las muestras y el estándar de pesos moleculares en los pocillos superiores del gel (pequeños agujeros formados en el agar mediante peines colocados antes de que el agar solidifique), se llena la cubeta de tampón y se conectan los electrodos a una fuente de electricidad creándose un campo eléctrico. La migración se realiza a un potencial constante (de unos 70V), y las proteínas, con carga negativa por acción del SDS, migran hacia la parte inferior del gel (ánodo), separándose únicamente en función de su masa.

Finalizada la electroforesis, el gel se tiñe con el azul brillante de Coomassie o sales de plata. Una vez teñido, las proteínas aparecen como bandas cuya posición relativa en el gel depende de su peso molecular, que puede extrapolarse a partir de los pesos del estándar utilizado. A fin de conservar el gel, se procede a su secado. Para ello, se coloca el gel sobre un papel de filtro y sobre el gel se dispone un papel de celofán. El conjunto se coloca en una placa secadora conectada a una bomba de vacío. Una vez secos, los geles se conservan indefinidamente.

Perfiles electroforéticos de proteínas totales o de envoltura

Para la realización de esta técnica, se procede a la lisis bacteriana y a la extracción de las proteínas que se desnaturalizan y se someten a electroforesis. Dado que el número de bandas obtenidas en el estudio de las proteínas totales es muy numeroso, lo que hace muy difícil su interpretación, una técnica alternativa consiste en estudiar tan solo las proteínas de membrana externa, lo que implica su separación y purificación previa a la electroforesis. La capacidad discriminativa de los perfiles electroforéticos de proteínas no siempre es adecuada y la técnica es compleja. Para simplificar la lectura de los geles de proteínas totales, se ha propuesto su transferencia a membranas de nitrocelulosa por la técnica de *Western blot* y su revelado con anticuerpos específicos únicamente para alguna de ellas, con lo que el número de bandas a comparar es más limitado y, por tanto, más fácil de evaluar (*Western blot*; véase el capítulo 8).

Análisis del polimorfismo enzimático (multilocus enzyme electrophoresis, MLEE)

Las mutaciones puntuales en el gen que codifica una determinada enzima pueden no modificar la función de esta enzima, pero dar lugar a cambios de aminoácidos que ocasionan modificaciones de la carga de esa proteína en ausencia de SDS, lo que a su vez comporta cambios en la

movilidad electroforética³. El estudio de varias enzimas por cepa (de 15 a 30) es poco práctico como técnica epidemiológica porque es muy laborioso y complejo; pero es muy útil para los estudios de genética de poblaciones, ya que permite establecer la distancia evolutiva entre las cepas (filogenia), siendo una técnica de referencia para este propósito.

Electroforesis de DNA

La electroforesis en geles de agarosa permite la separación de los fragmentos de DNA de distintos tamaños y el cálculo de su peso molecular⁴. La electroforesis se basa en la migración a pH neutro del DNA, cargado negativamente, hacia el polo positivo. Para hacer los geles, se mezcla una cantidad adecuada de agarosa purificada con tampón y se calienta hasta su disolución. Se vierte la agarosa sobre una bandeja de electroforesis y se coloca un peine en uno de los extremos para que, al enfriarse y solidificar, queden unos pocillos en los que puedan depositarse las muestras. La migración del DNA a través del gel depende de su tamaño y de la porosidad del gel. La concentración de agarosa determina la porosidad del gel y, por lo tanto, los márgenes de pesos moleculares que se pueden separar con una buena resolución; sin embargo, la forma del DNA también puede influir en la migración. Los fragmentos de DNA migran a una velocidad inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular, lo que permite deducir el peso de los fragmentos separados por comparación con estándares de peso molecular conocido. Para la visualización del DNA se utiliza el bromuro de etidio, que se intercala en el DNA, y emite luz cuando se excita con ultravioleta (el gel se coloca sobre un transiluminador con lámparas ultravioletas) (Fig. 10.4).

Transferencia (Blot)

Los fragmentos de DNA o las proteínas separados por electroforesis en un gel de agarosa o poliácridamida no pueden ser estudiados directamente mediante anticuerpos, sondas u otros procedimientos técnicos, por lo que deben ser transferidos a una membrana de nitrocelulosa que permite esos estudios. La transferencia de DNA se realiza mediante una técnica denominada «*Southern blot*» (según su autor E. M. Southern), y la de las proteínas se conoce como «*Western blot*».

MARCADORES GENOTÍPICOS

La capacidad para tipificar microorganismos se ha visto notablemente incrementada en los últimos años por la introducción de un número importante de técnicas

³ Las diferentes variantes de un gen, que se producen como consecuencia de mutaciones, se denominan alelos. Cuando el gen codifica una enzima, cada alelo codifica una variante de la enzima, denominándose a esas variantes isoenzimas. Las diferentes isoenzimas poseen la misma actividad enzimática pero distinta movilidad electroforética. Cada enzima puede tener en 0 y 15 isoenzimas.

⁴ La poliácridamida se utiliza para la electroforesis de proteínas por su menor poro, ya que las proteínas tienen una masa menor que los fragmentos de DNA que se suelen estudiar. Cuando se requiere una gran discriminación para el DNA, se pueden utilizar geles de poliácridamida en lugar de agarosa.

que analizan y comparan los ácidos nucleicos de los microorganismos. A diferencia de los marcadores fenotípicos, que requieren técnicas diferenciadas adaptadas a cada especie, las técnicas que analizan el DNA pueden ser utilizadas, con mínimas variaciones, para cualquier microorganismo. En este sentido, los marcadores genotípicos poseen una flexibilidad y tipabilidad muy superior a la de los marcadores fenotípicos. Algunos son más adecuados para estudios epidemiológicos y otros filogenéticos.

Los métodos genotípicos se dividen en dos grupos según estudien el DNA extracromosómico (plásmidos) o cromosómico.

ANÁLISIS DEL DNA PLASMÍDICO

El análisis plasmídico sólo se utiliza para el estudio y comparación entre bacterias. Los plásmidos son moléculas de DNA bicatenario circular que se hallan en el citoplasma bacteriano, independientes del cromosoma y dotados de replicación autónoma⁵.

Se parte del supuesto de que las cepas pertenecientes al mismo clon tendrán plásmidos idénticos en número, tamaño y patrones de restricción. Para caracterizarlos, se extrae el DNA plasmídico, lo que requiere un protocolo específico para separarlo del DNA cromosómico⁶, y se separan por electroforesis en geles de agarosa que se tiñen con bromuro de etidio, lo que permite su visualización (Fig. 10.4).

La principal ventaja del estudio de plásmidos reside en la sencillez de la técnica, que además es idéntica para todas las especies bacterianas, a excepción de las diferencias en los protocolos para la lisis de pared según la bacteria. No obstante, la presencia de plásmidos no se da con la misma frecuencia en todas las especies, por lo que, si bien en algunos casos puede resultar una técnica útil, en otras las cepas no son tipables por carecer de plásmidos.

La interpretación de los perfiles plasmídicos no es sencilla. En función de variables ligadas a la extracción, pueden obtenerse tres formas del mismo plásmido (superenrollada, circular o lineal) que tienen movilidades electroforéticas distintas y no son fáciles de distinguir, por lo que se pueden confundir con plásmidos distintos. Por otra parte, los plásmidos son elementos prescindibles que fácilmente pueden perderse total o parcialmente. Asimismo, la conjugación entre las cepas permite la adquisición de nuevos plásmidos. Todo ello comporta que el perfil plasmídico sea inestable y que un conjun-

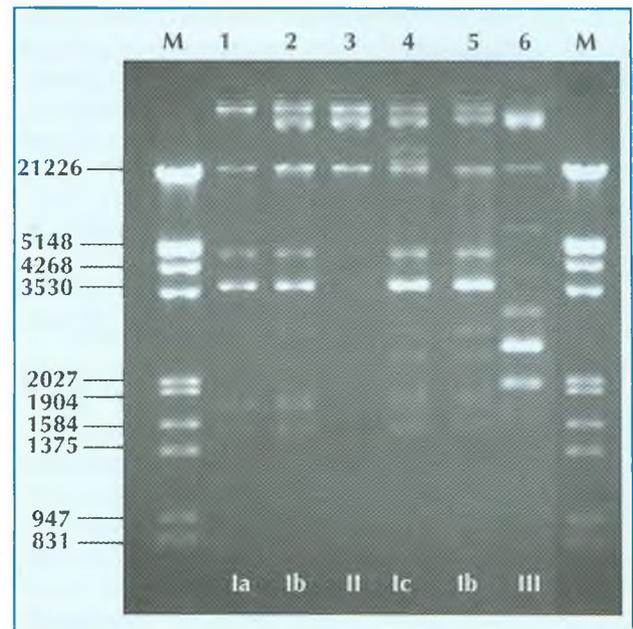


Figura 10.4. Perfil plasmídico.

to de cepas con el mismo cromosoma (y por tanto clonales) puedan tener perfiles plasmídicos distintos. Esta inestabilidad del perfil plasmídico es tanto más importante cuanto mayor es la distancia en el tiempo de aislamiento de las cepas que se comparan. En las cepas de archivo, la conservación a temperatura ambiente y las resiembras favorecen la pérdida de plásmidos.

Por último, dos plásmidos diferentes pueden compartir la misma masa molecular, por lo que forman bandas en el mismo nivel. En estos casos, es conveniente su purificación y la comparación de los fragmentos formados tras cortarlos con enzimas de restricción para confirmar su identidad (Véase más abajo: *Enzimas de restricción*).

ANÁLISIS DEL DNA CROMOSÓMICO

Para el análisis del DNA cromosómico con fines epidemiológicos se utilizan tres tipos de enfoques gene-

⁵ Su tamaño oscila entre 1 y 400 Kb. El número de copias no es uniforme, pero en general tiende a ser elevado en los de pequeño tamaño, mientras que los de gran tamaño tan solo presentan una o dos copias. Pueden codificar una gran variedad de proteínas, incluyéndose entre ellas factores de resistencia a los antibióticos, factores de virulencia (toxinas, adhesinas) o enzimas del metabolismo bacteriano; pero, por definición, no codifican proteínas esenciales para la supervivencia de la bacteria en su medio natural.

⁶ La extracción convencional del DNA bacteriano comporta la lisis de la bacteria por uno o más de los siguientes elementos: ebullición, acción de detergentes, lisozima o microbolas de vidrio. La separación de las proteínas se obtiene solubilizándolas en fenol y adicionando un detergente que las desnatura inactivándolas, lo que es fundamental para evitar la acción de las DNAsa. El DNA puede precipitarse por etanol y concentrarse con sílice, vidrio, ultrafiltración o ultracentrifugación.

rales. Un grupo de técnicas compara las diferencias del tamaño (polimorfismo) de los fragmentos de restricción que resultan del corte del DNA mediante enzimas de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism* o RFLP), otro grupo de técnicas se basa en la amplificación del DNA (*Amplification-based microbial typing*; ABMT) y finalmente el tercer grupo se basa en las diferencias en la secuencia nucleotídica de determinados fragmentos del genoma (*Multilocus sequence typing*; MLST).

Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción

Enzimas de restricción

La comprensión de la mayoría de las técnicas de genotipado comporta entender previamente el concepto de enzima de restricción y de fragmentos de restricción. Las enzimas de restricción son enzimas producidas naturalmente por numerosas bacterias que reconocen una corta secuencia del DNA bicatenario, habitualmente de cuatro a ocho pares de bases, denominada «diana»; se unen a ella y cortan el DNA en ese punto⁷. Los fragmentos de DNA resultantes de los cortes se denominan fragmentos de restricción, y se producen tantos fragmentos de DNA como dianas haya más uno (por ejemplo: cinco dianas dan lugar a seis fragmentos).

La función natural de estas enzimas es, probablemente, destruir el DNA exógeno que penetra en la célula. Este sistema de protección se complementa con una metilación del DNA propio en el lugar de restricción para evitar que sea digerido por su propia enzima.

Muchas enzimas de restricción reconocen dianas (secuencias) muy abundantes en el DNA, por lo que se producen muchísimos cortes, que dan lugar a numerosísimos fragmentos de DNA. Otras enzimas son de baja frecuencia de corte, ya que en el DNA hay pocas dianas para ellos, y por tanto dan lugar a pocos fragmentos de restricción de gran tamaño (macrorrestricción).

Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Para estudiar los fragmentos de restricción por técnicas convencionales, se extrae el DNA microbiano mediante diversos métodos según el microorganismo y se añade la enzima de restricción seleccionada. Para revelar los fragmentos producidos, se pone el DNA tratado por las enzimas en un pocillo de un gel de agarosa, que se somete a un campo eléctrico (electroforesis). Los diferentes fragmentos se desplazan a lo largo del gel a una distancia inversamente proporcional a su tamaño. Se

para el campo eléctrico y se revelan los fragmentos tiñendo con bromuro de etidio u otra sustancia reveladora de DNA (Fig. 10. 5). El diferente tamaño de los fragmentos de restricción traduce la distancia entre dos dianas de restricción contiguas. Un cambio o cambios por mutación o recombinación en las dianas de restricción las hace irreconocibles para la enzima y se traduce en una variación en el número o localización de las bandas en el gel de electroforesis. El perfil también variará si existen deleciones o inserciones de DNA entre dos lugares de restricción al disminuir o aumentar el tamaño del fragmento formado entre esos lugares. La comparación del perfil de restricción de varias cepas permite establecer la identidad o diferencia entre ellas.

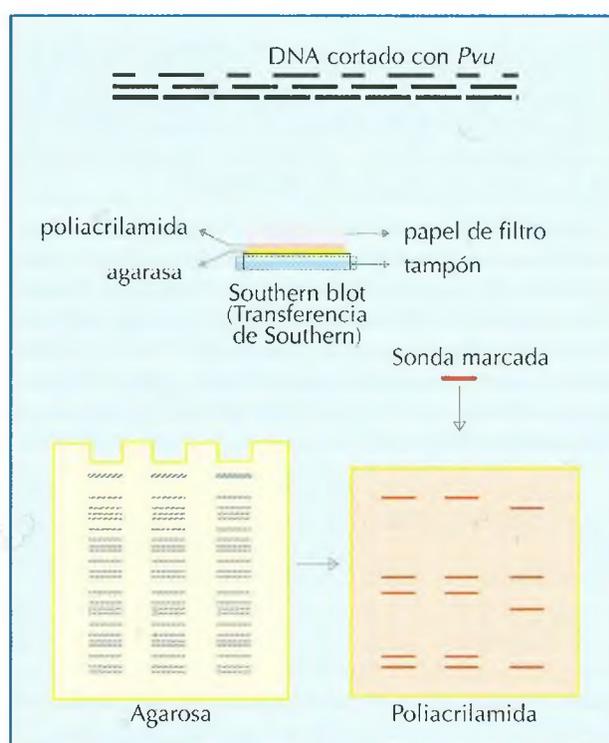


Figura 10.5. Patrones de restricción-hibridación.

Cuando se corta el DNA con enzimas de restricción de alta frecuencia de corte se produce un número tan extraordinariamente grande de fragmentos que hace imposible su comparación (imagen de la izquierda).

Para simplificar la comparación de los fragmentos de DNA formados (imagen de la izquierda), se realiza su transferencia a una membrana de nitrocelulosa (imagen de la derecha). Esta técnica se denomina *Southern blot*. Los fragmentos transferidos se analizan mediante hibridación con una sonda marcada, complementaria de una secuencia repetida, entre 10 y 20 veces, en el genoma del microorganismo estudiado. El revelado de la hibridación tan solo pondrá en evidencia aquellos fragmentos que contengan la secuencia complementaria de la sonda. El número de bandas estará en relación con el número de copias de la secuencia existentes en el genoma y su presencia en los diversos fragmentos estará en relación con su distribución a lo largo del genoma, así como con las variaciones en los lugares de restricción.

⁷ Las enzimas de restricción se denominan según la bacteria de la que se han aislado; por ejemplo, *EcoRI* de *Escherichia coli*; *Sma I* de *Serratia marcescens*. Cada una reconoce una secuencia específica de nucleótidos; por ejemplo *EcoRI* reconoce [5' G|AATT|C 3'] *Sma I*: [5' CCC|GGG 3']. Los cortes de las enzimas de restricción pueden dar lugar a extremos romos (—|—) o cohesivos (—|—), según corten las dos cadenas en el mismo lugar o en lugares diferentes. Las enzimas de restricción pueden obtenerse purificadas en el comercio.

Análisis de los fragmentos de restricción por hibridación tras transferencia de Southern

Los fragmentos de pequeño tamaño obtenidos con las enzimas de alta frecuencia de corte pueden separarse por electroforesis convencional, pero el gran número de bandas obtenido dificulta enormemente la comparación de los perfiles de las distintas cepas estudiadas inválidando, en cierta forma, la utilidad de esta técnica.

Un procedimiento para simplificar la interpretación de las numerosísimas bandas generadas por enzimas de alta frecuencia de corte consiste en revelar sólo algunas de todas las formadas. Para ello, los fragmentos de restricción del DNA total obtenidos con una enzima con alta frecuencia de corte y separados por electroforesis en un gel de agarosa se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o alternativamente a un papel impregnado con 2-aminofenil-tioeter (APT) (*Southern blot*) y se analizan mediante hibridación con una sonda marcada complementaria de una determinada secuencia. Mediante este procedimiento, tan solo se pondrán en evidencia aquellos fragmentos (bandas) que contengan la secuencia a la que se ha unido la sonda marcada, obteniéndose perfiles con pocas bandas (Figs. 10.5 y 10.6). El número de bandas estará en relación con el número de copias de la secuencia existentes en el genoma, mientras que su situación en la membrana depende de la localización de la secuencia en los diferentes puntos del genoma, y con las variaciones en los lugares de restricción según las cepas. En la técnica conocida como ribotipado se utiliza una sonda única para todas las bacterias, complementaria de un fragmento de rDNA del que existen diversas copias distribuidas por el genoma bacteriano.

Se aprovecha el hecho de que en estos genes existen zonas muy conservadas en todas las bacterias, lo que permite utilizar la misma sonda para todas las especies. El ribotipado ha sido automatizado mediante el Ribo-Printer®system (Qualicon, Inc./DuPont).

En otros procedimientos de tipado la sonda, en lugar de estar dirigida a una diana universal como el 16S rDNA, puede estar dirigida a una secuencia propia de una especie determinada, como la secuencia de inserción IS6110 de *M. tuberculosis* (Fig. 10.6).

Macrorrestricción. Campo pulsante (PFGE)

Tanto la transferencia de Southern como la posterior hibridación complican notablemente los aspectos técnicos de las pruebas convencionales para el estudio de RFLP que se acaba de describir. Por ello, se recomienda estudiar el polimorfismo del DNA total mediante macrorrestricción con enzimas de baja frecuencia de corte, separando los fragmentos por electroforesis. Los fragmentos de gran tamaño obtenidos por macrorrestricción, mayores de 40 kb, en la electroforesis convencional comigran en una única banda y han de separarse con técnicas electroforéticas especiales, como la electroforesis con alternancia de campos eléctricos o electroforesis de campo pulsante (*Pulsed field gel electrophoresis*, PFGE).

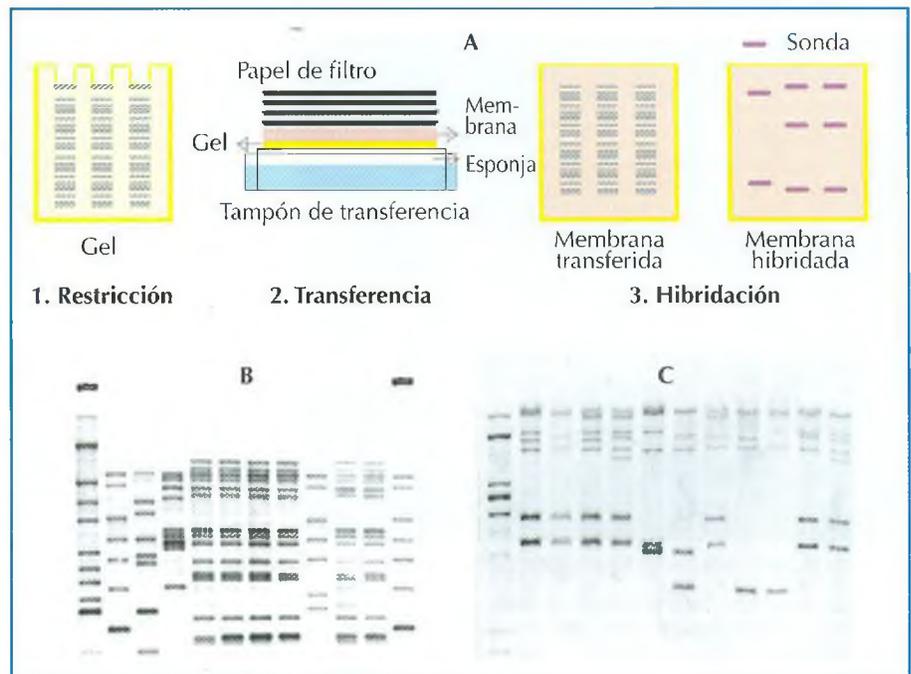
Mediante esta técnica, se obtienen perfiles con pocas bandas (idealmente unas 15 ó 20) que son fácilmente comparables entre sí (Figs. 10.7 y 10.8). A pesar de que se utilizan enzimas que cortan el DNA con baja frecuencia, el hecho de que se explore todo el genoma bacteriano hace que, en general, la electroforesis en campo pulsante sea

Figura 10.6. Ejemplos de sondas utilizadas en los patrones de hibridación-restricción.

A. 1) El DNA se ha cortado con una enzima de restricción y los fragmentos se han separado por electroforesis en un gel de agarosa. 2) El DNA se ha transferido a una membrana de nitrocelulosa y posteriormente, 3) se revelan las bandas con una sonda marcada.

B. En este caso la sonda está dirigida contra la secuencia de inserción IS6110, con la que hibrida, poniéndose en evidencia los fragmentos (bandas) de DNA en los que está dicha secuencia.

C. Sondas universales. Ribotipado. En la técnica conocida como ribotipado, se utiliza una sonda única para todas las bacterias, complementaria de los operones de 16 y 23S RNA de *E. coli* (regiones del cromosoma en las que se encuentra codificado el RNA ribosómico). En la figura se observan los patrones de ribotipado obtenidos con *XhoI* en cepas de *Neisseria meningitidis*. Obsérvese como las cepas de las calles 2 y 4 comparten el mismo patrón.



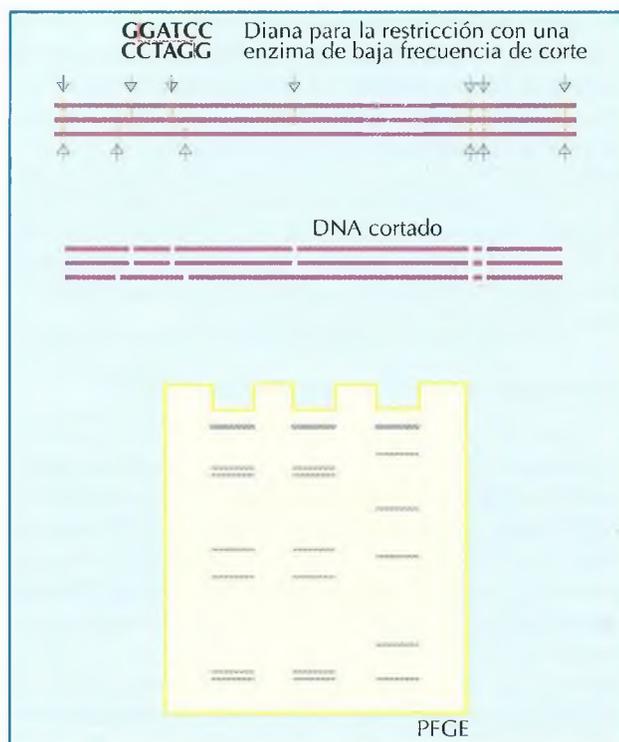


Figura 10.7. Electroforesis de campo pulsante (PFGE).

Las enzimas de restricción de baja frecuencia de corte se denominan así porque su secuencia diana se halla poco repetida en el genoma y por ello se producen pocos fragmentos (10 a 30) de gran tamaño. Estos fragmentos (> 40 kb) comigran en una única banda en la electroforesis convencional y han de separarse con técnicas electroforéticas especiales como la electroforesis de campo pulsante (PFGE). En la parte superior del esquema se observan los fragmentos de restricción generados por una enzima con baja frecuencia de corte, *Bam* HI, en el DNA de las tres cepas analizadas. Estos fragmentos se han separado por PFGE en un gel de agarosa y se visualizan después de teñir el gel con bromuro de etidio. Obsérvese como las cepas de las calles 1 y 2 comparten el mismo patrón.

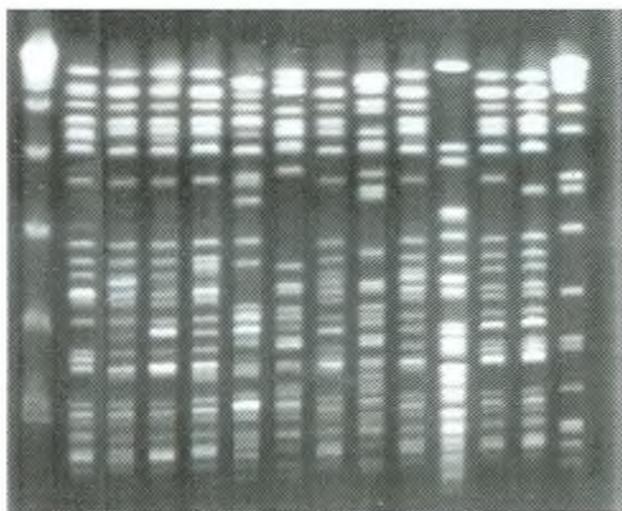


Figura 10.8. Electroforesis de campo pulsante (PFGE).

En la figura pueden observarse los fragmentos de macrorestricción separados por campo pulsante en 13 cepas de *Shigella sonnei*. Las cepas de las cuatro primeras calles presentan pulstipos prácticamente idénticos y se habían aislado de un brote de enteritis.

muy discriminativa, y en la actualidad es una de las técnicas epidemiológicas de referencia que además puede aplicarse a un gran número de microorganismos.

El principal inconveniente del PFGE es su complejidad técnica y de manipulación, así como la necesidad de disponer de un utillaje adecuado.

Marcadores basados en la técnica de amplificación por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido tratada desde el punto de vista técnico y de sus aplicaciones diagnósticas en el capítulo precedente. Los marcadores basados en las reacciones de amplificación tienen la ventaja de ser rápidos (ya que los resultados pueden obtenerse en horas) y técnicamente sencillos. Por otra parte, el instrumental necesario (termociclador) suele estar presente en la mayoría de los laboratorios clínicos. Sin embargo, en algún protocolo la reproducibilidad puede ser un problema. El estudio del polimorfismo de amplificación tiene básicamente tres enfoques distintos: 1) el polimorfismo de *loci* específicos, 2) el polimorfismo de regiones escogidas arbitrariamente y 3) el polimorfismo de regiones situadas entre fragmentos repetidos.

Polimorfismo de los fragmentos de restricción de un locus específico amplificado por PCR

El 16S rDNA, que codifica el 16S rRNA (RNA ribosomal), es un marcador molecular de un gran valor filogenético en microbiología por estar presente en todos los microorganismos y porque diferentes fragmentos de su secuencia presentan niveles diferentes de variabilidad. Esto ha hecho que el 16S rDNA sea un gen ampliamente utilizado en diferentes técnicas epidemiológicas, bien como en el ribotipado (ya descrito anteriormente), donde un fragmento muy conservado se usa como diana para una sonda, o bien amplificando esta región y cortando el amplificado con enzimas de restricción o secuenciándolo. De todas formas, excepto en su utilización como diana para una sonda (ribotipado), su utilidad es más como herramienta filogenética para establecer la relación evolutiva entre microorganismos que para la comparación epidemiológica de cepas de una misma especie.

La amplificación del gen 16S rDNA (ARDRA; Amplified rDNA restriction analysis) o de los espacios intergénicos entre tRNA (tDNA-ILP; *Intergenic spacer length polymorphism*), seguida en ambos casos del corte con varios enzimas de restricción, permite comparar los patrones de los fragmentos formados. Son técnicas sencillas y reproducibles. No obstante, su principal limitación es el bajo poder de discriminación debido a que la región analizada del genoma es muy limitada.

Una herramienta similar al ARDRA es el PRA (PCR-restriction fragment length polymorphism analysis), que se utiliza fundamentalmente para la identificación de microorganismos.

bacterias. En este caso, el gen amplificado es el *hsp65*, que codifica una proteína de 65 kDa presente en todas las micobacterias, cuya restricción da lugar a diferentes fragmentos característicos de cada especie de micobacteria.

Polimorfismo de los patrones de amplificación obtenidos mediante iniciadores arbitrarios (AP-PCR; RAPD)

El AP-PCR (*Arbitrary Primed-PCR*) se basa en una amplificación en condiciones de baja astringencia⁸ y utilizando iniciadores arbitrarios cortos (generalmente de 8-10 pb), de tal forma que por simple cuestión de probabilidad este iniciador se unirá a diferentes fragmentos del genoma complementarios de su secuencia y sólo algunos de ellos estarán en la orientación y distancia adecuada para generar fragmentos por acción de la DNA polimerasa. Estas técnicas también se denominan polimorfismo de DNA amplificado al azar (*Random Amplification of Polimorphic DNA*; RAPD). Esta técnica es rápida y fácil de aplicar, pero adolece de falta de reproducibilidad, especialmente si no se ajusta la calidad y la cantidad de DNA.

Polimorfismo de los patrones de amplificación obtenidos mediante iniciadores específicos de secuencias repetidas (rep-PCR)

Estas técnicas se fundamentan en la amplificación de fragmentos del genoma, que se encuentran entre dos secuencias repetidas. Son tres las secuencias repetitivas que se han utilizado con esta finalidad: las secuencias REP (*repetitive extragenic palindromic*), las ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) y los elementos BOX. En tales casos, las técnicas se han denominado REP-PCR, ERIC-PCR y BOX-PCR respectivamente, y rep-PCR colectivamente. Estas técnicas se han mostrado más reproducibles que las AP-PCR y se están aplicando para el estudio epidemiológico de un gran número de especies distintas; además, son de gran utilidad por su sencillez y rapidez, pudiendo introducirse en el día a día del laboratorio (Figs. 10.9 y 10.10).

Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP; Amplified-fragment length polymorphism)

En esta técnica, el primer paso consiste en una digestión del genoma con dos enzimas de restricción distintas (una de alta frecuencia de corte y otra de baja frecuencia); simultáneamente, se añaden unos adaptadores (pequeños fragmentos de DNA) diseñados para que se unan a los extremos cohesivos de los fragmentos gene-



Figura 10.9. Técnicas epidemiológicas basadas en la PCR: rep-PCR.

En la rep-PCR, secuencias repetidas y próximas entre sí del genoma (como las secuencias ERIC, BOX o REP) se utilizan como diana para los cebadores que amplifican los espacios intermedios. Las técnicas comparan las diferencias de tamaño existentes de los espacios intermedios amplificados entre las cepas.

Estas técnicas son rápidas, y sencillas en relación al PFGE y aunque su reproducibilidad no es absoluta, la comparación de los resultados en un mismo gel posee extraordinario valor.

rados por las enzimas a los que se unen mediante una ligasa. A continuación se realiza la PCR utilizando iniciadores específicos para los adaptadores utilizados. En función de los microorganismos estudiados, se puede añadir una base al extremo 3' del iniciador, con el fin de reducir el número de amplificadas obtenidos. Ésta es una técnica que presenta una gran reproducibilidad y que para una gran variedad de especies ha mostrado un gran poder discriminativo, aunque es algo más laboriosa que las citadas anteriormente.

Polimorfismo de secuencia (Multilocus sequence typing; MLST)

La determinación de la secuencia de nucleótidos del gen de una proteína conservada en la evolución (generalmente una enzima esencial del metabolismo, por ejemplo, la fumarato-reductasa) permite detectar variaciones en esa secuencia en diferentes microorganismos de la misma o diferentes especies (polimorfismo de secuenciación). El estudio de varios genes en un microorganismo permite conocer sus secuencias, que pueden compararse con las de otros microorganismos, lo que permite su tipado (*Multilocus sequence typing*; MLST).

Los protocolos publicados están perfectamente estandarizados y suelen basarse en la secuenciación de fragmentos de unos siete genes distintos que son previamente amplificados. La selección de estos genes debe compatibilizar, por una parte, una discriminación adecuada y, por la otra, que la variabilidad observada sea fruto de mutaciones puntuales (ausencia de recombinación). El fragmento a estudiar en cada gen suele ser de unas 450 pb a fin de permitir su secuenciación utilizando un único iniciador en cada sentido. Este tipo de estudios se han inspirado en los de MLEE (véase más arriba), que revelan por electroforesis las diferentes isoenzimas, que son consecuencia de mutaciones en su genoma y que, en defini-

⁸ En biología molecular se denomina astringencia a las condiciones que facilitan o dificultan la formación de una doble cadena de DNA (desnaturalización/renaturalización). Los factores que facilitan la renaturalización del DNA (hibridación) son la temperatura moderada, la elevada osmolaridad y el pH neutro (baja astringencia). Las condiciones opuestas facilitan la desnaturalización y dificultan la renaturalización (alta astringencia).



Figura 10.10. Ejemplo de ERIC-PCR.

En la figura se muestran los resultados de ERIC-PCR en 15 cepas de *E. coli*. En ambos extremos del gel se encuentran los marcadores de peso molecular. Obsérvese como las cepas de las calles 4, 5 y 6 comparten el mismo patrón. Asimismo son idénticas las cepas de las calles 13, 14 y 15.

tiva, son las mutaciones que se evidencian en el MLST directamente por secuenciación.

Esta técnica se desarrolló inicialmente para *Neisseria meningitidis* y rápidamente se ha estandarizado para otros microorganismos que están incrementando a gran velocidad (neumococo, *Streptococcus pyogenes*, estafilococos, *Haemophilus influenzae*, *E. coli*). A igual que en el caso del MLEE, los resultados pueden interpretarse con fines epidemiológicos o evolutivos (filogenia). La gran ventaja de esta técnica es su absoluta objetividad, lo que permite comparar secuencias y por tanto microorganismos de modo muy preciso, así como exportar los resultados a otros laboratorios constituyendo así bases de datos a gran escala absolutamente comparables y abordando de forma global la identificación y difusión de los microorganismos.

Análisis de los datos

La mayoría de marcadores moleculares se basan en separaciones electroforéticas que dan lugar a un patrón de bandas (Figs. 10.8 y 10.10).

En el contexto de una investigación epidemiológica, desde el punto de vista práctico, para considerar dos cepas formando parte del brote o, alternativamente, considerarlas diferentes, se han establecido diversos criterios según la técnica utilizada. Uno de los más referidos para el campo pulsante ha sido el propuesto por Tenover y colaboradores⁹.

Como se ha advertido tantas veces, los resultados de los análisis moleculares (y también los fenotípicos) deben valorarse a la luz de los datos de la epidemiología de campo.

Para los estudios cuantitativos de la homología, el análisis de los resultados se basará en el cálculo de

los coeficientes de similitud de estos patrones para cada par de cepas. Estos resultados se expresan en una matriz de similitud que puede representarse gráficamente como un dendrograma de homologías.

Es extremadamente importante estandarizar las condiciones experimentales a fin de que los patrones electroforéticos sean reproducibles y puedan compararse los resultados obtenidos en distintos geles tanto en el mismo laboratorio como en distintos laboratorios. Este hecho es especialmente importante cuando los datos de tipificación de un determinado microorganismo se centralizan en un laboratorio dando lugar a grandes bases de datos. Aunque este esfuerzo de estandarización se ha hecho para algunos microorganismos (*M. tuberculosis* y RFLP asociado a IS6110, *S. aureus* y PFGE), queda mucho por hacer en este sentido.

El primer paso en el análisis de los resultados es la normalización de los geles. Existen numerosos factores que influyen en el proceso electroforético (protocolo de trabajo, carga del gel, condiciones de electroforesis, instrumentación, etc.) que pueden dar lugar a que dos bandas del mismo tamaño tengan una posición en el gel ligeramente diferente. La normalización consiste en asignar a estas bandas el mismo peso (posición) a pesar de las diferencias generadas por el proceso analítico. La normalización de los geles se ha visto facilitada por el desarrollo de *softwares* (algunos comercializados), pero, en cualquier caso, exige una cuidadosa supervisión visual.

Una vez normalizados los geles, para el cálculo de la similitud entre un par de cepas pueden utilizarse diversos coeficientes. El más utilizado es el coeficiente de Dice (S_D), que se basa en la posición de las bandas. Cuando se ha definido la totalidad de bandas a evaluar, se determina su presencia o ausencia en cada una de las dos cepas y el coeficiente de similitud se calcula con la siguiente fórmula: $S_D = 2n_{AB}/(2n_{AB} + a + b)$, donde n_{AB} es el número de bandas presentes en las dos cepas, a es el número de bandas presentes en la cepa a pero no en la cepa b y b es el número de bandas presentes en la cepa b pero no en la cepa a. Otros marcadores basados en la posición de las bandas son el de Jaccard (S_j) o el coeficiente de Pearson (S_p).

El algoritmo matemático más utilizado para construir dendrogramas a partir de la matriz de similitud es el método de agrupación por pares no ponderado utilizando promedios (*unweighted pair group method using arithmetic averages*: UPGMA). Este método asume que el «reloj molecular» es idéntico para todas las cepas y da lugar a un árbol con raíz (o punto de partida) a partir del cual tienen lugar las divisiones. Los dendrogra-

⁹ J Clin Microbiol, 1995; 33: 2233-2239. Para una revisión, Goering R.V. Rev Med Microbiol 2000; 11: 145-152.

mas generados con la mayoría de los marcadores moleculares no deben ser considerarlos como una representación filogenética de las relaciones entre cepas, sino como una forma práctica de visualizar el grado de relación entre cepas e identificar grupos o clades. En un dendrograma, el punto de corte para considerar las

cepas como relacionadas es arbitrario. En algunos casos se exige una identidad de patrones, pero frecuentemente, tal como se ha comentado para el PFGE, se acepta un cierto número de diferencias. La experiencia y la concordancia de sistemas de tipado ayudan a seleccionar un punto de corte adecuado.

Seguridad biológica en los laboratorios de microbiología clínica

INTRODUCCIÓN

El personal que trabaja en los laboratorios de microbiología corre riesgo de infección, por lo que debe adoptar un conjunto de normas de seguridad que sirven para reducir a un nivel aceptablemente bajo el riesgo inherente a la manipulación de todo el material peligroso.

Los servicios de Microbiología clínica deben tener un responsable de seguridad biológica y disponer de un manual de seguridad que se revise anualmente y se entregue a todo el personal garantizando su cumplimiento. Las personas que se incorporan a trabajar en un laboratorio de microbiología deben ser informadas de las normas de seguridad. El director del servicio es el último responsable de la seguridad del laboratorio¹.

El diseño arquitectónico y el equipamiento de los laboratorios de microbiología han de contribuir a la seguridad; pero ésta sólo es posible si la formación, actitud y forma de proceder del personal que trabaja en ellos es la adecuada para este propósito.

Debe tenerse en cuenta que en un laboratorio de microbiología, además del riesgo biológico, existen riesgos por agentes químicos y físicos, a los que no se hace referencia en este texto.

CLASIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Los agentes biológicos se clasifican en cuatro grupos de riesgo en función de la virulencia y la dosis infectiva del microorganismo, la disponibilidad de tratamiento, el modo de transmisión en el laboratorio, el riesgo de difusión en la comunidad y la viabilidad del microorganismo en el entorno. Los microorganismos de cada grupo han de manipularse con medidas de contención específicas (Tabla 11.1).

El grupo 1 incluye microorganismos que no son patógenos para las personas sanas. Se trata de microorganismos ambientales, asociados a vegetales o formando parte de la flora normal de los animales, como *Escherichia coli* K12, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* o los

microorganismos que se utilizan en la industria alimentaria, como *Saccharomyces cerevisiae*. Este tipo de microorganismos es el recomendado para que los estudiantes de un curso introductorio de microbiología realicen sus prácticas.

Los agentes del grupo 2 pueden causar infecciones de carácter moderado o grave, se transmiten fundamentalmente por contacto o por ingestión, es difícil que se propaguen a la comunidad y se dispone de tratamiento y profilaxis eficaz; entre ellos se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* o *Neisseria gonorrhoeae*.

El grupo 3 incluye microorganismos que pueden causar infecciones graves, algunos son de transmisión aérea, con riesgo variable de propagarse a la comunidad, frente a los que también se dispone de tratamiento o profilaxis eficaz, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Yersinia pestis*, las brucelas, los virus de la hepatitis B y C o el de la inmunodeficiencia humana.

La clasificación de los microorganismos en uno de los grupos de riesgo, 2 y 3 —que incluyen la mayoría de los microbios que se manipulan habitualmente en los laboratorios de microbiología clínica— no es fácil debido a que hay que valorar tanto su patogenicidad intrínseca como el riesgo de transmisión aérea.

Por otra parte, la decisión del nivel de seguridad a utilizar para manipular las muestras clínicas es difícil, ya que no se conoce con seguridad los microorganismos que contienen; sin embargo, también hay que tener en cuenta su posible patogenicidad, y la posibilidad de que la muestra genere aerosoles durante su manipulación.

Finalmente los del grupo 4, además de causar infecciones graves o muy graves que no tienen profilaxis o tratamiento eficaz pueden propagarse a la comunidad con mucha facilidad, como los virus de Lassa, Marburg, Ebola o el de la viruela (cepas de archivo).

Los microorganismos multirresistentes de los grupos 2 y 3 (por ejemplo, *S. aureus* o *M. tuberculosis*) han de manipularse en su nivel de contención con extraordinario cuidado y, si es posible, en el nivel de contención superior.

¹ En España, Real Decreto 664/1997 de 12 de mayo (BOE 24-5-97) y Orden de 25 de marzo de 1998 (BOE 30-3-98 y 15-4-98).

Tabla 11.1
Algunos ejemplos de agentes biológicos clasificados por grupos de riesgo¹

Microorganismos por grupo de riesgo

Grupo 1	Microorganismos que es improbable que causen enfermedad en trabajadores sanos. (<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Streptococcus lactis</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>Streptomyces spp.</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> y otros). Algunos de ellos son de interés industrial.			
Grupo 2	Microorganismos que causan enfermedad de buen pronóstico, frente a los que existe tratamiento y que en general no se transmiten por vía aérea y no es fácil su difusión en la comunidad.			
	<i>Bordetella pertussis</i> (V)	<i>Aspergillus spp</i>	Adenovirus	<i>Ascaris lumbricoides</i>
	<i>Clostridium botulinum</i> (T)	<i>Candida spp</i>	Parvovirus B19	<i>Criptosporidium spp</i>
	<i>Clostridium tetani</i> (T) (V)	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Rotavirus	<i>Entamoeba histolytica</i>
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (TV)	Dermatofitos	Virus de la hepatitis A (V)	<i>Giardia intestinalis</i>
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pneumocystis jiroveci</i>	Virus de la gripe (V)	<i>Schistosoma</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Sporothrix schenckii</i>	Virus del sarampión (V)	<i>Toxoplasma gondii</i>
	<i>Streptococcus</i>		Virus de las paperas (V)	<i>Trichinella</i>
	Micobacterias oportunistas		Virus de la rubéola (V)	
	<i>Haemophilus influenzae</i> (V)			
	Salmonelas gastroenteríticas			
	<i>Shigella</i>			
	<i>Yersinia enterocolitica</i>			
	<i>Legionella</i>			
	<i>Borrelia</i>			
	Neisserias patógenas			
	<i>Treponema pallidum</i>			
	<i>Vibrio</i>			
Grupo 3	Causan infecciones graves, algunas de transmisión aérea, con riesgo variable de transmitirse a la comunidad. Se posee terapéutica aunque de eficacia variable.			
	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Virus de la encefalitis de California	<i>Echinococcus</i>
	<i>Brucella</i>	<i>Coccidioides immitis</i>	Virus de la encefalitis equina americana (V)	<i>Leishmania brasiliensis</i>
	<i>Escherichia coli</i> verotoxigénica)	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Virus de la estomatitis vesicular	<i>Leishmania donovani</i>
	<i>Francisella tularensis</i> (V)	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Virus de la hepatitis B (V) (D)	<i>Plasmodium falciparum</i>
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (V)		Virus de la hepatitis C (D)	<i>Taenia solium</i>
	<i>Mycobacterium leprae</i>		Virus de la hepatitis D (D)	<i>Trypanosoma cruzi</i>
	Rickettsias		Virus de la fiebre amarilla (V)	
	<i>Salmonella ser. Typhi</i> (V)		Virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)	
	<i>Shigella dysenteriae ser 1</i> (T)			
	<i>Yersinia pestis</i> (V)			
Grupo 4²	Causan infecciones graves o muy graves, muchas de transmisión aérea que pueden pasar a la comunidad y frente a las que no hay terapéutica eficaz.			
			Virus de la viruela (V)	
			Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea (Congo)	
			Virus de Marburg	
			Virus Ebola	

¹ Para una información más completa al respecto puede consultarse: *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*. CDC/NIH. US Department of Health and Human Services. Public Health Service (4ª Ed). Washington.

No se recogen exhaustivamente todos los microorganismos del grupo 4.

² Se han de incluir aquí también los microorganismos del grupo 3 que adquieren propiedades que los hacen particularmente peligrosos (p.ej., *M. tuberculosis* multiresistente).

(D) La lista de trabajadores expuestos al agente debe conservarse durante más de diez años después de la última exposición.

(T) Producción de toxinas.

(V) Vacuna eficaz disponible.



Figura 11.1. Recipientes para el transporte de microorganismos.

La remisión, envío o traslado de microorganismos fuera del laboratorio debe hacerse en condiciones adecuadas. Están comercializados diversos recipientes homologados para el transporte de cepas. En esta figura se muestra uno de ellos. Las compañías mensajeras que efectúan el transporte también deben estar homologadas.

Entre los microorganismos que producen con mayor frecuencia infecciones al personal en los laboratorios clínicos convencionales están las brucelas, las salmonelas y las shigelas, *M. tuberculosis*, los virus de las hepatitis B y C, el virus de la inmunodeficiencia humana, *Francisella tularensis* así como *Burkholderia mallei* y *B. pseudomallei* en zonas endémicas y en menor proporción los hongos dimórficos (*Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* y otros).

El traslado de cepas entre laboratorios debe realizarse en contenedores de seguridad adecuados, que deben corresponder a modelos homologados, y el transporte ha de efectuarse mediante compañías autorizadas (Fig. 11.1).

MEDIOS DE CONTENCIÓN

Para que se produzca un accidente por un agente biológico han de concurrir un huésped susceptible, un agente infeccioso y unas condiciones de transmisión apropiadas. De todos ellos, el que mejor puede controlarse es la vía de transmisión. Las vías de transmisión más comunes en los laboratorios de microbiología son la inoculación directa (pinchazos) y la vía aérea. La vía oral y el contacto directo con la piel o las mucosas son también posibles, pero menos frecuentes.

El término «contención» se utiliza para describir los métodos que hacen segura la manipulación de los pro-

ductos en el laboratorio y su objetivo es reducir al mínimo la exposición del personal y del entorno a agentes potencialmente patógenos.

Para la seguridad biológica de los laboratorios de microbiología son importantes tres elementos:

1. Los equipos de protección disponibles que constituyen las barreras primarias, que incluyen desde las batas hasta las cabinas de seguridad biológica.
2. Unas instalaciones con un diseño adecuado para un laboratorio de microbiología (barreras secundarias).
3. Unas técnicas microbiológicas (procedimientos estándar) desarrolladas en condiciones de seguridad y la actitud de las personas que trabajan en el laboratorio.

Existen cuatro niveles de contención (niveles de seguridad biológica, *biosafety levels*, BSL) de complejidad creciente y relacionada con el grado de biopeligrosidad de los microorganismos que se han de manipular. En estos cuatro niveles (1 a 4) se combinan, en mayor o menor grado, los tres elementos de seguridad antes enumerados: los equipos, la estructura y los procedimientos técnicos.

BARRERAS PRIMARIAS Y SECUNDARIAS

Las barreras primarias constituyen la primera línea de protección cuando se manipulan materiales biológicos que puedan contener microorganismos.

Pertenecen a esta categoría la ropa y otros elementos de protección personal (batas, gorro, guantes, mascarillas, gafas), así como las cabinas de seguridad biológica (CSB).

Batas

Durante el trabajo se utilizarán batas protectoras o uniformes especialmente diseñados para trabajar en los laboratorios. Las batas deben ser, preferentemente, abrochables por detrás y con puños elásticos. En algunas circunstancias puede ser útil añadir un delantal encima de la bata.

La ropa de trabajo se dejará dentro del laboratorio antes de salir a zonas exteriores y se lavará en la propia institución.

Guantes

Se utilizarán guantes siempre que se manipule material clínico de cualquier tipo (muestras clínicas, incluyendo, por descontado, sangre, suero o fluidos), microorganismos de los grupos de riesgo 2, 3 y 4 y siempre, incluyendo el grupo 1, que existan pequeñas heridas o excoriaciones de la piel de las manos. El tipo de guantes de uso habitual en el laboratorio de microbiología es el de látex o cloruro de polivinilo. Cuando se manipulan agentes de los grupos de riesgo 3 y 4 es recomendable ponerse dos pares de guantes y, al acabar, retirar el par exterior en el interior de la CSB. Es importante revisar los guantes antes de usarlos para asegurarse de que están en buenas condiciones y no tienen pinchazos, agujeros o rasgaduras.

En ocasiones, el peligro por contacto no es sólo biológico sino que puede ser secun-
de a la manipulación de sustancias corrosivas, irritantes, disolventes u objetos calientes; en estos casos deben utilizarse guantes adecuados al riesgo del material que se va a manipular.

Gorro

Las personas con cabellos largos deben recogerlos con un gorro adecuado.

Gafas y protectores oculares

Las gafas u otros elementos de protección ocular deben utilizarse cuando hay peligro de salpicaduras y aerosoles por productos con contaminación biológica o química y deben corresponder a un modelo homologado de policarbonato que cumpla la normativa DIN EN 166F/CE. Las personas que usen lentillas deberán utili-

zar gafas protectoras según la norma general y extremar la higiene habitual de las lentillas.

Mascarillas

Para minimizar el riesgo de inhalación de aerosoles portadores de elementos biológicos debe utilizarse mascarillas homologadas FFP3 que cumplan la normativa EN 149:2001 FFP3, ya que las mascarillas de tipo quirúrgico no protegen en absoluto de este riesgo. Algunos modelos de mascarillas P3 tienen válvula de exhalación, que minimiza la acumulación de aire caliente y humedad y reduce el esfuerzo para respirar.

Es muy importante señalar que las batas, guantes, mascarillas, gafas y otros elementos de protección deben ser cómodos y no dificultar las manipulaciones, si no es así podrían incrementar el riesgo en lugar de disminuirlo. No es recomendable llevar ropa que aumente la superficie corporal expuesta (pantalones cortos, sandalias, etcétera).

Cabinas de seguridad

Existen diferentes clases de cabinas de seguridad según el tipo de material a manipular o la función a que van destinadas. Las cabinas o campanas de gases capturan los humos y vapores procedentes de la manipulación de productos químicos en su interior y los eliminan al exterior del edificio, pero no ofrecen protección en caso de riesgo biológico.

Las cabinas de flujo laminar crean un flujo de aire, esterilizado tras su paso por un filtro HEPA², que puede ser horizontal o vertical. Esa cortina de aire estéril crea una barrera de protección para el material que se manipula en el interior, nunca para el operador, por lo que se utilizan para manipular material no contaminado ni tóxico que debe mantenerse estéril, como medicamentos que han de administrarse por vía parenteral, sueros, medios de cultivo y otros.

Las cabinas de seguridad biológica (CSB) permiten reducir al mínimo el riesgo del personal que trabaja en el laboratorio. El objetivo principal de estos equipos es proporcionar una zona de trabajo que minimice la posibilidad de que una partícula suspendida en el aire pueda escapar al exterior de la cabina, contaminando al operario y a la zona que le circunda. Esencialmente, son cámaras de circulación forzada del aire que, según sus especificaciones y diseño, proporcionan diferentes niveles de protección.

Las CSB pueden ser de tres categorías, I, II y III, cuya numeración no guarda relación estricta con los niveles de seguridad. Las de clase I y II permiten trabajar con

² HEPA filtro de alta seguridad, retiene con una eficacia del 99,9% las partículas de hasta 0,3 micras de diámetro. www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/biosfty.htm

microorganismos de riesgo 2 y 3 y las de clase III, con los de riesgo 4.

Cabinas de seguridad biológica de clase I

Tienen una abertura frontal para los brazos del operador. El aire penetra por esa abertura frontal, atraviesa la zona de trabajo y sale al exterior después de atravesar un filtro HEPA, generalmente situado en el techo de la cabina (Fig. 11.2).

Cabinas de seguridad biológica de clase II

Se diferencian de las de clase I en que además de proteger al operario y su entorno, ofrecen también protección de la contaminación al producto que se manipula. Por la abertura frontal de la cabina penetra un flujo de aire que es absorbido a través de una rendija en la poyata de la cabina (junto a la abertura), recirculando por detrás hasta el techo, donde es filtrado y proyectado verticalmente como flujo laminar siendo reabsorbido a través de las rendijas en la poyata. Este aire y el nuevo que

se absorbe son en parte recirculados, como se acaba de señalar, y en parte expulsados al exterior después de ser filtrados (Fig. 11.2). Los diferentes tipos de cabinas de la clase II (A, B₁, B₂ y B₃) se diferencian entre sí por las características de construcción, velocidad del flujo, porcentaje de aire recirculado y sistema de extracción, factores que influyen en la posibilidad de proteger también de tóxicos químicos. Las de clase II tipo B, a diferencia de las de tipo A, deben disponer de un conducto hermético de salida al exterior del laboratorio, con un extractor y un sistema de alarma apropiado. En las de clase II-B2, todo el aire es expulsado al exterior y no recirculado. Estas cabinas de clase II son las más usadas en los laboratorios de microbiología para manipular muestras respiratorias, micobacterias, hongos y virus porque son capaces de eliminar una proporción significativa de vapores tóxicos generados durante los procesos de desinfección (Fig. 11.2).

Las cabinas deben situarse lejos de las entradas del aire acondicionado y durante su funcionamiento las ventanas de la habitación deben estar cerradas.

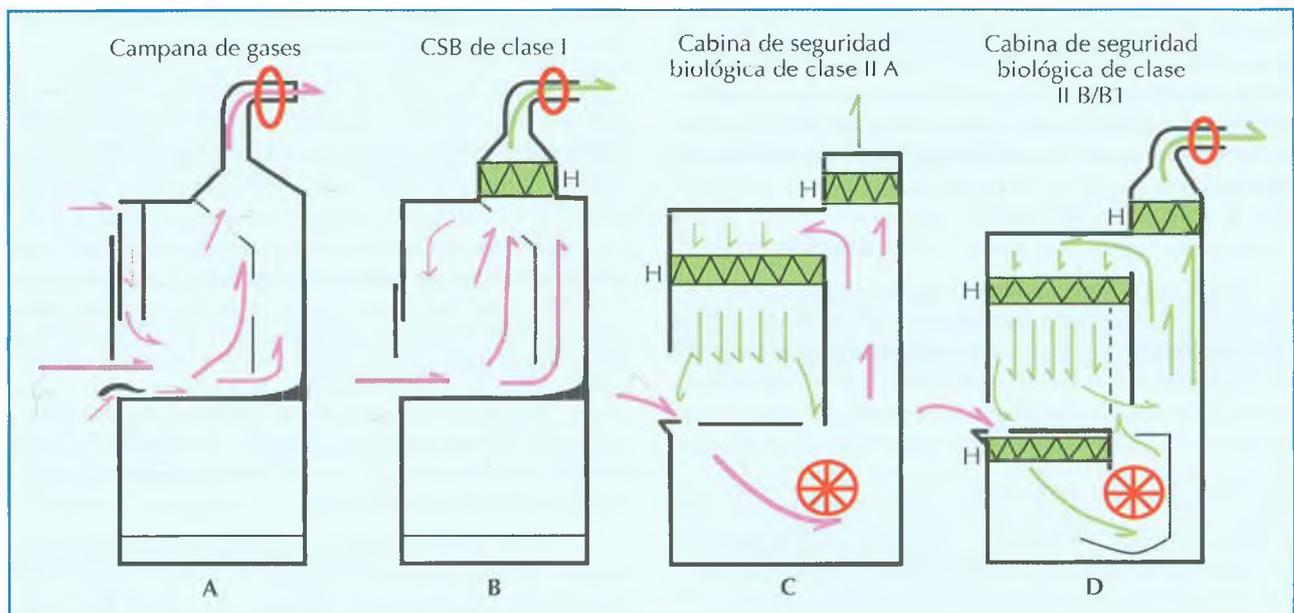


Figura 11.2. Cabinas de seguridad biológica (CSB).

A. Campana de gases. No es una cabina de seguridad biológica. Crea un flujo de aire desde la boca de entrada hasta la parte superior de la cabina. El aire, y los gases formados en su interior por las sustancias volátiles, son eliminados por una conducción hasta el exterior del edificio.

B. Cabina de seguridad biológica de clase I. Toma el aire por la parte anterior, circula en sentido ascendente arrastrando las partículas en suspensión. El aire atraviesa un filtro de seguridad (HEPA) situado en la parte superior. Una vez filtrado, el aire es expulsado mediante un conducto al exterior del edificio. Estas cabinas protegen al manipulador, pero no al producto, ya que el aire que entra directo del exterior incide sobre el material.

C. Cabina de seguridad biológica de clase II A. Toma el aire por la parte anterior; pero es dirigido a través de unas rendijas, situadas en la zona anterior de la superficie de trabajo, a la parte inferior de la cabina. Asciende por detrás de la pared de la cabina hasta la parte superior y es dirigido hacia abajo después de pasar por un filtro HEPA, para crear un flujo laminar vertical de aire estéril que protege al material manipulado y a la persona que manipula. Una parte del aire circulante es expulsado al exterior, en la propia habitación, después de atravesar un filtro HEPA, por lo que esta cabina no puede ser usada con productos que desprendan gases o vapores tóxicos.

D. Cabina de seguridad biológica de clase II B/B1. Se basa en un principio semejante al anterior, pero recircula menos aire y el que se expulsa va al exterior del edificio mediante un conducto adecuado.

Las diferencias entre las cabinas de clase II estriban en la cantidad de aire recirculado y, por tanto, en la posibilidad de trabajar con organismos en condiciones en que se generen gases irritantes o tóxicos.

H: Filtro HEPA.

Antes de iniciar el trabajo, las cabinas deben ponerse en marcha durante 10 a 15 minutos para purgar los filtros y permitir que se alcance y estabilice la presión adecuada, que debe controlarse en el manómetro. En su interior debe disponerse tan solo el material estrictamente necesario, bien ordenado de modo que no exija movimientos forzados. Si se introduce o saca material debe esperarse unos momentos antes de reiniciar el trabajo para que se estabilice el flujo y se eviten turbulencias.

La limpieza interior de las cabinas puede realizarse con alcohol etílico o isopropílico al 70%, sin embargo para no estropear la superficie de trabajo de la cabina se recomienda el glutaraldeído al 1-2%.

El mantenimiento de las cabinas debe ser periódico y efectuado por personal experto y constar en un registro. Debe atenderse muy particularmente al cambio de filtros según un programa y siempre que estén rotos o colmatados. Ha de disponerse de un registro que recoja las actividades de mantenimiento y las incidencias.

Debe tenerse en cuenta que los diferentes tipos de cabina I y II, cuando son de buena calidad y están bien mantenidas, no presentan diferencias en cuanto a la seguridad biológica y que sus diferencias estriban fundamentalmente en su capacidad para trabajar con material que pueda desprender alguna cantidad de vapores tóxicos, incluyendo los desinfectantes utilizados normalmente.

Cabinas de seguridad biológica de clase III

Proporcionan el máximo nivel de seguridad y se utilizan para manipular microorganismos de riesgo 4. Son recintos herméticos que carecen de abertura y se opera en ellos a través de unos guantes de plástico de elevada resistencia incorporados al frontal de la cabina, disponiéndose de una trampilla para introducir los productos. El aire entra en su interior a través de un filtro HEPA y sale al exterior a través de dos de ellos. Su instalación requiere condiciones muy especiales y su utilización debe reservarse a personas experimentadas. Este tipo de cabinas está restringido a algunos centros de referencia y de investigación.

Barreras secundarias

Las normas generales de construcción y utilización de todos los elementos de un laboratorio, desde los más generales como el alicatado y material de las paredes, tipo de grifos e interruptores de manipulación segura, hasta los más específicos, deben contribuir a la seguridad de los trabajadores y, naturalmente, de los pacientes.

Es aconsejable que las centrifugas dispongan de tapa de seguridad y que correspondan a modelos con cubetas que permitan su desinfección con facilidad en previsión de que se produzca una rotura de los tubos. Las centrifugas, los agitadores, las neveras y los congeladores

que generan ruido y/o calor han de estar situados en pequeños habitáculos adaptados para ellos para evitar esas molestias y mejorar su rendimiento.

Desde el punto de vista estructural es aconsejable que los servicios de microbiología estén ubicados fuera del tránsito del hospital y que no sea un lugar de paso para otras dependencias para las que no existe restricción para el acceso.

Los laboratorios de contención de clase 4 (véase más adelante) requieren un diseño complejo y específico que escape al objeto de esta revisión.

NORMAS Y PROCEDIMIENTOS ESTÁNDAR

Bajo este concepto se incluyen las normas generales del funcionamiento del laboratorio y de la manipulación de los productos biológicos. Al laboratorio sólo entrarán las personas que sean imprescindibles y estén autorizadas. Todas las personas deben conocer al responsable de la seguridad del laboratorio. Asimismo todo el personal debe conocer la localización y saber utilizar las duchas para los ojos y para el cuerpo en caso de accidente químico o físico (o biológico si es necesario).

Las personas deben trabajar concentradas en las manipulaciones que efectúan y relajadas, realizando todos los procedimientos con meticulosidad para minimizar las salpicaduras, los pinchazos o cortes y la formación de aerosoles.

Las medidas de protección estándar (precauciones universales) que se señalan a continuación deben aplicarse en todos los niveles de contención, incluso cuando se trabaja con microorganismos inocuos como *E. coli* K12 o *Sacharomyces cerevisiae*.

1. En el laboratorio jamás se comerá, beberá o fumará. No se llevará a la boca lápices u otros objetos. Tampoco se almacenarán alimentos, bebidas u otros elementos de consumo en las neveras o armarios para reactivos.

2. Debe utilizarse siempre bata y guantes bien adaptados a las manos para manipular cualquier muestra clínica o microorganismo resembrado o de archivo (los guantes no son estrictamente necesarios para manipular microorganismos de clase 1, excepto si hay escoriaciones, incluso pequeñas, en las manos). Es fundamental recordar que no se puede salir jamás del laboratorio con bata ni guantes y no se cogerá el teléfono ni se escribirá con guantes. Es recomendable manipular sin anillos, relojes de muñeca, etc., para evitar su contaminación y para poder lavarse las manos sin restricciones.

3. Jamás debe pipetearse con la boca, debiendo utilizarse pipetas manuales o automáticas.

4. Debe tenerse presente las actividades que generan aerosoles o salpicaduras, como la esterilización del asa en un mechero Bunsen, la centrifugación y la agitación en «vórtex». Por todo lo dicho, es preferible dispo-

ner de mecheros eléctricos en lugar de Bunsen para esterilizar las asas, de centrifugas con tapa hermética para controlar los aerosoles y recordar que debe evitarse la agitación en «vortex» con tubo abierto, aun con microorganismos de riesgo 1. En su caso deben tomarse las precauciones adecuadas (mascarilla, gafas).

5. Es muy importante desechar el material punzante o cortante (agujas hipodérmicas, hojas de bisturí, etcétera) en recipientes específicos para este material. Es fundamental no forzar la introducción del material cuando están llenos, debiendo cambiarse por otros vacíos antes de que estén colmados.

6. Al finalizar el trabajo se recogerá el material empleado y se desechará el contaminado en los recipientes adecuados (recipientes de seguridad para material punzante y recipientes metálicos o de plástico para esterilización o incineración respectivamente). Se limpiará la poyata de trabajo con agua y detergente y después se desinfectará con alcohol etílico o isopropílico al 70%, con hipoclorito sódico (lejía doméstica diluida al 1/10), con compuestos fenólicos del 0,2 al 3%, compuestos de amonio cuaternario del 0,1 al 2% o aldehídos al 0,5%.

7. Se lavarán las manos después de cada tarea aunque se haya utilizado guantes y siempre antes de salir del laboratorio. Debe utilizarse jabón neutro y frotar durante 20 segundos antes de aclarar con agua (lavado higiénico). Si se requiere un lavado antiséptico se procederá de la misma manera, pero utilizando un jabón con clorhexidina o povidona yodada. En todo caso las manos deben secarse con toallas de papel desechables.

8. Cualquier accidente debe comunicarse a la supervisora y al responsable de seguridad del laboratorio, quienes lo comunicaran al director del servicio. También debe comunicarse al médico de empresa. Las medidas a tomar han de dirigirse a la profilaxis del accidentado y de otras personas si hay lugar.

NIVELES DE CONTENCIÓN

Hay cuatro niveles de contención (1-4) que combinan los elementos de seguridad señalados. Existen diferentes recomendaciones sobre cuál de ellos debe aplicarse según el grado de riesgo de los microorganismos que se manipulan y del material que los vehicula, pero en la práctica no siempre es fácil decidir cómo se han de utilizar los diferentes elementos de seguridad en la actividad diaria, ya que muchas veces no se conocen los microorganismos existentes en una muestra y además existen aspectos imprecisos en las normativas y las recomendaciones.

Para trabajar con microorganismos de riesgo 1 (Tabla 11.1) puede utilizarse la poyata de un laboratorio convencional, sin cabinas de seguridad, pero teniendo en cuenta las normas de protección estándar señaladas

anteriormente en «Normas y procedimientos estándar» y resumidas en la tabla 11.2 que constituirían el nivel de contención 1.

Las manipulaciones de material en el que se sospecha la presencia de microorganismos de riesgo 2, cuya transmisión es por contacto o ingesta, pueden hacerse en una poyata convencional siempre que se utilicen las medidas de barrera primarias adecuadas incluyendo bata y guantes, sin embargo debe usarse cabina y centrifugas de seguridad cuando puedan producirse aerosoles o se sospeche que las muestras puedan contener microorganismos de transmisión aérea (contención 2).

Todo el material que pueda contener microorganismos de riesgo 3 debe manipularse en cabina de bioseguridad. Para este nivel de protección las cabinas de seguridad han de estar en un habitáculo (laboratorio) que no dé directamente a los pasillos sino a un cuartito antelaboratorio en el que se pueda colgar la bata o efectuar premanipulaciones o manipulaciones que no deban realizarse en la cabina. Las mamparas deben ser rígidas y seguras, pero con áreas acristaladas para poder observar a las personas que manipulan y advertir la posible ocurrencia de accidentes o necesidad de ayuda (contención 3).

Las muestras clínicas convencionales se manipularán según el nivel de contención 2 que es el recomendado para trabajar con patógenos que se transmiten por vía oral, por contacto o por vía parenteral, como las salmonelas, *S. aureus* o los virus de las hepatitis B y C y HIV respectivamente.

Tabla 11.2

Normas estándar de seguridad biológica (Resumen)

1. No comer, fumar ni llevar ningún objeto a la boca en el laboratorio.
2. Utilizar siempre bata. Ponerse guantes si se manipula material clínico o microorganismos de los grupos de riesgo y siempre que existan pequeñas lesiones en las manos. Ponerse mascarilla y gafas si existe riesgo de aerosoles o salpicaduras. No salir del laboratorio con ninguno de estos elementos de protección.
3. No pipetear con la boca. Usar pipetas manuales o automáticas.
4. Desechar el material, en particular el punzante, en los recipientes adecuados.
5. Recoger y limpiar las superficies de trabajo al finalizar, desinfectándolas cuidadosamente con alcohol isopropílico al 70-80% o glutaraldehído al 1-2%.
6. Lavarse las manos después de cada procedimiento y al final de la tarea aunque se hayan utilizado guantes (frotar 20 segundos con jabón).

Para mayor detalle, consultar en el texto: Normas y procedimientos estándar.

Las muestras convencionales de origen respiratorio en manipularse en cabinas de seguridad biológica de nivel II, ya que pueden contener microorganismos de transmisión aérea.

En el nivel de contención 3 es recomendable que, antes del funcionamiento, exista desde el pasillo, pasando por el ante laboratorio, el laboratorio y la cabina hasta el exterior un gradiente de presiones negativas.

Algunas muestras clínicas en las que se sospecha la presencia de determinados microorganismos de riesgo 3 como *Bacillus anthracis*, *Brucella*, *Clostridium botulinum*, *Francisella tularensis* o *Yersinia pestis* deben manipularse bajo nivel 2, pero cuando hay posibilidad de formación de aerosoles o salpicaduras a partir de las muestras y cuando se manipulan cultivos (no las muestras clínicas) de esos microorganismos debe hacerse en laboratorios de nivel 3.

En los casos en que se sospecha un microorganismo de riesgo 4 o riesgo de bioterrorismo, debe trasladarse a un laboratorio especializado de referencia para nivel 4 (P4). Debe atenderse a las condiciones del transporte. En España, se puede conseguir del Centro Nacio-

nal de Microbiología la información necesaria sobre el transporte de muestras.

Estas normas se recogen en las tablas 11.3 y 11.4.

PROFILAXIS DE LOS ACCIDENTES

El personal del laboratorio debe estar correctamente vacunado de la hepatitis B. Debe recordarse periódicamente al personal las normas de la utilización de las duchas corporales y de los ojos, así como otras medidas generales.

Ante un accidente se han de tomar las medidas de protección y precauciones adecuadas, que debe coordinar el médico de empresa o el servicio de medicina preventiva, junto con el director del servicio y el responsable de seguridad del laboratorio.

Si se ha derramado algún material contaminado, después de ponerse la bata y los guantes adecuados y cualquier otra protección necesaria (mascarilla y en su caso botas de goma) se recogerá la mayor parte posible de ese material en contenedores adecuados para esterilizar y se depositarán sobre la zona de vertido toallas de papel impregnadas en lejía doméstica al 1/10 o solución de aldehídos al 0,5%, que también son útiles cuando está implicado *M. tuberculosis*³.

Tabla 11.3
Medidas de protección para los diferentes niveles de contención

Medidas de protección	Niveles de contención ¹		
	2	3	4
Prácticas estándar ²	Sí	Sí	Sí
Laboratorio específico e individualizado	No	Aconsejable	Sí
Laboratorio con equipos propios	No	Aconsejable	Sí
Acceso a la zona de trabajo sólo del personal autorizado	Aconsejable	Sí	Sí
Material infectado se manipulará en cabina de seguridad	Cuando proceda ³	Sí	Sí
Superficies impermeables al agua y de fácil limpieza	Sí	Sí	Sí
Superficie de trabajo resistente a ácidos, álcalis, disolventes y desinfectantes	Aconsejable	Sí	Sí
El lugar de trabajo deberá poder precintarse para ser desinfectado	No	Aconsejable	Sí
Procedimientos de desinfección específicos	Sí	Sí	Sí
Presión negativa en la zona de trabajo	No	Aconsejable	Sí
El material introducido y extraído de la zona de trabajo deberá estar protegido mediante filtro HEPA	No	Sí (salida)	Sí (entrada y salida)
Plan de actuación de seguridad para agentes etiológicos	Sí	Sí	Sí

¹ En principio estos niveles de contención se aplican para manipular microorganismos de su mismo grupo de riesgo (Tabla 11.1).

² Las medidas de protección se inician cumpliendo las prácticas estándar recogidas en el apartado «Normas y procedimientos estándar» de este capítulo y en la tabla 11.2. Con los microorganismos de riesgo 1 puede trabajarse en una poyata convencional siguiendo únicamente las normas estándar.

³ Cuando se sospeche la presencia de microorganismos de transmisión aérea en una muestra clínica y los cultivos de estos microorganismos.

⁴ Este es un producto, Chemisorb (Merck), que está disponible como polvo o granulado. Es muy absorbente y, aunque carece de propiedades desinfectantes, facilita la recogida de los líquidos derramados.

Tabla 11.4
Tabla resumen de niveles de contención según grupos de riesgo de los agentes biológicos

Nivel de bioseguridad	Tipo de microorganismos	Recomendaciones	Equipos de protección personal
BSG-1	No patógenos humanos (Nivel de riesgo 1)	Normas estándar	Bata (guantes ¹)
BSG-2 ²	Patógenos humanos (Nivel de riesgo 2)	Normas estándar Limitar acceso	Bata y guantes Protector ocular si hay riesgo de salpicaduras Cabina de bioseguridad tipo I o II si hay riesgo de aerosoles
BSG-3 ³	Patógenos humanos (Nivel de riesgo 3)	Normas estándar Control de acceso Descontaminar residuos Personal entrenado específicamente	Bata, guantes y mascarilla Protector ocular si hay riesgo de salpicaduras Cabina de bioseguridad tipo II
BSG-4	Patógenos humanos (Nivel de riesgo 4)	Específicas	Específicos <i>Nota: No se detalla el diseño físico ni la normativa de trabajo en un laboratorio BSG-4 ya que por su complejidad son responsabilidad de especialistas altamente cualificados</i>

Para los niveles de riesgo de los microorganismos, consúltese la tabla 11.1. Para Normas estándar ver Tabla 11.2 y en el texto Normas y procedimientos estándar.

¹ Si hay escoriaciones en las manos.

² Cuando en el nivel de contención 2 se trabaje con material que puede producir aerosoles o salpicaduras, particularmente conteniendo microorganismos de transmisión aérea, deben extremarse las precauciones de protección personal o trabajar en el contexto de BSG-3.

³ El nivel de contención 3 requiere que la cabina de seguridad biológica de clase II A o preferentemente II B esté en una habitación con presión negativa con un ante-cubículo para dejar la bata y otros elementos de protección. El acceso debe estar estrictamente limitado a las personas imprescindibles. Deben estar estandarizadas (Libro de seguridad) y ser conocidas las medidas adecuadas a este nivel.

Los accidentes por inhalación requieren medidas de profilaxis diversas, según el posible agente etiológico.

En los accidentes por pinchazos existe riesgo de infección por el virus de la hepatitis B y C y del virus de la inmunodeficiencia humana. En este caso es muy importante conocer si la «fuente» de la infección es una persona seropositiva para esos virus, por lo que hay que intentar obtener una muestra de suero para efectuar la determinación de anticuerpos antihepatitis C, antígeno de superficie y anticore de la hepatitis B, anticuerpos antiHIV y en su caso antígeno p24 y detección del DNA proviral del HIV. En caso de positividad, la determinación del antígeno e y la cuantificación del RNA del virus de la hepatitis C y del HIV aporta una información adicional sobre el riesgo. También es importante conocer el estado inmune del accidentado frente a esos virus. Al mismo tiempo hay que comunicarlo a los servicios clínicos y preventivos correspondientes para iniciar la profilaxis de esas infecciones.

Los servicios de higiene y seguridad en el trabajo y el médico de empresa implementan protocolos de profilaxis para estos accidentes, que no se recogen en este texto por estar sometidos a frecuentes revisiones.

GESTIÓN Y TRATAMIENTO DE LOS RESIDUOS

La gestión de los residuos ha de ser considerada una parte muy importante de la seguridad en los laboratorios de microbiología.

A diferencia de lo que sucede con los residuos químicos y radiactivos, los riesgos asociados a los residuos infecciosos no pueden identificarse de forma objetiva.

La posibilidad de contraer infecciones en el laboratorio al manipular una muestra clínica o un cultivo es un hecho bien conocido. Es mucho más difícil evaluar el riesgo que las actividades del laboratorio pueden tener sobre la salud de la comunidad. En cualquier caso, parece razonable hacer un tratamiento particularizado de los residuos infecciosos antes de eliminarlos como residuos urbanos.

Los objetos punzantes y cortantes, como agujas, pipetas Pasteur de vidrio y otros, constituyen un claro riesgo de inoculación accidental de microorganismos; se depositan en recipientes específicos resistentes a la punción y con cierre hermético. Es muy importante cerrar correctamente estos recipientes, que deben ser autoclavados o incinerados antes de desecharlos.

Los líquidos infecciosos deben recogerse en recipientes herméticos conteniendo una solución de hipoclorito sódico al 5% preparada de forma reciente. Después, pueden ser eliminados por el desagüe. Algunos laboratorios someten los residuos líquidos, sangre incluida, a un tratamiento en autoclave.

Esta práctica es obligada cuando se trata de residuos procedentes de las áreas de micobacterias y virología.

Los residuos sólidos (muestras clínicas, medios de cultivo sembrados, etc.) deben ser incinerados o esterilizados por autoclave antes de ser desechados.

PARTE

III

**DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO
DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

INTRODUCCIÓN

En esta tercera parte del manual se revisan los principales síndromes de la patología infecciosa, haciendo énfasis en los agentes causales y en la toma de las muestras y su procesamiento.

Con respecto a la etiología, hay que destacar que los microorganismos causantes de un proceso infeccioso como neumonía, meningitis, enteritis y otros pueden variar según la edad del paciente, la época del año, la profesión, el área geográfica y en las infecciones oportunistas dependiendo de los factores predisponentes; por todo ello es muy difícil establecer una lista de agentes causales de un síndrome que posea valor universal.

El criterio clínico y epidemiológico permitirá establecer en cada caso los agentes que con mayor probabilidad están causando la infección. En la toma de muestras, el tipo de material clínico a recoger, la cantidad, así como el método de transporte dependen de los estudios a realizar que, a su vez, dependerán de la sospecha etiológica.

SOLICITUD DE ANÁLISIS

En todo proceso analítico, la fase previa tiene una importancia capital para la calidad final de los resultados. Entre los factores cruciales de esta etapa, hay que señalar la obtención de la muestra en las condiciones apropiadas según las especificaciones del laboratorio, su correcta rotulación para evitar errores de identificación, el transporte y la conservación adecuada del material recogido.

Para la toma de muestras se seguirán los siguientes principios: que la muestra sea representativa del tejido infectado, preferiblemente del margen activo de la lesión, que la cantidad sea suficiente, que la contaminación por flora comensal se reduzca al mínimo, que haya sido recogida por punción siempre que sea posible (y no por escobillonado) y que el transporte al laboratorio sea rápido.

Es imprescindible que las muestras para análisis lleguen al laboratorio con un papel de petición perfectamente cumplimentado con los datos de filiación y clínicos del paciente, señalando las características del proceso patológico que está en estudio, indicando las enfermedades de base, los factores predisponentes de infección, si existen, y los datos epidemiológicos de interés como la profesión, los hábitos que comportan riesgo de infección, los viajes y otros. Asimismo, es muy importante conocer la medicación prescrita al paciente, en particular antibióticos, citostáticos y medicamentos de acción directa sobre la respuesta inmunitaria (corticoides e inmunosupresores)¹.

La información clínica sobre el paciente es fundamental para el diagnóstico; en la tabla 12.1 se indican algunos ejemplos de su importancia.

Como es responsabilidad del microbiólogo conducir el algoritmo diagnóstico, es importante que el clínico establezca y refleje en el papel de solicitud su opinión respecto al orden de prioridad del agente o agentes que se sospecha que pueden estar causando la infección. Piénsese, además que cuando no existe suficiente volumen de material para realizar todos los estudios requeridos o cuando son muy laboriosos o caros, se debe tomar una decisión sobre las pruebas que hay que priorizar.

En la solicitud debe figurar claramente el nombre del médico que la ha efectuado y su teléfono para poder consultarle o informarle personalmente cuando sea necesario.

Hace algunos años se recomendaba identificar las muestras de pacientes con sida, hepatitis y otros procesos patológicos con riesgo de contagio para el personal del laboratorio. Por ello, en algunos centros, los recipientes con las muestras de esos pacientes se señalaban con etiquetas de un color convenido. En la actualidad no se utiliza esta estrategia y todo el material clínico y las muestras biológicas que se manipulan en un laboratorio de microbiología se consideran potencialmente contaminadas y se deben manipular bajo las normas de las «precauciones universales» (véase el capítulo 11).

¹ En la tabla 21.1, se señalan los factores predisponentes de infección más frecuentes.

Tabla 12.1
Información sobre el paciente

Patología	Información relevante	Actitud consecuente con la información
Infección urinaria	El paciente está sondado	La infección urinaria suele ser monomicrobiana, pero en el paciente sondado frecuentemente es polimicrobiana (no desechar la orina como contaminada, sino estudiarla)
Granuloma subcutáneo	El paciente tiene en casa una pecera	Pensar en <i>Mycobacterium marinum</i> (realizar Ziehl Neelsen y cultivo a T ⁿ adecuada)
Neumonía cavitada	El paciente tiene una artritis reumatoide y toma dosis altas de corticoides desde hace un año	Pensar en <i>Nocardia</i> (sembrar la muestra respiratoria en el medio de BCYE. Prolongar la incubación)
Infiltrado pulmonar con sospecha de tuberculosis	El paciente ha vivido en el valle del Mississippi durante 6 meses	Pensar en <i>Histoplasma capsulatum</i> (utilizar las técnicas y las precauciones adecuadas para el aislamiento de hongos dimórficos)
Diarrea	Paciente anciano postoperado que desde hace 15 días toma antibióticos y omeprazol	Pensar en <i>Clostridium difficile</i> (utilizar las técnicas específicas para detectar este patógeno y/o su toxina)
Exudado absceso	Abierto al exterior o cerrado	La información es relevante para evaluar el significado de los microorganismos aislados como contaminantes o patógenos
Síndrome febril	Viaje a África subsahariana	Pensar en el paludismo (realizar extensión y gota gruesa)

La información sobre el paciente es clave para un estudio correcto de las muestras. En esta tabla se ponen tan sólo algunos ejemplos de la importancia de la información clínica y epidemiológica.

TOMA DE MUESTRAS

Excepto para estudios convencionales, es muy adecuado que el clínico contacte personalmente con el microbiólogo para informarse y acordar el método de recogida de las muestras. Es fundamental que la persona que efectúa la toma de la muestra conozca el método de recogida, el volumen recomendable y la necesidad o no de introducir el material obtenido en un medio de transporte.

Material para la recogida de muestras

Los frascos y tubos para recoger material fluido (vg: orina, heces, exudado pleural, líquido ascítico) deben ser estériles y de cierre hermético.

Los escobillones de dacrón, rayón o de alginato cálcico son los más adecuados²; estos últimos son los más recomendables para el cultivo de *Bordetella pertussis* y clamidias pero no son adecuados para muestras con gonococo, ureaplasma y virus, para los que deben utilizarse los de dacrón o rayón, que también son útiles para muestras que se han de someter a técnicas de amplificación genética. El mango no ha de ser de madera, sino de plástico o metálico. Para efectuar tomas de muestras de la nasofaringe, uretra o el cuello uterino se

utilizan escobillones con un mango metálico fino y flexible. Los escobillones incorporan en la funda medios de transporte adecuados para bacterias, como el medio de Stuart o Amies. El medio de transporte de Stuart está formado por una solución de fosfato de glicerol, que mantiene la humedad de la muestra y actúa como tampón; también incorpora tioglicolato sódico para obtener una atmósfera reductora, azul de metileno como indicador de oxido-reducción y una pequeña cantidad de agar para darle una consistencia semisólida.

El medio de Amies es semejante al de Stuart, pero utiliza un tampón fosfato y otras sales en lugar del fosfato de glicerol, ya que éste es utilizado como nutriente por algunas bacterias. En algunas fórmulas se añade polvo de carbón, que neutraliza sustancias que pueden ser tóxicas para algunas bacterias (neisserias, bordetela, etcétera). El medio de Cary-Blair se utiliza para el transporte de heces y tiene una formulación semejante a los anteriores, pero con pH elevado (7,4-8,4).

El medio de Hanks es una solución salina tamponada que contiene glucosa, a la que se añaden antibióticos (vancomicina, colistina y anfotericina B o penicilina, gentamicina y anfotericina B) y constituye un buen medio de transporte para muestras que contengan virus.

² Los escobillones de algodón inhiben las clamidias. El mango de madera puede interferir en la viabilidad de algunos virus.

Es recomendable que los tubos para serología incorporen silicato u otro material que facilite la coagulación y un gel inerte que acelere la retracción del coágulo, como el Vacutainer SST II.

Recogida de las muestras

Los escobillones con medio de transporte son útiles para recoger muestras de exudado o pus de algunas infecciones en las que habitualmente no participan bacterias anaerobias, como el exudado faríngeo, el pus ótico, el pus de una herida, de una piodermitis y otros.

En lesiones vesiculosas es preferible recoger líquido con una jeringa fina tipo insulina, pero si están abiertas es mejor tomar con escobillón una muestra frotando enérgicamente la base de la lesión.

Las muestras de las supuraciones y exudados que pueden contener bacterias anaerobias (muestras relacionadas con la orofaringe, el tubo digestivo y ginecológicas) deben recogerse mediante una jeringa e inocularse en un vial específico con atmósfera anaerobia, apto para la mayoría de las muestras y estudios; estos recipientes se encuentran comercializados³. Si no se dispone de este recipiente puede remitirse la jeringa tapada con su capuchón, pero sin la aguja, para evitar accidentes⁴. Si el material no se puede tomar con jeringa, se ha de utilizar un escobillón, aunque éstos recogen poco volumen de muestra y además no son adecuados para el transporte de bacterias anaerobias; sin embargo algunas compañías ofrecen escobillones con medios de transporte adaptados para anaerobios⁵.

Los exudados de origen cervical y vaginal (tricomonas, gonococo y otras) es mejor observarlos con el microscopio y sembrarlos a la cabecera del paciente; en caso alternativo deben tomarse con un escobillón con medio de transporte bacteriológico y procesarse urgentemente. La siembra inmediata, junto al paciente, del exudado en un tubo con medio de cultivo para tricomonas, de los que existen varios comercializados, es sencilla y permite recuperar este protozoo y las candidas con gran eficacia. Si simultáneamente se practica una extensión en un portaobjetos, convenientemente teñida en el laboratorio, permitirá efectuar el diagnóstico de vaginosis.

El diagnóstico de infección por *Chlamidia trachomatis* y gonococo en la mujer y el hombre mediante detección de antígeno o amplificación genética puede hacerse en muestras de orina, en particular para esta última técnica debe recogerse 10-20 ml de orina después de dos horas de no haber orinado y ponerla de inmediato en la nevera.

El material fluido (vg: orina, heces, exudado pleural, líquido ascítico) se recogerá en los tubos o frascos adecuados, estériles y de cierre hermético. Para el estudio bacteriológico y micológico convencional de algunos productos fluidos que pueden obtenerse en cantidad abundante, como el líquido pleural o ascítico, se recomienda, además de tomar la muestra habitual para el examen microscópico y el cultivo convencional, sembrar directamente a la cabecera del enfermo, con las máximas precauciones de asepsia, un volumen importante del líquido (5-10 ml) en frascos de hemocultivo.

Las muestras fluidas como líquido cefalorraquídeo, pericárdico y otros, para estudio de virus se tomarán y transportarán en tubos estériles con tapón de rosca.

Las heces pueden recogerse en un frasco convencional o mejor en uno provisto de una cucharilla que facilita su toma. Para la detección de antígeno y amplificación genética pueden conservarse en la nevera. Si el estudio bacteriológico no puede procesarse en menos de dos horas han de recogerse en un frasco adecuado con el medio de transporte de Cary-Blair. Las muestras fecales para estudio parasitológico se han de introducir en un fijador como el MIF o el formol preparado por el laboratorio o adquirido en el comercio.

Para la investigación de virus en lesiones cutáneas o mucocutáneas, pueden utilizarse escobillones con la torunda de rayón o dacrón y bastón metálico o de plástico. Algunas compañías comercializan escobillones con medios de transporte para virus, generalmente Hanks; sin embargo también puede recogerse la muestra con un escobillón de las características señaladas e introducirlo en un tubo con 1 ml de medio de Hanks facilitado por el laboratorio. También existen escobillones y tubos con este medio comercializados⁶.

Las infecciones corneales (queratitis) son de pronóstico grave y pueden estar causadas por virus, bacterias, hongos y protozoos. Para su estudio debe obtenerse una muestra de raspado corneal por una persona experta. El oftalmólogo basándose en las características de las lesiones suele establecer una sospecha etiológica bastante precisa y la muestra debe sembrarse de inmediato en los medios adecuados junto al enfermo, previo contacto con el laboratorio para la provisión de dichos medios.

Las muestras de sangre para hemocultivos convencionales y para micobacterias se siembran a la cabecera del enfermo en los frascos adecuados, según el protocolo de extracción aséptica detallado en el capítulo 19. Exis-

³ Vacutainer Anaerobic collector (BBL); Port-A-Cul Tube™ Anaerobic transport systems (BD); Anaerobic transport system. (Starplex Sc. Inc.).

⁴ Una vez obtenida la muestra con la jeringa, quitar la aguja con extremo cuidado e introducirla en un recipiente de seguridad adecuado para desechar este tipo de material. Entonces puede ponerse el capuchón de plástico a la jeringa. Intentar poner el capuchón con la aguja puesta está absolutamente prohibido ya que comporta un gran riesgo de pinchazo.

⁵ Anaerobic Culturette, (BBL); Starswabs II (Starplex Sc. Inc.).

⁶ BD Diagnostics; Remel; Hardy Diagnostics Starplex Sc. Inc., entre otras, comercializan escobillones y tubos con medio de transporte para virus.

ten frascos específicos para pediatría. Las muestras de sangre obtenidas por venopunción y a través del catéter para realizar hemocultivos cuantitativos han de introducirse en tubos estériles con EDTA. Las puntas de catéteres cortadas en condiciones de asepsia han de introducirse en un tubo estéril.

Existen equipos de extracción alternativos a la jeringa, como el BD Safety-Lok® que incrementa el grado de seguridad al reducir el riesgo de pinchazos durante la extracción (Fig. 19.4).

Para realizar estudios virológicos y parasitológicos de muestras de sangre o de médula ósea es recomendable contactar previamente con el laboratorio para acordar el procedimiento de recogida (tubos convencionales, tubos con EDTA, tubos con heparina de litio, extensiones, gota gruesa).

Debe tenerse muy presente que el material obtenido por biopsia que se remite al laboratorio de microbiología no se ha de introducir en un recipiente con fijador (formol u otro, como se requiere para los estudios de anatomía patológica), sino en un recipiente estéril y de cierre hermético, con unas gotas de suero fisiológico estéril, para evitar la desecación del material⁷.

Es muy importante conocer la temperatura de conservación de las muestras (ambiente o nevera) y el tiempo que pueden mantenerse en esas condiciones hasta su procesamiento (Tabla 12.2).

El control de la contaminación de las superficies de las poyatas, superficie de quirófanos, salas de aislamiento, suelos o paredes se efectúa mediante placas con medios de cultivo que sobresalen ligeramente (placas Rodac, con superficie convexa)⁸ que se hacen contactar con la superficie a estudiar. La determinación de la carga microbiana del aire de una habitación o recinto se efectúa mediante unos aspiradores en cuyo interior se puede insertar una placa con un medio de cultivo adecuado a la investigación a realizar, sobre el que se dirige el chorro de aire, pudiéndose conocer el volumen muestreado y por tanto la cantidad de microorganismos por volumen de aire. En ambos casos, estudio de superficies y aire, las placas se llevan directamente a la estufa a incubar.

Las muestras de agua u otros fluidos se estudian después de concentrar los microorganismos por filtración de un volumen conocido.

Para los estudios serológicos, se obtendrá con técnica aséptica una muestra de sangre venosa, cuya cantidad que dependerá de la edad del paciente y del número

de pruebas a realizar (5-10 ml en adultos), se introducirá en un tubo específico para este propósito. El suero, después de separado, puede mantenerse durante una semana en la nevera; para períodos más largos debe congelarse a -20°C o indefinidamente entre -70 y -80°C . Es imprescindible alicuotar las muestras para no tener que descongelarlas y congelarlas cada vez que se requiere una muestra de un suero.

En los últimos tiempos ha adquirido una notable importancia la recogida de muestras muy diversas para estudios convencionales así como para la detección de antígeno y pruebas de amplificación genética (PCR y otras).

Para la conservación de las muestras antes de su procesamiento hay que seguir siempre la normativa establecida por el fabricante. A título de orientación se presentan unas recomendaciones generales.

En relación con la toma de muestra para detección de antígeno, una norma adecuada sería trasladar las muestras al laboratorio en menos de 2-4 horas de su extracción y mantenerlas en la nevera ($2-8^{\circ}\text{C}$) hasta su procesamiento. Si éste se retrasa más de tres días, congelar las muestras preferentemente a -70° , y si no es posible, a -20°C . Cuando la muestra es sangre completa (tubo con EDTA o tubo con heparina de litio) para estudios de antigenemia por técnicas de inmunofluorescencia (IFI), deberá procesarse lo más rápidamente posible, pero puede mantenerse en la nevera hasta 24 horas sin excesiva pérdida de sensibilidad.

Las diferentes muestras para estudios de PCR han de ser trasladadas rápidamente al laboratorio en un tubo estéril y, a poder ser, refrigeradas. Si no se pueden procesar de inmediato se han de conservar en nevera no más de 48 horas; para períodos más largos, las muestras han de congelarse preferentemente a -70°C . Sin embargo, cuando no se pueden procesar en el mismo día, lo más recomendable es practicar con rapidez la extracción de los ácidos nucleicos y mantenerlos congelados a -70°C .

En caso de tratarse de muestras de sangre, el suero o plasma ha de separarse antes de 4 horas, pudiéndose mantener en la nevera hasta tres días, congelándolo a -70°C para períodos más prolongados y alternativamente a -20°C . En este caso también es extraordinariamente importante realizar la extracción de los ácidos nucleicos cuanto antes.

En la tabla 12.2 se indican las normas para la recogida de las muestras clínicas más comunes⁹. Ante cual-

⁷ Ante la sospecha de una infección fúngica debe enviarse muestra al laboratorio de microbiología. Es frecuente pensar que para el diagnóstico etiológico de una micosis bastan los estudios histológicos, sin embargo el estudio histológico en la mayoría de los casos no permite identificar el hongo y por tanto efectuar una orientación terapéutica.

⁸ Reactivos para Diagnóstico SL.

⁹ Existen varias compañías que comercializan tubos, escobillones y frascos con y sin medio de transporte para la toma de muestras, entre ellas BD Diagnostic; Starplex Scientific; VWR Scientific Inc. Products; Terumo Medical Co., entre otras. En España en la Guía Puntex puede encontrarse información al respecto.

Tabla 12.2
Recogida, transporte y mantenimiento de las muestras

Muestra clínica ¹	Volumen, recipiente ² (conservación) ³
Orina	
Urinocultivo convencional	10-20 ml de orina ⁴ . Frasco sin MT (nevera. Máx 24 h)
Micobacterias	Orina ⁵ . Frasco sin MT (nevera. Máx 24 h)
Virus	5 ml. Frasco sin MT (nevera. Máx 24 h)
Sonda permanente	5-20 ml de orina tomados con jeringa de la sonda. Frasco sin MT (nevera. Máx 24 h)
Bolsa colectora (niños)	Poner la orina emitida en un tubo o frasco sin MT (nevera. Máx 24 h)
Clamidia y gonococo ⁶	5 ml de orina en frasco sin MT (nevera. Máx 24 h)
Parásitos. Esquistosoma	Orina de 24 horas. Frasco sin MT. Orina de 24 horas (nevera desde el inicio de la recogida. (Máx. 24 h)
Heces	
Recogida universal	5-15 ml. Frasco sin MT. (T ^a ambiente, hasta 2 h)
Bacterias	2-5 ml. Frasco con MT ^{CB} (T ^a ambiente. Máx 24 h)
Parásitos	2-5 ml. Frasco con fijador (MIF, Formol). T ^a ambiente. Tiempo indefinido
Virus	2-5 ml. Frasco sin MT (nevera. Máx 24 h. después congelar a -70° C)
Espuito	
Para cualquier estudio	Espuito ⁷ . Frasco sin MT (nevera. Máx 24 h)
Lavado broncoalveolar	
Para cualquier estudio	Mínimo: 5 ml. Frasco sin MT (nevera. Máx 24 h)
Cepillado protegido	
Bacterias	Poner el cepillo en un tubo con 1 ml de suero fisiológico estéril (nevera. Máx: 24 h)
Exudado ótico	
Bacterias	Escobillón con MT ^S (T ^a ambiente Máx 24 h). Aspirado de timpanocentesis en un tubo sin MT (T ^a ambiente. Máx 2 h)
Exudado faríngeo	
Bacterias	Escobillón con MT ^S (T ^a ambiente. Máx 24 h)
<i>S. pyogenes</i> y otras	Escobillón de alginato de calcio con MT ^S (nevera. Máx 24 h)
<i>B. pertussis</i>	Escobillón con MT ^V (nevera. Máx 24 h)
Virus	Escobillón con MT ^V (nevera. Máx 24 h)
Aspirado nasofaríngeo	
Virus	La muestra se obtiene aspirando a través de una cánula unida a una jeringa o mediante un dispositivo comercializado para aspiración automática. En ambos casos el moco se recoge en suero fisiológico estéril que se conserva en nevera. Máx 24 h. Ver detalle de la obtención en el capítulo 17
Escamas cutáneas, cabellos, uñas	
Hongos	Material de raspado o cortado. Placa de Petri o frasco (T ^a ambiente. Varios días) Las lesiones cutáneas secas pueden tomarse frotando con una moqueta (5 x 5 cm) previamente esterilizada. Ponerla en una placa de Petri y trasladarla al laboratorio
Pus cutáneo o subcutáneo	
Bacterias	Escobillón con MT ^S (nevera. Máx: 24 h)
Granuloma cutáneo o subcutáneo	
Bacterias, micobacterias, hongos, parásitos	Punch (biopsia) cutáneo. Frasco de cierre hermético con una pequeña cantidad de SF estéril para mantener la humedad (nevera. Máx 24 h). Sin formol u otros fijadores
Líquido cefalorraquídeo	
Bacterias, hongos y BK	1-3 ml. Frasco sin MT (T ^a ambiente. Máx 24 h)
Virus	1 ml. Frasco sin MT (nevera. Máx: 72 h)
Líquido pleural/pericárdico	
Bacterias, BK	5-15 ml. Frasco sin MT (nevera. Máx 24 h)
Virus	1 ml. Frasco sin MT (nevera. Máx 72 h)

(continúa, pag. 236)

Tabla 12.2 (continuación)
Recogida, transporte y mantenimiento de las muestras

Muestra clínica ¹	Volumen, recipiente ² (conservación) ³
Líquido ascítico Bacterias y BK	5-15 ml. Frasco sin MT ⁸ (nevera. Máx 24 h)
Líquido articular Bacterias	1 ml. Tubo sin MT (T ^a ambiente. Máx 24 h)
Pus exudado vaginal/endocervical Bacterias, hongos y parásitos	Examinar y sembrar junto al paciente si es posible. Alternativamente: escobillón con MT ⁸ . (T ^a ambiente. Máx 24 h, no adecuado para la investigación de tricomonas; sembrar inmediatamente en medio para este protozoo) (véase texto)
Papilomavirus (hibridación)	Toma de muestra con cepillo y MT ^v (existen kits comercializados. Digene Corp.)
Exudado uretral Bacterias, hongos y parásitos	Toma del exudado con asa o escobillón fino para examinar y sembrar junto al paciente, si es posible. Alternativamente: escobillón con MT ⁸ (sembrar inmediatamente)
Úlceras genitales (Herpes)	Escobillón con MT ^v . Frotar enérgicamente la base de la lesión (nevera. Máx 24 h) (véase texto)
Exudado conjuntival Bacterias Virus	Escobillón con MT ⁸ (T ^a ambiente. Máx 24 h) Escobillón con MT ^v (nevera. Máx 24 h)
Exudado abdominal, peritoneal, bilis	Frasco con MT para anaerobios. 5 ml (T ^a ambiente. Máx: 24 h)
Absceso abdominal, hepático, pancreático	5-15 ml. Frasco con MT para anaerobios. (T ^a ambiente Máx 24 h)
Sangre Hemocultivo (bacterias y hongos) Extensiones parasitológicas Cultivo de virus Virus. Antigenemia (IFI) Amplificación (carga vírica)	Ver capítulo 19 y tabla 19.2 Practicar extensión y gota gruesa a la cabecera del enfermo o, alternativamente, tomar 1-5 ml de sangre con EDTA y practicar extensiones antes de una hora 1-5 ml. Tubo con heparina de litio. Procesar lo más rápidamente posible (nevera. Máx 24 h) 1-5 ml. Tubo con EDTA o con heparina de litio (nevera. Máx 24 h) 1-5 ml. Tubo con EDTA. Separar el plasma antes de 4 horas. Mantener en la nevera hasta tres días o a -70° C para períodos más prolongados
Serología	5-10 ml. Tubo tipo «Vacutainer SST II» específico para serología Dejar coagular. Separar el suero. Alicuotar (nevera. Máx cinco días. Congelar a -70° C para mantener indefinidamente)

Las normas de recogida y transporte de las muestras que se procesan mediante sistemas comercializados suelen venir detalladas en los prospectos de los fabricantes. En particular, las muestras para detección de antígeno y amplificación genética se tomarán, transportarán y conservarán según las recomendaciones incluidas en los kits que van a utilizarse. En el texto se indican unas normas generales que pretenden tener únicamente valor orientativo.

Los medios de transporte para virus no inhiben las reacciones de amplificación ni la detección de antígenos. Los de transporte para bacterias y los fijadores para parásitos tienen diferentes comportamientos. Por ello, las muestras para esos estudios es mejor recogerlas sin medio de transporte y procesarlas inmediatamente.

¹ Todas las muestras se considerarán potencialmente contaminadas por microorganismos patógenos y se manipularán con las precauciones universales y según normas específicas (véase el capítulo 11).

² Todos los recipientes para la recogida de las muestras (frascos y tubos) estarán estériles y provistos de un tapón de rosca que cierre herméticamente. Para la recogida de las heces puede utilizarse recipientes escrupulosamente limpios aunque no estén estériles. El material que llega en frascos o tubos rotos o mal cerrados constituye un riesgo. Dependerá del responsable de seguridad del laboratorio la actitud a adoptar en este caso (guardar, esterilizar, etcétera).

³ La temperatura de la nevera debe situarse entre 4 y 8° C; la del congelador a -20° C, excepto para conservación indefinida, que es preferible a -70° C (-60 a -80° C).

⁴ Lavar previamente los genitales externos y recoger 10-20 ml de la orina de la mitad de la micción (véase en capítulo 13: Toma de muestras).

⁵ Recoger toda la orina emitida en la primera micción de la mañana.

⁶ En las infecciones genitales, la orina también es una muestra aceptable para la detección de antígeno y la amplificación genética.

⁷ Debe asegurarse que el esputo es mucoso o purulento y que no está contaminado con saliva.

⁸ Para el estudio bacteriológico convencional se recomienda, además, sembrar entre 5-15 ml de líquido ascítico directamente en un frasco de hemocultivo.

Ag: antígeno, BK: micobacterias, Máx: tiempo máximo de conservación. MIF: medio de fijación con mertiolato, yodo, formol. MT: medio de transporte. MT⁸: medio de transporte de Cary-Blair. MT⁸: medio de transporte tipo Stuart (Stuart o Amies; véase texto). MT^v medio de transporte para virus (Hanks o similar).

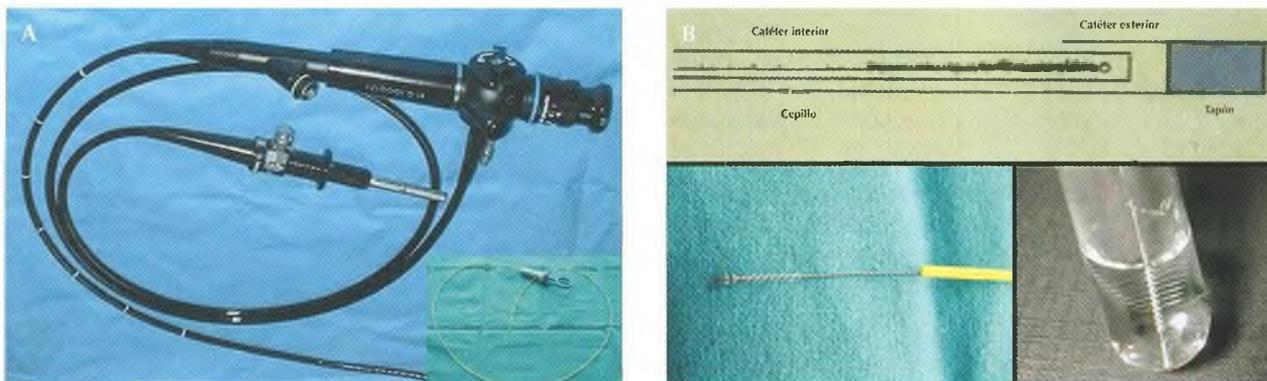


Figura 12.4. Cepillo protegido.

Las muestras pulmonares se toman mediante un cepillo protegido para evitar contaminaciones de las vías respiratorias altas. Se introduce el fibroscopio (A), a través de la vía respiratoria hasta el lugar próximo a la zona afectada. En uno de los conductos del fibroscopio se ha situado un catéter cerrado en su extremo con un tapón de una sustancia reabsorbible (catéter externo). En su interior se ha colocado otro catéter (catéter interno) con un largo filamento en cuyo extremo hay un pequeño cepillo (B). Al llegar a la zona afectada se hace salir el catéter interno y luego el cepillo para tomar la muestra. Después se reintroduce en el catéter, procediendo a extraer el fibroscopio del paciente. El cepillo se corta y se introduce en un tubo con 1 ml de suero fisiológico estéril, llevándose al laboratorio para su procesamiento.

Cortesía del doctor X. de Gracia. Servicio de Neumología. Hospital Vall d'Hebron.

de diagnóstico no siempre pueden poner sistemáticamente en marcha aquellos procedimientos cuya eficacia sólo se ha objetivado en estudios de investigación complejos y de carácter excepcional.

EVALUACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

A la llegada de una muestra clínica al laboratorio, es importante su observación macroscópica. Se debe anotar en la libreta de trabajo aquellas características que puedan ser útiles para orientar o interpretar el análisis microbiológico. Así, las heces pueden describirse como líquidas, pastosas o formes y observar si contienen sangre o moco; el líquido cefalorraquídeo o la orina pueden ser claros o turbios; un esputo puede ser hemoptoico o estar muy contaminado por saliva o la muestra de un escobillón sin medio de transporte estar completamente seca.

Además, en el caso de la orina y del esputo, es absolutamente imprescindible realizar una observación microscópica, para evaluar el grado de contaminación que han sufrido durante su recogida por la flora comensal del tracto genitourinario o de la orofaringe, respectivamente.

En el caso de que la muestra no sea aceptable para su procesamiento, como sucede con los escobillones secos, las orinas o los esputos contaminados, las heces formes para diagnóstico de enteritis, las muestras para cultivo de anaerobios mal transportados o las biopsias fijadas (formol), etc., deberá comunicarse personalmente al médico responsable del paciente y solicitar que recoja una nueva muestra; pero la muestra antigua se conservará siempre hasta que llegue la nueva.

En referencia al procesamiento de las muestras, cabe destacar que cada laboratorio tiene sus preferencias entre los diferentes procedimientos estandarizados; tanto respecto a las técnicas de examen microscópico, como la selección de los diversos medios de cultivo a utilizar, de los sistemas de identificación y de los métodos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En los últimos años, en los laboratorios de microbiología se han introducido numerosos sistemas automatizados para la identificación de las bacterias, para realizar antibiogramas, para la detección de antígenos, para las pruebas serológicas y también se han introducido y generalizado técnicas de biología molecular para diagnóstico y epidemiología, con un elevado nivel de automatización.

Los kits comerciales para la detección de antígeno o las técnicas de amplificación, en general, aportan el medio de transporte o hacen recomendaciones específicas relativas al método de recogida y transporte de las muestras. Estas recomendaciones con frecuencia varían según el fabricante.

El sentido común y la experiencia de los microbiólogos clínicos son los factores que ayudan a seleccionar entre las técnicas tradicionales y las modernas, aquellas que resultan más adecuadas y con mejor relación coste-beneficio en función de los objetivos y los condicionantes de cada laboratorio.

De cualquier manera, es imprescindible someter los reactivos y los procedimientos a controles de calidad regulares. La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica ha abierto una página para intercambio de experiencias en relación con la calidad de los reactivos de microbiología (www.seimc.org).

CONCEPTO Y ETIOLOGÍA

Las infecciones del tracto urinario están causadas en su mayoría por bacterias de la flora intestinal que, ascendiendo por la uretra, alcanzan la vejiga urinaria y en algunos casos progresan afectando a los uréteres y los riñones.

Las infecciones de la vejiga urinaria, denominadas cistitis, dan lugar a un síndrome caracterizado por micción dolorosa y frecuente (disuria y polaquiuria) con sensación continua de necesidad de orinar (tenesmo) y escasa sintomatología general, ya que no suelen ocasionar fiebre o astenia intensa. Las infecciones que afectan a los uréteres y riñones (pielonefritis) se manifiestan por fiebre, dolor lumbar y afectación del estado general, asociadas a disuria, polaquiuria y tenesmo urinario cuando existe una cistitis concomitante.

En la orina, además de las bacterias (bacteriuria), como respuesta a la infección, hay leucocitos (piuria) por lo que su aspecto es generalmente turbio y con frecuencia maloliente. El estudio microscópico del sedimento del centrifugado de la orina permite constatar la infección urinaria al visualizar la bacteriuria y la piuria.

Las infecciones urinarias suelen darse con mayor frecuencia en las mujeres debido a la cortedad de la uretra que, además, desemboca en el introito vaginal que está colonizado por la flora intestinal. Estas infecciones, a menudo están relacionadas con el coito y también son más frecuentes durante el embarazo. En general son monomicrobianas, siendo *Escherichia coli* el microorganismo que las causa con mayor frecuencia, seguido por otras enterobacterias y enterococos. Aunque poco frecuente, es característica la infección por *Staphylococcus saprophyticus* en la mujer joven sexualmente activa.

En las personas con factores predisponentes de infección, como litiasis renal, hipertrofia de la próstata, cistocèle, vejiga neurógena, alteraciones congénitas de las vías urinarias, reflujo vesicoureteral y otros procesos, así como en los portadores de sonda permanente, las infecciones suelen ser a menudo polimicrobianas, y recidivan mientras persiste el factor predisponente. Además, como habitualmente estos pacientes han recibido antimicrobianos para el tratamiento de los episodios anteriores,

las infecciones recidivantes están causadas por microorganismos resistentes (Tabla 13.1).

En algunas personas, como niños, embarazadas, ancianos o sondados, puede observarse la presencia de bacteriuria sin piuria y sin síntomas clínicos de infección urinaria (aunque este último dato es difícil de recoger en los pacientes con sonda permanente). Estas bacteriurias asintomáticas pueden persistir largo tiempo para desaparecer o alternativamente dar lugar a una forma sintomática.

Los riñones pueden infectarse por vía hematógena, como sucede en la tuberculosis o en la bacteriemia estafilocócica; pero la patogenia, la clínica y la evolución de estas infecciones son diferentes de las que se producen por vía ascendente y por ello no se incluyen en el concepto convencional de infección urinaria.

TOMA DE MUESTRAS

En la mujer, para evitar al máximo la contaminación de la orina por la flora comensal de la vagina, debe efectuarse una limpieza cuidadosa de los genitales externos con un jabón neutro, aclarando bien con agua y sin utilizar antisépticos; limpieza que también se recomienda para el glande en el varón. El paciente debe iniciar la micción y, sin interrumpirla, recoger la orina de la mitad de la micción en un frasco estéril, lo que permite que la primera parte del chorro urinario elimine al máximo por mecanismo de arrastre la flora normal de la uretra distal.

Salvo que deba realizarse un sondaje por alguna razón, éste no constituye un método recomendable para la recogida de orina porque no siempre se evita la contaminación accidental de la muestra y además puede provocarse una infección que no existía. En los enfermos con sonda permanente la orina se toma con jeringa, pinchando la sonda en el fragmento de goma existente para este propósito (Fig. 13.1). No debe tomarse nunca la muestra de la orina acumulada en la bolsa. Tampoco deben cultivarse las puntas de las sondas después de su extracción, sino una muestra de orina tomada antes y según la técnica señalada.

Tabla 13.1
Algunos agentes causales de infección urinaria

	Sin factores predisponentes ¹	Con factores predisponentes ²
Frecuentes	<i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Otras enterobacterias y BGN-NF ⁵ Enterococo <i>Candida albicans</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
Poco frecuentes	Enterococo <i>Staphylococcus saprophyticus</i> ³ Adenovirus tipos 11 y 21 ⁴	<i>Corynebacterium urealyticum</i> ⁶

¹ Las infecciones urinarias en las personas sin factores predisponentes son generalmente monomicrobianas. Los agentes causales de infección son en su mayoría bacterias de la flora aerobia y anaerobia facultativa del tubo digestivo, siendo *E. coli* el más frecuente.

² Las infecciones urinarias en pacientes con factores predisponentes con frecuencia son polimicrobianas.

Entre los factores predisponentes de infección urinaria algunos son fisiológicos, como el coito y el embarazo; y otros patológicos, como la litiasis renal, la hipertrofia de próstata, el cistocele, el reflujo vesico-ureteral, la vejiga neurógena, las alteraciones congénitas de la vía y el sondaje permanente.

³ Causa infección en mujeres jóvenes.

⁴ Causan cistitis hemorrágica en niños.

⁵ Entre las enterobacterias: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Citrobacter* y entre los bacilos gramnegativos no fermentadores (BGN-NF): diversas especies de *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*. Cualquiera de las bacterias señaladas puede establecerse endémicamente en una sala, servicio u hospital durante períodos de tiempo variables, para ser suplantada después por otra; estas cepas con frecuencia son multirresistentes.

⁶ Puede producir cistitis incrustante.



Figura 13.1. Sonda permanente.

Las sondas permanentes poseen un dispositivo por donde puede tomarse la orina con una jeringa para estudio microbiológico. Quince minutos antes de la toma debe pinzarse la sonda, como se observa en la imagen, para que se acumule la orina en la zona de extracción. Jamás debe tomarse la muestra de la bolsa.

Cuando en los niños se utiliza una bolsa colectora, ha de lavarse con agua y jabón el área genital, dejando que se seque y adheriendo la bolsa. Debe vigilarse, para retirarla inmediatamente después de la emisión de la orina.

La toma de la muestra mediante punción suprapúbica ha de reservarse para los casos de pacientes no son-

dados, en particular los niños, en los que no puede recogerse orina por micción espontánea en condiciones adecuadas y el diagnóstico es trascendente.

Para el diagnóstico de una infección urinaria convencional es adecuado tomar de 10 a 20 ml de orina. Una vez recogida, debe llevarse rápidamente al laboratorio. Si la muestra no puede procesarse de inmediato, debe mantenerse en nevera (4-6° C) un máximo de 24 horas; jamás ha de conservarse a temperatura ambiente¹.

EXAMEN DIRECTO

El sedimento de 10 ml de la orina centrifugada (3.000 rpm/15 minutos) se examina en fresco, disponiendo una gota del mismo entre porta y cubre y observándola a 400 aumentos. Tras la eliminación del cubreobjetos, esta misma muestra convenientemente secada y fijada puede teñirse por el método de Gram para la observación detallada de las bacterias.

El examen microscópico posee gran valor en el estudio de las infecciones urinarias, ya que permite detectar la presencia de contaminación accidental, particularmente en la mujer, puesto que en este caso aparecen numerosas células de descamación del epitelio vaginal muy características (Fig.13.2). Por el contrario, la presencia de leucocitos y bacterias en una orina sin células vaginales es índice de infección urinaria (Fig. 13.3).

¹ Se ha propuesto la conservación de la orina a temperatura ambiente incorporando ácido bórico a la concentración final de 1,8% o una mezcla de polivinil pirrolidona y NaCl a las concentraciones finales de 1% y 9% respectivamente.

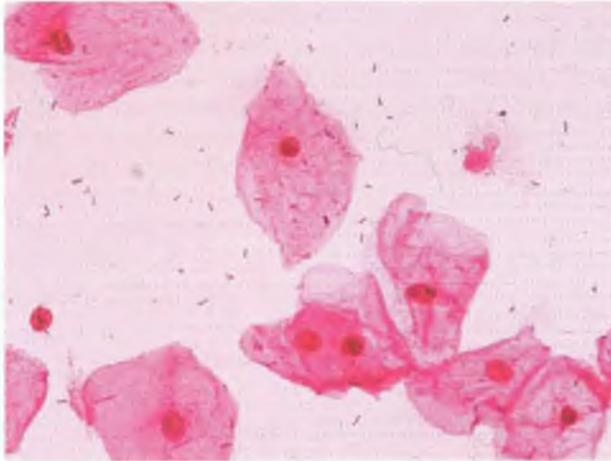


Figura 13.2. Orina contaminada.

Tinción de Gram del sedimento de una orina con contaminación vaginal. Puede observarse las células vaginales y la presencia de una flora variada. La muestra no es apta para estudio microbiológico.

La presencia de piuria sin bacteriuria se debe, generalmente, a la administración reciente de antibióticos que han eliminado las bacterias persistiendo aún los leucocitos², pero también puede deberse, entre otras causas, a una tuberculosis renal y ante esa sospecha debe teñirse el sedimento por el método de Ziehl Neelsen y efectuar los estudios pertinentes (véase más adelante). Cuando en la tinción de Gram del sedimento de una orina bien recogida se observa la presencia de abundante flora mixta aerobia y anaerobia, ha de pensarse en una fístula vesico-intestinal o vesico-genital (Fig. 13.4).

Alternativamente, se ha recomendado evaluar la tinción de Gram de la orina no centrifugada, observando a 1.000 aumentos, en inmersión; en estas condiciones una bacteria por campo se correspondería a un cultivo de ~ 10^5 ufc/ml de orina³.

La observación del sedimento de orina es un procedimiento sensible y específico para la detección de las infecciones urinarias, pero quizás es demasiado laborioso para ser utilizado sistemáticamente para el cribaje del gran número de orinas que han de ser estudiadas en algunos laboratorios, particularmente en medio ambulatorio. Por ello se han propuesto numerosas técnicas rápidas de cribado, como la detección en la orina de nitrataasa, catalasa, ATPasa y otras enzimas de origen bacteriano o esterasas de origen leucocitario que indican la presencia de bacterias y/o leucocitos, para diferenciar con rapidez las orinas infectadas de las no infectadas. Uno de los métodos consiste

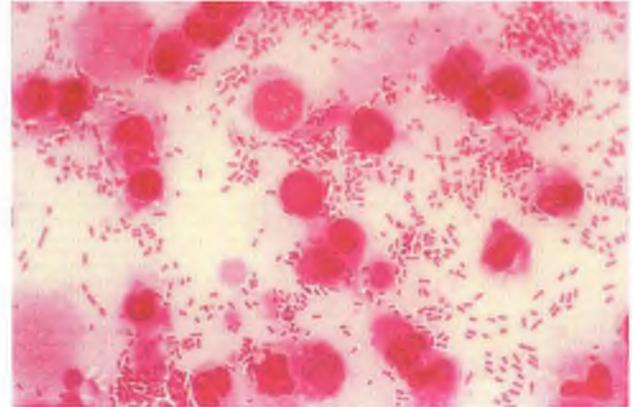


Figura 13.3. Infección urinaria.

Tinción de Gram del sedimento de la orina de una mujer con infección urinaria. La orina está bien recogida, por lo que no existen células vaginales. Se observan abundantes leucocitos y una flora monomicrobiana formada por bacilos gramnegativos.

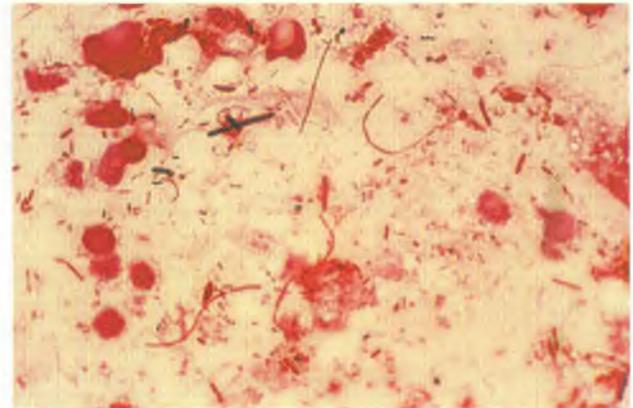


Figura 13.4. Fístula vesicorrectal.

La observación de una flora fecal en una muestra de orina bien recogida debe hacer sospechar la presencia de una fístula entre la vejiga urinaria y el tubo digestivo.

en mojar en la orina una «tira reactiva» (*dipstick*) con varias bandas —cada una detecta una enzima— que cambian de color si las reacciones son positivas. La sensibilidad y especificidad de estas pruebas varía de unas a otras y dependen de diversos factores, pero probablemente cuando se estudia un gran número de muestras sea imprescindible su uso, asumiendo sus limitaciones. Estas pruebas pueden presentar falsos negativos con orinas diluidas y, a diferencia del sedimento de orina, no permiten detectar la contaminación vaginal⁴ (Fig. 13.5).

Con facilidad se olvida que una orina transparente raramente está infectada, lo que unido al resultado negativo

² Si se siembra la superficie de una placa con agar Mueller Hinton con una cepa de *Micrococcus luteus*, se deposita un disco de papel y sobre él una gota de orina, si el paciente está tratado, se observará a las 18 horas de incubación a 35° C un halo de inhibición alrededor del disco.

³ Los recuentos de $\geq 10^5$ ufc (unidades formadoras de colonias) clásicamente se han considerado significativos de infección urinaria. El número de ufc es equivalente al número de bacterias viables (véase más adelante).

⁴ Existen tiras de estas características en el comercio. Combur-test®, Chemstrip® (Roche).



Figura 13.5. Tira reactiva.

Puede verse arriba una tira reactiva con la banda que detecta la esterasa leucocitaria positiva (última banda de la derecha), indicando la presencia de leucocitos (piuria). Abajo se muestra una tira negativa.

de la esterasa leucocitaria y nitratasa («tira reactiva») permite considerarla no infectada con mucha fiabilidad.

Existen diversos sistemas automatizados de cribado; muchos de estos métodos tienen una sensibilidad muy aceptable, pero una escasa especificidad⁵. También existen instrumentos para el recuento de células en la orina, algunos con posibilidad de captar las imágenes⁶.

URINOCULTIVO

Para el cultivo convencional de la orina se utilizan medios sólidos, como el de MacConkey o el de CLED (agar cisteína-lactosa-electrolito-deficiente), que es un medio polivalente que impide la invasión por proteus y posee buena capacidad diferencial, permitiendo el crecimiento de la mayoría de las bacterias causantes de infección urinaria.

En la actualidad existen medios de cultivo cromogénicos como el CPS ID3[®] (bioMérieux), CHROMagar Orientation (CHROMagar[®] Microbiology), UTI[®] (Oxoid Inc.) o URI Select 4 (Bio-Rad Laboratories Inc.), entre otros, que permiten el crecimiento de la mayoría de las bacterias causantes de infección urinaria y aportan una excelente capacidad diferencial para los microorganismos que las causan con mayor frecuencia (*E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus* y enterococos), por lo que basándose en el aspecto de las colonias se puede identificar presuntamente el agente causal directamente en la placa con notable especificidad.

En la gran mayoría de los casos, para realizar un urinocultivo basta con sembrar uno de los medios que se acaba de citar; la utilización adicional de otros medios,

como el agar sangre con colistina y ácido nalidíxico para el aislamiento de enterococos y estreptococos, el medio hipersalino de Chapman para aislar estafilococos u otros, dependerá de los microorganismos observados en la tinción de Gram. Existen medios cromogénicos para aislar e identificar presuntamente las levaduras, aunque éstas también crecen en la mayoría de los medios convencionales, incluyendo los indicados más arriba (véase el capítulo 5). En general, no es necesario incubar las placas en anaerobiosis, ya que las bacterias anaerobias no causan infecciones urinarias.

La siembra en los medios indicados, por técnica de agotamiento mediante asas calibradas, además de aislar las bacterias permite efectuar recuentos bacterianos. Cuando se utilizan asas que cargan 0,01 ó 0,001 ml de orina cada colonia equivale a 10² y 10³ ufc/ml respectivamente (Fig. 13.6).

Aunque ya se ha señalado que la tuberculosis renal no entra en el concepto clásico de infección urinaria, cuando se sospecha clínicamente y en particular cuando además se detecta una piuria sin bacteriuria, debe realizarse una tinción de Ziehl-Neelsen y un cultivo específico. También se utilizan técnicas de amplificación a pesar de no estar aprobadas por la FDA para muestras extrarrespiratorias (véase el capítulo 9).

Interpretación cuantitativa

Hace unos años se daba gran importancia al recuento de las bacterias en la orina para interpretar el significado de un cultivo, considerándose significativos los recuentos de $\geq 10^5$ ufc/ml. En la actualidad, la evaluación de los

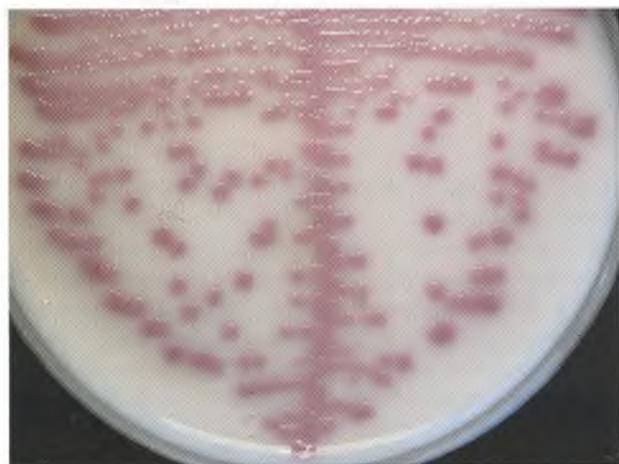


Figura 13.6. Urinocultivo.

Placa cromogénica sembrada con un asa calibrada de 0,001 ml. El número total de colonias crecidas en la placa ha de multiplicarse por 1.000 para conocer el número de células viables por ml de orina (ufc/ml). El aspecto de las colonias crecidas en este medio permite identificarlas presuntamente como *Escherichia coli*.

⁵ FiltraCheck-UTI (Meridian Diagnostics Inc.); UTI screen Bacterial ATP Assay (Coral Biotechnology); Bac-T-Screen (bioMérieux Vitek) y otros.

⁶ (iQ 200[®], Iris).

recuentos se efectúa en función del método de recogida de la orina, de la existencia de sonda permanente, de la presencia de factores predisponentes, de la sintomatología clínica del paciente, de la existencia de piuria, del tipo de microorganismo y del grado de contaminación de la orina definida por el examen microscópico del sedimento. En las orinas bien recogidas de pacientes con piuria y/o sintomatología clínica, se aceptan como significativos los recuentos de $\geq 10^3$ ufc/ml (Tabla 13.2).

Las bacterias aisladas deben identificarse por las técnicas convencionales y debe también estudiarse su sensibilidad a los antimicrobianos⁷.

Las pruebas serológicas aunque se han utilizado con fines experimentales no se emplean para el diagnóstico de las infecciones urinarias.

PROSTATITIS, EPIDIDIMITIS Y ORQUITIS

Se denomina prostatitis a la infección de la próstata, que en la mayoría de los casos es de etiología bacteria-

na, siendo *E. coli* el agente causal más frecuente. Las prostatitis se presentan bajo dos formas clínicas: la aguda y la crónica.

La prostatitis aguda bacteriana se manifiesta por dolor perineal generalmente intenso, que se acentúa con la defecación y la sedestación, y síntomas sistémicos: fiebre y síndrome tóxico agudo. Generalmente hay síntomas vesicales por la existencia de infección urinaria concomitante y obstructivos que pueden llegar hasta la retención aguda de orina. El tacto rectal es muy doloroso. En ocasiones la prostatitis aguda se acompaña de bacteriemia.

La prostatitis crónica se manifiesta por episodios repetidos de infección del tracto urinario inferior causados por el mismo microorganismo. El tacto rectal a menudo no es doloroso y los síntomas sistémicos, si están presentes, son discretos. El signo objetivo característico es el hallazgo en el líquido prostático, obtenido después de masaje realizado por vía rectal, de una leucocituria y una bacteriuria claramente superior a la de una muestra de

Tabla 13.2
Interpretación del urinocultivo

Toma de la muestra	Cultivo	Interpretación
Micción espontánea		
Orina contaminada ¹	No procesar Solicitar nueva muestra	
Orina no contaminada		
Con piuria	$\geq 10^3$ ufc/ml: 1-2 microorganismos 3 o más microorganismos	Positivo (informar) Repetir con una nueva muestra bien recogida. Pensar en factores predisponentes (sonda, litiasis y otras)
Sin piuria	$\geq 10^4$ ufc/ml: 1 microorganismo 2 o más microorganismos	Possible bacteriuria asintomática. Possible contaminación ¹ Repetir con nueva muestra bien recogida Probable contaminación ¹ . Repetir con nueva muestra bien recogida. Pensar en factores predisponentes
	$\leq 10^3$ ufc/ml: 1 o más microorganismos	Probable contaminación ¹
Sonda permanente		
Con piuria	1 o más microorganismos	Positivo (informar)
Sin piuria	1 o más microorganismos	Bacteriuria asintomática
Punción suprapúbica²		
	Cualquier resultado	Informar el resultado

Los criterios propuestos tienen carácter orientativo y deben valorarse a la luz de otros datos clínicos, biológicos y radiológicos.

¹ La contaminación en la mujer se detecta por la presencia de células de origen vaginal en el sedimento, que no se observan en la orina bien recogida. En el hombre esta valoración es más difícil. En un paciente sin infección urinaria, aunque la orina esté bien recogida, si se conserva a temperatura ambiente durante más de una hora se produce la multiplicación de las escasas bacterias contaminantes detectándose una falsa bacteriuria sin piuria.

² En las muestras recogidas por punción suprapúbica y procesadas de forma inmediata, el resultado debe considerarse definitivo y por tanto constituye el método de referencia.

⁷ Hay microbiólogos que prefieren tocar varias colonias iguales (y por tanto presuntivamente pertenecientes a la misma especie) para hacer un antibiograma mixto que permite detectar posibles variantes resistentes dentro de la especie, que podrían seleccionarse con el tratamiento.

orina obtenida antes del masaje. El cultivo positivo de la secreción prostática no es suficiente por sí solo para confirmar la existencia de una prostatitis crónica. El diagnóstico objetivo de la prostatitis crónica puede ser muy difícil, siendo recomendable que se efectúe en centros con experiencia en esta patología.

La epididimitis es la infección del epidídimo, que se asocia frecuentemente a la infección del testículo, denominada orquitis. La epididimitis se caracteriza por un epidídimo aumentado de tamaño y doloroso; cuando también se afecta el testículo, éste se encuentra inflamado, doloroso y en ocasiones se produce un hidrocele. Estas infecciones pueden ser de origen retrógrado, originadas desde la uretra a través del conducto deferente y están causadas por gonococo, clamidia o *E. coli*. Alternativamente, pueden ser de origen hematógeno, como las causadas por el virus de la parotiditis, la brucela o *Mycobacterium tuberculosis*.

LA ORINA EN LA DETECCIÓN DE ANTÍGENO

En ocasiones, sin existir infección urinaria en el sentido convencional, se eliminan con la orina microorganismos viables que están produciendo infecciones sistémicas. Así sucede, por ejemplo, en la fiebre tifoidea, en la endocarditis por *Staphylococcus aureus*, en la brucelosis, en las candidemias y en la infección renal por citomegalovirus. En la infección por *Schistosoma haemato-*

bium, localizada en los plexos venosos perivesicales, se eliminan los huevos a la vejiga urinaria.

Estos microorganismos no se investigan en la orina, excepto en el caso de la esquistosomiasis (observación de huevos en el sedimento de orina), ya que es más sencilla y específica su detección en la sangre.

Por el contrario, posee gran interés la detección en la orina de antígenos de microorganismos causantes de infecciones focales o sistémicas (neumonía, meningitis, bacteriemia), como son el neumococo, la legionela, el meningococo y *Haemophilus influenzae*, entre otros. En estos casos no se elimina el microorganismo viable por la orina sino sólo algunas estructuras antigénicas, que pueden detectarse mediante métodos inmunológicos. Existen varios equipos de reactivos comercializados que permiten detectar esos antígenos por diversas técnicas (aglutinación en porta, inmunocromatografía, ELISA, etc.). Para realizar estas pruebas debe recogerse una cantidad de orina entre 10 y 15 ml, centrifugarse a 2.000 rpm durante 10 minutos y trabajar con el sobrenadante despreciando el sedimento. El sobrenadante debe procesarse según las instrucciones del fabricante, procediendo a su concentración sólo si está recomendada. La sensibilidad y especificidad de la prueba varía según el reactivo y las características del paciente. Las orinas para detección de antígeno se conservan bien en nevera a 4-6° C durante dos semanas o en el congelador a -20° C para períodos superiores (véase el capítulo 8).

INTRODUCCIÓN

Existe un conjunto de microorganismos causantes de enfermedades infecciosas del aparato genital que se transmiten por contacto sexual. Estas enfermedades de transmisión sexual se manifiestan típicamente por dos cuadros clínicos diferentes, 1) la exudación o supuración y 2) la formación de vesículas o úlceras. En la mujer puede producirse exudación en la vulva y vagina, en el cérvix uterino o en la uretra y aunque puede predominar en una de estas localizaciones suelen estar afectadas simultáneamente. Las lesiones vesiculosas y/o ulceradas se producen en los genitales, pero pueden presentar otras localizaciones. Los condilomas son lesiones verrucosas que constituyen una patología frecuente de origen vírico.

ETIOLOGÍA Y CLÍNICA

Los agentes que con mayor frecuencia producen vulvovaginitis inflamatoria exudativa son las candidas y las tricomonas (Tabla 14.1). En la candidiasis se observa una secreción blanca, cremosa como yogur en la vulva y vagina; en tanto que en la tricomoniasis la secreción en la vagina y en el cérvix es amarillada y espumosa. Estas infecciones producen intenso prurito vulvovaginal.

La vaginosis es un proceso discretamente exudativo, caracterizado por la desaparición de los lactobacilos de la flora vaginal normal y la aparición de una abundante flora mixta en la que predominan la gardnerela y los micoplasmas, así como mobiluncus y otras bacterias anaerobias; en realidad, se trata de un desequilibrio de la flora vaginal sin componente inflamatorio (disbacteriosis). Clínicamente, el proceso se caracteriza por la aparición de un exudado de olor inconfundible y molestias vulvovaginales inespecíficas. En el Gram del exudado se observan los microorganismos adheridos a las células epiteliales vaginales de aspecto característico (*clue cells*) en ausencia de leucocitos, ofreciendo una imagen muy típica que posee gran valor diagnóstico.

Tabla 14.1

Agentes de infecciones de transmisión sexual que cursan con exudado o supuración

Bacterias	Hongos	Protozoos
<i>Gardnerella vaginalis</i> ¹	<i>Candida</i> ³	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (gonococo)		
<i>Chlamydia trachomatis</i> ²		

¹ Se asocia a micoplasmas, mobiluncus y otras bacterias anaerobias para producir una disbacteriosis denominada vaginosis (véase texto).

² Serotipos D-K. Las infecciones por este microorganismo en nuestro país son poco frecuentes.

³ Las especies aisladas con más frecuencia son *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei*.

Aunque la candidiasis y la vaginosis pueden transmitirse por contacto sexual, probablemente la mayoría de los casos no tienen ese origen, sino que se originan de la propia flora intestinal.

Las infecciones exudativas o supuradas del cérvix uterino están causadas por las tricomonas, el gonococo y las clamidias¹; como se ha señalado anteriormente, las tricomonas también pueden causar vaginitis. En el varón las candidas causan balanitis, pero no uretritis y la tricomoniasis uretral sintomática, exudativa o purulenta, es muy infrecuente. Por el contrario, el gonococo y la clamidia producen uretritis supurada que se acompaña de importante disuria. *Ureaplasma urealyticum* se ha asociado a uretritis no gonocócica (Figs. 14.1 a 14.4).

Las lesiones vesiculares o ulceradas, que en la mujer se dan en la vulva y el cérvix y en el hombre en el glande y el prepucio, están causadas con mayor frecuencia por los virus del herpes simple y suelen ser clínicamente características y dolorosas (Fig. 14.5).

La úlcera sifilítica (chancro), que es indolora, puede localizarse en cualquier lugar de los genitales, pero también en lugares diferentes del aparato genital, como la boca o el recto, como consecuencia de actividades sexuales.

¹ Debe señalarse que la infección genital por *Chlamydia trachomatis* en nuestro medio no es tan frecuente como la señalada en EE.UU. y otros países, no superando el 5% de las mujeres, incluso en poblaciones de riesgo.



Figura 14.1. Vulvovaginitis candidiásica.

Puede observarse las lesiones eritematosas y el exudado blanquecino propios de la candidiasis.

Cortesía del profesor L. Cabero. Servicio de Ginecología y Obstetricia. Hospital Vall d'Hebron.

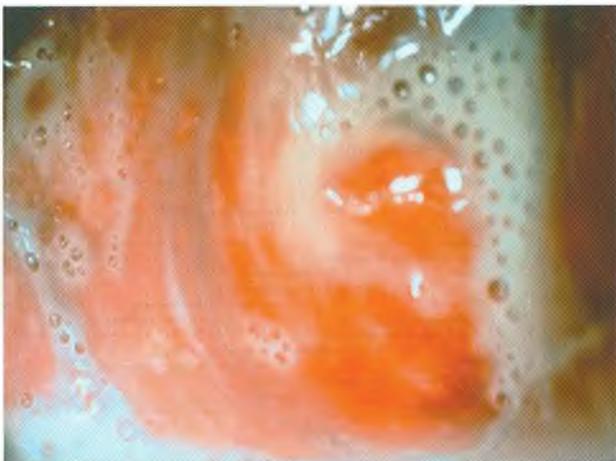


Figura 14.2. Cervicitis tricomoníásica.

Las tricomonas causan cervicitis produciendo una secreción espumosa característica.

les que comportan contacto con estas zonas. (Fig. 14.6) (Tabla 14.2).

Debe pensarse también en la existencia de infecciones rectales (proctitis) causadas por los microorganismos de transmisión sexual, en particular el gonococo.

Algunos papilomavirus causan en las zonas genitales y perianales eflorescencias cutáneas verrucoides características, denominadas condilomas acuminados, que se transmiten por contacto sexual (Fig. 14.7).

Las shigelas y otros agentes causales de enteritis, así como el virus de la hepatitis A pueden transmitirse a través de prácticas sexuales oroanales.

Algunas enfermedades sistémicas, como las hepatitis B y C, la infección por el citomegalovirus y el virus de



Figura 14.3. Balanitis candidiásica.

En el varón la *Candida* no suele producir uretritis sino balanitis.

Cortesía del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Vall d'Hebron.



Figura 14.4. Uretritis gonocócica.

La gonococia en el varón causa una supuración uretral abundante. Cortesía del Servicio de Dermatología del Hospital Vall d'Hebron.

la inmunodeficiencia humana, que se transmiten a través de la sangre o líquidos corporales, también pueden transmitirse por contacto sexual, aunque generalmente con menor eficacia que a través de la sangre.

Por otra parte, en la mujer se dan infecciones genitales como endometritis, salpingitis, ooforitis y pelviperitonitis que suelen producirse por vía ascendente y están causadas por agentes de transmisión sexual, como el gonococo o la clamidia, o por asociaciones polimicrobianas de la flora autóctona (*Escherichia coli*, estreptococos, bacteroides, etc.). Dan lugar a un cuadro clínico de intensidad, evolución y pronóstico variable conocido como enfermedad inflamatoria pélvica.

En el varón puede producirse epididimitis y orquitis causadas por agentes de transmisión sexual, principal-



Figura 14.5. Herpes genital

Aunque las lesiones herpéticas suelen iniciarse como una o varias vesículas, el médico con frecuencia las ve en un estadio más avanzado, como lesiones ulceradas, múltiples y dolorosas.

Cortesía del profesor A. Alomar. Servicio de Dermatología. H. Sant Pau.



Figura 14.6. Chancro sifilítico.

La úlcera sifilítica de inoculación —chancro— es indolora y cura espontáneamente.

Cortesía del Servicio de Dermatología del Hospital Vall d'Hebron.

mente el gonococo, así como por bacterias que progresan desde las vías urinarias como *E. coli* o por microorganismos de origen sistémico como *Mycobacterium tuberculosis* o la brucela que llegan por vía hemática.

TOMA DE MUESTRAS

El exudado vaginal puede tomarse con asa bacteriológica o con escobillón. Para tomar las muestras uretrales debe utilizarse un escobillón fino y flexible, específico para ese menester. Las muestras endocervicales deben tomarse también con un escobillón flexible ayudados por un espéculo sin lubricante. Todas estas muestras deben procesarse de inmediato a la cabecera del enfermo. Cuando las muestras no pueden procesarse de inmediato y por tanto deben transportarse, los escobillones han de disponer de medio de transporte tipo Amies o Stuart y mantenerse a temperatura ambiente.



Figura 14.7. Condilomas acuminados.

Lesiones papilomatosas múltiples que corresponden a condilomas acuminados causados por papilomavirus.

Cortesía del Prof A. Alomar. Servicio de Dermatología. H. Sant Pau.

Tabla 14.2
Agentes de infecciones de transmisión sexual que cursan con úlceras

	Bacterias	Virus
Frecuentes	<i>Treponema pallidum</i> (sífilis)	Herpes simple 2 ¹
Infrecuentes	<i>Haemophilus ducreyi</i> (chancro blando) ² <i>Chlamydia trachomatis</i> serotipo L ₁ , L ₂ y L ₃ (linfgranuloma venéreo) ² <i>Calymmatobacterium granulomatis</i> (granuloma inguinal) ²	

Las lesiones vesiculares o ulceradas se localizan preferentemente en la vulva o el cérvix en la mujer y en el glande o prepucio en el hombre.

¹ En los estadios iniciales de la infección se producen vesículas que posteriormente dan lugar a pequeñas úlceras. También pueden producirse por el tipo 1.

² No son autóctonos de Europa occidental ni de América del norte, se dan en países tropicales o subtropicales entre personas sexualmente promiscuas. Debe recordarse que aunque la lesión inicial puede ser una úlcera, evolucionan en estadios con diferentes manifestaciones clínicas. Ante su sospecha los pacientes deben remitirse a un centro especializado.

Para el diagnóstico de las infecciones herpéticas debe tomarse el contenido de las vesículas con una jeringa de insulina. Si las vesículas están ulceradas, después de limpiar la superficie con una gasa empapada en suero fisiológico estéril (no alcohol ni antisépticos), debe tomarse el material de la base de la úlcera frotando enérgicamente con un escobillón que ha de introducirse en un tubo con medio de transporte para virus tipo Hanks, o tomarse con un escobillón comercializado para muestras virológicas. Si la muestra para cultivo virológico se ha tomado con un escobillón con un medio de transporte bacteriológico tipo Amies al llegar al laboratorio debe inocularse de inmediato en los cultivos celulares o pasar a un medio de transporte virológico (véase el capítulo 12).

Es muy importante insistir en que es recomendable que el examen microscópico en fresco, así como los cultivos, se efectúen de inmediato, junto al paciente, para preservar la viabilidad de los microorganismos.

Las muestras para detección de antígeno por EIA o fluorescencia, o para pruebas de amplificación genómica, deben tomarse siguiendo estrictamente las normas recomendadas por el fabricante del kit utilizado. La orina puede ser una muestra aceptable para estos estudios.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Examen directo

El examen microscópico en fresco del exudado vaginal permite observar con elevada sensibilidad las tricomonas, las levaduras y las *clue-cells* de la vaginosis. El examen en fresco debe efectuarse inmediatamente después de la toma de la muestra para poder observar la movilidad característica de las tricomonas. Si la muestra, después de observada en fresco, se tiñe por el método de Gram, se puede confirmar la candidiasis y la vaginosis. El Gram del exudado uretral del varón permite diagnosticar la gonococia, pero no es recomendable efectuar estudio en el exudado cervical o en muestras del recto porque posee muy poca especificidad, debiéndose realizar el diagnóstico mediante cultivo. Aunque es infrecuente, en el varón una uretritis supurada puede estar causada por tricomonas, siendo útil para su diagnóstico el examen en fresco del exudado en suero fisiológico. (Figs. 14.8 a 14.11).

La observación del material del raspado de las úlceras herpéticas mediante la técnica de Tzanck permite el diagnóstico de esta infección, sin embargo cuando se dispone de poco material es preferible reservarlo para la detección de antígeno por fluorescencia y/o para el cultivo (Fig. 14.12).

En las úlceras sifilíticas la observación por campo oscuro de una muestra de la base de la lesión permite

visualizar los treponemas, pero debe poseerse el instrumental y la experiencia suficiente.

Cultivo

Si es posible, se efectuará inmediatamente después de la toma de la muestra, sembrando el exudado, el líquido vesicular o el material de la base de la úlcera en los medios de cultivo adecuados. La mayoría de las veces es imposible hacerlo así y el material se traslada según se ha señalado más arriba para inocularlo en el laboratorio.

Para el cultivo de las candidas puede utilizarse el medio de Sabouraud con o sin antibióticos o alternativamente un medio cromogénico² que permite identificar presuntivamente, por el aspecto y color de las colo-

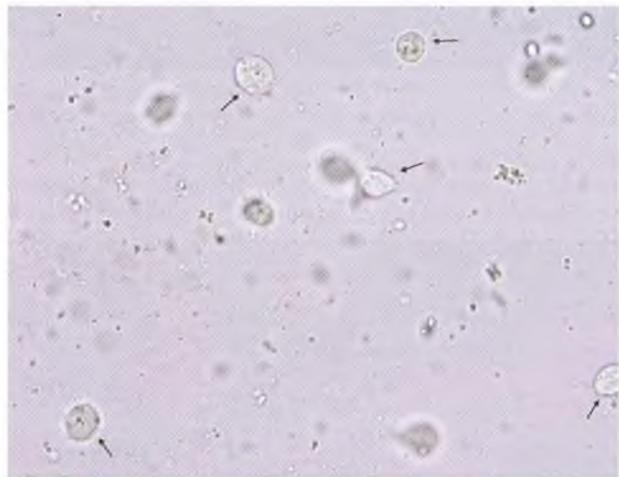


Figura 14.8. Tricomoniasis vaginal. Examen en fresco.

Las tricomonas son protozoos flagelados. Pueden detectarse, por su morfología y movilidad característica, en el examen en fresco de la secreción vaginal.

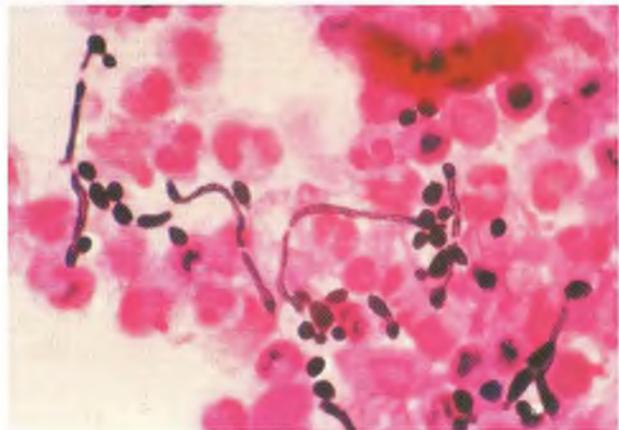


Figura 14.9. Candidiasis vaginal.

Tinción de Gram del exudado vaginal donde se observan abundantes levaduras y micelios.

² CHROMagar[®] Candida, Candida ID[®] o CandiSelect[®] (véase el capítulo 5).

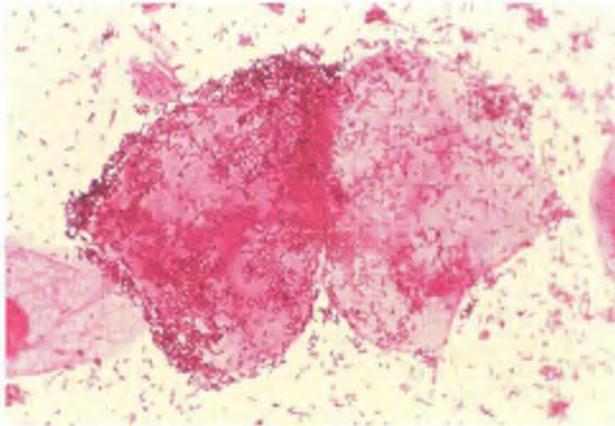


Figura 14.10. Vaginosis. Tinción de Gram.

Puede observarse la ausencia de leucocitos y la abundancia de células epiteliales recubiertas de *Gardnerella* y *Mobiluncus* (*clue cells*).

nias, las especies *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata* (Fig. 5.10). Para el cultivo de las tricomonas se utiliza un medio semisólido como el de Roiron³ que es muy eficaz y en el que también crecen muy bien las candidas. Es muy sencillo y útil sembrar este medio en el momento de la toma de la muestra para recuperar las tricomonas (y candida). Estos cultivos suelen positivizarse entre las 24 y 48 horas.

La *Gardnerella* puede cultivarse en agar sangre incubado en atmósfera aerobia hipercápnica, pero el diagnóstico de vaginosis es mejor efectuarlo por criterios clínicos y confirmarlo mediante la tinción de Gram (*clue cells*).

El gonococo crece bien a las 24-48 horas en medios como el de Thayer-Martin y otros de formulación semejante que son muy selectivos para este microorganismo.

En la mayoría de los laboratorios, el diagnóstico de la infección por clamidia no se suele efectuar por cultivo sino por detección de antígeno o técnicas de amplificación (véase más adelante). En todo caso, antes de solicitar el estudio de este microorganismo debe consultarse al laboratorio para acordar el tipo de muestra y el método de recogida y de transporte.

El virus del herpes simple crece en 24-48 horas en diversas líneas celulares, como la Vero y la A-549, por lo que el cultivo es una técnica sensible y específica.

El diagnóstico microbiológico del chancro blando (*Haemophilus ducreyi*), linfogranuloma venéreo (*C. trachomatis* L₁-L₃) y el granuloma inguinal (*Calymmatobacterium granulomatis*) se efectúa en laboratorios especializados.

En la tabla 14.3 se señala el protocolo para el diagnóstico de estas enfermedades.

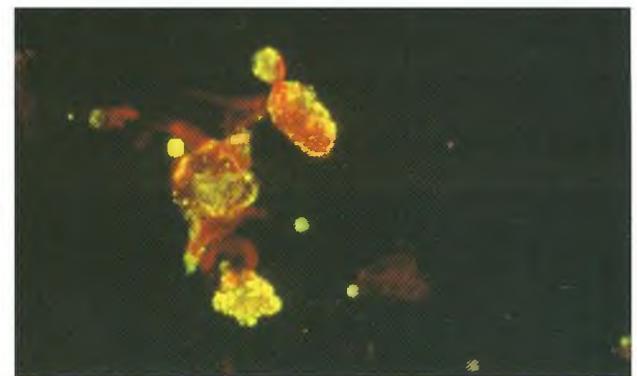


Figura 14.12. Herpes genital. Inmunofluorescencia.

Los anticuerpos antiherpes simple marcados con fluoresceína permiten detectar mediante el microscopio de fluorescencia las células infectadas.

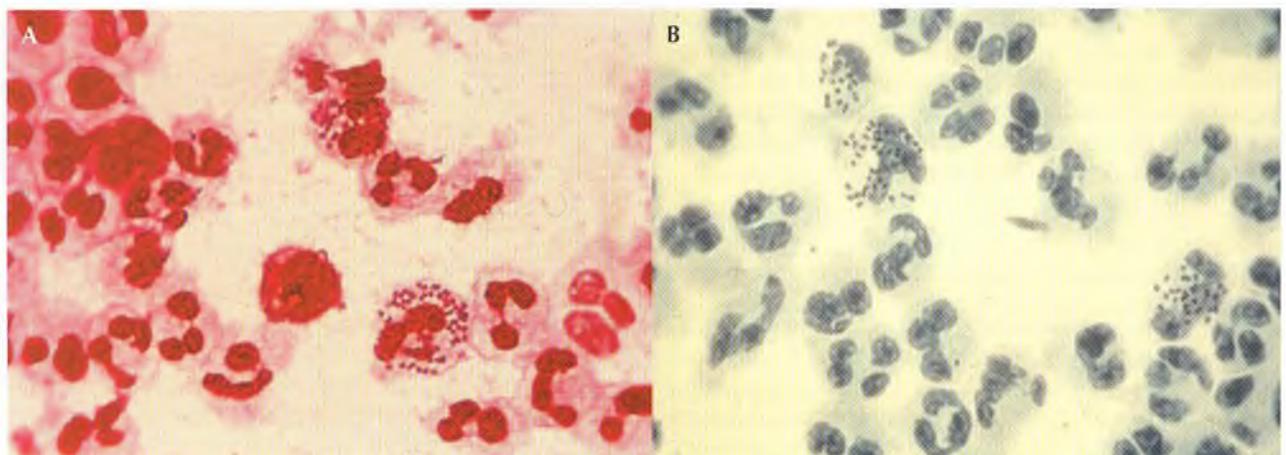


Figura 14.11. Infección gonocócica.

A. Tinciones de Gram. B. Azul de metileno de la supuración de un varón afecto de uretritis gonocócica. Se observan diplococos gramnegativos intra y extra leucocitarios.

³ Reactivos para Diagnóstico SL.

CONCEPTO Y ETIOLOGÍA

Diversas bacterias, protozoos y virus con capacidad enteropatógena causan infecciones intestinales, denominadas enteritis, cuyo síntoma cardinal es la diarrea.

Aunque la mayoría de las enteritis son autolimitadas, cuando la diarrea es intensa produce deshidratación y trastornos electrolíticos, que en niños pequeños, ancianos y personas desnutridas comportan un pronóstico grave.

Los microorganismos enteropatógenos actúan por invasión de la mucosa intestinal (mecanismo invasor) o por producción de enterotoxinas (mecanismo toxigénico).

En las enteritis causadas por bacterias invasoras, como las salmonelas, los campilobacter, las shigelas y las yersinias, las heces diarreicas pueden presentar sangre y leucocitos, y el cuadro clínico se acompaña de dolor abdominal y fiebre.

En las enteritis toxigénicas, como las causadas por *Vibrio cholerae* O1 y O139 o *Escherichia coli* enterotoxigénica, predomina un cuadro de diarrea líquida abundante, con escaso dolor abdominal, generalmente afebril, de pronóstico grave cuando la diarrea es intensa y persistente. Sin embargo, las toxinas de *E. coli* enterohemorrágica y de *Clostridium difficile* son necrotizantes y pueden causar desde un cuadro de diarrea indiferenciada benigna hasta un cuadro muy grave de diarrea sanguinolenta por la producción de úlceras y necrosis en el colon (colitis hemorrágica y colitis pseudomembranosa, respectivamente) (Fig. 15.1). Además, *E. coli* O157:H7 y otros serotipos enterohemorrágicos de *E. coli* pueden causar complicaciones muy graves, como el síndrome hemolítico urémico o la púrpura trombótica trombocitopénica. Por el contrario, el cuadro clínico producido por las toxinas de *Staphylococcus aureus* preformadas en los alimentos y por *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens* es leve y autolimitado, caracterizado por náuseas, vómitos y en menor medida diarrea, tras un período de incubación corto, inferior a seis horas.

Las enteritis víricas, en particular las causadas por rotavirus y norovirus en los niños, tras un período de

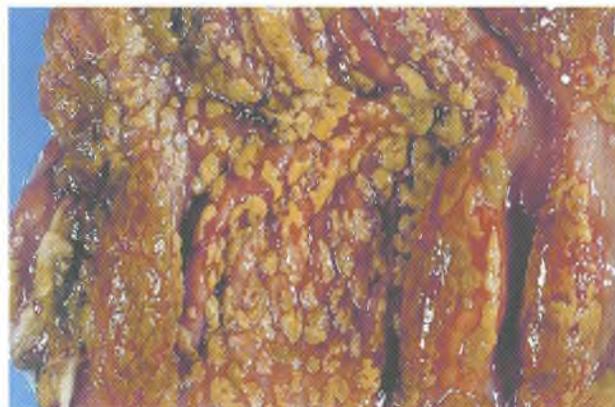


Figura 15.1. Colitis pseudomembranosa.

La toxina A de *Clostridium difficile* produce lesiones necrotizantes en el colon, que se recubren de fibrina adquiriendo el aspecto de pseudomembranas (colitis pseudomembranosa). En esta imagen se observa una mucosa colónica con múltiples placas blanco-amarillentas de exudado purulento y presencia de ulceraciones de la mucosa con material hemático.

Cortesía del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron.

incubación entre 24 y 48 horas, suelen presentar una clínica de corta duración caracterizada por náuseas y vómitos predominando sobre la diarrea; la gravedad de esta infección es consecuencia de la facilidad con que los niños pequeños, y en particular los lactantes, se deshidratan y de la dificultad de la rehidratación oral por los vómitos. Las infecciones por rotavirus son más frecuentes en invierno y los norovirus causan con frecuencia brotes de origen alimentario.

Las enteritis por protozoos dan lugar a cuadros clínicos variados. *Cryptosporidium parvum*, tras un período de incubación de 2 a 14 días causa diarrea de carácter acuoso con náuseas y dolor abdominal. *Giardia lamblia*, después de un período de incubación de una a cuatro semanas, puede dar cuadros agudos de diarrea; pero no es infrecuente la evolución subaguda y el carácter recidivante.

La enterocolitis causada por *Entamoeba histolytica* responde a un mecanismo invasor y tras un período de incubación de semanas a meses produce lesiones ulceradas en el colon causando una diarrea disenteriforme con sangre, moco y pus. Las amebas pueden alcanzar el hígado por vía portal, causando abscesos.

A pesar de lo dicho, en la mayoría de los casos, la clínica de las enteritis es indiferenciada y anodina y hace difícil deducir el agente causal.

Las enteritis suelen ser más frecuentes en los niños y más graves en los lactantes y los ancianos. En Europa occidental la mayoría está causada por virus (rotavirus y norovirus) seguidos de salmonela, campilobacter y giardia; pero a nivel mundial la etiología varía según el área geográfica y el nivel de desarrollo.

Los microorganismos causantes de enteritis se muestran en las tablas 15.1, 15.2 y en la 15.3 se recogen los períodos de incubación.

La parasitación intestinal por helmintos como los áscaris, oxiuros, tenias o los anquilostomas no suele dar lugar a un cuadro agudo de gastroenteritis, sino a otras manifestaciones clínicas dependientes del agente causal, por lo que no se incluyen tradicionalmente entre los agentes de enteritis.

La participación de *Helicobacter pylori* en la patogenia de la úlcera duodenal y la gastritis antral parece incuestionable, recomendándose la erradicación del microorganismo mediante antibióticos (Fig. 15.2).

TOMA DE MUESTRAS

Las muestras para el estudio de las gastroenteritis son las heces. El volumen recomendado para los estudios convencionales oscila entre 5 y 10 ml de heces líquidas. En el comercio existen frascos con un tapón de rosca que lleva una cucharilla adecuada para la toma de muestras fecales. Alternativamente han de recogerse con una espátula para introducirlas en un frasco convencional, limpio y de cierre hermético sin conservantes ni fijadores. Una vez recogidas, deben trasladarse rápidamente al laboratorio para su estudio inmediato. Este es el método ideal y polivalente, ya que permite la

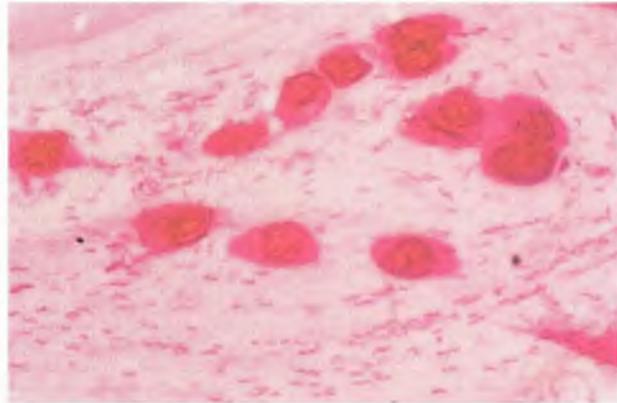


Figura 15.2. *Helicobacter pylori*.

Tinción de Gram de la mucosa gástrica. Puede observarse bacilos gram-negativos curvados compatibles con *H. pylori*.

detección de las bacterias y sus toxinas, los parásitos y los virus.

Si se prevé que las heces no podrán procesarse en un tiempo inferior a dos horas después de su emisión, debe recogerse una parte en un recipiente con un medio de transporte como el de Cary-Blair para el estudio bacteriológico, otra parte debe introducirse en un frasco con un fijador, como el mertiolato-yodo-formol (MIF), para estudio parasitológico y una tercera parte en un recipiente sin conservantes que debe mantenerse en la nevera para el estudio de las toxinas bacterianas y de los virus. Si la muestra de heces no se procesa de inmediato, y no se dispone de medios de transporte o fijación como los señalados, puede guardarse en la nevera durante un máximo de 24 horas antes de ser procesada; pero, sin duda, disminuirá el rendimiento del estudio bacteriológico y parasitológico.

Las muestras tomadas mediante escobillonado rectal, con el que se recoge poca cantidad de material fecal, deben mantenerse húmedas en un medio de transporte tipo

Tabla 15.1

Principales agentes causales de enteritis en la población general

	Bacterias	Protozoos	Virus
Frecuentes	<i>Salmonella enterica</i> ¹ <i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Giardia lamblia</i>	Rotavirus Calicivirus ⁵
Infrecuentes	<i>Shigella</i> ² <i>Yersinia enterocolitica</i> ³ <i>E.coli</i> enterohemorrágica ^{tox 4}	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Adenovirus 40, 41 Astrovirus

La etiología de las enteritis varía según el área geográfica. Estos microorganismos son los más prevalentes en Europa occidental y América del norte.

¹ Los serotipos prevalentes son: Enteritidis y Typhimurium.

² En Europa occidental se aíslan *S. sonnei*, *S. flexneri* y excepcionalmente *S. boydii*.

³ Solo son enteropatógenos los serotipos O3, O8 y O9 y algunos serotipos infrecuentes de América del Norte (cepas esculina negativa).

⁴ Fundamentalmente el serotipo O157:H7.

⁵ Los calicivirus incluyen los norovirus (virus de Norwalk) y sapovirus (virus de Sapporo) entre otros.

^{tox} Se señalan con «tox» las bacterias que actúan por mecanismo toxigénico.

Tabla 15.2
Agentes causales de enteritis en situaciones especiales

	Bacterias	Protozoos	Virus
Pacientes hospitalizados (>72 h del ingreso)	<i>Clostridium difficile</i> ^{tox 1}		
Pacientes con sida² (CD4 <100/μl)			
Frecuentes	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Salmonella enterica</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Giardia lamblia</i>	Rotavirus Calicivirus ³ Adenovirus 40, 41
Infrecuentes	<i>Shigella</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>	Microsporidios <i>Isospora</i> <i>Cyclospora</i>	
Viajeros⁴	<i>E. coli</i> enteropatógena <i>E. coli</i> enterotoxigénica ^{tox} <i>E. coli</i> enteroagregativa <i>Shigella</i> <i>E. coli</i> enteroinvasiva <i>Vibrio cholerae</i> O1, O139 ^{tox}	<i>Entamoeba histolytica</i>	
Brotos de toxiinfección alimentaria⁵			
Frecuentes	<i>Salmonella enterica</i> <i>Staphylococcus aureus</i> ^{tox} <i>Clostridium perfringens</i> ^{tox}	<i>Giardia lamblia</i> ⁶ <i>Cryptosporidium parvum</i> ⁶	Calicivirus ³ Rotavirus ⁶
Infrecuentes	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Shigella</i> ⁶ <i>Bacillus cereus</i> ^{tox} <i>E. coli</i> enterohemorrágica ^{tox}		

¹ Los pacientes ancianos, los postoperados y los que han recibido antiácidos y antibióticos son los más susceptibles a esta infección; estos pacientes con frecuencia se hallan hospitalizados.

² Las enteritis bacterianas y víricas en el sida, aunque más graves, son de etiología semejantes a las del resto de la población, excepto en la frecuencia con la que se observan algunos protozoos, como criptosporidios y microsporidios. Las infecciones de la pared intestinal por micobacterias (*M. tuberculosis*, *M. avium*), por citomegalovirus y por el propio virus de la inmunodeficiencia humana corresponden a la localización focal de una infección sistémica más que a una enteritis en sentido convencional, aunque pueden causar diarrea y ser de extrema gravedad.

³ Los calicivirus incluyen norovirus y sapovirus entre otros.

⁴ Además de los señalados en la tabla, las salmonelas, campilobacter, giardia, criptosporidios, rotavirus, calicivirus y otros agentes causales de enteritis de distribución universal lógicamente también afectan a los viajeros. Los agentes indicados en la tabla dependen del país al que se ha efectuado el viaje.

⁵ En torno a la mitad de los casos no puede detectarse la etiología de las toxiinfecciones alimentarias.

⁶ Las infecciones por estos microorganismos corresponden con frecuencia a brotes de origen hídrico.

^{tox} Se señala con «tox» las bacterias que actúan por mecanismo toxigénico.

Cary-Blair y pueden ser útiles para determinados estudios, como la búsqueda específica de salmonela o vibrio (siembra inmediata y exclusiva en un medio líquido de enriquecimiento), pero no es un procedimiento adecuado de tomar las heces para los estudios microbiológicos, debiendo recogerse como se ha señalado anteriormente.

EXAMEN DIRECTO

El examen directo mediante la tinción de Gram posee poco valor para el diagnóstico de las enteritis bacterianas, ya que, a excepción de campilobacter y vibrio, el resto de las bacterias enteropatógenas no posee una morfología característica (Fig. 15.3).

Por el contrario, el examen microscópico directo o tras concentración de las heces coloreadas con una gota de lugol es fundamental para la detección de protozoos, siendo, de hecho, la técnica utilizada convencionalmente para el diagnóstico de las protozoosis intestinales. Como el fijador MIF incorpora en su fórmula eosina y lugol, las muestras quedan discretamente coloreadas y pueden observarse directamente. Si existen problemas para la identificación de los trofozoitos o quistes de los protozoos observados, debe recurrirse a tinciones específicas (Fig. 15.4).

Para la visualización de *Cryptosporidium parvum* se utiliza una tinción de Ziehl modificada; esta tinción debe efectuarse en heces frescas o fijadas con formol, pero no con MIF (véase la figura 7.29).

Tabla 15.3
Período de incubación de los agentes causales de enteritis

Microorganismo	Valores medios	Valores extremos
Bacterias		
<i>Salmonella enterica</i>	24-48 horas	6 horas-10 días
<i>Campylobacter jejuni</i>	2-5 días	2-10 días
<i>Shigella</i>	24-48 horas	12 horas-6 días
<i>Yersinia enterocolitica</i>	24-48 horas	1-10 días
<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva	V	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4-30 horas	
<i>E. coli</i> enteropatógena clásica	V	
<i>Listeria monocytogenes</i>	10-32 horas	
<i>Vibrio cholerae</i> O1, O139	6 horas-5 días	
<i>Bacillus cereus</i> ^{tox}	1-6 horas para la toxina emetizante; 6-24 horas para la diarreigénica	
<i>Clostridium perfringens</i> ^{tox}	8-16 horas	
<i>Staphylococcus aureus</i> ^{tox}	2-4 horas	30 minutos-8 horas
<i>E. coli</i> enterohemorrágica ^{tox}	4-5 días	1-10 días
<i>E. coli</i> enterotoxigénica ^{tox}	6-48 horas	
Protozoos		
<i>Cryptosporidium parvum</i>	7 días	2-28 días
<i>Giardia lamblia</i>	7 días	3-25 días
<i>Entamoeba histolytica</i>		Días a meses
Virus		
Calicivirus	24-48 horas	15-75 horas
Astrovirus	24-48 horas	15-75 horas
Rotavirus	1-4 días	

^{tox} Se señalan con «tox» las bacterias toxigénicas.

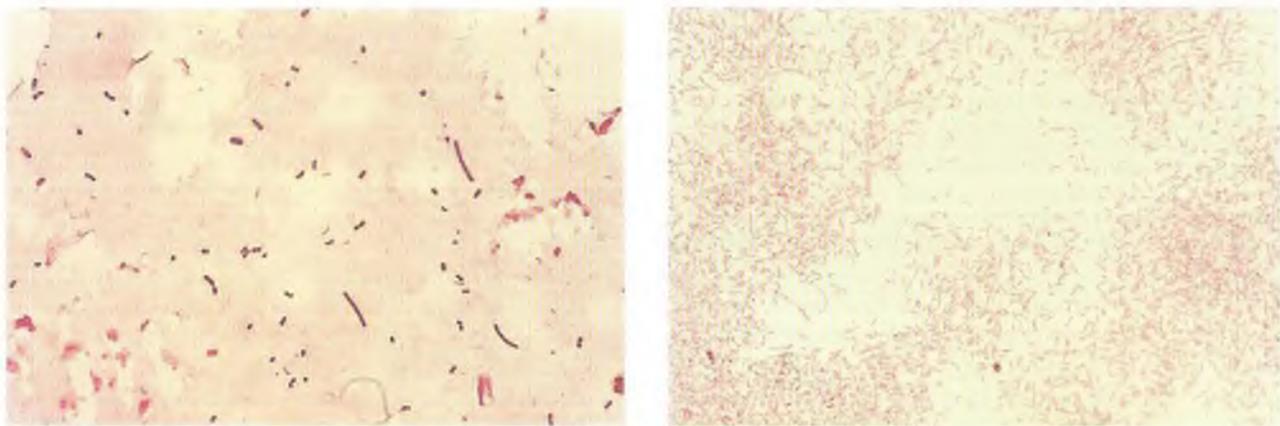


Figura 15.3. *Campylobacter jejuni*.

El examen directo de las heces mediante tinción de Gram resulta de escasa ayuda diagnóstica en las enteritis bacterianas, excepto en las causadas por campilobacter, en las que la morfología curvada del microorganismo es muy característica, como puede observarse en la fotografía de la izquierda. A la derecha puede observarse una tinción de Gram de una extensión realizada a partir de un cultivo.

La observación de extractos fecales al microscopio electrónico permite visualizar los rotavirus y otros virus enteropatógenos con su morfología característica, pero, obviamente, esta técnica no se emplea en los laboratorios de rutina.

CULTIVO

El coprocultivo se utiliza para el aislamiento de las bacterias enteropatógenas. Los medios de cultivo utilizados son medios selectivos y de enriquecimiento que

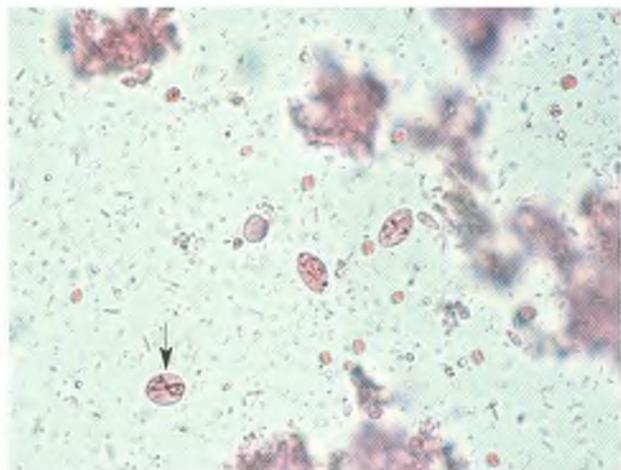


Figura 15.4. Quistes de *Giardia lamblia*.

Muestra de heces fijada con MIF. Obsérvese la presencia de abundantes formas quísticas de giardia.

permiten el crecimiento de las bacterias que se desea aislar, inhibiendo el resto de la flora.

El número y clase de medios a utilizar depende de los patógenos a investigar y de la experiencia y preferencias de cada laboratorio. Para el diagnóstico de las enteritis aparecidas en la comunidad debe emplearse siempre medios selectivos para el aislamiento de las salmonelas y campilobacter, ya que estos dos microorganismos son los responsables de la mayoría de las enteritis bacterianas. Como puede verse en la tabla 15.4 algunos medios utilizados para el aislamiento de las salmonelas como el agar MacConkey, el agar xilosa-lisina-deoxicolato y el agar salmonela-shigela también son útiles para el aislamiento de *E. coli* enteropatógena, shigela y yersinia respectivamente (Fig. 15.5). Los campilobacter son microaerófilos, y los que causan enteritis con mayor frecuencia son termofli-

cos por lo que se recomienda incubar los medios selectivos como el de Skirrow u otros, a 42° C en atmósfera microaerófila durante 48 horas (Fig. 15.6). Cuando se sospecha la existencia de una enteritis causada por *E. coli* O 157: H7 (*E. coli* enterohemorrágica) debe sembrarse el medio de MacConkey con sorbitol. Este serotipo verotoxigénico, a diferencia de la mayoría de *E. coli*, es sorbitol negativo. También se han diseñado medios cromogénicos para el aislamiento de salmonela y *E. coli* O 157: H7, como el de Rambach y CHROMagar O157 respectivamente.

Los vibriones se aíslan en el agar tiosulfato citrato con sales biliares (TCBS), que constituye un medio muy selectivo para ellos. Las yersinias se aíslan en el medio de cefsulodin-irgasán-novobiocina (CIN). Las características de estos medios se detallan en el capítulo 2. Medios de cultivo.

Las salmonelas pueden enriquecerse sembrando previamente las heces en un medio líquido como el caldo selenito F incubado a 35° C (8-12 horas); *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica puede enriquecerse mediante técnicas inmunomagnéticas (Dynabeads®, Dynal Biotech; Denka Seiken Co., Ltd.), las yersinias se enriquecen cultivando las heces en caldo usual incubado a 4-6° C durante una a cuatro semanas y los vibriones sembrándolos en agua de peptona alcalina con pH 8,4 incubada a 35° C durante seis-ocho horas. Es muy importante ajustarse a los tiempos y temperaturas de incubación recomendados. Después de incubados estos medios líquidos de enriquecimiento deben sembrarse en los respectivos medios selectivos sólidos que se han indicado más arriba.

En las enteritis aparecidas en el hospital o tras la administración prolongada de antibióticos y antiácidos debe investigarse la presencia de *Clostridium difficile*. Es extraordinariamente importante sembrar las heces inmedia-

Tabla 15.4
Protocolo mínimo de estudio de las enteritis

	Método	Microorganismos detectados
Examen microscópico	Fresco Gram	Giardia y otros ¹ Campilobacter
Medio (incubación)	MAC; SS; RB (24-48 h, 37° C) Sel F → XLD (8-12 h a 37° C) CCDA; SK (48 h a 42° C en microaerofilia)	Salmonela. Shigela. Yersinia. <i>E. coli</i> ² Salmonela Campilobacter
Detección de antígeno	Látex [ELISA]	Rotavirus

Protocolo de procesamiento de las muestras de heces de pacientes que han adquirido la enteritis en la comunidad y no padecen el sida. Este protocolo mínimo va dirigido a la detección de los agentes de enteritis más frecuentes y universales en personas previamente sanas: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Giardia* y rotavirus.

¹ La giardia puede observarse en las heces en fresco o mejor contrastadas con una gota de colorante (yodo); por el contrario los criptosporidios requieren la tinción de Ziehl modificada para su observación (capítulo 7).

² Los medios de MAC y SS permiten aislar, además de las salmonelas, las shigelas, *E. coli* enteropatógena y las yersinias, aunque estas últimas se aíslan mejor en el medio de CIN. El agar SS es inhibidor para *E. coli*, por lo que debe utilizarse el de MacConkey para su aislamiento.

MAC: agar MacConkey. SS: agar de Salmonela-Shigela. XLD: agar xilosa-lisina-desoxicolato. RB: medio cromogénico de Rambach. Sel F: caldo de enriquecimiento con selenito. CCDA: agar carbón-cefoperazona-desoxicolato. SK: medio de Skirrow. CIN: agar cefsulodina-irgasán-novobiocina.

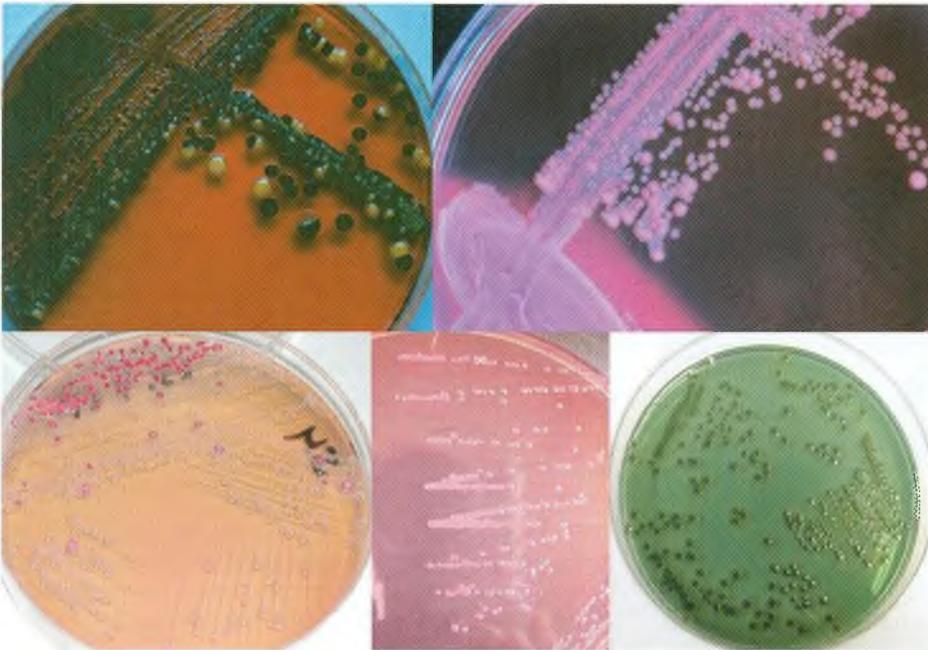


Figura 15.5. Medios selectivo-diferenciales.

Colonias de *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *E. coli* O157: H7, *Yersinia enterocolitica* y *Vibrio parahemolyticus* en medios selectivo-diferenciales.

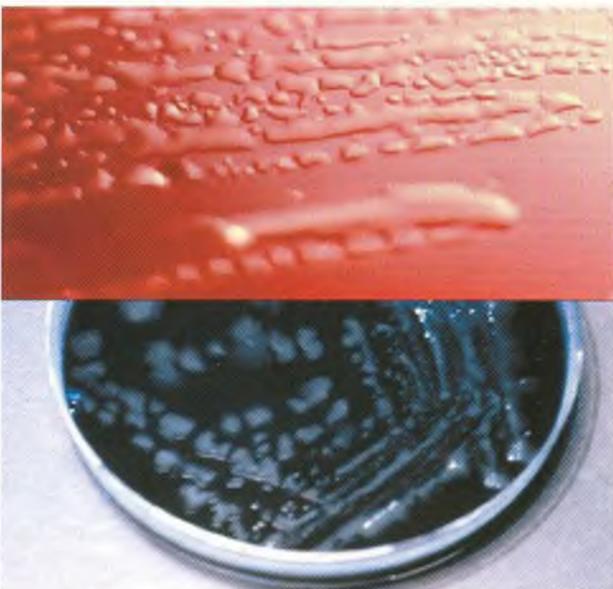


Figura 15.6. Colonias de *Campylobacter jejuni*.

Los campilobacter termofílicos enteropatógenos forman tres tipos de colonias, unas diminutas y puntiformes, otras de aspecto invasor y otras, las más características, mucoides con brillo mercurial. En esta figura puede verse una colonia mucoide.

tamente después de su emisión en el medio de cicloserina-cefoxitina-fructosa agar (CCFA) y a continuación incubar las placas en anaerobiosis debido a la gran labilidad de este microorganismo frente al oxígeno (Fig. 15.7).

Identificación de las bacterias enteropatógenas

Los campilobacter termofílicos, aparte de formar unas colonias muy características en los medios selectivos



Figura 15.7. Colonia de *Clostridium difficile*.

Las colonias de *Clostridium difficile* suelen ser muy características, según se muestra en esta figura. Arriba, agar sangre; abajo izquierda, agar Columbia; abajo derecha, agar cicloserina-cefoxitina-fructosa (CCFA).

específicos, presentan en la tinción de Gram una morfología muy típica, son oxidasa positiva y microaerófilos lo que permite su identificación presuntiva, que debe completarse con pruebas bioquímicas para la identificación a nivel de especie (Tabla 3.12).

A pesar del empleo de medios de enriquecimiento y selectivo-diferenciales para enterobacterias enteropatógenas siempre crece en las placas de aislamiento una mezcla heterogénea de colonias; por tanto, las colonias sospechosas de corresponder a una enterobacteria enteropatógena o vibrio en TCBS deben resemebrarse en medios de identificación rápida como el agar de Kligler (KIA) y el agar lisina hierro (LLA) que permiten identi-

ficar presuntivamente a estos microorganismos siguiendo el algoritmo presentado en el esquema 15.1 (Fig. 15.8 y tablas 3.8 y 3.9). La identificación presuntiva de *C. difficile* es relativamente sencilla por lo característico de la morfología de las colonias en el medio de CCFA y de su olor, que recuerda al de las heces de caballo. La identificación definitiva requiere pruebas bioquímicas y estudio cromatográfico de los catabolitos de la glucosa.

En todo caso debe confirmarse la identificación presuntiva de las bacterias aisladas, utilizando métodos estandarizados, y en las especies toxigénicas como *C. difficile*, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enterohemorrágica, *V. cholerae* O1 y O139, constatar la producción de toxinas por técnicas inmunológicas o genéticas. Sin embargo, a diferencia de las técnicas inmunológicas que permiten la detección directa de la toxina, la presencia del gen no garantiza que la cepa sea productora de la toxina.

En los laboratorios de rutina no se utilizan técnicas de cultivo para el aislamiento de protozoos o virus. El examen microscópico directo y la detección de antígeno, respectivamente, son las técnicas utilizadas comúnmente.

TÉCNICAS MOLECULARES

Detección de antígenos

Las técnicas de detección de antígeno se emplean habitualmente para la detección de rotavirus, adenovirus serotipos 40 y 41, norovirus y astrovirus. Las más utilizadas son la aglutinación facilitada mediante partículas de látex y el enzimoimmunoanálisis, existiendo numerosos reactivos comercializados (Fig. 8.3).

Las pruebas de detección de antígeno, por ser rápidas y prácticas, se utilizan para la detección de las toxinas (A y A+B) de *C. difficile* directamente de las heces,

constituyendo la técnica de elección por el elevado número de portadores asintomáticos del microorganismo. Algunos reactivos también pueden utilizarse para detectar la producción de toxinas por las cepas aisladas. Existen diversos sistemas comercializados para su detección¹.

Estas técnicas también se utilizan para detectar las verotoxinas de *E. coli* enterohemorrágica (ELISA, inmunocromatografía y otras)². Las pruebas se realizan a partir de muestras de heces sin medio de transporte conservadas en la nevera (en su caso conservadas a -20°C).

Existen reactivos comercializados para la detección en heces de antígenos de giardia, criptosporidios y amebas por inmunofluorescencia o EIA; pero, probablemente, no superan en coste/eficacia a las técnicas microscópicas convencionales.

En ocasiones es muy difícil diferenciar morfológicamente entre *Entamoeba histolytica* (patógena) y *E. dispar* (no patógena), pero los reactivos para EIA utilizados para la detección de antígeno, permiten su diferenciación utilizando las heces como muestra.

En los brotes de toxiinfección alimentaria, las toxinas de *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* y *Clostridium botulinum* se estudian por métodos inmunológicos en los alimentos sospechosos³.

En caso de sospecha clínica de botulismo, el paciente debe tratarse urgentemente y recoger sangre (suero), heces y los alimentos sospechosos para remitirlos a un centro especializado; debiendo declararse urgentemente a las autoridades sanitarias.

Técnicas de amplificación

En la actualidad las técnicas de amplificación son poco utilizadas para el diagnóstico de las enteritis, pero

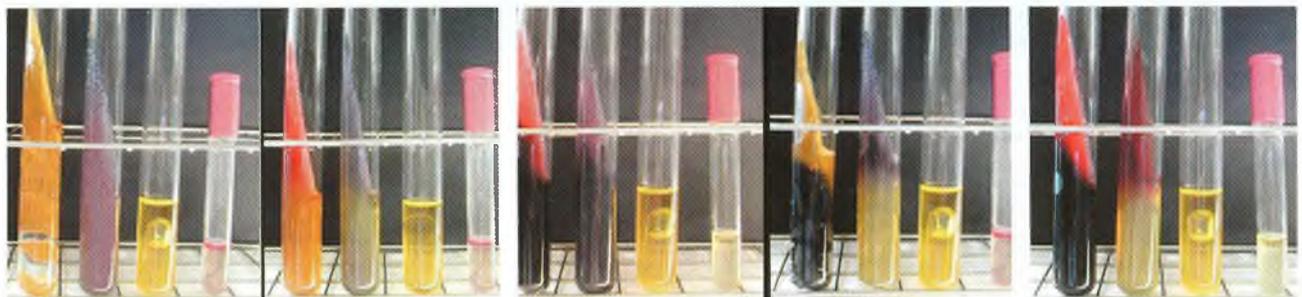


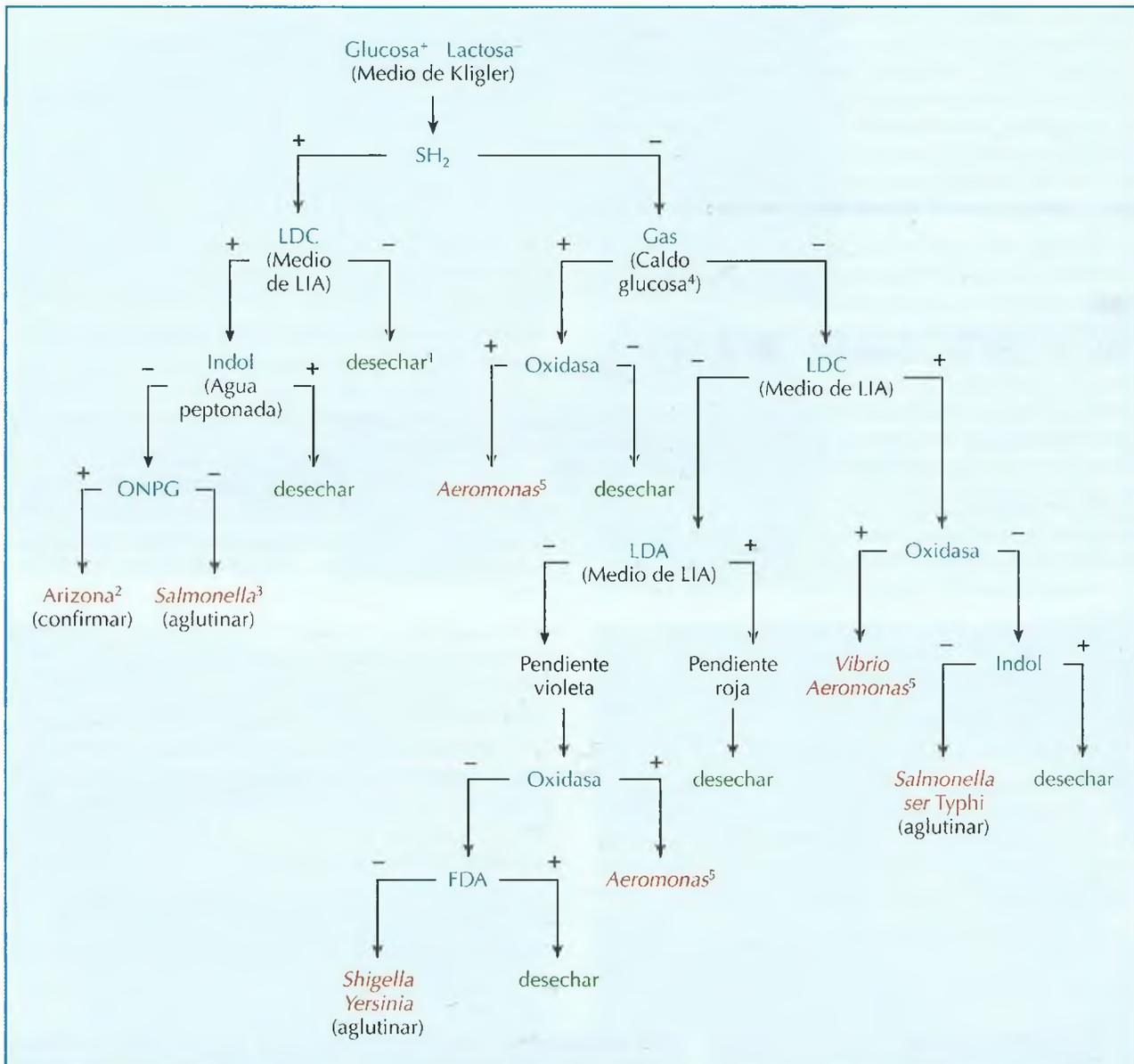
Figura 15.8. Identificación presuntiva de bacterias enteropatógenas.

Los medios utilizados para el cribado de enterobacterias (KIA, LIA, gas en glucosa e indol) permiten identificar presuntamente diferentes especies enteropatógenas. Son caracteres clave la utilización de la lactosa, la producción de SH_2 , la producción de gas a partir de la glucosa y la decarboxilación y desaminación de la lisina (esquema 15.1). La utilización de la campana de Durham en un tubo con caldo glucosa facilita la detección del gas. De izquierda a derecha se representan las características en estos medios de *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, *Citrobacter freundii* y *Proteus mirabilis*.

¹ Meridian Diagnostics Inc.; Wampole Laboratories Inc.; bioMérieux; Oxoid Inc.; BD Diagnostics.

² Meridian Diagnostics Inc. y Alexon-Trend (detección en heces y en colonia); Denka Seiken Co., Ltd.; Oxoid Inc. (detección sólo en colonia).

³ El estudio de estas toxinas en las heces de los pacientes no se recomienda por ser poco sensible.



Esquema 15.1.

Medios de cribado: el cribado se realiza resemebrando la colonia sospechosa en el medio de Kligler, en agar lisina hierro (LIA), en caldo glucosa con campana de Durham (caldo glucosa) y en agua peptonada con triptófano (agua peptonada). En el medio de Kligler se estudia la fermentación de la glucosa y la lactosa, la producción de gas y de SH₂; en la base del medio de LIA se determina la decarboxilación de la lisina (LDC) y en la pendiente, su deaminación (LDA). En el medio de glucosa con campana se confirma la producción de gas y en el agua peptonada se estudia la producción de indol a partir del triptófano (véase Fig. 15.8).

Otras pruebas rápidas incluidas en este cribado son la oxidasa, la fenilalanina deaminasa (FDA) y la β-galactosidasa (ONPG).

Las cepas que no fermentan la glucosa en el medio de Kligler deben desecharse.

En las cepas que producen gran cantidad de SH₂ puede resultar difícil la lectura de la fermentación de la glucosa en el medio de Kligler y de la decarboxilación de la lisina en el medio de LIA; sin embargo, en las cepas que no decarboxilan la lisina existe poco precipitado férrico (negro) por lo que la lectura de la reacción negativa es fácil.

Con este cribado es fácil identificar presuntivamente las cepas de *E. coli* por lo que en caso de búsqueda de *E. coli* enteropatógena se realizarán las pruebas adecuadas.

¹ *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A es LDC negativa (100%) y sólo produce SH₂ en alrededor del 10 al 15% de los casos.

² Si la cepa es lactosa positiva o negativa, pero con la ONPG positiva e indol negativo se descartará *Salmonella enterica* de las subespecies II y III (Arizona).

³ *S. enterica* serovar Typhi es agasógena y débil productora de SH₂.

⁴ Aunque el medio de Kligler permite detectar el gas, el caldo glucosa con campana es más sensible.

⁵ No existe unanimidad sobre la patogenicidad de las especies de *Aeromonas*.



Figura 15.9. PCR de VT1 y VT2.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite determinar la presencia de los genes de las verotoxinas en *E. coli*.

M: Marcador de peso molecular. Calles 1 y 4: controles positivos de VT1 y VT2, respectivamente. Calles 2 y 5: controles negativos. Calles 3 y 6: muestras.

en algunos campos se impondrán probablemente con facilidad. La detección de los virus enteropatógenos es mucho más sensible por técnicas genéticas que por detección de antígeno (Fig. 9.7). La identificación de

cepas enteropatógenas que pertenecen a especies en las que la mayoría de las cepas son comensales —*E. coli*, *Y. enterocolitica*, *V. cholerae* y *C. difficile* y en un futuro probablemente otras— hasta ahora se hacía determinando el serotipo, pero en la actualidad se realiza detectando genes específicos de patogenicidad mediante técnicas de amplificación y sondas (Fig. 15.9).

No hay que olvidar el interés de la industria alimentaria por detectar con urgencia partidas de alimentos contaminados o certificar su buena calidad. Las técnicas convencionales son muy lentas para ese propósito, el diagnóstico clínico probablemente avanzará en la este- la de ese interés comercial y social.

PROTOCOLO DE ESTUDIO DE LAS ENTERITIS

Si se tiene en cuenta que en los países desarrollados y en pacientes ambulatorios las salmonelas y campilobacter causan el 90% de las enteritis bacterianas, y que esos dos microorganismos junto con rotavirus y giardia causan el 80% de todas las enteritis esporádicas diagnosticadas etiológicamente, se comprenderá que el protocolo mínimo de estudio debe incluir el diagnóstico de estos cuatro enteropatógenos mayoritarios (Tabla 15.4).

En los pacientes con sida debe estudiarse todos los microorganismos recogidos en el apartado correspondiente de las tablas 15.2 y 15.5.

En los brotes de toxi-infección alimentaria debe investigarse salmonela, shigela, campilobacter y norovirus, estos agentes deben buscarse en las heces de los pacien-

Tabla 15.5

Protocolo de estudio de las enteritis en situaciones específicas

Factor de riesgo	Estudio
Población normal	El «protocolo mínimo» consiste en la detección de <i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i> (<i>Shigella</i> y <i>Yersinia</i>), giardia y rotavirus según se muestra en la tabla 15.4
Población normal con heces hemorrágicas y/o SHU	«Protocolo mínimo» + estudio de <i>E. coli</i> enterohemorrágica o sus toxinas (O157:H7 y otros)
Pacientes hospitalizados (\geq de 72 horas) ¹	Investigación de <i>C. difficile</i> o sus toxinas (puede causar brotes intrahospitalarios)
Pacientes con sida	«Protocolo mínimo» + investigación de <i>Cryptosporidium</i> (véase además tabla 15.2)
Brote epidémico extrahospitalario	«Protocolo mínimo» + norovirus. La determinación de las toxinas de <i>S. aureus</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>B. cereus</i> debe efectuarse en los alimentos
Diarrea del viajero	«Protocolo mínimo» + <i>E. coli</i> EP, ET, EI, EA y EH + <i>Shigella</i> + <i>V. cholerae</i> O1 y O139 + <i>E. histolytica</i> (descartar poliparasitosis)

Dado el gran número de microorganismos que pueden causar enteritis resulta adecuado estudiar aquellos que se hallan asociados a diversos factores de riesgo.

¹ Pacientes hospitalizados y en general los que reciben tratamiento antibiótico prolongado o antiácidos, particularmente los que tienen diarrea sanguinolenta.

EP: enteropatógena; ET: enterotoxigénica; EI: enteroinvasora; EA: enteroagregativa; EH: enterohemorrágica; SHU: síndrome hemolítico-urémico.

tes y en los alimentos. La detección de las toxinas de *S. aureus*, *C. perfringens* y *B. cereus* posee interés sanitario, pero suelen causar enfermedad muy benigna y auto-limitada. En los brotes hídricos ha de tenerse en cuenta las salmonelas, shigelas, giardia, criptosporidio y norovirus.

En los pacientes con diarrea del viajero además de los cuatro microorganismos señalados debe investigarse *E. coli* enteropatógena, y otros dependiendo del país visitado. Si no se dispone en rutina de las técnicas para detectar *E. coli* enteropatógena las muestras deben remitirse a un centro especializado.

En las enteritis de aparición intrahospitalaria (a partir del tercer día después del ingreso) o en pacientes bajo tratamiento antibiótico prolongado y/o antiácidos debe investigarse la toxina de *C. difficile* mediante una técnica inmunológica adecuada (EIA, látex, etcétera).

Dado el gran número de agentes causales de enteritis, deben investigarse los más frecuentes en función de los diferentes factores de riesgo según se propone en las tablas 15.2 y 15.5.

DIAGNÓSTICO DE LAS HELMINTOSIS INTESTINALES

Algunos helmintos causan parasitosis intestinales cuyas manifestaciones clínicas dependen del parásito involucrado (Tabla 15.6).

El diagnóstico de estas infecciones se efectúa mediante la observación macroscópica de las heces, para la visualización de los helmintos adultos (oxiuros, áscaris, tenias). Cuando la observación macroscópica es negativa, ha de efectuarse una observación microscópica, después de aplicar una técnica de concentración como la de Kato, Ritchie u otra, que facilitan la

Tabla 15.6
Helmintosis intestinales

Agentes causales	Manifestaciones clínicas
Trematodos	
<i>Fasciola hepatica</i>	Hepatomegalia, ictericia
<i>Taenia solium</i>	Molestias intestinales inespecíficas Cisticercosis
<i>Taenia saginata</i>	Molestias intestinales inespecíficas
<i>Diphyllobothrium latum</i>	Anemia
Nematodos¹	
<i>Enterobius vermicularis</i>	Prurito anal
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ninguna. Malestar abdominal ²
<i>Trichuris trichiura</i>	Prurito y prolapso rectal
<i>Strongyloides stercoralis</i>	Dolor epigástrico
<i>Necator americanus</i>	Dolor epigástrico, anemia

Estas parasitosis son excepcionales en los países desarrollados. El diagnóstico se basa en la observación de los helmintos o sus huevos en las heces.

¹ *Schistosoma mansoni* es un trematodo que no parasita el tubo digestivo sino los plexos mesentéricos, pero sus huevos se eliminan por las heces. *Trichinella spiralis* es un nematodo cuya forma adulta parasita la pared del tubo digestivo, pero no elimina huevos en las heces porque es vivípara y las larvas pasan directamente a los tejidos donde se enquistan (capítulo 7).

² En las parasitosis masivas por este nematodo puede producirse oclusión intestinal.

detección de los huevos de helminto. La morfología de los huevos permite la identificación del parásito. Las hembras de *Enterobius vermicularis* (oxiuro) depositan por la noche los huevos en los márgenes del ano de las personas parasitadas. La impronta en esa zona, a primera hora de la mañana y antes del aseo personal, de una cinta adhesiva (tipo celo) que es adherida después a un porta, facilita su observación microscópica (véase el capítulo 7).

MENINGITIS. CONCEPTO Y ETIOLOGÍA

Las infecciones del sistema nervioso central más frecuentes y relevantes son las meningitis, las encefalitis y los abscesos cerebrales.

Las meningitis son infecciones de las leptomeninges, la aracnoides y la piamadre, que difunden al líquido cefalorraquídeo (LCR) del espacio subaracnoideo y de los ventrículos cerebrales (Fig. 16.1). Su pronóstico y tratamiento depende del agente causal por lo que es fundamental el diagnóstico etiológico. Las meningitis se manifiestan por fiebre, cefalea, vómitos, obnubilación y rigidez de nuca y puede existir contractura espinal generalizada y paresia de los pares craneales y, en ocasiones, convulsiones. En general son de curso agudo o sobragudo, excepto la meningitis tuberculosa o la causada por criptococo, que suelen evolucionar de modo subagudo o crónico.

Las bacterias, virus y hongos causantes de meningitis poseen un tropismo por las leptomeninges a las que

alcanzan por vía hemática desde una puerta de entrada, como la faringe en el caso del meningococo o los enterovirus o el tracto respiratorio en el caso del neumococo o el criptococo. Con mucha menor frecuencia las bacterias llegan a las meninges desde un foco de vecindad y no por vía hematogena (véase más adelante).

Las meningitis son más frecuentes en la infancia y los microorganismos que las causan en esas edades son el meningococo, el neumococo, los enterovirus y el virus de la parotiditis. Las meningitis causadas por *Haemophilus influenzae* ser tipo b se dan en niños entre seis meses y seis años y han sido muy frecuentes en algunos países, pero en la actualidad la vacunación ha hecho desaparecer prácticamente las infecciones invasivas por este microorganismo. La única manifestación de la infección sistémica por meningococo puede ser la meningitis, pero en ocasiones se produce una bacteriemia persistente (sepsis meningocócica) asociada o no a meningitis. La sepsis meningocócica suele ser grave, cursando con hipotensión y *shock*, coagulación intravascu-

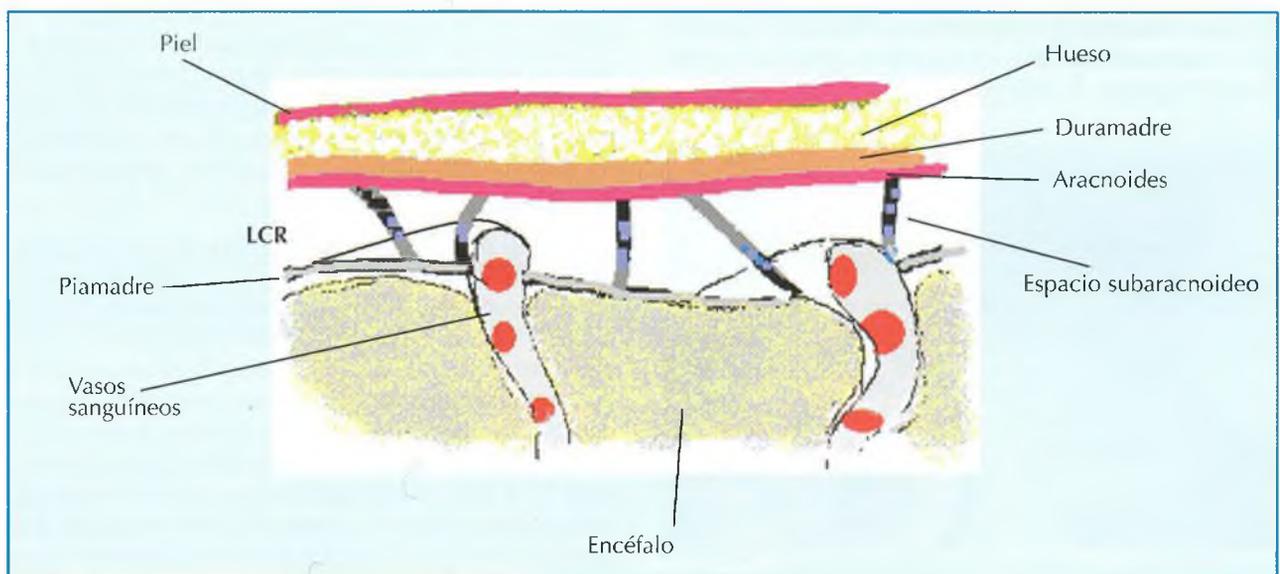


Figura 16.1. Meninges.

Corte a nivel craneal en el que se observa la piel y tejido celular subcutáneo, el hueso craneal, la duramadre, la aracnoides y la piamadre; éstas dos últimas son las leptomeninges. Entre la aracnoides y la piamadre existe el espacio subaracnoideo conteniendo el líquido cefalorraquídeo. Los microorganismos, por vía hematogena, alcanzan la aracnoides, la piamadre y difunden al líquido cefalorraquídeo causando meningitis. Los abscesos pueden ser de localización epidural (entre el hueso craneal y la duramadre), subdural (entre la duramadre y la aracnoides) o intracerebrales.

lar diseminada (petequias o equimosis); tiene mal pronóstico (Fig. 16.2). El meningococo posee capacidad para producir epidemias.

En el período neonatal (hasta los 30 días de edad) las meningitis suelen estar causadas por estreptococo del grupo B (*Streptococcus agalactiae*), *Escherichia coli* y listeria entre otros.

Las meningitis producidas por neumococo son más frecuentes en la edad adulta. La meningitis tuberculosa es consecuencia de la diseminación hemática del bacilo de Koch desde un foco activo distante o bien de la reactivación de un foco tuberculoso situado en las leptomeninges o el epéndimo. Las meningitis criptocócicas se dan en enfermos inmunodeficientes, preferentemente con el sida.

Las meningitis bacterianas que no se producen por vía hematogena se originan desde un foco de vecindad, ótico, sinusal o a través de una fístula post-traumática o post-quirúrgica de la base del cráneo en comunicación con las fosas nasales, en las que el microorganismo, generalmente el neumococo, penetra desde la nasofaringe. Estas meningitis suelen ser recidivantes mientras persiste la fístula. En pacientes con hipertensión endocraneal se colocan catéteres de drenaje del LCR internos o externos. Tras la colonización bacteriana de uno de estos catéteres, bien sea interno (*shunt* de derivación) o externo (drenaje ventricular o lumbar), se pueden producir meningitis o ventriculitis desde ese punto de partida. Estas infecciones suelen estar causadas por estafilococos coagulasa negativa, propionibacterias y pseudomonas, y generalmente presentan poca clínica de irritación meníngea.

Las meningitis que aparecen en bañistas, causadas por amebas de vida libre que se encuentran en charcas, penetran a través de la lámina del etmoides y son de evo-



Figura 16.2. Meningococemia.

Lesiones petequiales y equimóticas múltiples en un paciente con sepsis meningocócica. Estas lesiones son consecuencia de una coagulopatía de consumo por coagulación intravascular diseminada con plaquetopenia, pudiendo asociarse a *shock séptico*.

Cortesía del doctor F. Moraga-Llop. Hospital Infantil Vall d'Hebron.

lución sobreaguda y grave, aunque son realmente excepcionales.

En la tabla 16.1 se indican los principales agentes de meningitis.

TOMA DE MUESTRAS

El diagnóstico etiológico de las meningitis descansa fundamentalmente en el estudio de líquido cefalorraquídeo obtenido por punción lumbar o a través del catéter en los pacientes con drenaje externo. Deben obtenerse entre 3 y 5 ml de líquido si es posible.

La punción lumbar está contraindicada si existe una elevada presión intracraneal o un absceso cerebral concomitante, de modo que ante un síndrome meníngeo debe realizarse una tomografía craneal antes de proceder a la punción lumbar en los siguientes casos:

1. Si la duración de la enfermedad es mayor de 48 horas.
2. Si existe un foco de infección de los que se suelen complicar con absceso cerebral como, por ejemplo otomastoiditis crónica con colesteatoma o sinusitis crónica.
3. Si el paciente presenta papiledema, hemiparesia o está en coma. Idealmente ha de registrarse la presión de salida del LCR y observarse si su aspecto es transparente, opalino o turbio, lo que sucede cuando el número de células (leucocitos) está aumentado y existen microorganismos.

El líquido debe procesarse inmediatamente después de su obtención y no conservarse en la nevera, manteniéndolo a temperatura ambiente para evitar la destrucción del meningococo y otros microorganismos lábiles, excepto si debe conservarse para el cultivo vírico o para la detección de antígeno, en cuyo caso se ha de separar y guardar 1 ml en nevera a 4° C, hasta un máximo de 24 horas.

El LCR no es una buena muestra para el diagnóstico etiológico de las encefalitis víricas; su estudio en estos casos es poco útil, excepto cuando se emplean técnicas de amplificación. La biopsia cerebral tiene un mayor rendimiento; pero, por razones obvias, debe restringirse a indicaciones precisas y excepcionales. De hecho, esa muestra ha dejado de ser el *gold standard* para el diagnóstico de la encefalitis herpética desde que se dispone de la PCR para el virus del herpes simple en el LCR, prueba que resulta muy sensible y específica. Con frecuencia la cantidad de LCR remitido al laboratorio no es suficiente para realizar todas las pruebas solicitadas, en ese caso si en el papel de petición no se han priorizado los diversos estudios a realizar, antes de iniciar el procesamiento de la muestra debe contactarse con el clínico responsable del paciente para establecer la priorización.

Tabla 16.1
Principales agentes causales de meningitis

	Virus ¹	Bacterias	Hongos	Parásitos
Frecuentes	Virus de la parotiditis ² Enterovirus	Meningococo Neumococo		
Poco frecuentes	Herpes simple Virus de la coriomeningitis linfocitaria	<i>Haemophilus influenzae</i> ² Estreptococo del grupo B ³ Estafilococos coagulasa negativa y propionibacterias ⁴ <i>Escherichia coli</i> y otras enterobacterias ³ Listeria ³ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ^{5,6} Brucela ⁶ Leptospira ⁶ <i>Treponema pallidum</i> ⁶	Criptococo ^{6,7} Cándida	<i>Acanthamoeba</i> ⁸ <i>Naegleria</i> ⁸

¹ Los virus causan con frecuencia cuadros mixtos de meningoencefalitis. Algunos virus, como los JC y BK (poliomavirus), causan meningoencefalitis u otros cuadros específicos del SNC en pacientes inmunodeprimidos (véase texto).

² Está disminuyendo gracias a la vacunación.

³ En el período neonatal y ocasionalmente en adultos o ancianos con cirrosis, diabetes o inmunodeprimidos.

⁴ En pacientes con derivaciones del SNC. Las propionibacterias son anaerobias, lo que debe preverse para su cultivo.

⁵ Suele evolucionar de modo subagudo o crónico.

⁶ Requieren técnicas de diagnóstico específicas por lo que debe advertirse al laboratorio de su sospecha.

⁷ Se da principalmente en pacientes con sida.

⁸ Amebas de vida libre. Son extraordinariamente infrecuentes.

Nota: Las infecciones recidivantes por neumococo, *H. influenzae* o estreptococo del grupo A deben hacer pensar en una fístula o una fisura.

ESTUDIO BIOLÓGICO DEL LCR

El estudio del número y tipo de leucocitos y la cuantificación de la glucosa y las proteínas del LCR ayuda a orientar el diagnóstico etiológico de las meningitis. En las infecciones bacterianas aparece un gran número de leucocitos polimorfonucleares con tasas muy altas de proteínas y la glucosa suele estar muy disminuida. En las infecciones causadas por *M. tuberculosis* o criptococo

aparecen linfocitos e incremento de las proteínas con cifras de glucosa moderadamente bajas. En las infecciones por virus existe un incremento de linfocitos y de proteínas con cifras de glucosa normal (Tabla 16.2).

La determinación de la adenosindeaminasa (ADA) es muy útil para el diagnóstico de la meningitis tuberculosa.

Se ha sugerido que la determinación de la proteína C reactiva, el ácido láctico y la procalcitonina en el LCR

Tabla 16.2
Características biológicas del líquido cefalorraquídeo

LCR	Normal	Meningitis		
		Víricas	Bacterianas	Tuberculosa criptocócica
Aspecto	Cristalino	Opalino	Turbio	Opalino/Turbio
Células/ μ l	0-5	50-500	1.000-10.000	5-1.000
Tipo	Linfocitos	Linfocitos	Polimorfonucleares	Linfocitos ¹
Glucosa (mg/dl)	50-80	Normal	Muy baja (<10)	Baja 15-30
Proteínas (mg/dl)	15-45	55-100	>100	>100

Los valores de adenosín-deaminasa (ADA) en LCR >10 UI/l son indicativos de meningitis tuberculosa.

¹ Inicialmente predominan los leucocitos polimorfonucleares, pero muy pronto aparece un claro predominio de los linfocitos.

puede ser útil para el diagnóstico diferencial de las meningitis bacterianas y víricas.

PROCESAMIENTO MICROBIOLÓGICO

Examen directo

Debe practicarse una tinción de Gram del sedimento del LCR centrifugado para observar la posible presencia de bacterias (Fig. 16.3). En ocasiones se observan precipitados que pueden confundirse con bacterias, por lo que es útil realizar una tinción con azul de metileno, colorante en el que raramente se forman precipitados. Si se sospecha una meningitis tuberculosa, debe efectuarse una tinción de auramina o Ziehl-Neelsen. La observación del sedimento del LCR centrifugado contrastado con tinta china permite la visualización de levaduras capsuladas, lo que indica la presencia de criptococo. Para eliminar los hematíes, que pueden confundirse con criptococos, es recomendable añadir al sedimento del centrifugado depositado en el porta una gota de KOH (Fig. 5.7).

El método recomendado para el diagnóstico de las meningitis amebianas es el examen en fresco del sedimento del LCR obtenido tras una centrifugación suave (150 g/5 minutos). Posteriormente la preparación puede teñirse por el método de Giemsa o tricómico (véase el capítulo 7).

Cultivo

Para el cultivo del meningococo, neumococo y *H. influenzae*, que son bacterias exigentes, el LCR debe sembrarse en agar sangre y agar chocolate. El resto de bacterias crece también en esos medios, que deben incubarse durante 48 horas a 37° C en atmósfera hipercápica (5-7% de CO₂). Algunas bacterias causantes de meningitis neonatal, como *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli*, aunque crecen bien en los medios señalados, se dispone para ellas de medios selectivos diferenciales (Fig. 16.4). Si se sospecha la presencia de criptococo u otros hongos puede utilizarse agar Sabouraud incubado de tres a siete días a 28° C, aunque

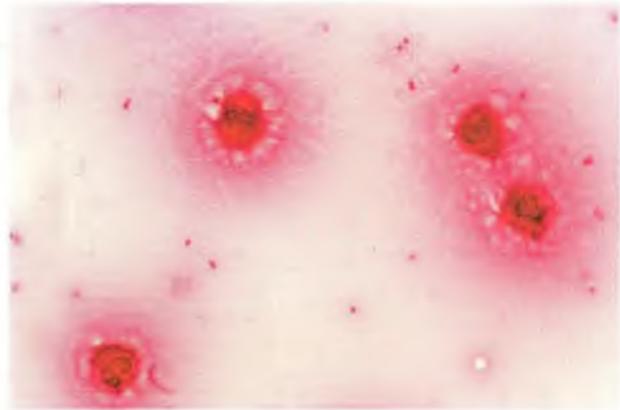


Figura 16.3. Gram del líquido cefalorraquídeo.

Gram del LCR de un paciente con meningitis. Se observan diplococos gramnegativos compatibles con meningococo.

también crece en los medios señalados, siempre que se tenga la precaución de prolongar su incubación durante una semana.

En enfermos neuroquirúrgicos con derivaciones internas del LCR, así como en meningitis recidivantes y abscesos cerebrales, las muestras se sembrarán en placas de agar sangre incubadas en aerobiosis y anaerobiosis, dada la posibilidad de encontrar bacterias anaerobias entre los agente causales (Tablas 16.1 y 16.4).

Para el diagnóstico de las meningitis bacterianas o fúngicas está indicado efectuar hemocultivos, en particular cuando se sospecha la presencia de meningococo, neumococo, brucela, *E. coli*, listeria o criptococo.

Para el cultivo de *M. tuberculosis* la muestra debe sembrarse en el medio de Löwestein-Jensen, o mejor en medios como el 7H11 de Middlebrook, utilizados para la detección precoz del crecimiento mediante sistemas semiautomatizados radiométricos o no radiométricos, (BACTEC®, MB-BacT®, MGIT® y otros) (véase el capítulo 4).

Para el aislamiento de virus, como el de la parotiditis y algunos enterovirus, como los poliovirus o los echo, debe inocularse el LCR en líneas celulares como la Vero

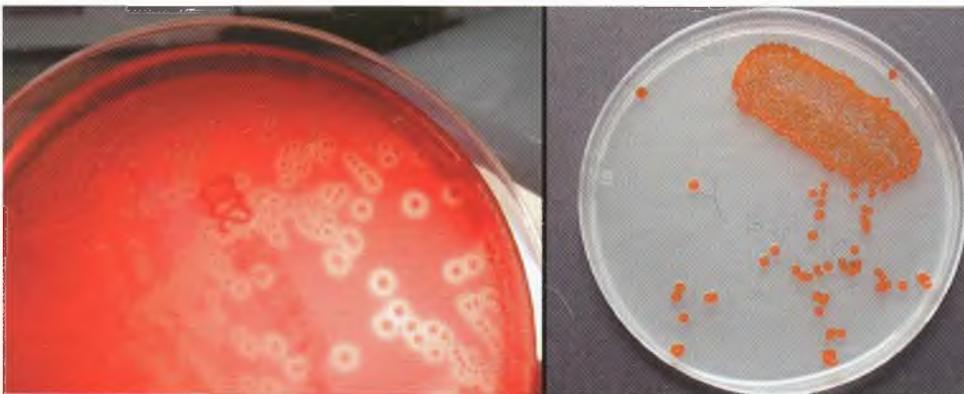


Figura 16.4. Cultivo de *Streptococcus agalactiae*.

Puede observarse en una placa de agar sangre la hemólisis beta de un estreptococo del grupo B, aislado del líquido cefalorraquídeo de un niño con una meningitis neonatal (izquierda).

Este microorganismo da lugar a colonias con un discreto pigmento anaranjado que se evidencia mejor en las placas incubadas en anaerobiosis y es particularmente intenso en el medio de Granada, como el que se muestra en esta figura (derecha).

y la A-549; pero el aislamiento de virus por cultivo del LCR en las meningitis víricas es poco frecuente, excepto que se inoculen muestras obtenidas muy precozmente. Los virus que causan meningitis se aíslan con más frecuencia de muestras obtenidas de la puerta de entrada (faringe) o vía de eliminación (heces), pero su aislamiento de esos territorios no permite decidir de forma absoluta si son los que están causando la meningitis. Las técnicas de amplificación permiten la detección de enterovirus en el LCR. Si se sospecha la presencia de virus exóticos en viajeros, es recomendable remitir la muestra a un centro especializado.

DETECCIÓN DE ANTÍGENO

Las infecciones meníngeas causadas por neumococo, meningococo, estreptococo del grupo B, *H. influenzae* y criptococo pueden diagnosticarse por detección de antígenos de esos microorganismos en el LCR (técnicas de aglutinación, látex, inmunocromatografía, EIA y otras) o en la orina utilizando reactivos comercializados. Hay que señalar, sin embargo, que no existen buenos reactivos para la detección del meningococo del grupo B. En todo caso, para el desarrollo de estas pruebas hay que atenerse a las normas de los fabricantes (véase el capítulo 8).

PRUEBAS DE AMPLIFICACIÓN

Se utilizan técnicas de amplificación en LCR para detectar el meningococo, el neumococo, el estreptococo del grupo B, *H. influenzae* y otras bacterias causantes de meningitis. Existen diversos abordajes, como utilizar cebadores específicos de cada microorganismo en ampliificaciones simples o múltiples, o amplificar una región del 16S rDNA. Para la detección de *M. tuberculosis* también pueden utilizarse estas técnicas, que están automatizadas y comercializadas aunque el rendimiento es bajo, dado que el número de bacilos en la muestra de LCR suele ser muy escaso.

Las técnicas de amplificación son de elección en algunas infecciones víricas del SNC, como las causadas por herpesvirus, enterovirus, virus del sarampión, virus de la parotiditis y virus JC, sin embargo, sólo están comercializados los reactivos para herpesvirus y enterovirus (véase el capítulo 9).

PRUEBAS SEROLÓGICAS

El diagnóstico serológico convencional (muestra de suero) ayuda al diagnóstico de aquellas infecciones sistémicas que ocasionalmente pueden localizarse en el SNC, como la sífilis, la brucelosis o el virus del sarampión. Pero en ocasiones la afectación específica del SNC por un microorganismo puede diagnosticarse mediante

la constatación de un título de anticuerpos específicos para ese microorganismo en el LCR superior al título del suero¹. Así sucede en las infecciones causadas por *Treponema pallidum* (sífilis), en la que la positividad de la prueba del VDRL es diagnóstica de neurolúes, *Borrelia burgdorferi*, brucela, arbovirus y virus del sarampión en la forma tardía de panencefalitis esclerosante subaguda y otras. Este tipo de pruebas, excepto el VDRL para el diagnóstico de la sífilis del SNC y la serología brucelar por técnica convencional, se suelen efectuar en laboratorios especializados.

ENCEFALITIS

En la mayoría de las meningitis se asocia un componente de encefalitis. Las encefalitis en su forma más genuina están causadas por virus que tienen tropismo por el SNC y afectan de un modo difuso el encéfalo. Algunas infecciones víricas, por un mecanismo inmunitario producen un cuadro de encefalitis sin afectación directa del virus al SNC, cuadro que aparece tardíamente en la evolución de la enfermedad y que se denomina encefalomielitis aguda o meningoencefalitis «postinfecciosa» (Tabla 16.3).

Tabla 16.3

Encefalitis víricas. Principales agentes causales

Encefalitis primarias
Virus de distribución universal
Virus del herpes simple 1
Virus de la varicela
Virus de la parotiditis
Virus del sarampión
Enterovirus
Virus de la inmunodeficiencia humana
Virus de distribución restringida
Arbovirus:
Alfavirus
Flavivirus
Bunyavirus
Arenavirus
Encefalitis secundaria o «postinfecciosa» ¹
Virus de la varicela
Virus de la parotiditis
Virus del sarampión
Virus de la rubéola
Virus de la vacuna de la viruela
Diversos virus respiratorios y entéricos

¹ Las encefalitis primarias son consecuencia de la multiplicación del virus en el SNC, en tanto que las secundarias se producen por mecanismo inmunológico y aparecen tardíamente tras un período de 2 a 15 días.

¹ Si la barrera está intacta, la concentración de anticuerpos en LCR es de 0,5-1% de la concentración en sangre; en caso contrario ha de ser correlacionada con la cantidad de proteínas presentes en el LCR en relación al plasma.

La clínica de la encefalitis se caracteriza por fiebre, cefalea, confusión, obnubilación, paresias de los pares craneales y convulsiones, síntomas que pueden asociarse a signos meníngeos más o menos evidentes, ya que con frecuencia la afectación del encéfalo también se acompaña de mayor o menor afectación meníngea.

En las encefalitis víricas, como en las meningitis de esta etiología, el LCR presenta valores de glucosa normales con proteínas y células mononucleares aumentadas. En los casos de encefalitis el aislamiento del virus del LCR mediante cultivo en líneas celulares suele ser infrecuente. La PCR del LCR es la técnica de elección para el diagnóstico de estas encefalitis; existen reactivos comercializados para el virus del herpes simple, enterovirus, pero no hay duda de que progresivamente se comercializarán otros.

En el sarampión se puede producir, años después de la infección, una panencefalitis esclerosante subaguda, y en los pacientes inmunodeprimidos puede reactivarse un poliomavirus (virus JC) y causar la leucoencefalitis multifocal progresiva. En la primera los títulos de anticuerpos antisarampión en el LCR son superiores a los de la sangre (suero). La leucoencefalitis por virus JC se diagnostica por PCR del LCR.

ABSCESO CEREBRAL

Los abscesos cerebrales son infecciones piógenas o necrotizantes de etiología bacteriana localizadas en el encéfalo que se producen por vía hematógena desde diversos focos. En ocasiones se producen por contigüidad desde la mastoides o los senos paranasales infectados; también pueden producirse tras fractura de la caja craneana o tras una intervención neuroquirúrgica. Los

agentes etiológicos suelen estar en relación con su origen y con el factor predisponente (sida, drogadicción) (Tabla 16.4).

La sintomatología es variable y pueden darse signos focales, como un proceso expansivo.

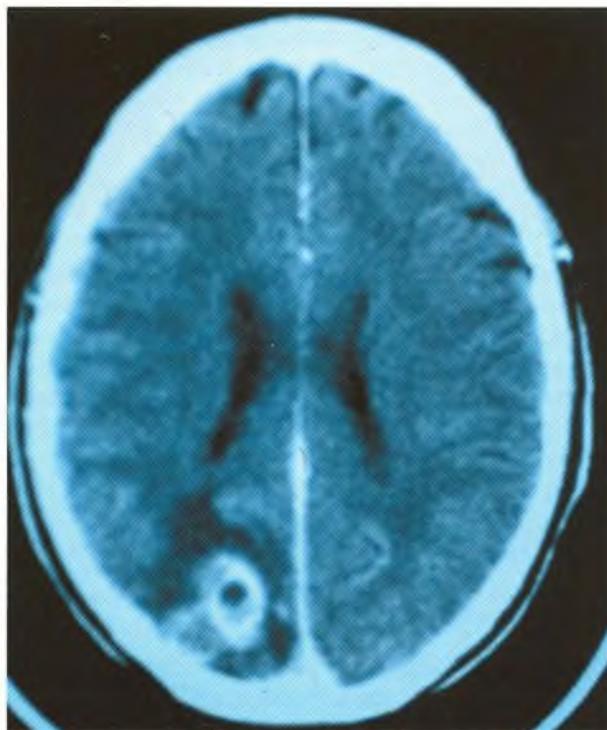


Figura 16.5. Absceso cerebral.

Tomografía axial computarizada en la que se observa una lesión en anillo, con edema perilesional de localización occipital, correspondiente a un absceso cerebral piógeno.

Cortesía del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Vall d'Hebron.

Tabla 16.4

Absceso cerebral. Patogenia y etiología

Patogenia	Etiología
Por contigüidad a partir de focos de:	
Mastoiditis, sinusitis	Estreptococos aerobios y anaerobios, bacilos gramnegativos anaerobios, enterobacterias, estafilococo, hemófilos
Empiema subdural	Estreptococos, neumococo, estafilococos, hemófilos
Por traumatismos o heridas penetrantes	Estafilococos, estreptococos, enterobacterias, pseudomonas
Hematógenas asociadas a:	
Drogadicción	Estafilococos, cándida, pseudomonas
Endocarditis	Estreptococos, estafilococos
Bronquiectasias o fístulas arteriovenosas pulmonares	Bacilos gramnegativos anaerobios, estreptococos, nocardia, hemófilos
Infección dental	Estreptococos, bacteroides
Sida	Toxoplasma, criptococo, nocardia, micobacterias
Shunt D/I congénitos	Estreptococos

El 70% de los abscesos cerebrales son polimicrobianos originados por contigüidad o a partir de una supuración dental o broncopulmonar crónica. Shunt D/I: Shunt derecho/izquierdo.

El diagnóstico se efectúa mediante técnicas de imagen (tomografía axial computarizada o resonancia magnética). Los criterios para el diagnóstico y la toma de muestras deben individualizarse (punción para cultivo) (Fig. 16.5). La punción lumbar es peligrosa, ya que puede producirse una hernia transtentorial y no suele aportar el diagnóstico, excepto que el absceso se haya abierto y

drene al espacio subaracnoideo. Aunque el LCR no es una buena muestra para el diagnóstico etiológico de los abscesos cerebrales, pueden hallarse incrementadas las proteínas y la celularidad por una reacción de vecindad. Para el diagnóstico etiológico del absceso cerebral debe estudiarse el pus obtenido por aspiración del absceso si se ha considerado adecuado obtener la muestra.

INFECCIONES DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS ALTAS

La mayoría de las infecciones agudas de las vías respiratorias altas, como la rinitis, la faringitis, la epiglotitis y la traqueobronquitis, suelen estar causadas por virus y son benignas y autolimitadas por lo que no requieren diagnóstico ni tratamiento específico, excepto la faringitis estreptocócica, por sus posibles complicaciones tardías (que son la fiebre reumática y la glomerulonefritis postestreptocócica), y la epiglotitis por *Haemophilus influenzae* que produce un cuadro muy grave de asfixia ante cuya sospecha hay que efectuar el traslado urgente del enfermo al hospital.

En la bronquitis crónica y en las sobreinfecciones de las bronquiectasias y la fibrosis quística, procesos en los que la infección bacteriana desempeña un papel preeminente, se aísla *Streptococcus pneumoniae* (neumococo), *H. influenzae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* entre otras bacterias.

Las estructuras pararespiratorias están formadas por la conjuntiva, los senos paranasales y el oído medio. Las

conjuntivitis suelen ser de etiología vírica, pero también pueden estar causadas por bacterias. En la conjuntivitis del recién nacido hay que pensar en el gonococo y la clamidia. Las otitis medias agudas son propias de los niños y suelen estar causadas por neumococo o *H. influenzae*. Las sinusitis también corresponden a esta etiología (Tabla 17.1 y Figs. 17.1 a 17.4).

Estudio microbiológico

La toma del exudado de la conjuntiva y de la faringe se ha de efectuar con un escobillón con un medio de transporte como el de Stuart o Amies. Si estas muestras se procesan rápidamente, además de los estudios bacteriológicos (neumococo, hemófilos, gonococo, etc.) pueden ser utilizadas para efectuar los estudios virológicos y de clamidias; pero si el estudio virológico no puede efectuarse inmediatamente al llegar al laboratorio, el escobillón debe transferirse a un medio de transporte para virus tipo Hanks. Es fácil entender que en estos casos sea recomendable efectuar la toma con dos escobillones, uno para estudio bacteriológico y otro para estudio virológico. Existen comercializados tubos y escobillones con medio de transporte para virus.

Tabla 17.1

Etiología de las infecciones respiratorias de vías altas y estructuras pararespiratorias

Rinitis (resfriado común)	Rinovirus, coronavirus y otros virus respiratorios ¹
Faringitis ²	<i>Streptococcus pyogenes</i> . Adenovirus. Enterovirus y otros virus respiratorios ¹ . Virus de Epstein-Barr
Epiglotitis (supraglotitis) ³	<i>Haemophilus influenzae</i>
Traqueobronquitis ⁴	Virus parainfluenza, virus respiratorio sincitial y otros virus respiratorios ¹ . Neumococo. <i>H. influenzae</i> . Otras bacterias ⁵
Otitis media	Neumococo. <i>H. influenzae</i>
Sinusitis	Neumococo. <i>H. influenzae</i> . Bacterias anaerobias
Conjuntivitis ⁶	Adenovirus. Enterovirus. Neumococo. <i>H. influenzae</i> . Estreptococo del grupo A

¹ El grupo denominado «virus respiratorios» está formado por los virus de la gripe, respiratorio sincitial, parainfluenza, metaneumovirus, adenovirus, coronavirus, rinovirus y algunos enterovirus cuya patología es preferentemente respiratoria.

² La única bacteria que causa faringitis, con frecuencia significativa, es *Streptococcus pyogenes* (excepcionalmente: el estreptococo β hemolítico del grupo C y *Arcanobacterium haemolyticum*). La difteria es excepcional debido a la vacunación.

³ La infección es muy grave. No debe intentarse tomar una muestra en el medio ambulatorio, ya que puede desencadenarse un espasmo. Ante la sospecha de este diagnóstico debe trasladarse urgentemente el paciente al hospital.

⁴ Las infecciones crónicas de la vía respiratoria responden a una patogenia determinada (tabaquismo, bronquiectasias).

⁵ En pacientes con bronquiectasias y fibrosis quística se aísla además *Pseudomonas aeruginosa* y otros bacilos gramnegativos multirresistentes. Existe una forma de traqueobronquitis semiinvasiva por aspergilos que se ve preferentemente en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica tratadas con corticoides y trasplantados de pulmón.

⁶ Las formas neonatales pueden estar causadas por el gonococo y la clamidia.

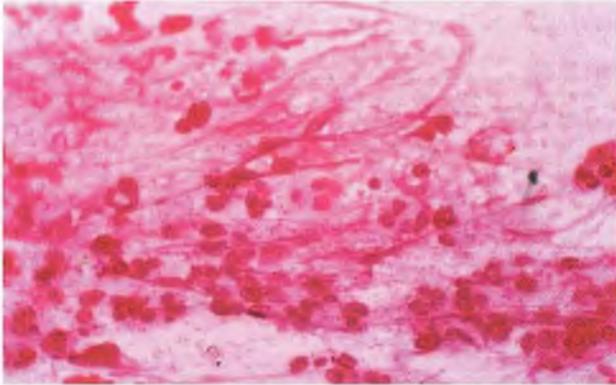


Figura 17.1. Supuración bronquial. Tinción de Gram.

Los pacientes con bronquitis crónica suelen padecer reactivaciones de origen bacteriano con abundante broncorrea (esputo abundante y purulento). Puede observarse el esputo de un paciente que presentaba una reactivación causada por *Haemophilus influenzae*. El neumococo también es un agente causal frecuente de estas reactivaciones. En los pacientes tratados de modo prolongado con antibióticos puede aislarse *Pseudomonas aeruginosa* y en los que han recibido tratamientos intensos y prolongados con corticoides se pueden observar cuadros de aspergilosis semiinvasiva.



Figura 17.2. Conjuntivitis vírica.

Conjuntivitis por adenovirus. Las conjuntivitis víricas suelen ser bilaterales y en ocasiones tienen carácter epidémico.

Cortesía del Servicio de Oftalmología. Hospital Vall d'Hebron.

De cualquier manera, aunque la toma del exudado orofaríngeo con escobillón es adecuada para el estudio bacteriológico de la faringitis, lo ortodoxo, para realizar los estudios virológicos, es la obtención de un aspirado de moco nasofaríngeo que debe introducirse en un recipiente con medio adecuado para virus, como el de Hanks o, alternativamente, con suero fisiológico estéril. Esta muestra es adecuada para el estudio de bordetela, pero si se ha recogido en Hanks debe comprobarse que no sea una fórmula con antibióticos.

La toma de muestra de una conjuntivitis se realiza con escobillón de modo semejante a la de la faringitis.

La toma de muestra del oído medio con el tímpano intacto o de los senos paranasales es difícil y debe ser



Figura 17.3. Otitis media aguda.

Puede verse la hiperemia y la protusión timpánica por el pus a tensión en el oído medio.

Cortesía del Servicio de Otorrinolaringología. Hospital Vall d'Hebron.

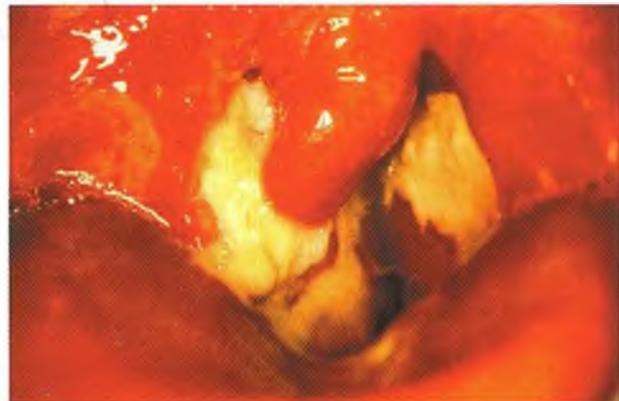


Figura 17.4. Faringoamigdalitis pultácea.

En esta imagen se muestra una amigdalitis pultácea aguda que corresponde a un paciente con mononucleosis infecciosa. La presencia de placas de pus sobre una amígdala inflamada es característica de la faringitis por estreptococo del grupo A (*S. pyogenes*), pero también es propia de la faringitis que acompaña a la mononucleosis causada por el virus de Epstein-Barr.

Cortesía del doctor F. Moraga-Llop. Servicio de Pediatría. Hospital Infantil Vall d'Hebron.

efectuado por un especialista, ya que si no drenan espontáneamente se requiere practicar una punción.

En los pacientes con bronquitis crónica o bronquiectasias la muestra a recoger es el esputo. Los cultivos bacterianos (y víricos si están indicados) deben realizarse según los métodos convencionales señalados para las infecciones pulmonares teniendo en cuenta los agentes causales en cada proceso. La siembra de una placa de agar sangre y otra de agar chocolate (incubadas en aerobiosis) es el requerimiento mínimo para el cultivo de las bacterias.

INFECCIONES PULMONARES

Para que se produzca una infección pulmonar los microorganismos deben alcanzar el pulmón a través de la vía respiratoria o por vía hemática a partir de un foco séptico distante. La mayoría de las neumonías se producen por el primer mecanismo.

En la etiología de las infecciones pulmonares influye la edad, la epidemiología regional y estacional y la naturaleza de los factores predisponentes del paciente, que incluyen desde enfermedades respiratorias locales, como las bronquiectasias, hasta enfermedades generales, como la inmunodepresión (Tablas 17.2 y 17.3).

En los lactantes la bronquiolitis y la bronconeumonía están causadas por virus como el respiratorio sincitial y otros virus respiratorios y enterovirus, pero también pueden estar causadas por bacterias como el neumococo y los hemófilos.

El neumococo causa neumonía con mayor frecuencia en los niños y los ancianos. Son infecciones de curso agudo caracterizadas por un cuadro de neumonía típica con dolor en punta de costado, tos seca, fiebre elevada, obnubilación y leucocitosis, con pronóstico grave. En ocasiones la clínica puede resultar atípica debutando en el anciano con un cuadro de desorientación (Fig. 17.5).

Aunque la gripe es fundamentalmente una infección del árbol traqueobronquial, en un porcentaje de casos puede ocasionar neumonía, que suele ser grave en el anciano y sobreinfectarse con neumococo.

Las infecciones en los adultos jóvenes están causadas por *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydothila pneumoniae* y poseen en general buen pronóstico. Las infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* afectan inicialmente al pulmón y pueden difundir por contigüidad a los ganglios linfáticos y por vía hemática al riñón, las meninges y los huesos. Tras la curación del episodio de primoinfección pulmonar, la enfermedad puede reactivarse meses o años después (Fig. 17.6). *Mycobacterium kansasii* es una micobacteria ambiental que puede causar infecciones pulmonares difíciles de diferenciar de la tuberculosis en personas previamente sanas o con patología local respiratoria.

Las infecciones por legionela se producen mediante aerosoles desde su reservorio acuático, afectan principalmente a personas mayores con broncopatías crónicas y poseen un pronóstico grave.

Tras la aspiración de secreciones orofaríngeas por etilismo agudo, anestesia, coma u otros factores, puede producirse una infección pulmonar polimicrobiana incluyendo flora anaerobia, que aboca al absceso de pulmón o a la neumonía necrotizante (Fig. 17.7).

Tabla 17.2
Etiología de la neumonía en el paciente previamente sano

	Niños	Jóvenes y adultos	Ancianos
Frecuentes	Virus respiratorios ¹ : Virus respiratorio sincitial Virus de la gripe Virus parainfluenza Adenovirus Enterovirus <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Neumococo <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Chlamydothila pneumoniae</i>	Neumococo Virus de la gripe
Menos frecuentes	Neumococo	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ² <i>Legionella pneumophila</i> <i>Coxiella burnetii</i> Virus de la gripe	<i>Legionella pneumophila</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Virus respiratorio sincitial <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>

Todos los agentes señalados causan infección con frecuencia significativa. Su frecuencia relativa varía según la edad, el ambiente epidemiológico, la localización geográfica y otros factores.

La neumonía por aspiración está causada por asociaciones de bacterias de la boca (estreptococos, bacterias anaerobias y ocasionalmente bacilos gramnegativos).

Las infecciones por *Histoplasma capsulatum*, coccidioides y otros hongos dimórficos no son autóctonas de Europa occidental.

¹ La incidencia mundial de metaneumovirus y coronavirus no es conocida con precisión. En determinadas circunstancias pueden causar neumonía otros virus como el citomegalovirus, el virus de la varicela-zoster o el hantavirus.

² Con menor frecuencia *M. kansasii*.

Tabla 17.3
Infecciones pulmonares en pacientes con factores predisponentes

Pacientes intubados	Pacientes postoperados
Aparición precoz: <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> Neumococo	Neumococo Enterobacterias ² Flora mixta ³ (aspiración)
Aparición tardía: BGN aerobios ¹ Enterobacterias ²	
Pacientes granulopénicos	Pacientes con sida
Aparición precoz: BGN aerobios ¹ Enterobacterias ²	<i>Pneumocystis (carinii) jiroveci</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>M. avium</i> y otras micobacterias
Aparición tardía: <i>Aspergillus</i> ⁴ Cándida	Citomegalovirus Neumococo Nocardia ⁵

¹ *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros.

² *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y otras.

³ Formada por bacterias aerobias y anaerobias de la cavidad oral y eventualmente bacilos gramnegativos (enterobacterias).

⁴ Las aspergilosis pulmonares invasivas en los pacientes granulopénicos son de presentación aguda y rápidamente progresivas; existe también una forma de aspergilosis semiinvasiva de mejor pronóstico que se da en enfermos con broncopatías crónicas sometidos a tratamientos prolongados con corticoides.

⁵ Las infecciones por nocardia también pueden darse en pacientes bajo tratamiento prolongado con corticoides.

BGN: bacilos gramnegativos.



Figura 17.5. Neumonía neumocócica.

Neumonía neumocócica en el lóbulo superior derecho. La neumonía neumocócica es el paradigma de la neumonía bacteriana. Afecta a un lóbulo o segmento broncopulmonar, siendo por tanto unilateral y presenta broncograma aéreo, aunque en ocasiones se producen formas bronconeumónicas que afectan a varios segmentos. Se puede acompañar de derrame pleural.

Cortesía del doctor F. Moraga-Llop. Servicio de Pediatría. Hospital Infantil Vall d'Hebron.

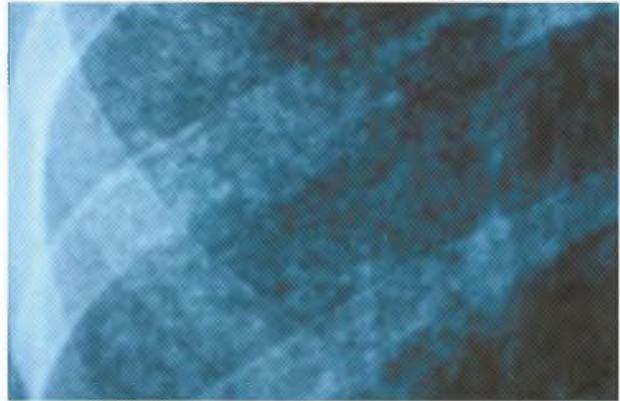


Figura 17.6. Tuberculosis miliar.

Imagen característica en «granos de mijo» de un paciente afecto de tuberculosis miliar.

Cortesía del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Vall d'Hebron.

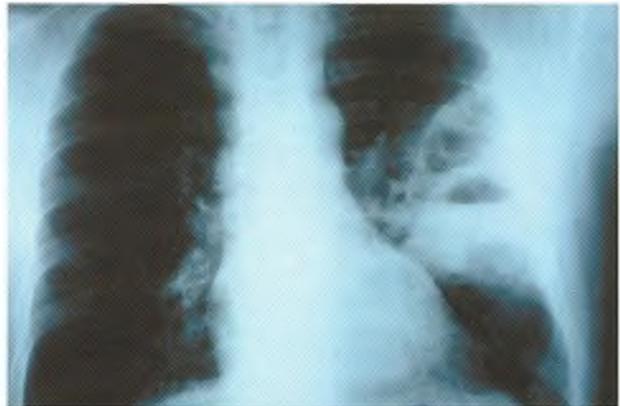


Figura 17.7. Absceso pulmonar.

Lesión pulmonar cavitada con nivel hidroaéreo correspondiente a un absceso pulmonar evolucionado.

Cortesía del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Vall d'Hebron.

En pacientes inmunodeprimidos, especialmente con el sida, es muy frecuente que la tuberculosis se presente con forma atípica (formas extrapulmonares, diseminadas, etc.). En estos pacientes también son frecuentes las infecciones respiratorias por *Mycobacterium avium* y *Pneumocystis jiroveci* así como por nocardia.

En los enfermos granulopénicos son frecuentes las infecciones bacterianas y, afortunadamente, menos frecuentes las infecciones por aspergilos y otros hongos filamentosos, que tienen un pronóstico muy grave.

Aunque las infecciones por virus respiratorios en su mayoría se localizan en los pacientes inmunodeprimidos en las vías respiratorias altas también pueden afectar al pulmón (virus de la gripe, virus respiratorio sincitial, citomegalovirus, adenovirus, enterovirus, varicela y otros).

En los enfermos intubados, las infecciones de aparición precoz están causadas por *S. aureus* y *H. influenzae* y las tardías por bacilos gramnegativos, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos aerobios. Los hongos dimórficos, como histoplasma, blastomices, coccidioides, paracoccidioides y otros, son de distribución restringida a algunas áreas geográficas (véase el capítulo 5). Cuando sus esporas son inhaladas causan infección pulmonar que puede diseminarse produciendo metástasis. El cuadro clínico recuerda a la tuberculosis.

TOMA DE MUESTRAS

Para comprender los métodos utilizados para el diagnóstico etiológico de las neumonías y la interpretación de los resultados es básico recordar que hay dos tipos de microorganismos causantes de estas infecciones:

1. Los patógenos que no forman parte de la flora normal, como *M. tuberculosis*, *L. pneumophila*, *P. jiroveci*, *Histoplasma capsulatum* y los virus respiratorios.

2. Los que se hallan en la vía respiratoria formando parte de la flora comensal normal o telúrica, como el neumococo o *H. influenzae*, cándida y aspergilos entre otros.

Para el diagnóstico de las infecciones causadas por el primer grupo de microorganismos, cualquier muestra que contenga secreción respiratoria de las vías bajas, como el esputo o el lavado broncoalveolar, es útil, ya que el microorganismo sólo se halla en el tracto respiratorio cuando está produciendo infección.

De todas maneras, el esputo debe ser de buena calidad, ya que si no contiene secreciones de la vía baja y únicamente está formado por saliva no podrá obtenerse un resultado fiable. Por ello, las muestras de esputo deben examinarse atentamente antes de aceptarlas, rechazando las formadas principalmente por saliva. Posteriormente, la calidad de la muestra debe recontrolarse por el Gram, evaluando la proporción de leucocitos polimorfonucleares en relación con las células epiteliales del tracto respiratorio superior. Para que la muestra sea aceptada ha de tener más de 25 polimorfonucleares y menos de 10 células epiteliales cuando se observa a 100 aumentos.

Con el fibrobroncoscopio pueden tomarse muestras de un segmento pulmonar mediante lavado broncoalveolar, instilando suero fisiológico estéril que después se aspira. Esta técnica explora una gran área pulmonar, pero no es tan selectiva como la que utiliza el cepillo protegido, por lo que sólo es útil para detectar los microorganismos que normalmente no se hallan como comensales en la vía respiratoria, como micobacterias, legionela, histoplasma, pneumocistis, citomegalovirus y otros virus.

Para el diagnóstico de las infecciones pulmonares víricas puede utilizarse como muestra el material obtenido mediante aspirado nasofaríngeo. Para su obtención se introduce hasta la nasofaringe una sonda conectada a una jeringa que contiene de 2 a 3 ml de suero fisiológico estéril; se aspira hasta que se observa moco en la sonda; se retira y se coloca en un tubo estéril, recogiendo el moco con el suero fisiológico de la jeringa. También existen comercializados recipientes con sonda incorporada, que pueden conectarse a un aspirador para obtener la muestra de moco nasofaríngeo (Vygon Corporation). Estas muestras además del cultivo permiten efectuar estudios de detección de antígenos de virus respiratorios (Fig. 17.8).

Para el diagnóstico de las infecciones causadas por microbios que forman parte de la flora normal, como el neumococo, los hemófilos, los aspergilos y otros, sólo las muestras obtenidas del foco de infección sin contaminación orofaríngea, mediante el cepillo protegido o por biopsia, permitirán el diagnóstico de certeza de las infecciones por este grupo de microorganismos.

En efecto, utilizando el fibroscopio¹ pueden tomarse muestras mediante un pequeño cepillo dispuesto al final de un filamento que pasa a través de una cánula y ésta a su vez por un tubo situado en la luz del fibroscopio (cepillo protegido). Una vez extraído el cepillo se corta y se introduce en un tubo con 1 ml de suero fisiológico estéril. Las muestras tomadas por este método permiten estudiar todos los patógenos, incluyendo las bacterias que colonizan la orofaringe porque recogen la muestra de una zona próxima al foco de infección y no suelen contaminarse con la flora comensal de las vías altas² (Fig. 12.4).

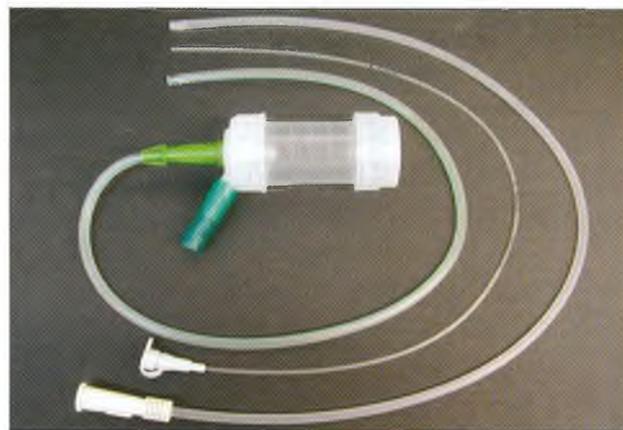


Figura 17.8. Aspirado nasofaríngeo.

Para efectuar un lavado nasofaríngeo debe prepararse una jeringa con 2 ó 3 ml de suero fisiológico estéril, unida a una sonda fina de plástico de unos centímetros de longitud. Se introduce la sonda por la nariz hasta la faringe y se aspira el moco. Alternativamente la sonda puede unirse a un recipiente como el mostrado en esta figura, que se empalma a un aspirador.

¹ La fibroscopia de la vía respiratoria posee contraindicaciones.

² El hecho de introducirlo en un volumen conocido de líquido es para efectuar cultivos cuantitativos que ayudan a interpretar el significado del aislamiento.

La punción transparietal con aguja ultrafina o la biopsia pulmonar son técnicas alternativas para tomar muestras del pulmón sin contaminación; sin embargo, son métodos agresivos por lo que deben seleccionarse muy bien sus indicaciones y ser realizadas por personal experimentado en condiciones de total asepsia.

En pacientes intubados en los que está contraindicada o es peligrosa la fibroscopia puede efectuarse una aspiración de la secreción bronquial mediante una cánula. Estas muestras sólo permiten aislar la flora colonizante de la tráquea y los bronquios, por tanto poseen poco valor predictivo para el diagnóstico de una neumonía, ya que no necesariamente esa flora es la que está produciendo la infección pulmonar.

Todas las muestras deben remitirse rápidamente al laboratorio y conservarse según se indica en la tabla 12.2, pero las muestras obtenidas por técnicas agresivas (fibroscopia y biopsia) son obviamente de gran responsabilidad y deben remitirse de modo personalizado y con la petición bien cumplimentada para permitir su procesamiento correcto.

El hemocultivo puede dar la clave del diagnóstico cuando la infección pulmonar se acompaña de bacteriemia (10 al 30% de los casos), por lo que es recomendable practicarlo siempre que se sospeche una neumonía bacteriana.

Es muy útil recoger una muestra de 10-15 ml de orina para detección de antígeno de neumococo y legionela, que debe conservarse en nevera a 4-6° C.

En un futuro próximo las técnicas de amplificación genética desarrollarán un gran papel en el diagnóstico de las infecciones causadas por patógenos respiratorios que no forman parte de la flora normal (véase más adelante).

Para serología debe recogerse una muestra de suero lo más precozmente posible y otra tres semanas después, debiendo conservarse congeladas para su estudio en paralelo.

En resumen, para el diagnóstico de una neumonía debe recogerse:

1. Una muestra respiratoria adecuada al microorganismo sospechado (esputo, aspirado nasofaríngeo, bronquial, lavado, cepillado, biopsia).
2. Practicarse un hemocultivo.
3. Recoger orina para detección de antígeno.
4. Tomar dos muestras de suero, una al inicio de la enfermedad y otra tres o cuatro semanas después.

PROCESAMIENTO MICROBIOLÓGICO

Examen directo

La tinción de Gram ofrece una idea aproximada sobre la calidad y el tipo de flora bacteriana de las muestras res-

piratorias. Para apreciar la calidad del esputo debe observarse al microscopio a 100 aumentos. Se considerará una muestra apta para cultivo bacteriológico aquella con menos de 10 células epiteliales/campo y más de 25 leucocitos/campo. La ausencia de leucocitos y la presencia de células de descamación significa que no se ha recogido material del foco infeccioso y la muestra está contaminada o formada por saliva por lo que no debe procesarse (Fig. 17.9).

Ya se ha señalado que para diagnosticar presuntamente por el Gram las infecciones por neumococo la muestra ha de ser de calidad excelente (Fig. 17.10). En el absceso de pulmón puede observarse una flora mixta con predominio de anaerobios. Cuando se sospecha una infección por micobacterias debe practicarse en el esputo una tinción con auramina o por el método de Ziehl Neelsen; para obtener un buen rendimiento, la muestra debe ser también de buena calidad.

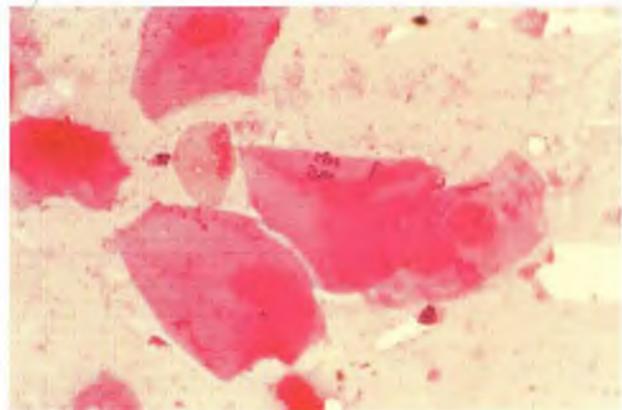


Figura 17.9. Muestra respiratoria contaminada.

En el Gram de este esputo se observan abundantes células del epitelio bucal y una flora muy variada. En realidad se trata de una muestra formada casi exclusivamente por saliva que no debe procesarse.

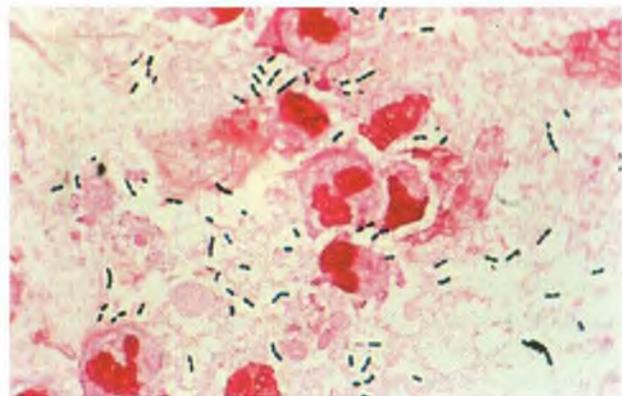


Figura 17.10. Tinción de Gram de un esputo.

Este esputo es una muestra respiratoria de buena calidad. Se observan abundantes leucocitos y una flora prácticamente monomicrobiana en ausencia de células epiteliales. Esta muestra muy probablemente provenía del foco de infección. La siembra de la muestra dio lugar a un cultivo puro de neumococo.

Si se sospecha la existencia de una infección por *L. pneumophila*, microorganismo que no se tiñe fácilmente por la técnica de Gram, puede visualizarse utilizando anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína (inmunofluorescencia directa). La especificidad de esta técnica es buena, pero su sensibilidad es baja en relación al cultivo.

Aunque los hongos levaduriformes se tiñen bien por la técnica de Gram, si se sospecha una infección oportunista por hongos filamentosos puede ser necesaria la aplicación de procedimientos específicos, como la homogeneización de la muestra con potasa y la tinción con azul algodón o blanco de calcoflúor (capítulo 5).

Para la visualización de *P. jiroveci* en las secreciones respiratorias, las tinciones más adecuadas son las de Giemsa (Diff-Quik®), que tiñen los trofozoitos y las estructuras intraquísticas, y la plata metenamina o el azul de toluidina para la tinción de quistes o el blanco de calcoflúor. También existen pruebas de inmunofluorescencia para la detección de este microorganismo.

Mediante inmunofluorescencia directa u otras técnicas inmunológicas pueden detectarse los virus en las secreciones respiratorias, preferentemente del moco nasofaríngeo; la sensibilidad y especificidad de estas técnicas en relación al cultivo celular son francamente buenas.

Cultivo

Los esputos para examen microscópico y cultivo deberían lavarse en suero fisiológico estéril dispuesto en una placa de Petri para seleccionar las partes más purulentas, que son las que deberían procesarse. Sin embargo, como esto es difícil de efectuar con un número importante de muestras, alternativamente se pueden tratar con un fluidificante como la cisteína, que homogeneiza la muestra sin afectar la flora. Esta técnica se diferencia de la de decontaminación utilizada para procesar las muestras para cultivo de legionelas y micobacterias, en las que se homogeneiza y se elimina la flora acompañante³.

Los medios a utilizar para los cultivos bacterianos y fúngicos son medios enriquecidos, selectivos y diferenciales, dependiendo de la sospecha etiológica. Su elección puede variar dependiendo de la experiencia y preferencias de cada laboratorio. Excepto en algunas investigaciones muy específicas como en el caso de la tuberculosis, siempre debe utilizarse medios para el aislamiento de neumococo, hemófilos, estafilococos y bacilos gramnegativos, incorporando cuando sea necesario los medios para el aislamiento de legionela (Fig. 17.11), nocardia (Fig. 21.9), cándida, aspergilos o histoplasma. Debe recordarse que algunos medios son polivalentes (Tabla 17.4).

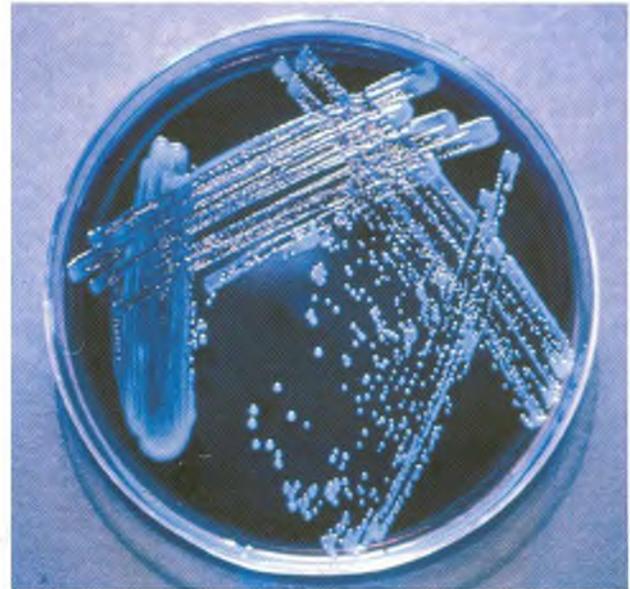


Figura 17.11. Cultivo de *Legionella pneumophila*.

Placa de BCYE α (Buffered charcoal yeast extract), medio selectivo para legionela, con un cultivo de *L. pneumophila*. Las colonias suelen aparecer entre los 5 y 7 días de incubación y poseen un aspecto característico de vidrio deslustrado con bordes iridiscentes. El aspecto varía según las especies. Aunque las colonias de algunas especies muestran fluorescencia con luz ultravioleta, las de *L. pneumophila* no fluorescen.

A pesar de su escaso rendimiento no hay que olvidar la práctica de hemocultivos ante la sospecha de neumonía bacteriana.

Por las dificultades técnicas del cultivo, el diagnóstico convencional de las infecciones por micoplasma, clamidia y coxiela suele hacerse por técnicas de detección de antígeno, de amplificación o serología.

Ya se ha señalado el valor de las diferentes muestras de origen respiratorio para el diagnóstico de estas infecciones. Los resultados de los cultivos para la investigación de aspergilos son de difícil interpretación, ya que generalmente se trata de pacientes sujetos a tratamiento antibiótico en los que la colonización fúngica es frecuente. Sólo una combinación de la clínica, la imagen radiológica, la microbiología y, en su caso la anatomía patológica, permite evaluar a estos pacientes, en los que el tratamiento precoz es fundamental.

Aunque todas las muestras respiratorias deben manipularse bajo medidas de seguridad, ha de recordarse que el bacilo de Koch, la legionela y los hongos dimórficos poseen elevada capacidad patógena (véase el capítulo 11).

La identificación presuntiva de las bacterias y de los hongos aislados debe realizarse por métodos estandarizados y practicarse un antibiograma si está indicado.

³ La fluidificación se efectúa con N-acetil-L-cisteína o ditiotreitól. Existen reactivos comercializados como Sputasol®, Oxoid Inc. Para la decontaminar el esputo para el cultivo de legionela, diluir la muestra al 1/5 en tampón HCl/KCl (pH 2.2), mezclar con vortex y dejar 4 minutos a temperatura ambiente. Sembrar en BCYE y agar sangre. Para micobacterias, ver capítulo 4.

Tabla 17.4
Medios de cultivo para patógenos respiratorios

Microorganismo sospechado	Medio ¹	Incubación
Neumococo	AS (ACH)	Aerobiosis con CO ₂
<i>H. influenzae</i>	ACH	Aerobiosis con CO ₂
<i>S. aureus</i>	AS, MSA (ACH)	Aerobiosis
Bacilos gramnegativos		Aerobiosis
Enterobacterias	MAC (AS, ACH)	Aerobiosis
No fermentadores	MAC (AS, ACH)	Aerobiosis
Legionela	BCYE α	Aerobiosis I: 5-10 días
Flora anaerobia	ASAk, AS	Anaerobiosis I: 7-15 días
<i>M. tuberculosis</i>	7H11, Lowenstein-Jensen	Aerobiosis I: 3 meses
Cándida	SABa (AS, ACH)	Aerobiosis
Nocardia	BCYE α , EMB	Aerobiosis I: 15 días
Aspergilos	SABa (AS, ACH)	Aerobiosis I: 7días. T ^a : 28°
Histoplasma	SABa-ACT	Aerobiosis I: 75 días. T ^a : 28°

Para cada microorganismo se señala el medio más idóneo por su aporte nutritivo o por su carácter selectivo o diferencial. Entre paréntesis, otros medios en los que también crece el microorganismo, pero no son de elección.

¹ Los medios se incuban a 37° C en aerobiosis durante 48-72 horas. Algunos microorganismos requieren incubación anaerobia, mayor tiempo de incubación (I) o temperatura diferente (T^a).

ACH: agar chocolate. AS: agar sangre. ASAk: agar sangre con vitamina K, hemina y amikacina. MSA: agar hipersalino con manitol. MAC: agar MacConkey. EMB: agar eosina azul de metileno; BCYE α : agar tamponado con carbón, extracto de levadura y cisteína. 7H11: 7H11 de Middlebrook. SABa: agar Sabouraud con antibacterianos. SABa-ACT: Sabouraud con antibacterianos y actidiona. CO₂: atmósfera hipercápnica.

Para el cultivo de virus debe tomarse por aspiración una muestra de la secreción nasofaríngea, que es la muestra más adecuada y polivalente, aunque también es útil el escobillado faríngeo, el broncoaspirado y el lavado broncoalveolar. Las muestras deben sembrarse en las líneas celulares adecuadas según el virus sospechado (Tabla 6.4). En la práctica, la mayoría de los virus respiratorios aislados por cultivo celular se identifican por inmunofluorescencia.

DETECCIÓN DE ANTÍGENO

El diagnóstico de las infecciones por virus respiratorios (virus de la gripe, respiratorio sincitial y otros) se ha visto enormemente facilitado por el uso de técnicas de detección de antígeno en el aspirado o escobillado nasofaríngeo, como la inmunofluorescencia (IF), enzimoinmunoanálisis (EIA) o inmunocromatografía. La IF es la técnica de elección, ya que, además de su excelente sensibilidad, permite constatar la presencia de células y por tanto conocer la calidad de la muestra que se está evaluando, siendo conveniente que las células sean abundantes puesto que los virus se encuentran en ellas. Sin embargo, la IF es más laboriosa que las otras técnicas de detección de antígeno y requiere experiencia para su lectura.

En la muestra respiratoria también puede investigarse la presencia de *L. pneumophila* y *P. jiroveci* por técnicas

de inmunofluorescencia. Sin embargo la sensibilidad de la IF para legionela es inferior al cultivo y los anticuerpos policlonales presentan reacciones cruzadas con otros microorganismos, por lo que no debe utilizarse regularmente. Por el contrario, la detección de pneumocistis por IF es muy útil.

Existen reactivos para la detección en la orina de antígeno de neumococo o legionela que están causando neumonía, por inmunocromatografía y EIA. La detección de antígeno de aspergilos (galactomanano) en el suero puede ser de gran utilidad en el diagnóstico de la aspergilosis invasiva en enfermos granulopénicos, pero el criterio para su utilización e interpretación de resultados requiere una cierta experiencia.

Algunas de las compañías que comercializan estos reactivos se recogen en el capítulo 8. Las pruebas con reactivos comercializados deben realizarse según las recomendaciones de los fabricantes y hay que tener presente la sensibilidad y especificidad de cada prueba y de cada reactivo.

TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN

Las técnicas de amplificación aplicadas a las muestras respiratorias para investigar microorganismos de la flora normal como posibles agentes de infección, como el neumococo o los aspergilos, participan de las mismas

limitaciones que los cultivos para la interpretación de los resultados positivos. Por el contrario, son de gran utilidad en el diagnóstico de las infecciones causadas por microbios que no forman parte de la flora autóctona como los virus respiratorios, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis*, *Chlamydomphila pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*, así como *M. tuberculosis* y *L. pneumophila*.

Se han comercializado diversas técnicas de amplificación para detectar *M. tuberculosis* en las muestras clínicas⁴. Su sensibilidad no es muy superior a la tinción de Ziehl, aunque se va mejorando progresivamente. En todo caso permite identificar esta especie, lo que en pacientes con sida es muy útil, ya que pueden estar infectados por otras micobacterias que requieren un tratamiento diferente.

Se están introduciendo con gran rapidez técnicas de amplificación para el diagnóstico de las enfermedades causadas por legionela, micoplasma, clamidia y clamidofila, coxiela y virus respiratorios (capítulo 9). Los resultados de estas pruebas combinados con los de la serología pueden ayudar al diagnóstico con mayor especificidad y rapidez que cada una de las pruebas por separado (PCR positiva junto con títulos serológicos altos). El panorama del diagnóstico de las infecciones respiratorias causadas por patógenos primarios puede variar enormemente en los próximos años por la introducción de las técnicas de amplificación.

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Tradicionalmente el diagnóstico de las infecciones causadas por micoplasma, clamidia, coxiela y virus respiratorios se ha efectuado por serología. La técnica más adecuada es la de fijación del complemento, excepto en el caso de micoplasma, para el que se recomiendan las técnicas de aglutinación pasiva, y de las clamidias que se utiliza la inmunofluorescencia.

El diagnóstico de la legionelosis suele hacerse por detección de antígeno (orina) y cultivo, pero en ocasiones sólo se obtiene un resultado positivo por serología. La técnica recomendada es la de inmunofluorescencia, aunque probablemente las técnicas de EIA también son adecuadas.

En general, para el diagnóstico serológico de todas estas infecciones es necesario procesar dos muestras de suero (fase aguda y convalecencia), tomadas con 15-20 días de intervalo. En algunas infecciones por *L. pneumophila* la seroconversión puede ser más tardía (> 3 semanas). Esta necesidad de procesar dos muestras de suero, convenientemente separadas en el tiempo, convierte la serología convencional en un método de diagnóstico retrospectivo de indudable valor epidemiológico, pero de escaso valor para la orientación terapéutica de los pacientes.

En muchos laboratorios se utilizan técnicas de EIA con buenos resultados.

⁴ Véase el capítulo 9. Compañías: Abbott Laboratories (LCx); BD Biosciences (BD Probe Tec ET); Gen-Probe, Inc. (TMA); Roche (PCR).

INTRODUCCIÓN

En cualquier lugar del organismo pueden producirse infecciones causadas por bacterias u hongos que dan lugar a procesos exudativos, supurados o necrotizantes. Entre los más frecuentes o importantes están las infecciones cutáneas y subcutáneas, las infecciones óseas y articulares, la mediastinitis, la peritonitis, así como los abscesos cerebrales, pulmonares, hepáticos, subfrénicos o pélvicos, que se destacan de entre otros como ejemplo. Estos procesos, según su localización y los microorganismos causales, presentan características clínicas y pronóstico muy diferente.

INFECCIONES CUTÁNEAS

Las infecciones cutáneas suelen estar causadas en su mayoría por bacterias como *Staphylococcus aureus*, el estreptococo β -hemolítico del grupo A (*Streptococcus pyogenes*), *Pseudomonas aeruginosa* o por hongos como las candidas y los dermatofitos.

Las infecciones estafilocócicas se inician en el folículo piloso dando lugar a una foliculitis o forúnculo, que es una lesión piógena que puede extenderse localmente produciendo un pequeño absceso multiloculado (ántrax). A veces estas lesiones están causadas por *Pseudomonas* (foliculitis de las piscinas o tras depilación con cera contaminada). Los estafilococos y estreptococos, a través de microlesiones de la piel, causan el impétigo, que es una infección superficial difusa, de aspecto eritematoso y con pequeñas vesículas, que en ocasiones forman ampollas con exudado seroso que dan lugar a costras meláceas. Las infecciones dérmicas por estreptococo del grupo A también dan lugar a una forma de dermatitis pápulo-eritematosa, la erisipela, clínicamente característica. Estas infecciones superficiales pueden profundizar causando linfangitis o celulitis (Figs. 18.1 a 18.5).

Las toxinas liberadas por *Staphylococcus aureus* desde una infección focal pueden producir diversos procesos patológicos. Las enterotoxinas actuando como superantígenos pueden causar un cuadro grave de shock tóxico y las toxinas exfoliativas pueden ocasionar el síndrome de la piel escaldada (Fig. 18.6).

Las lesiones eritematosas de la piel causadas por *Candida albicans* y otras especies de *Candida* se producen en zonas de roce y humedad, como el pliegue submamario, la ingle (eritema del pañal en los niños y ancianos con incontinencia) o en las zonas periungueales (Fig. 18.7).

Los dermatofitos causan tiñas, particularmente en los pies, en las zonas interdigitales y plantar (pie de atleta).



Figura 18.1. Foliculitis.

La foliculitis es una infección del folículo piloso. Muchas veces hay lesiones múltiples, presentando el aspecto que se muestra en esta imagen. Cuando la foliculitis adquiere mayor tamaño forma un forúnculo. Varios forúnculos confluentes forman un ántrax.

Cortesía del Servicio de Dermatología del Hospital Vall d'Hebron.



Figura 18.2. Impétigo.

El impétigo es una infección de la epidermis causada por estreptococo o estafilococo. Se caracteriza por presentar lesiones múltiples de aspecto eritematoso, que forman ampollas con abundante exudado líquido. Cuando se abren forman costras melicéricas que se desprenden sin dejar cicatriz.



Figura 18.3. Erisipela.

Celulitis facial con borde bien delimitado típico de la erisipela. La erisipela es una lesión de la piel de etiología estreptocócica que con frecuencia afecta a la cara.

Cortesía del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Vall d'Hebron.



Figura 18.4. Linfangitis.

La afectación difusa de los linfáticos da lugar a una placa eritematosa característica por sus bordes flamígeros, mal delimitados.

Cortesía del Servicio de Dermatología del Hospital Vall d'Hebron.



Figura 18.5. Celulitis orbitaria.

La afectación del tejido celular subcutáneo puede tener localizaciones muy variadas y es de pronóstico reservado ya que puede extenderse a las fascias y al músculo subyacente.

Cortesía del doctor F. Moraga-Llop. Servicio de Pediatría. Hospital Vall d'Hebron.



Figura 18.6. Síndrome de la piel escaldada.

Las exfoliatinas (toxinas A y B) liberadas por *Staphylococcus aureus* desde una infección focal dan lugar a la formación a distancia de ampollas y descamación de la epidermis localizadas o generalizadas (enfermedad de Ritter). El líquido vesicular es estéril.

Cortesía del doctor F. Moraga-Llop. Servicio de Pediatría. Hospital Vall d'Hebron.



Figura 18.7. Eritema del pañal.

La humedad y el roce de los pañales facilitan las infecciones rebeldes por *Candida*, dando lugar a lesiones características como la que se muestra en esta imagen.

Cortesía del doctor F. Moraga-Llop. Servicio de Pediatría. Hospital Vall d'Hebron.

ta) y en otras áreas de la piel glabra; así como en el cabello y las uñas. La expresión clínica de estas infecciones es extraordinariamente variada, dependiendo de la zona afectada y el dermatofito infectante. En los pies forman grietas interdigitales, en las plantas lesiones eritematosas, vesiculares o hiperqueratósicas, en el cuerpo o extremidades lesiones papuloeritematosas o secas e hiperqueratósicas; las lesiones causadas por dermatofitos zoofílicos que afectan al cuero cabelludo dan lugar al querion, que es una lesión pseudotumoral con supuración melicérica y afectación del cabello (Fig. 18.8).

Las infecciones cutáneas tras una mordedura humana o animal son polimicrobianas y están causadas por la flora aerobia y anaerobia de la boca; sin embargo, a veces las infecciones consecuentes a mordeduras por animales son monomicrobianas y están causadas por *Pasteurella multocida*, en el caso de mordedura por felinos o cánidos, y *Eikenella corrodens* en el caso de mordedura humana. Estos microorganismos se aíslan por cultivo convencional en agar sangre.

Las celulitis necrotizantes de rápida evolución con afectación del tejido celular subcutáneo, de las fascias y/o el músculo subyacente (gangrena) se dan en tejidos con mala vascularización, particularmente en las extremidades en ancianos con arteriosclerosis y diabéticos, y están causadas por *Clostridium perfringens* y otros *Clostridium*

tridios necrotizantes¹, pero también por *Escherichia coli* o asociaciones de *S. aureus* y *S. pyogenes* (grupo A) (Fig. 18.9). En estas lesiones la puerta de entrada cutánea puede ser evidente o pasar desapercibida. La tinción del Gram es muy orientadora y los cultivos deben efectuarse en aerobiosis y anaerobiosis.

Los granulomas subcutáneos de larga evolución (semanas o meses), que en ocasiones se presentan ulcerados o fistulizados, pueden deberse a:

1. La presencia de un cuerpo extraño, acompañado de sobreinfección bacteriana.
2. Infecciones por leishmania.
3. Infecciones por nocardia u otros actinomicetales.
4. Infecciones fúngicas por *Sporothrix schenckii*, alternaria u otros hongos dematiáceos causantes de feohifomicosis².
5. Micobacterias patógenas de inoculación cutánea *Mycobacterium marinum* y *M. ulcerans*³.

Para el estudio microbiológico de los granulomas o úlceras crónicas hay que evitar la toma superficial de exudado y efectuar una biopsia para examen directo y cultivo (Fig. 18.10).

Figura 18.8. Lesión cutánea por dermatofitos.

Los dermatofitos dan lugar a lesiones de topografía y aspecto muy variados, dependiendo en parte de la especie involucrada.

La afectación de los pies constituye una localización muy frecuente, rebelde y fácilmente recidivante. Las lesiones varían desde grietas interdigitales hasta vesículas plantares, lesiones exudativas o secas y descamativas.

Los dermatofitos zoofílicos suelen producir lesiones muy inflamatorias y aparatosas, como el querion en el cuero cabelludo.

Las dermatofitosis de la piel glabra suelen dar lugar a lesiones circinadas con el borde más eritematoso y activo.

Cortesía del profesor A. Alomar. Servicio de Dermatología. Hospital de Sant Pau.



¹ *Clostridium septicum*, *C. novyi*, *C. histolyticum*, *C. bifermentans* y *C. sordellii*.

² Véase Micosis subcutáneas y tabla 5.1.

³ *M. marinum* se encuentra en peceras, charcas, etc. y *M. ulcerans* tiene una distribución geográfica restringida a áreas tropicales y es el causante de la úlcera de Buruli.



Figura 18.9. Gangrena gaseosa.

La gangrena gaseosa es una infección necrotizante causada por *Clostridium perfringens* y otras especies de *Clostridium* con capacidad necrotizante. A la palpación, los tejidos afectados suelen crepitarse por la acumulación del gas generado por los microorganismos; la crepitación no es patognomónica de *Clostridium*, porque se puede dar en la infección por otras bacterias (por ejemplo, *E. coli*). El estado general del paciente suele ser muy grave y con signos de shock séptico. El amplio desbridamiento de la lesión es un aspecto fundamental del tratamiento.

Cortesía del doctor J Barrio. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital de Sant Pau.

Toma de muestra

Si la lesión es purulenta o exudativa, las muestras se toman con escobillón con medio de transporte tipo Amies. En las lesiones eritemato-edematosas no exudativas de la piel y del tejido celular, como la erisipela, las linfangitis o las celulitis en los estadios iniciales, al no existir exudado (ni pus) es prácticamente imposible recoger una muestra, siendo el diagnóstico únicamente clínico. En estos casos, algunos microbiólogos recomiendan inyectar en el borde de la placa eritematosa, con una jeringa tipo insulina, 0,5 ml de suero fisiológico estéril y raspárselo para practicar una tinción de Gram y un cultivo.

Si la lesión es seca y escamosa, como en algunas dermatofitosis, debe rasparse con un bisturí estéril para recoger las escamas; si están afectados los cabellos y las uñas, han de cortarse o rasparse; estas muestras deben depositarse en una placa de Petri.

En los granulomas siempre hay que tomar una muestra por biopsia, que se estudiará teniendo en cuenta los posibles agentes etiológicos señalados más arriba.

Procesamiento microbiológico

Examen directo

Para la visualización de bacterias y levaduras, el pus o exudado se examina en una extensión teñida por el método de Gram (Fig. 18.11). Para el examen de los hongos filamentosos (dermatofitos) se deposita en un porta una gota de solución de potasa y en ella se suspenden las escamas, dejando reposar unos minutos para facilitar su disgregación, contrastando la preparación median-



Figura 18.10. Granuloma subcutáneo.

Lesión granulomatosa necrotizante de evolución crónica y de etiología fúngica (*Alternaria*). Causan lesiones granulomatosas *Sporothrix schenckii*, hongos dematiáceos como *Alternaria* y otros, las leishmanias, *Mycobacterium marinum*, actinomicetos y cuerpos extraños sobreinfectados. El diagnóstico se realiza por examen microscópico y cultivo de la biopsia practicada al paciente.

te una gota de azul de lactofenol y depositando sobre ella un cubreobjetos. Esta técnica facilita la observación de los micelios fúngicos (Fig. 18.12) (véase el capítulo 5).

Las biopsias deben estudiarse mediante tinciones que tengan en cuenta el agente buscado, Gram, Ziehl-Neelsen, Giemsa o tinciones argénticas.

Cultivo

Los cultivos han de efectuarse como mínimo en agar sangre y agar sangre para anaerobios. Si se sospecha una candidiasis debe añadirse el medio de Sabouraud con antibacterianos (cloranfenicol o gentamicina). Para el cultivo de los hongos filamentosos dematiáceos (*alternaria*, etc.) ha de utilizarse agar Sabouraud con antibacterianos y para el de *sporotrix* y los dermatofitos debe utilizarse el medio de Sabouraud con antibacterianos y actidiona, que inhibe los hongos contaminantes. Las nocardias crecen en el medio de eosina azul de metileno (5-15 días) dando unas colonias muy características, pero el medio de BCYE α , utilizado para el cultivo de legionelas, es muy selectivo y recomendable para su aislamiento. Para *M. marinum* y *M. ulcerans* pueden utilizarse los medios empleados para el aislamiento de *M. tuberculosis* incubados a 28-30° durante seis a ocho semanas.

OSTEOMIELITIS Y ARTRITIS

Las infecciones de los huesos y articulaciones pueden producirse como consecuencia de una diseminación hematogena desde un foco distante y en estos casos son monomicrobianas y generalmente producidas por estafilococos (*S. aureus*) y con menos frecuencia por gonococo (artritis). En los lactantes están causadas principal-



Figura 18.11. Gangrena gaseosa. Tinción de Gram.

Puede observarse la presencia de bacilos grampositivos con la morfología de los clostridios. En el Gram del exudado de las lesiones no se acostumbra a observar leucocitos ni formas esporuladas. En los cultivos viejos suelen observarse abundantes esporas.

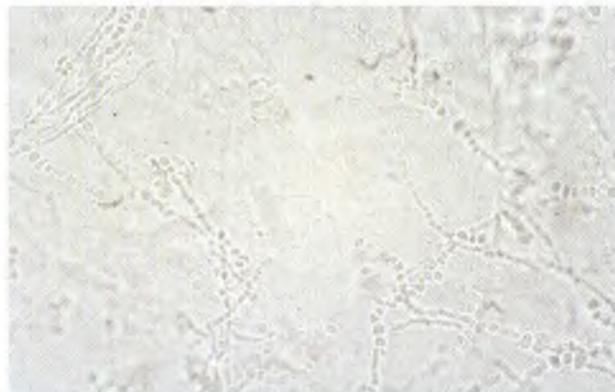


Figura 18.12. Dermatomicosis. Examen directo.

Las escamas obtenidas por raspado de una lesión cutánea, se han depositado en una gota de potasa (KOH). Al calentar suavemente, la potasa disgrega las células y facilita la observación de los micelios fúngicos si están presentes.

mente por estreptococo del grupo B (*S. agalactiae*), *E. coli* y neumococo (Fig. 18.13).

En la tuberculosis y la brucelosis se puede producir una osteomielitis hematógena, preferentemente de localización vertebral (espondilitis) (Fig. 18.14). En los adictos a drogas por vía parenteral son relativamente frecuentes (vértebras, pubis, clavícula) y están producidas por *S. aureus*, *P. aeruginosa*, enterobacterias y *Candida*.

Cuando se contamina una fractura abierta, las infecciones óseas están causadas por una flora polimicrobiana, incluyendo según los casos *S. aureus*, *Pseudomonas*, clostridios, *Bacillus* y otros microorganismos.

Un capítulo importante de este apartado lo constituye el de las infecciones de las prótesis articulares y de las placas de fijación⁴. Los agentes causales más frecuentes son los estafilococos coagulasa negativa, en particular *S. epidermidis*. Las infecciones adquiridas durante la colocación de la prótesis suelen manifestarse precozmente (menos de dos meses); y las que se implantan por vía hematógena suelen aparecer tardíamente (más de dos meses). Las infecciones de las prótesis tienen un pronóstico reservado debido a que muchas veces no curan con antibioticoterapia y son tributarias de drenaje, limpieza y en casos refractarios de sustitución quirúrgica de la prótesis.

Toma de muestras

En las artritis con colección purulenta o exudado intraarticular, habitualmente es fácil obtener por punción el material para examen directo o cultivo. En las osteomielitis cerradas es más difícil y hay que evaluar las ventajas y los inconvenientes de hacer una toma cruenta del pus óseo, estando especialmente indicada



Figura 18.13. Osteomielitis.

Imagen radiológica de una osteomielitis crónica en la que puede verse un sequestró óseo (central) y se insinúa un trayecto fistuloso a la derecha.

Cortesía del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Vall d'Hebron.

⁴ Son elementos metálicos para la fijación del hueso (osteosíntesis) tras fracturas u otras causas.



Figura 18.14. Espondilitis.

Resulta muy evidente la afectación del disco y los cuerpos vertebrales adyacentes. El agente causal era *Staphylococcus aureus*.

en la espondilodiscitis del adulto. En las osteoartritis agudas debe tomarse siempre una muestra de sangre para hemocultivo.

En las osteomielitis crónicas fistulizadas, el trayecto fistuloso se coloniza por flora exógena y los microorganismos que se aíslan de la secreción de la fístula, como pseudomonas, proteus o estafilococos coagulasa negativa, no suelen corresponder a los que están produciendo la infección ósea, por lo que el resultado carece de valor excepto si se detecta un patógeno primario (salmonela, micobacteria, brucela, actinomices, nocardia, etcétera).

El pus o exudado se examina teñido por el método de Gram. Si se sospecha la etiología tuberculosa, u otra específica, se efectuarán las tinciones adecuadas (Ziehl-Neelsen convencional o modificado para nocardia u otras).

Cultivo

Los cultivos deben hacerse en medios convencionales, como el agar sangre, incubado en aerobiosis y anaerobiosis, aunque las osteomielitis por anaerobios son raras. Si se sospecha la etiología tuberculosa o brucelar deben incluirse los medios de cultivo adecuados (Lowenstein Jensen o Middlebrook 7H11 y medio bifásico del tipo Castañeda). Una serología de brucela negativa en la práctica descarta esta etiología.

Ha de tenerse en cuenta la posibilidad de una osteítis micótica de origen traumático (*Sporotrix*, alternaria, etcétera).

INFECCIONES POR ANAEROBIOS

La flora normal de la cavidad orofaríngea, del tubo digestivo y en menor proporción de la vagina es una flora mixta formada por bacterias aerobias y anaerobias facultativas y abundantes bacterias anaerobias estrictas. En el colon, donde la flora es más abundante, existen alre-

dedor de 10^{11} bacterias por gramo de heces, siendo las bacterias anaerobias las más abundantes y variadas.

Existe un conjunto de infecciones causadas por la flora comensal de la orofaringe, del tubo digestivo o vaginal, que se producen en su contigüidad, como consecuencia de la perforación accidental o de una intervención quirúrgica sobre esos territorios. Las lesiones pueden ser infiltrativas, piógenas o más frecuentemente necrotizantes y se denominan coloquialmente «infecciones por anaerobios» por la regular participación de estas bacterias en esos procesos, aunque la mayoría de las veces son polimicrobianos y están causados por abundante flora mixta aerobia y anaerobia.

A este grupo pertenecen los abscesos periodontales causados por la flora bucal, el absceso periesofágico y la mediastinitis, de pronóstico grave, que aparecen tras ruptura esofágica como consecuencia de neoplasias, traumatismos o intervenciones quirúrgicas; el absceso pulmonar por aspiración de las secreciones bucofaríngeas por coma, etilismo agudo o trastornos de la deglución, y las peritonitis diseminadas o los abscesos abdominales de localización pélvica, subfrénica o retroperitoneal tras una perforación intestinal por un traumatismo, una neoplasia o tras una intervención quirúrgica del tubo digestivo o las vías biliares.

La mayoría de los abscesos son polimicrobianos, como los cerebrales, pulmonares o pancreáticos, pero algunos pueden ser monomicrobianos, como el absceso hepático amebiano (Fig. 18.15), el renal de origen hematógeno por estafilococo dorado (*S. aureus*) o el prostático por *E. coli*.

Hay que diferenciar las peritonitis bacterianas causadas por una perforación intestinal o un fallo de sutura tras cirugía intestinal, con una flora abundantísima, de las infecciones de líquido ascítico que se producen en los pacientes con cirrosis avanzada (peritonitis primaria, peritonitis espontánea) que son monomicrobianas (*E. coli*, enterococo) y cuya patogenia se debe al paso de una bacteria desde el tubo digestivo hasta el peritoneo por un proceso de translocación a través de la pared intacta del intestino.

Las endometritis, anexitis y pelviperitonitis se producen en la mujer por la vía genital de modo ascendente y están causadas por agentes específicos, como el gonococo o la clamidia, pero también por flora mixta comensal aerobia y anaerobia de origen vaginal. Las endometritis no son excepcionales en pacientes portadoras de un dispositivo intrauterino y pueden estar causadas, además de la flora señalada, por actinomices. Tras un aborto séptico puede producirse una endometritis por clostridios (gangrena gaseosa), generalmente acompañada de sepsis de evolución sobreaguda y pronóstico gravísimo (shock, coagulación intravascular diseminada).

Tras las intervenciones quirúrgicas sobre territorios no contaminados (cirugía limpia), la incisión cutánea puede



Figura 18.15. Absceso hepático.

Tomografía axial computarizada abdominal en la que se observa un absceso hepático único de gran tamaño, causado por *Entamoeba histolytica*.

Cortesía del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Vall d'Hebron.

infectarse por la flora de la piel del paciente o del personal que interviene en el acto quirúrgico; estas infecciones son poco frecuentes ($\leq 2\%$), monomicrobianas y en general causadas por *S. aureus*; pero cuando la intervención quirúrgica se realiza sobre territorios con flora comensal abundante, como la orofaringe, el colon o la vagina, las infecciones de la incisión cutánea son frecuentes, están causadas por la flora endógena del paciente, propia de esos territorios, y suelen ser infecciones polimicrobianas causadas por bacterias aerobias y anaerobias (Fig. 18.16).

Las úlceras vasculares y de decúbito se hallan colonizadas por flora polimicrobiana, ocasionalmente con predominio de los anaerobios, cuya significación patogénica, a veces, es difícil de interpretar. En las bacteriemias por *Bacteroides fragilis* de foco inicialmente desconocido, entre otras posibilidades debe pensarse en su origen a partir de un decúbito infectado. Es frecuente la colonización de las úlceras cronicadas, en particular en ancianos, por *S. aureus* meticilina resistente (MRSA).

Toma de muestras

El exudado o pus debe aspirarse con una jeringa e introducirse en un frasco estéril adecuado para el transporte de anaerobios. Estos frascos están comercializados. Si no se dispone de ellos puede dejarse el pus en la jeringa y trasladarse ésta de modo urgente al laboratorio. Es recomendable desechar la aguja en un recipiente adecuado inmediatamente después de obtenida la muestra y tapar la jeringa, ya sin aguja, con su capuchón para no pincharse y evitar riesgos relativos a enfermedades de transmisión parenteral (hepatitis, sida). A pesar de que existen escobillones con medio de transporte para ana-



Figura 18.16. Incisión quirúrgica infectada.

En la figura se observa una incisión quirúrgica infectada después de haber sido desbridada y en la que se ha colocado un rosario con gentamicina.

erobios no son recomendables, excepto si no puede tomarse la muestra de otra manera. En este caso han de procesarse con urgencia (véase el capítulo 12).

En determinadas ocasiones el foco no es accesible, como en el caso de un absceso periesofágico cerrado, subfrénico o cerebral y si no existe indicación terapéutica de drenaje, debe valorarse las ventajas de una toma cruenta de la muestra en relación con un tratamiento médico empírico.

Procesamiento microbiológico

Examen directo

El examen directo es muy importante en estas muestras. La tinción de Gram es muy orientadora permitiendo sugerir la presencia de una flora monomicrobiana o polimicrobiana con componente anaerobio, lo que ayuda a establecer precozmente el tratamiento empírico (Figs. 18.17 y 18.18).

Cultivo

Debido al gran número de microorganismos causantes de muchas de estas infecciones es imposible su aislamiento individualizado y el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos de cada uno de ellos, por lo que el tratamiento de estas infecciones es empírico⁵. Por ello, el cultivo de las supuraciones o exudados polimicrobianos de estas características no tiene como objetivo el aislamiento de todos los microorganismos participantes en la infección, sino:

1. Confirmar la existencia de una flora mono o polimicrobiana.

⁵ La flora en estas muestras puede estar formada por decenas o centenas de microorganismos y algunos de los pertenecientes a la flora anaerobia son exigentes y de crecimiento muy lento. El aislamiento y estudio de la sensibilidad de todos ellos podría requerir semanas.

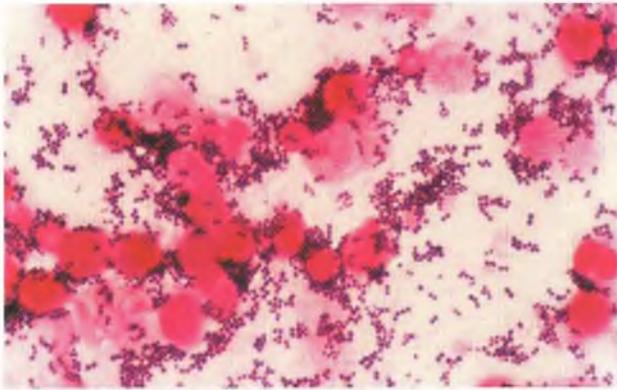


Figura 18.17. Infección por *Staphylococcus aureus*.

Se observan cocos grampositivos con las características de los estafilococos. La muestra del pus obtenido de una incisión quirúrgica infectada se ha teñido por el método de Gram. Por cultivo se aislaron abundantes colonias de *S. aureus*.

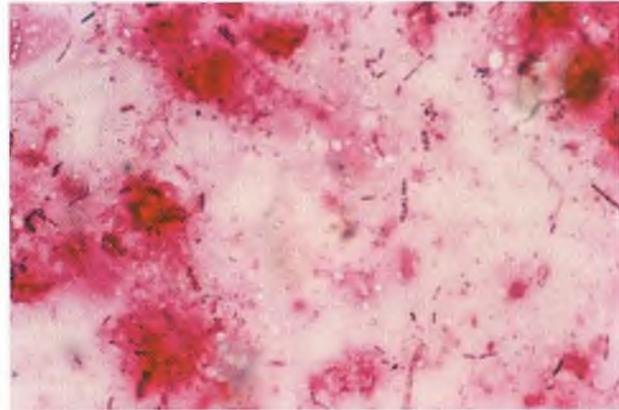


Figura 18.18. Peritonitis. Tinción de Gram.

Peritonitis tras un fallo de sutura después de una intervención de neoplasia de colon. Se observa una abundante flora polimicrobiana formada por bacterias facultativas y anaerobias estrictas de origen fecal.

2. Adquirir una idea de los principales componentes de la flora aerobia.

3. Constatar la participación de los anaerobios en el proceso y su importancia.

La evaluación conjunta del Gram y del crecimiento en los medios de agar sangre incubado en aerobiosis y agar sangre suplementado con amikacina incubado en

anaerobiosis permite obtener una impresión global, aproximada, pero aceptable de la flora existente y del balance entre bacterias aerobias y anaerobias. La utilización de medios de cultivo selectivos adicionales ayuda a precisar los componentes de la flora aerobia, como enterobacterias, bacilos gramnegativos no fermentadores, enterococos, estafilococos, estreptococos y cándida (Tabla 18.1) (Fig. 18.19).

Tabla 18.1
Protocolo de estudio de las infecciones supuradas

Medio ¹	Incubación	Información obtenida
Evaluación global de la flora		
Agar sangre	Aerobia	Orienta sobre la abundancia y variedad de la flora aerobia global. Permite el aislamiento de las bacterias aerobias cuando hay pocas especies (1-4 aproximadamente)
Agar sangre para anaerobios con amikacina ²	Anaerobia	Orienta sobre la abundancia y variedad de la flora anaerobia global. Permite el aislamiento de las bacterias anaerobias cuando hay pocas especies (1-4 aproximadamente)
Detección individualizada de bacterias³		
Agar MacConkey	Aerobia	Detecta la presencia de enterobacterias y bacilos gramnegativos aerobios (<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> y otros). Permitirá realizar antibiograma si interesa
Agar hipersalino con manitol	Aerobia	Detecta la presencia de estafilococos de los que puede realizarse antibiograma si interesa
Agar sangre-colistina-ácido nalidíxico	Aerobia	Detecta la presencia de estreptococos y enterococos de los que puede realizarse antibiograma si interesa
Agar Sabouraud-amikacina	Aerobia	Detecta la presencia de levaduras (cándida y otras)
Agar Thayer-Martin	Aerobia	Detecta la presencia de gonococo

¹ Según la muestra clínica estudiada y la orientación aportada por la tinción de Gram puede introducirse uno u otro de estos medios aunque el agar sangre y el agar sangre para anaerobios deben introducirse siempre. El medio de Thayer y Martin sólo se introducirá regularmente en productos de origen genital.

² La amikacina inhibe la mayoría de la flora gramnegativa aerobia y parte de la grampositiva aerobia. Aunque en el agar sangre-amikacina incubado en anaerobiosis puede crecer alguna bacteria aerobia y anaerobia facultativa resistente a amikacina, en general ofrece una buena muestra de la flora anaerobia.

³ Los medios que se indican en este apartado son selectivos y sólo permiten el crecimiento de las bacterias señaladas en la columna «información obtenida». Pueden utilizarse otros medios con el mismo fin; por ejemplo el agar MacConkey y el de Sabouraud pueden sustituirse por medios cromogénicos.



Figura 18.19. Estrategia para el estudio de las infecciones polimicrobianas.

El examen microscópico de la muestra clínica de una infección exudativa, supurada o necrótica, teñida por la técnica de Gram, es esencial para obtener una primera información de la etiología del proceso, que permitirá orientar el tratamiento.

La siembra de la muestra en los medios de cultivo no tiene por objeto aislar, identificar y estudiar la sensibilidad de todas las especies bacterianas presentes, que a veces son numerosísimas (por lo que constituiría una tarea imposible) sino adquirir una idea de la flora global existente y de sus principales representantes, para poder instaurar un tratamiento empírico adecuado. La flora global aerobia se detecta en una placa de agar sangre incubada en aerobiosis (1) y la anaerobia estricta y facultativa se evalúa en una placa de agar sangre con hemina y vitamina K, incubada en anaerobiosis (2); estos antibióticos inhiben prácticamente la totalidad de la flora anaerobia facultativa. Los estreptococos y enterococos se detectan en un medio de agar sangre con colistina y ácido nalidixico (4). El medio hipersalino de Chapman permite detectar los estafilococos (5), el medio de MacConkey los bacilos gramnegativos (6). Alternativamente, pueden utilizarse otros medios equivalentes o suplementarios, como el de Sabouraud. Los diferentes medios cromogénicos pueden sustituir a algunos de los propuestos.

Infecciones causadas por: **A:** *Staphylococcus aureus*. **B:** Flora polimicrobiana anaerobia estricta. **C:** Flora mixta aerobia y anaerobia estricta.

Estos cultivos permiten practicar el antibiograma de las bacterias aerobias predominantes; las anaerobias suelen responder al tratamiento empírico debido a que excepto los bacteroides del grupo *fragilis* no presentan resistencias adquiridas de modo significativo⁶. La técnica de Etest (véase el capítulo 3) permite estudiar con sencillez la sensibilidad de las bacterias anaerobias en las infecciones monomicrobianas.

TRATAMIENTO EMPÍRICO

Cuando se diagnostica una infección monomicrobiana causada por una bacteria aerobia, por ejemplo por estafilococo dorado, *E. coli* o *P. aeruginosa*, se estudia su sensibilidad a los antimicrobianos de elección para instaurar el tratamiento.

Si la infección está causada exclusivamente por bacterias anaerobias, tanto si es monomicrobiana como polimicrobiana, debe administrarse un antibiótico empíricamente activo frente a ellas como la amoxicilina con ácido clavulánico, un carbapenémico, el metronidazol (si no hay cocos o bacilos grampositivos en el examen directo), una cefamicina o clindamicina, aunque estos dos últimos antimicrobianos pueden presentar resistencias

significativas. Sin embargo, como se ha señalado, en las infecciones monomicrobianas por anaerobios puede realizarse un Etest.

Si la infección está causada por una flora mixta muy abundante con bacterias anaerobias asociadas a flora aerobia, debe administrarse uno de los antimicrobianos señalados más arriba con actividad frente a la flora anaerobia asociado a otro para cubrir la flora aerobia existente, definida mediante los cultivos indicados anteriormente (enterobacterias, bacilos gramnegativos no fermentadores, enterococos, estafilococos, levaduras y gonococo en infecciones genitales). El ertapenem, la cefotaxima asociada a metronidazol, el imipenem o la piperacilina con tazobactam, con amplio espectro aerobio y anaerobio, pueden administrarse para el tratamiento de las infecciones mixtas por aerobios y anaerobios dada su actividad simultánea frente a los dos grupos de bacterias.

No ha de olvidarse que el drenaje o la limpieza quirúrgica suele ser el remedio cardinal para el tratamiento de los abscesos o lesiones necróticas.

En ocasiones hay que retirar el material protésico, si es posible, para conseguir la curación.

⁶ Mantienen su actividad, amoxicilina con ácido clavulánico, piperacilina con tazobactam, imipenem, ertapenem y metronidazol.

CONCEPTO Y ETIOLOGÍA

En nuestro medio suele denominarse septicemia a la invasión persistente del torrente circulatorio por bacterias u hongos que da lugar a manifestaciones clínicas de infección sistémica, como fiebre, taquicardia, leucocitosis y otras¹. El diagnóstico etiológico de las septicemias se efectúa mediante el cultivo de la sangre (hemocultivo).

La entrada al torrente circulatorio de una bacteria o de un hongo se produce a partir de una infección focal, que puede estar localizada en la piel, en el tracto urinario, en el pulmón, en el tubo digestivo o en otro lugar que constituye la puerta de entrada (o foco de sepsis). Los catéteres y otros instrumentos intravasculares colonizados también son un foco de sepsis frecuente. La bacteriemia o la fungemia se establece cuando la multiplicación de los microorganismos en la sangre supera la capacidad del sistema fagocitario para eliminarlos.

En ocasiones el foco de sepsis es asintomático, por lo que no puede detectarse la puerta de entrada, denominándose sepsis primaria o criptogénica. Esto sucede en las sepsis que se originan a partir de un absceso abdominal silente o de un catéter infectado sin flebitis aparente y también puede tener lugar en pacientes con enfermedades de base graves, como cirrosis, inmunodepresión o granulopenia, en los que desde el tubo digestivo se produce una bacteriemia o fungemia primaria por un microorganismo de la flora normal (*Escherichia coli*, estreptococo *viridans*, *Candida albicans*, etc.) que atraviesa la pared intestinal sin producir síntomas locales por un proceso denominado translocación.

En infecciones como la fiebre tifoidea, la brucelosis, la sepsis meningocócica y la fiebre botonosa, en que la bacteriemia constituye un estadio persistente y fundamental de la infección tampoco suelen existir síntomas en la puerta de entrada. Sin embargo, en alguno de estos procesos sistémicos pueden presentarse signos orienta-

dores de su etiología, como el exantema evanescente de la tifoidea, la sudoración en la brucelosis, las petequias en la meningococemia o la escara que aparece en la fiebre botonosa mediterránea en el lugar de la inoculación de la rickettsia por la garrapata (Fig. 19.1).

En ocasiones se da la situación opuesta, ya que en algunas infecciones locales con gran expresividad clínica, como la neumonía neumocócica, la meningitis meningocócica o la osteomielitis estafilocócica entre otras, en las que es frecuente la presencia de una bacteriemia clínicamente expresiva, puede producirse una bacteriemia silente con manifestaciones clínicas difíciles de identificar, por lo que es importante practicar siempre un hemocultivo, tanto como ayuda al diagnóstico etiológico de esos procesos como para constatar la concomitancia de una bacteriemia clínicamente elusiva.

Las bacteriemias pueden ser relativamente bien toleradas, como sucede en la brucelosis, o presentar un cua-



Figura 19.1. Fiebre botonosa.

Lesión de inoculación (mancha negra, *tache noir*) producida por la picadura de una garrapata seguida de la inoculación de *Rickettsia conorii* en un paciente con fiebre botonosa mediterránea.

¹ En la terminología anglosajona se denomina sepsis a cualquier infección con evidencia de respuesta clínica sistémica (fiebre > 38° C o hipotermia < 36° C, taquicardia > 90 p/m, taquipnea > 20 r/m, hipocapnia Pa CO₂ < 32 mmHg, leucocitosis > 12.000/mm³ o leucopenia < 4.000/mm³ con más del 10% de bandas. Por extensión se habla de paciente séptico para hacer referencia a todo enfermo que presenta esta sintomatología. Para denominar el paso de las bacterias u hongos a la sangre resulta más preciso utilizar la denominación de bacteriemia o fungemia respectivamente, pero ante la sospecha clínica y antes de conocer el agente etiológico no parece incorrecto utilizar el término septicemia. El paso a la sangre de los virus y parásitos se denomina viremia y parasitemia respectivamente y no se incluyen en el término septicemia.

dro de *shock* séptico caracterizado por los signos de infección sistémica indicados anteriormente junto a hipotensión, oliguria, acidosis metabólica y ansiedad, que puede evolucionar hacia el fallo multiorgánico y la coagulación intravascular diseminada, como sucede con mayor frecuencia en las bacteriemias por bacterias gramnegativas (enterobacterias, pseudomonas, meningococo).

El microorganismo vehiculado por la sangre puede localizarse en otro lugar, distinto de la puerta de entrada, causando una infección focal secundaria (metástasis séptica). La localización depende tanto del tropismo de la bacteria o el hongo como de otros factores poco precisados, como la vascularización de los diversos órganos o la presencia de prótesis o material exógeno.

Cuando se produce una bacteriemia en un paciente con lesiones en las válvulas cardíacas de origen congénito, reumático o arterioesclerótico, en portadores de prótesis valvulares o en adictos a drogas por vía parenteral, los microorganismos pueden implantarse en ellas causando endocarditis². Las endocarditis sobre válvula nativa suelen asentarse en la mitral o la aórtica preferentemente, en los pacientes drogadictos en la tricúspide y en los pacientes con prótesis en la válvula protésica.

Desde ese foco endocárdico, intravascular, la bacteriemia (o fungemia) se establece de modo permanente y su erradicación es extraordinariamente difícil. Las lesiones petequiales distales son características de la endocarditis subaguda (Fig. 19.2). El pronóstico de estas infecciones es muy grave, pudiendo requerir tratamiento quirúrgico además del tratamiento antibiótico. La endocarditis derecha, tricúspide, del drogadicto suele tener en general buen pronóstico.

En numerosas virasis, como la poliomielitis, la parotiditis o las hepatitis, se produce el paso del virus a la sangre en un estadio precoz y clínicamente inespecífico o incluso asintomático, ya que la personalidad clínica de la infección vírica solo se manifiesta cuando se localiza el virus en los órganos diana. En infecciones causadas por virus persistentes, como HIV, citomegalovirus y otros, puede existir una viremia continua, sintomática o asintomática, durante períodos de tiempo muy prolongados o de modo persistente en los leucocitos.

Algunos parásitos, como los plasmodios, los tripanosomas, las leishmanias en el kala-azar o las filarias presentan regularmente una fase hemática sintomática, por lo que las infecciones que causan se agrupan bajo la denominación común de hemoparasitosis.



Figura 19.2. Endocarditis infecciosa.

Lesión petequial distal en un paciente con endocarditis infecciosa. Las lesiones petequiales subungueales de estos pacientes se denominan manchas de Janeway. Las petequias también son frecuentes en el paladar y la conjuntiva. Las lesiones dolorosas que aparecen en los pulpejos de los dedos son los panadizos de Osler.

Cortesía del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Vall d'Hebron.

En este capítulo sólo se hace referencia a la sepsis de etiología bacteriana o fúngica. En la tabla 19.1 se presentan los principales agentes de bacteriemia y fungemia.

EXAMEN DIRECTO

En las bacteriemias y fungemias, el examen directo de la sangre (Gram) no es una técnica útil para el diagnóstico, debido a que el escaso número de microorganismos circulantes no permite su visualización. El examen directo de una muestra de sangre es adecuado sólo para el diagnóstico de las fiebres recurrentes causadas por borrelias (Giemsa) y *Bartonella bacilliformis*, que es la única bartonela que puede detectarse en la sangre intraeritrocitariamente (Giemsa).

HEMOCULTIVO

Las bacteriemias y fungemias se diagnostican por hemocultivo, que consiste en el cultivo de una muestra de sangre en medios adecuados para recuperar las bacterias y los hongos que son capaces de crecer en medios artificiales.

Para realizar un hemocultivo en un adulto se extrae al paciente entre 10 y 20 ml de sangre sin anticoagulante y se inocula en dos frascos con 50 ml de caldo de cultivo, uno de los cuales tiene atmósfera aerobia y el otro anaerobia para permitir el crecimiento de los respectivos microorganismos (Fig. 19.3). La extracción debe hacerse mediante una técnica rigurosamente aséptica para evitar contaminaciones, según se describe en la tabla 19.2³ (Fig. 19.4).

Es recomendable practicar dos o tres hemocultivos mediante extracciones separadas y a ser posible de pun-

² Estas bacteriemias en ocasiones son transitorias y pasan desapercibidas como las que se ocasionan durante las manipulaciones dentales, un tacto rectal, un sondaje, etcétera.

³ Aunque en ocasiones es difícil efectuar una extracción de sangre sin que se contamine (niños y pacientes con malos accesos vasculares), en muchas otras la contaminación se debe —injustificadamente— a una extracción incorrecta.

Tabla 19.1
Algunos agentes causales de septicemia

Sepsis adquirida en la comunidad ¹	Sepsis de origen intrahospitalario ²
Frecuentes	
<i>E. coli</i> y otras enterobacterias Neumococo <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> y otras enterobacterias <i>S. epidermidis</i> y otros estafilococos coagulasa negativa <i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> y otros BGN-NF ³ Estreptococo del grupo <i>viridans</i> Enterococo
Poco frecuentes	
Meningococo Salmonelas gastroenteríticas Anaerobios <i>P. aeruginosa</i> <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi ⁴ <i>Brucella</i> ⁴	Cándida <i>Bacteroides fragilis</i> y otros ⁵ <i>Clostridium perfringens</i> y otros Corinebacterias

¹ Los agentes causales y su frecuencia varían dependiendo de que el paciente viva en medio rural o urbano, de la profesión (zoonosis) y de otros factores.

² El microorganismo varía según la puerta de entrada (catéter, infección urinaria, absceso abdominal, neumonía, etc.) y la epidemiología local. En algunos pacientes con enfermedades debilitantes (sida y otras) las infecciones oportunistas septicemiantes como tuberculosis, criptococosis y otras pueden debutar en medio ambulatorio.

³ BGN-NF: bacilos gramnegativos no fermentadores.

⁴ Actualmente es excepcional en el medio urbano.

⁵ En ocasiones son bacteriemias polimicrobianas.



Figura 19.3. Frascos para hemocultivo.

Los frascos para hemocultivo llevan diferentes clases de medios, dependiendo del objetivo del cultivo y el microorganismo sospechado. Según la técnica convencional se siembran dos frascos, uno con atmósfera aerobia y otro anaerobia. En pediatría se siembra un solo frasco de hemocultivo, con menor volumen de medio de cultivo y atmósfera aerobia («pediátrico»).

tos de venopunción diferentes. El intervalo entre ellos dependerá del tiempo que sea prudente esperar para iniciar el tratamiento antibiótico, generalmente entre 30 y 60 minutos, aunque este tiempo puede reducirse a 10-15 minutos o incluso sin intervalo de tiempo (por ejemplo en un *shock* séptico o bien en una insuficiencia cardíaca grave). Por el contrario, ante la sospecha



Figura 19.4. Extracción de la sangre para hemocultivo.

La sangre debe extraerse del paciente e inocularse en los frascos para hemocultivo, mediante una técnica rigurosamente aséptica para evitar contaminaciones. Es inaceptable asumir las elevadas tasas de contaminación que se encuentran habitualmente en los laboratorios (igual o superior a los positivos verdaderos). Esa cifra puede reducirse alrededor del 1% (en adultos) cuando la extracción se realiza correctamente. En la tabla 19.2 se describe la técnica de extracción.

de una endocarditis infecciosa sin un cuadro tóxico grave, es mejor repartir tres hemocultivos en 24 horas con el fin de demostrar una bacteriemia continua. Hacer varios hemocultivos permite además sembrar un volumen mayor de sangre, por lo que es más probable la recuperación del agente causal. En estudios realizados en enfermos adultos, la concentración de microorga-

nismos en la sangre en la mitad de los casos es menor o igual a una unidad formadora de colonias (ufc) por ml, y en una quinta parte de ellos puede incluso ser inferior a 0,1 ufc/ml. En niños la cantidad aconsejable de sangre para sembrar es entre 1 y 5 ml adaptándose a su volemia, aunque a veces no se puede obtener esta cantidad. Se considera que entre 0,5 y 1 ml es el volumen mínimo aceptable y su incubación en un único frasco aerobio sería suficiente. Existen frascos comercializados para siembras pediátricas. Un volumen insuficiente de sangre es causa de hemocultivo negativo, pero cantidades superiores a las señaladas no aumentan su rentabilidad, por otra parte la relación óptima sangre/medio de cultivo para diluir posibles sustancias inhibitoras es de 1 a 5 (v/v).

Debe evitarse, si es posible, la extracción de la muestra a través de catéteres, en particular si llevan más de 48 horas colocados, ya que las contaminaciones son más frecuentes.

La realización de varios hemocultivos al permitir aislar repetidamente el mismo microorganismo facilita la confirmación de una sepsis causada por microorganismos colonizantes de la piel al descartar la contaminación (endocarditis por *Staphylococcus epidermidis*, bacteriemia por *S. epidermidis* con origen en un catéter, etcétera).

Tipos de técnicas

Actualmente se dispone de diferentes técnicas para hacer un hemocultivo. La tradicional utiliza frascos con medios líquidos que requieren lectura visual para detectar el crecimiento microbiano. Se sacan los frascos de hemocultivo de la estufa y se leen cada día para detectar signos macroscópicos de crecimiento.

Los frascos contienen entre 40 y 100 ml de caldo de cultivo rico en elementos nutritivos y al mismo tiempo llevan incorporado un anticoagulante (polianetol sulfonato sódico, SPS), que puede tener una cierta acción inhibitoria sobre las neisserias y los peptoestreptococos. Algunos frascos, además del medio de cultivo, contienen resinas u otros materiales que fijan e inactivan los antibióticos, permitiendo la recuperación de bacterias en pacientes tratados.

Cabe destacar el sistema bifásico de Ruiz-Castañeda consistente en frascos que tienen en su interior dos fases, una sólida de agar adosada a la pared y otra líquida. Este sistema se ideó para el diagnóstico de la brucelosis ya que la bacteria responsable de esta infección es de crecimiento lento y tiene una elevada virulencia. Con este sistema puede observarse el crecimiento en

el medio sólido sin necesidad de abrir el frasco con lo que se evita tanto el riesgo de contaminar el medio como de contraer esta infección en el laboratorio.

El sistema de lisis-centrifugación se basa en la introducción de la sangre en un tubo con saponina y fluorocarbón; la saponina lisa las células sanguíneas y el fluorocarbón hace de cojín para la centrifugación, se decanta el sobrenadante y se siembra el sedimento en una placa de Petri con el medio de cultivo adecuado⁴.

En los sistemas automatizados⁵ los frascos de hemocultivo se introducen en celdas individuales dentro del incubador con agitación continua para facilitar la multiplicación bacteriana y se realiza un control del crecimiento en cada botella cada 10-15 minutos (Fig. 19.5).



Figura 19.5. Estufa automática para hemocultivos.

Los frascos de hemocultivo se incuban en una estufa con agitación y lectura continua y automática. Estos frascos poseen en su base un sensor que percibe modificaciones, inducidas por el crecimiento microbiano, que son leídas por la máquina. Existen modelos de diferentes marcas que detectan la producción de CO₂ por cambio de color (Bact/ALERT) o fluorescencia (Vital) en el sensor de la base del frasco (véase figura 19.3). Otros detectan la producción de CO₂ y el consumo de O₂ por fluorescencia (Serie BACTEC 9000) y otros perciben cambios de presión en las botellas (serie ESP). Al efectuar una lectura continua detectan precozmente el crecimiento microbiano.

⁴ Un sistema de este tipo, Isolator®, está comercializado por Wampole Laboratories.

⁵ Existen diversos sistemas automatizados de hemocultivos, como los sistemas Bact/ALERT (bioMérieux) y el sistema BACTEC (BD) y ESP (Trek Diagnostic Systems), entre otros.

Algunos microorganismos requieren medios específicos y/o técnicas particulares para su aislamiento, como las micobacterias (utilizan caldos como el 7H9; capítulo 4), la legionela, para cuyo aislamiento debe usarse un sistema de lisis-centrifugación y sembrar en BCYE; para *Bartonella* y *Afipia* también se requiere una técnica de lisis-centrifugación y sembrar en medio de agar sangre de conejo (5-7%) incubado en atmósfera húmeda con CO₂; para el aislamiento de borrelia y leptospira se requieren técnicas complejas y experiencia, por lo que el cultivo de la sangre no siempre constituye la técnica más recomendable para el diagnóstico⁶.

La técnica de lisis-centrifugación también se recomienda cuando se sospecha una fungemia por *Histoplasma capsulatum* (que se localiza en los macrófagos), pero no en casos de candidemia o aspergilosis sistémica.

Seguimiento

Una vez inoculados los frascos se incuban a 35-37° C durante siete a diez días con lectura diaria. Con el método convencional los frascos se inspeccionan diariamente de forma manual con el fin de detectar signos que indiquen la presencia de crecimiento (enturbiamiento, hemólisis, gas o presencia de colonias en el medio de Castañeda). Hay microorganismos que crecen sin enturbiar el medio y por otra parte con el tiempo la sangre se hemoliza espontáneamente y el medio se enturbia aún sin crecimiento bacteriano, por ello se ha recomendado efectuar un subcultivo desde los frascos que sean visualmente negativos transcurridas las primeras 48 horas y otro el último día antes de desecharlo como negativo. Estos subcultivos se realizan en dos placas de agar sangre o chocolate que se incuban una en aerobiosis y otra en anaerobiosis. No todos los microbiólogos consideran eficiente efectuar estas resiembras ciegas. Ante la sospecha de microorganismos de crecimiento lento, como la brucela, o frente a una probable endocarditis o una fungemia se mantienen los hemocultivos hasta tres semanas. La sospecha de brucelosis puede confirmarse realizando una prueba serológica rápida, como el Rosa de Bengala, lo que permite manipular los hemocultivos con más cuidado, si cabe⁷. Cuando se utiliza el medio bifásico, el subcultivo se hace en el mismo frasco; basta con bañar la superficie del agar con el propio caldo de cultivo.

En los sistemas automatizados la lectura está programada y tiene lugar automáticamente cada 10 minutos. La positividad no depende de la turbidez o la hemólisis sino que se detecta por el cambio de pH en el medio

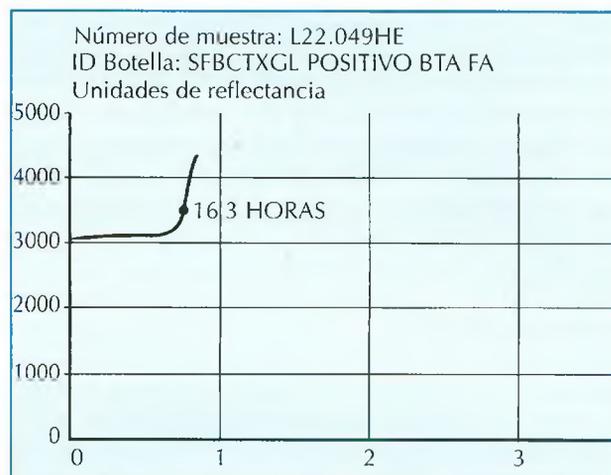


Figura 19.6. Curva de crecimiento.

La curva de crecimiento, determinada por el incremento de color, fluorescencia o presión, queda registrada en el ordenador. Se emite una señal sonora cuando la pendiente de la gráfica es interpretada como positiva.

de cultivo, por la producción de CO₂ por el microorganismo, o por otro marcador químico (O₂) o físico (fluorescencia, presión). La positividad suele detectarse más precozmente con estos instrumentos que mediante la lectura visual convencional, no obstante, no hay diferencia en cuanto al porcentaje de hemocultivos positivos (Fig. 19.6).

Cuando se detecta un hemocultivo positivo se practica una tinción de Gram y posteriormente se resiembran en los medios adecuados según las características morfológicas y tintoriales del microorganismo observado, para su posterior aislamiento e identificación. Además, es recomendable efectuar directamente un estudio de sensibilidad por técnicas de difusión. El 85% de los hemocultivos son positivos en menos de 72 horas, los sistemas automáticos pueden detectarlos incluso en ocho horas.

Algunos microorganismos que crecen lentamente o son poco activos metabólicamente, como *Bartonella*, no se detectan por los sistemas automáticos, por lo que ante su sospecha debe efectuarse una resiembra en el medio específico según la bacteria sospechada.

Información e interpretación de los hemocultivos positivos

Para interpretar correctamente un hemocultivo positivo es necesario conocer la situación clínica del paciente, su enfermedad de base, la presencia de factores predisponentes de la infección, así como el tratamiento antimicrobiano previo recibido. La valoración viene faci-

⁶ Aunque *Francisella tularensis* requiere medios con cistina, en los hemocultivos crece en 5 a 15 días por el aporte nutritivo de la sangre. Las brucelas, en el primer aislamiento, crecen lentamente (5-10 días), pero no son exigentes.

⁷ Las precauciones universales obligan a manipular todas las muestras con el nivel de seguridad tipo 2.

litada no solo por la clínica del paciente sino también por el número de hemocultivos positivos al mismo microorganismo. El crecimiento de un microorganismo colonizador habitual de la piel (estafilococo coagulasa negativa, corinebacterias) o de las mucosas (estreptococos del grupo *viridans*) tiene más probabilidad de ser contaminante si se produce en un único hemocultivo entre varios realizados. Otros microorganismos también considerados habitualmente como contaminantes son las neisserias saprofitas, bacilus y propionibacterias. Sin embargo, el hallazgo de hemocultivos positivos para estos microorganismos, en pacientes portadores de catéteres endovasculares, material protésico o con cardiopatías valvulares, obliga a descartar una infección verdadera.

También se ha sugerido que los hemocultivos positivos para bacterias potencialmente contaminantes que crecen tardíamente después de 72 horas de incubación son sospechosos de corresponder a una contaminación. Naturalmente, la condición clínica del paciente y otros datos de la exploración son fundamentales para la evaluación definitiva de estos resultados.

Es esencial informar lo más precozmente posible al médico responsable del paciente, del resultado positivo del hemocultivo, indicándole el microorganismo observado mediante la tinción de Gram, y al día siguiente del resultado de la identificación presuntiva y del antibiograma directo. En algunos casos, puede ser necesario la confirmación de estos resultados por técnicas estandarizadas.

LOS CATÉTERES ENDOVASCULARES COMO FOCO DE SEPSIS

En la actualidad es muy frecuente que un paciente hospitalizado lleve un catéter endovascular y no es excepcional que también lo lleven pacientes en régimen de asistencia domiciliaria. Estos catéteres pueden infectarse y causar septicemia.

Existen diversos tipos de catéteres, pero en la mayoría de ellos la infección suele producirse desde la piel a través del trayecto subcutáneo hasta alcanzar el extremo intravascular, o bien a partir de las conexiones externas, avanzando los microorganismos por el interior del catéter. La mayoría de las infecciones están causadas por estafilococos coagulasa negativa, particularmente *S. epidermidis*, y con menor frecuencia por *S. aureus*, bacilos gramnegativos, cándidas y corinebacterias. No son infrecuentes las infecciones polimicrobianas de los catéteres con presencia de dos o más clones de estafilococos coagulasa negativa (véase el capítulo 21).

En las infecciones de los catéteres puede producirse una inflamación local con flebitis y ocasionalmente sep-

ticemia. Sin embargo, una colonización sin flebitis también puede originar una bacteriemia.

Técnica cuantitativa

Se acepta que el número de bacterias existentes en la punta de un catéter infectado es elevado. Por ello en la septicemia de ese origen, los cultivos cuantitativos de la sangre obtenida a través del catéter suelen dar recuentos superiores a los de la sangre obtenida directamente de una vena periférica.

Ante la sospecha clínica de una bacteriemia cuyo origen puede ser un catéter intravascular, que no es posible retirar fácilmente, se pueden realizar hemocultivos cuantitativos con el objetivo de demostrar que es el foco de la infección. Se extrae una pequeña cantidad de sangre a través de una vena y otra a través del catéter y se pone cada una en un tubo estéril diferente con anticoagulante. En el laboratorio se añade una cantidad igual de cada muestra a dos tubos de agar fundido mantenidos a 50° C. Se mezcla con suavidad la sangre y el agar y se vierte cada tubo en una placa diferente. Tras la incubación se cuentan las colonias crecidas en la masa de cada una de las placas de agar. Se considera que un catéter es foco de infección cuando se aísla el mismo microorganismo y el número de ufc/ml es al menos cuatro veces superior en el cultivo hecho con la sangre obtenida del catéter que en el de la venopunción (Fig. 19.7).

Por si la bacteriemia fuera escasa y los cultivos por esta técnica fueran negativos se recomienda practicar una serie de hemocultivos convencionales.



Figura 19.7. Hemocultivo cuantitativo.

La comparación entre el número de colonias obtenidas en una extracción efectuada por una vena de un paciente con bacteriemia y las obtenidas en una extracción efectuada a través de un catéter intravascular permite sospechar que éste es el foco de la bacteriemia cuando se aísla la misma bacteria y el número de colonias obtenidas a través del catéter es al menos cuatro veces superior al de las obtenidas por la vía venosa. Las muestras extraídas se siembran en la masa de un agar fundido. A la izquierda se observa el cultivo de la sangre venosa y a la derecha las incontables colonias de la sangre obtenida a través del catéter.

Tabla 19.2
Técnica de extracción de sangre para hemocultivo

1. Para la extracción utilizar guantes estériles.
2. Colocar encima de una mesa y en la cabecera del enfermo los frascos de hemocultivo. Mojar el algodón con alcohol yodado o povidona y colocarlo sobre los tapones de goma, dejando actuar durante tres minutos.
3. Desinfectar la piel del brazo del enfermo en el lugar donde se practicará la extracción con algodón empapado en alcohol etilítico o alcohol isopropílico del 70%. Aplicar posteriormente otro algodón con tintura de yodo (1-2%) durante 30 segundos como mínimo o povidona yodada al 10% durante un minuto, siendo recomendado prolongar ligeramente estos tiempos. Poner un torniquete en el brazo.
Retirar el algodón que se ha dejado en el lugar previsto de la extracción y extraer con una jeringa con técnica aséptica entre 10 y 20 ml de sangre (1-5 ml en niños, mínimo entre 0,5 y 1 ml).
Alternativamente la extracción puede hacerse mediante un sistema de seguridad tipo Safety-Lok® (BD Diagnostics).
4. Debe tenerse preparado otro algodón empapado con alcohol yodado, para que al extraer la aguja de la vena se pueda ocluir el lugar de la punción. No tocar la aguja con el algodón. Sacar los algodones de los tapones e inyectar la sangre a partes iguales en cada frasco. Sembrar primero el frasco anaerobio evitando la entrada de aire.
5. Limpiar el yodo residual de la piel con alcohol de 70° para evitar que se irrite.
6. Durante todo el procedimiento tiene que haber el mínimo de personas en la habitación (idealmente las personas involucradas), se han de evitar las corrientes de aire y hablar.
7. Agitar suavemente por rotación los frascos inoculados. Limpiar los tapones de goma con la misma solución de yodo. No cubrir los tapones con gasas, algodón o esparadrapo. Colocar las etiquetas de identificación del paciente en los frascos y llevarlos al laboratorio con el impreso de la petición debidamente cumplimentado orientando la sospecha clínica.

DETECCIÓN DE ANTÍGENO Y TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN EN LA SANGRE

Las técnicas de detección de antígeno en la sangre se han utilizado para la detección de criptococo (látex) tanto con fines de diagnóstico como para seguir la evolución del proceso (sepsis por criptococo).

No hay que olvidar que se utilizan técnicas de detección de antígeno en muestras de sangre para el diagnóstico de la hepatitis B (HBsAg, HBeAg), en las infecciones sistémicas por citomegalovirus y en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (véase el capítulo 8).

Asimismo las técnicas de amplificación (PCR y otras) se utilizan para la detección en la sangre de citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, del HIV, de los virus de las hepatitis B y C, de *Mycobacterium tuberculosis* y otros.

Por otra parte, se está evaluando la utilidad de las técnicas de amplificación con muestras de sangre para la detección del genoma de microorganismos que causan infecciones focales como la meningitis (meningococo, neumococo) y la neumonía (neumococo, clamidófila y otros) (véase el capítulo 9).

CONCEPTO DE HEPATITIS VÍRICA

Algunos virus tienen un tropismo específico para el hígado, en el que se replican causando inflamación y necrosis hepática difusa (hepatitis). Estos virus se denominan conjuntamente «virus de las hepatitis». En este momento se considera la existencia de seis virus formando parte de este grupo: los virus de las hepatitis A, B, C, D, E y G. Otros virus, que afectan prioritariamente a otros órganos o tejidos, ocasionalmente pueden causar hepatitis asintomática o clínicamente expresiva, como sucede con el virus de Epstein-Barr y el citomegalovirus; pero no se incluyen en este grupo (Tabla 20.1).

Las hepatitis agudas suelen presentar un cuadro clínico relativamente homogéneo, caracterizado por astenia, inapetencia, anorexia, náuseas, molestias en el hipocóndrio derecho, ictericia y coluria, todo ello de intensidad variable (Figs. 20.1 y 20.2). La necrosis de las

células hepáticas, característica de las hepatitis, da lugar al incremento en el suero de las transaminasas (amino-transferasas) que son enzimas intracelulares. El aumento de la aspartatoamino-transferasa (AST) y de la alaninaamino-transferasa (ALT), constituye el mejor marcador de hepatitis activa. Asimismo, se produce un incremento de la bilirrubina en el plasma, responsable de la ictericia y la coluria, de la fosfatasa alcalina y la γ -glutamyl-transpeptidasa (γ GT) como consecuencia de la obstrucción canalicular hepática por la inflamación.

Los principales aspectos que diferencian a los virus de las hepatitis entre sí son:

1. La vía de transmisión y el período de incubación.
2. La tendencia a la cronicidad y a causar complicaciones tardías (cirrosis y cáncer hepático).
3. La disponibilidad de vacunas.

Tabla 20.1
Algunas características de las hepatitis víricas

Virus de las hepatitis	Transmisión	Período de incubación en días ¹	Primo infección asintomática	Evolución a la cronicidad	Vacuna
A	Oral	15-50 (28-30)	Frecuente en niños < 5 años: 80-95% > 5 años: 10-25%	No	Sí
B	Parenteral ²	45-180 (60-90)	Frecuente 65-80%	Sí ^{3,4} (5-10% en adultos) (70-100% en recién nacidos)	Sí
C	Parenteral ²	15-180 (45-60)	Frecuente > 90%	Sí ⁴ (60-80%)	No
D	Parenteral ²	15-60 —	Rara	Sí Variable ⁵	No ⁶
E	Oral	15-65 (25-40)	Frecuente 65-80%	No	No

¹ Se indican los valores extremos y entre paréntesis el promedio.

² También se transmite con frecuencia variable por vía sexual. Se puede transmitir al recién nacido durante el parto.

³ La cronicidad se define por la persistencia del HBsAg más de 6 meses o el HBeAg más de 3 meses.

⁴ Tardíamente puede causar cirrosis y carcinoma hepatocelular.

⁵ Varía entre el 5% en la coinfección y el 80% en la superinfección.

⁶ En los pacientes no infectados por el HBV la vacuna de la hepatitis B previene la infección por el virus de la hepatitis D.



Figura 20.1. Paciente icterico.

Puede observarse el color amarillo de la conjuntiva y de la piel de un paciente afecto de hepatitis vírica.

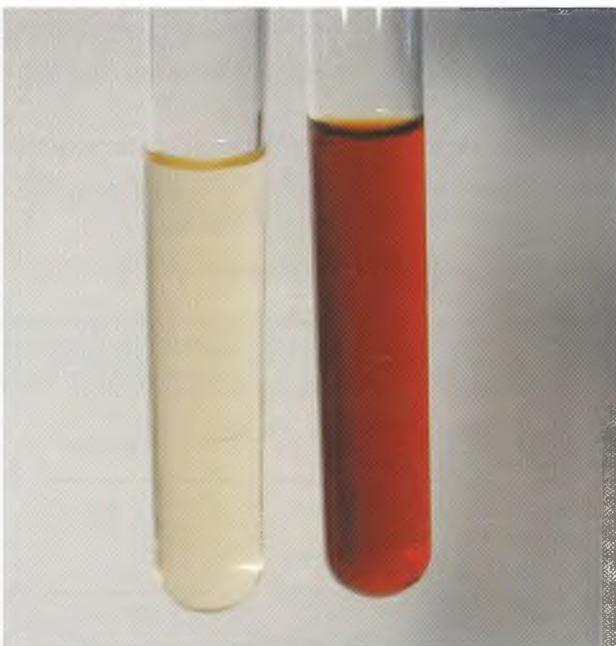


Figura 20.2. Orina colúrica.

En el tubo de la izquierda puede observarse una orina de aspecto normal y en el de la derecha una orina intensamente colúrica.

Los virus de las hepatitis no se replican en las líneas celulares convencionales, por lo que el diagnóstico etiológico no se efectúa por cultivo, sino mediante técnicas de detección de antígeno, pruebas genéticas y serológicas.

VIRUS DE LA HEPATITIS A

El virus de la hepatitis A (*Hepatitis A virus*, HAV) es un virus RNA perteneciente al género *Hepatovirus* que forma parte de los picornavirus.

La infección se produce por vía oral, directamente de persona a persona o a través del agua o alimentos contaminados; en estos casos pueden producirse brotes. El período de incubación oscila entre 15 y 50 días.

La eliminación del virus por las heces tiene lugar al final del período de incubación y cesa al inicio del período sintomático, siendo resistente en el medio ambiente a los agentes físicos y químicos.

En el 95% de los casos, en particular en niños y jóvenes, la infección es asintomática. En los pacientes sintomáticos, las manifestaciones clínicas y biológicas no se diferencian de las producidas por los otros virus de las hepatitis, aunque pueden existir formas clínicas muy benignas, indiferenciadas, con febrícula y astenia como única sintomatología. Los síntomas suelen durar de dos a tres semanas, mejorando progresivamente. La enfermedad es autolimitada y no evoluciona a la cronicidad por lo que el pronóstico general es muy bueno; aunque excepcionalmente pueden darse formas fulminantes.

La infección aguda se diagnostica mediante la detección en el suero de los pacientes de anticuerpos anti-HAV de clase IgM por técnica de ELISA de captura; los anticuerpos IgG anti-HAV persisten toda la vida y constituyen un signo de inmunidad.

La administración de inmunoglobulina humana después de la exposición puede prevenir la enfermedad o disminuir la sintomatología. La vacunación con virus inactivados previene la enfermedad.

VIRUS DE LA HEPATITIS E

El virus de la hepatitis E (*Hepatitis E virus*, HEV) es un virus RNA que posee muchas características semejantes al de la hepatitis A, como son:

1. Su transmisión feco-oral, en particular a través del agua con contaminación fecal, y un período de incubación semejante.
2. Su capacidad para producir brotes epidémicos.
3. Sus manifestaciones clínicas y biológicas.
4. La ausencia de evolución a la cronicidad.

Tiene una distribución universal, aunque irregular, siendo frecuente en el mundo subdesarrollado e infrecuente en Europa occidental y Norteamérica.

La infección es asintomática o presenta una clínica semejante a la de la hepatitis A. Tiene buen pronóstico, pero por razones desconocidas, cuando la enfermedad afecta a mujeres embarazadas durante el tercer trimestre, son frecuentes las formas fulminantes con elevada mortalidad. La excreción de virus por las heces tiene lugar durante toda la enfermedad.

Debe pensarse en la hepatitis E en los viajeros a zonas endémicas (Extremo oriente, Asia, África, México y otros) que retornan con una hepatitis no A, no B, no C. El diagnóstico etiológico se efectúa mediante la detección de anticuerpos específicos (anti-HEV de la clase IgM), pero no se determinan regularmente en nuestro medio por la rareza de la enfermedad.

VIRUS DE LA HEPATITIS B

El virus de la hepatitis B (*Hepatitis B virus*, HBV) está formado por DNA bicatenario incluido en una cápsida de 27 nm de diámetro, recubierta por una envoltura lipídica. El diámetro del virión completo es de 42 nm. Perteneció al género *Orthohepadnavirus*.

El antígeno de superficie denominado HBsAg (*Hepatitis B surface Antigen*) está formado por las glicoproteínas que se hallan en la envoltura del virión, que son segregadas al plasma, donde forman agregados libres. Este antígeno se denomina también antígeno Australia.

Otro antígeno de interés es el denominado antígeno del «core», abreviado como HBcAg (*Hepatitis B core Antigen*); este antígeno se localiza en la cápsida. El HBcAg a diferencia del HBsAg no se detecta nunca libre en el plasma de los enfermos. Otro antígeno situado más internamente en la cápsida es el antígeno e (HBeAg, *Hepatitis B e Antigen*), codificado en el mismo gen del HBcAg, pero con otra pauta de lectura. En las fases de replicación activa del virus, el HBeAg se detecta en el plasma del paciente y es un índice de la transmisibilidad del virus.

Todos estos antígenos dan lugar a la producción de sus anticuerpos específicos: anti-HBs, anti-HBc y anti-HBe.

El HBV se transmite por vía parenteral fundamentalmente a través de transfusiones de sangre y plasma, de la administración de factores de la coagulación a hemofílicos (factor VIII)¹, de jeringas compartidas (drogadictos), contacto con sangre en actividades médicas, en particular dentistas, cirujanos, ginecólogos, y pinchazos con jeringas que se acaban de utilizar en pacientes con hepatitis (accidentes laborales). Este virus también se transmite, aunque menos eficientemente, por contacto sexual. La transmisión materno-infantil durante el parto es frecuente, en particular en madres con títulos elevados de HBeAg que como se ha señalado es un índice de elevada replicación y transmisibilidad del virus.

El período de incubación oscila entre 45 y 180 días. La enfermedad puede ser asintomática. En los casos sintomáticos, las manifestaciones clínicas son las comunes a las hepatitis: febrícula, astenia, inapetencia, náuseas y finalmente ictericia con coluria y acolia. Excepcionalmen-

te, se puede producir una hepatitis fulminante mortal. En alrededor del 10% de los casos, la infección evoluciona a la cronicidad.

En la mayoría de los pacientes con hepatitis B aguda y en prácticamente todos los que tienen una hepatitis crónica (activa o no) se detecta la presencia en el suero del HBsAg, en ausencia de anticuerpos anti-HBs, por lo que este antígeno es un buen marcador de infección. También se hallan regularmente presentes los anticuerpos anti-HBc. Cuando el paciente cura, persisten los anti-HBc, pero deja de detectarse el HBsAg y aparecen los anticuerpos anti-HBs.

Ante la sospecha clínica de hepatitis B aguda el diagnóstico se efectúa como en las demás hepatitis, mediante la detección de la alteración de los parámetros biológicos: incremento de la bilirrubina, de las transaminasas, de la γ GT y de las fosfatasa y la detección del HBsAg y de anticuerpos anti-HBc de la clase IgM.

Cuando el estado de portador, definido por la positividad del HBsAg, se prolonga más de 6 meses después de la infección, el paso a la cronicidad es prácticamente la regla.

El valor de las transaminasas orienta sobre el grado de actividad en las formas crónicas, pero también es útil la cuantificación del HBeAg y del DNA del HBV, que están incrementados cuando existe una replicación activa. Los estadios de mejoría en las formas crónicas se caracterizan por la disminución de los títulos de HBeAg y HBV-DNA y la aparición de anti-HBe (Tabla 20.2).

El curso de los pacientes con infección crónica es muy variado, ya que puede ser benigno o evolucionar hacia la cirrosis o el hepatocarcinoma, siendo necesaria la biopsia para conocer con precisión el grado de lesión existente.

A las personas con accidentes laborales y a los niños nacidos de madres HBsAg positivo se recomienda como profilaxis la administración de inmunoglobulina específica hiperinmune. En todo caso debe administrarse dentro de las 12 horas que siguen al contacto o al parto.

La mejor profilaxis es el uso de la vacuna. La vacuna debe administrarse junto a la inmunoglobulina hiperinmune en los niños recién nacidos hijos de madre HBsAg positivo y a las personas seronegativas expuestas por un accidente (pinchazos, contacto sexual esporádico o convivencia con una pareja con infección crónica).

VIRUS DE LA HEPATITIS D

El virus de la hepatitis D (*Hepatitis delta virus*, HDV), pertenece al género *Deltavirus*. Es un virus RNA defec-

¹ Hoy estos productos terapéuticos están controlados y raramente son causa de transmisión de éste y otros virus prevalentes (Hepatitis C, HIV).

Tabla 20.2
Marcadores virológicos en los estadios de la hepatitis B

Marcador	Período de incubación	Fase aguda	Infección crónica		Infección curada	Vacunación
			Activa	Inactiva		
HBsAg ¹	+	+	+	+	-	-
HBeAg ²	+	+	+ ⁴	-	-	-
HBV DNA ²	+	+	+ ⁵	+ ⁵	-	-
Anti HBe						
IgM	-	+	+	-	-	-
Ig totales ³	-	+	+	+	+	-
Anti HBe ²	-	-	- ⁴	+	+	-
Anti HBs	-	-	-	-	+	+ ⁶

¹ Es el marcador más precoz de infección.

² La presencia de estos marcadores (HBeAg y HBV DNA) en las formas crónicas se relacionan con la actividad (replicación activa: HBeAg; anti-HBe⁻; ausencia de replicación: HBeAg⁻, anti-HBe⁺).

³ Es el marcador persistente de una infección pasada, independientemente de su evolución.

⁴ Algunas personas en este estadio pueden presentar HBeAg negativo y anti-HBe positivo.

⁵ Algunas personas en este estadio pueden presentar niveles muy bajos.

⁶ En la vacunación, como sólo se inyecta HBsAg, sólo aparecen anticuerpos frente a él.

tivo que sólo puede replicarse en las células hepáticas en presencia del virus de la hepatitis B, coinfectando la misma célula.

El genoma del virus codifica una única proteína que durante el ensamblaje del virión se sitúa alrededor del RNA y constituye el antígeno D del virus (HDAg). La simetría de la nucleocápsida no ha sido precisada. A su vez esta zona nuclear está recubierta por la compleja estructura que forma la envoltura del HBV, que incluye el HBsAg, que está codificado en el virus B.

La infección por el HDV puede producirse simultáneamente (coinfección) con el HBV o posteriormente como una superinfección en un portador crónico de HBV, siendo en este caso el período de incubación de 15 a 60 días.

En las coinfecciones el cuadro clínico es semejante al de la infección por HBV, pero suele ser bifásico, con dos elevaciones de las transaminasas separadas por un mes; apareciendo en la segunda los anticuerpos anti-HDV, incluyendo los de la clase IgM. Cuando la coinfección evoluciona hacia la curación (> 90% de los casos), los títulos de anticuerpos anti-HDV suelen ser bajos y transitorios, haciendo el diagnóstico retrospectivo difícil. Cuando se produce la superinfección (que se da en alrededor del 10% de los portadores crónicos), en más del 80% de los casos la infección por el HDV evoluciona a la cronicidad. En ambos casos la hepatitis suele ser más grave, produciéndose cuadros de hepatitis fulminante y tendencia a la cirrosis con más frecuencia que en las

infecciones únicas por el virus B. La transmisión se produce por vía parenteral y también por vía sexual.

La prueba más utilizada para el diagnóstico de la superinfección por HDV es la determinación de los anticuerpos anti-HDV IgM y las Ig totales que suelen ser elevadas. En ambas situaciones, coinfección y superinfección el HBsAg es positivo pero en el primer caso se detecta anti HBe de la clase IgM y en el segundo caso no.

Debido a que la infección por el HDV no puede producirse en las personas que no están infectadas por HBV la vacunación frente a este virus es el mejor método de profilaxis.

VIRUS DE LA HEPATITIS C

El virus de la hepatitis C (*Hepatitis C virus*, HCV) es un virus RNA que pertenece al género *Hepacivirus* (Familia *Flaviviridae*) y ha sido reconocido como la causa principal de hepatitis posttransfusional y hepatitis crónica no causadas por el virus B. El virus se ha clasificado en seis genotipos que se han correlacionado con diferentes áreas geográficas y diferente nivel de respuesta terapéutica al interferón².

El HCV se transmite por vía parenteral, sexual y perinatal, aunque estas últimas con menor frecuencia que el HBV o el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). La prevalencia en la población general varía, siendo alrededor del 1-2%, aunque depende de la zona considerada.

² Por técnica de hibridación inversa (INNO-LiPA, Innogenetics; véase el capítulo 9) se pueden diferenciar varios genotipos del virus de la hepatitis C. Existen otros métodos de tipado como amplificación seguida de restricción o serotipado.

La mayoría de las infecciones son asintomáticas. En las formas sintomáticas el cuadro inicial aparece tras un período de incubación de 15 a 180 días de media y cursa como otras hepatitis agudas. La infección tiene una gran tendencia a la cronicidad (~70%). En el 20 al 30% de estos pacientes se produce cirrosis hepática en un período medio de 20 años y existe un mayor riesgo para el desarrollo del carcinoma hepatocelular.

El diagnóstico se efectúa mediante detección de anticuerpos totales (anti-HCV) frente a proteínas de la región nuclear del HCV y proteínas no funcionales. Aunque la sensibilidad de esta prueba es elevada, un pequeño porcentaje de personas infectadas es negativo en los estadios iniciales. La especificidad de esta reacción puede comprobarse mediante una prueba de EIA frente a antígenos individualizados y purificados (RIBA, Chiron Corp.) (véase el capítulo 8).

La detección del RNA del virus (HCV RNA) en el suero por una técnica de amplificación es un método adecuado para la confirmación y el seguimiento de la enfermedad.

El control sistemático y obligatorio de las donaciones de sangre para descartar a los portadores de HBV, HCV y HIV, es una de las mejores medidas de control de las infecciones causadas por estos virus. A pesar de ello la transmisión de estas enfermedades continúa a través de prácticas de riesgo, como la drogadicción, y de relaciones sexuales.

VIRUS DE LA HEPATITIS G

El virus de la hepatitis G (*Hepatitis G virus*, HGV) se ha considerado causante de hepatitis adscribiéndose ten-

tativamente a la familia *Flaviviridae*. Sin embargo, en diversos estudios sobre casos de transmisión postransfusional y de infección neonatal por este virus no se han asociado a signos clínicos ni biológicos de hepatitis, por lo que queda por determinar su verdadera capacidad patógena, que probablemente es nula.

TÉCNICAS DE LABORATORIO

El diagnóstico de las hepatitis se realiza fundamentalmente utilizando técnicas serológicas complementadas por la detección de algunos antígenos víricos y en segundo lugar por técnicas genéticas de amplificación y de captura de híbridos para la detección del genoma vírico y la determinación de los genotipos, respectivamente.

La importancia sanitaria y económica de estas pruebas ha hecho que la industria haya desarrollado sistemas muy eficientes de diagnóstico con un alto grado de automatización. Resulta imposible señalar todas las técnicas y las compañías que disponen de reactivos e instrumentos automáticos para el diagnóstico inmunológico y genético de estas infecciones. A continuación se señalan aquellas que disponen de sistemas automáticos para el diagnóstico de las hepatitis. Estos sistemas pueden ser abiertos y cerrados. Los que se señalan a continuación disponen simultáneamente de sistemas y reactivos para el diagnóstico: Abbott Laboratories; Beckman Coulter Inc.; Bio Chem Inmuno Systems; bio Merieux, biokit SA, Bio-Tek Instruments; DiaSorin; Ortho-Clinical Diagnostics; Roche y otras.

Disponen de reactivos para la detección de ácidos nucleicos de los virus de las hepatitis: Bayer Corp. Diagnostic; Roche; Gen-Probe Inc.; Digene Corporation.

INTRODUCCIÓN

Las defensas antiinfecciosas se estructuran en tres niveles fundamentales, el primero lo constituye la barrera cutaneomucosa que impide la penetración de los microorganismos, el segundo la fagocitosis que destruye los microbios que han superado esa barrera y por último la respuesta inmunitaria que refuerza los mecanismos anteriores, produciendo anticuerpos, incrementando la eficacia de la fagocitosis y destruyendo las células parasitadas por microbios a cuyo interior no llegan los elementos de defensa.

Las alteraciones y déficit en cualquiera de los niveles defensivos señalados incrementan la susceptibilidad a las infecciones que están causadas no sólo por patógenos, sino también por los microorganismos que forman parte de la flora comensal normal o del medio ambiente (flora telúrica). Estos microbios comensales, que son incapaces de producir enfermedad en las personas sanas, pero que la producen en las que tienen algún factor predisponente de infección, se denominan microorganismos oportunistas y las infecciones que causan, infecciones oportunistas. Dependiendo del tipo de déficit defensivo se producirá la infección por uno u otro microorganismo.

MECANISMOS DE DEFENSA

Ni los microbios comensales ni los patógenos pueden atravesar la piel intacta salvo en contadas excepciones como el virus del papiloma o los estrogiloides. Los microbios comensales tampoco pueden atravesar las mucosas, pero es atributo de los patógenos introducirse en el cuerpo humano a través de ellas, para cuya penetración disponen de sistemas específicos.

Por otra parte, algunos órganos profundos, como el pulmón, el riñón, el útero, el hígado y el páncreas, las glándulas salivales y otros, están en contacto con el exterior a través de sus vías y conductos naturales; por tanto, para que la flora normal no alcance esos órganos, existen sistemas de defensa fisiológicos, el más importante

de los cuales es la permeabilidad de esas vías al flujo ininterrumpido de las secreciones (orina, saliva, bilis, etc.) que fluyen por ellas arrastrando los microorganismos.

Los microbios que por una u otra razón atraviesan las mucosas, o a través de los conductos naturales alcanzan órganos como el pulmón o los riñones y se multiplican en el espacio intersticial de los tejidos, son fagocitados por los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y los macrófagos tisulares. Los microbios no patógenos (de la flora normal y telúricos) son rápidamente erradicados por los fagocitos¹, pero los patógenos resisten la fagocitosis de los neutrófilos por disponer de una cápsula u otros factores que dificultan la endocitosis por parte de esas células fagocitarias; pero si finalmente son endocitados suelen ser destruidos en los fagolisosomas; este grupo de microorganismos es el de las bacterias piógenas y algunos hongos (por ejemplo, estafilococo, estreptococo, meningococo, aspergilos).

Otros microorganismos patógenos de multiplicación extracelular como *Mycobacterium tuberculosis*, las leishmanias o *Histoplasma capsulatum*, aunque sean endocitados por los neutrófilos no son destruidos y requieren la acción de los macrófagos que se van acumulando en el lugar de la infección formando un granuloma. La fagocitosis por los macrófagos permite reducir la carga microbiana, pero habitualmente no los erradica por lo que algunos de estos microorganismos persisten durante mucho tiempo o toda la vida en el macrófago o en el granuloma formado y pueden reactivarse después de largos períodos de latencia.

Un último grupo de microorganismos, constituido por algunas bacterias, protozoos y todos los virus, se multiplican obligadamente en células parenquimatosas (intestinales, hepáticas, alveolares, nerviosas, hemáticas y otras) que no son fagocitarias y en su interior están al abrigo de los polimorfonucleares y los macrófagos; sin embargo, no ha de olvidarse que estos microorganismos inicialmente alcanzan las mucosas en situación extracelular y que, después de replicarse en las células de las mucosas, algunos circulan por la sangre libremente (viremia) para pasar a replicarse en las células de otro

¹ Excepto situaciones especiales, en particular cuando se hallan asociados a un cuerpo extraño.

órgano distante (por ejemplo, el virus de la poliomielitis o el de la parotiditis).

La respuesta inmunitaria ha aparecido probablemente porque en los vertebrados, que son animales longevos de reproducción limitada, cuando la fagocitosis falla o simplemente es imposible², las consecuencias de las infecciones son devastadoras. Por lo que se conoce actualmente, puede decirse que la respuesta inmunitaria tiene dos vías efectoras, la humoral, consistente en la producción de anticuerpos, y la celular que a su vez se subdivide en dos, la mediada por los linfocitos T CD4 y la mediada por los T CD8.

Tras la penetración de un antígeno extraño, como una macromolécula microbiana (proteína o lipopolisacárido), los linfocitos B a través de sus receptores de superficie la reconocen y maduran a células plasmáticas que producen anticuerpos dirigidos contra esa macromolécula; anticuerpos que se distribuyen por la sangre, los tejidos y las mucosas, para encontrar al microbio portador de ese antígeno.

Los anticuerpos al unirse a los antígenos de la superficie de las bacterias capsuladas, de los hongos y de los virus facilitan su endocitosis y posterior destrucción por los polinucleares neutrófilos. En otras ocasiones los anticuerpos aglutinan los microbios y este proceso puede ser suficiente para su inactivación.

Los anticuerpos secretados a las mucosas (IgA) pueden bloquear la adherencia de los virus (y otros microorganismos) a su llegada, antes de que penetren al interior de las células y los anticuerpos plasmáticos los bloquean durante las fases de viremia cuando circulan como viriones extracelulares libres.

Además, los anticuerpos son el único mecanismo defensivo eficaz contra las toxinas (tetánica, diftérica, etcétera).

Cuando los macrófagos fagocitan microorganismos capaces de persistir intracelularmente en ellos³ sólo pueden erradicar esos microorganismos si son activados por la acción de los linfocitos T CD4 (linfocitos cooperadores, *helper*). Estos linfocitos reconocen a través de sus receptores específicos antígenos de los microbios fagocitados expuestos en la superficie de los macrófagos y como consecuencia, liberan una interleucina, el interferón γ (INF γ), que activa la capacidad microbicida de los macrófagos, lo que permite lisis de los microorganismos endocitados y por tanto erradicarlos.

Los virus, protozoos y bacterias de multiplicación intracelular obligada, cuando penetran en las células, quedan al abrigo de la fagocitosis y de la acción de los

anticuerpos. La estrategia defensiva en este caso está conducida por los linfocitos T CD8 (linfocitos citocidas, *killer*) que reconocen a través de sus receptores específicos antígenos microbianos procesados y expuestos en la superficie de las células parenquimatosas infectadas. Los CD8 a través de varios mecanismos inducen la destrucción de la célula parasitada para conseguir bloquear la replicación microbiana.

Es importante señalar que los linfocitos T CD4, además de su función estimuladora de los macrófagos, actúan estimulando la acción de los CD8 y de los linfocitos B; por ello un déficit en el número de CD4, como sucede en el sida u otras inmunodeficiencias, puede afectar a las tres ramas de la respuesta inmune con diversa intensidad en cada una de ellas.

Cabe indicar que estos mecanismos de defensa además de dirigirse contra el microbio pueden tener acciones indeseables contra la propia persona. Basta señalar algunos ejemplos, como el depósito de complejos inmunes⁴ en el glomérulo renal seguido de activación del complemento que ocasiona lesiones vasculíticas, la liberación de enzimas líticas por los macrófagos activados, seguida de destrucción de los tejidos circundantes o la destrucción de células hepáticas infectadas con el virus de la hepatitis B por acción de los T CD 8.

En las figuras 21.1 y 21.2 se representa en esquema los mecanismos de defensa a los que se acaba de hacer referencia.

En la tabla 21.1 se recogen los principales factores predisponentes de infección; que pueden clasificarse en dos grandes grupos: locales y generales.

ALTERACIONES DE LAS BARRERAS LIMITANTES

Toda ruptura de la integridad de la piel y mucosas, como la causada por las quemaduras y las heridas, facilita las infecciones por la flora comensal y telúrica.

La eficacia defensiva de la barrera cutaneomucosa también se altera por la aplicación de todo tipo de instrumentos para la cateterización o el drenaje, como los catéteres venosos, las sondas urinarias, las traqueotomías u otros que predisponen a la infección oportunista.

Quemaduras

La supresión de la barrera cutánea en las quemaduras facilita la infección del tejido celular subcutáneo que puede seguirse de sepsis. Existe una relación entre la extensión de las quemaduras y el pronóstico

² Es imposible la fagocitosis de un virus en localización intracelular.

³ No confundir la persistencia en los macrófagos, como hace *M. tuberculosis*, con la replicación intracelular obligada en las células parenquimatosas de algunos microbios, como los virus y otros. Bajo el concepto de células parenquimatosas se incluyen las de los diferentes órganos y tejidos (hepatocitos, enterocitos, fibroblastos, etc.) que no realizan funciones fagocitarias, reservadas a los polinucleares y a los macrófagos.

⁴ Son antígenos microbianos unidos a sus anticuerpos.

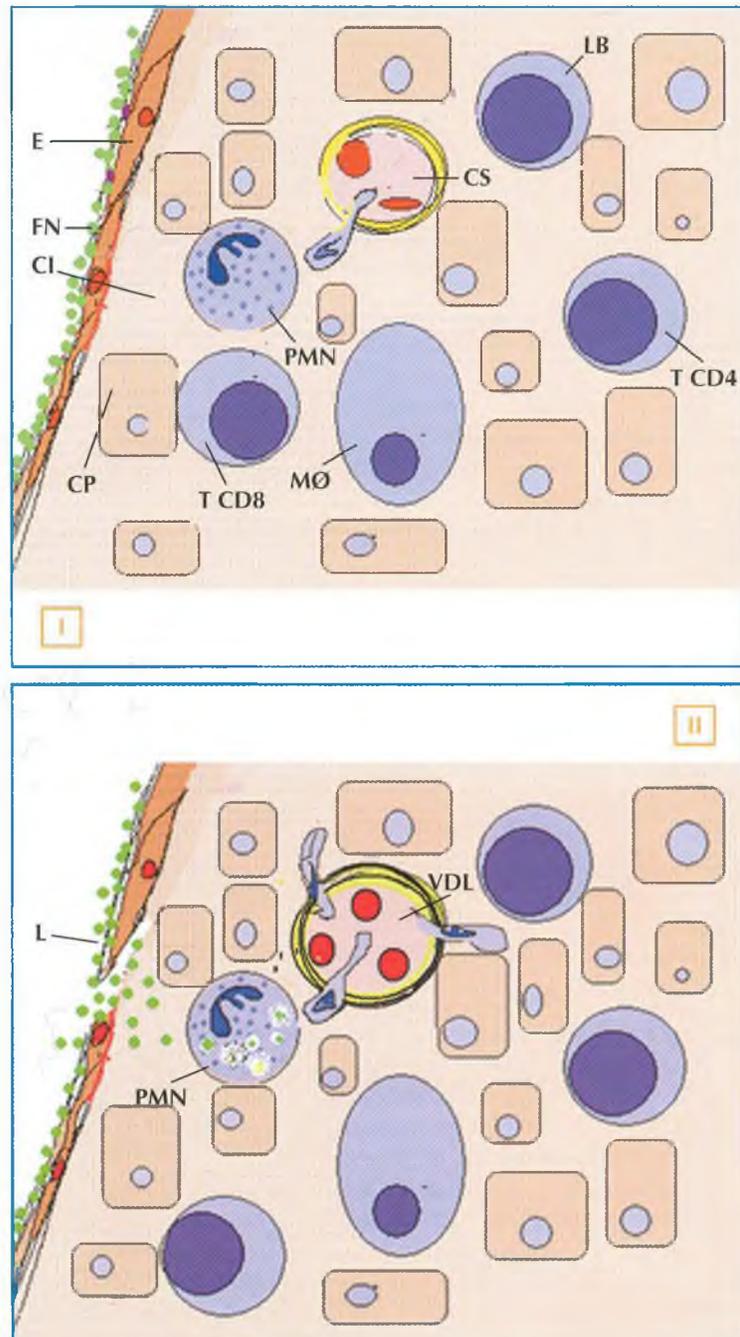


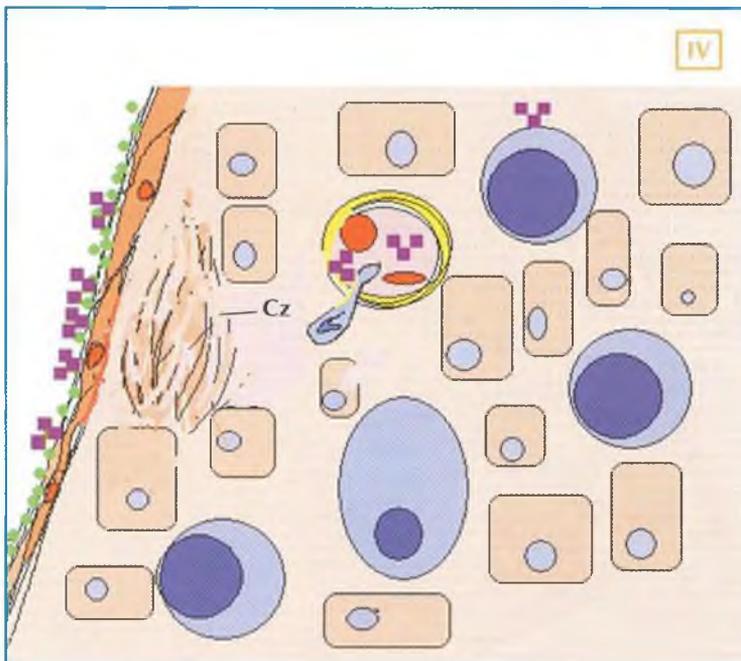
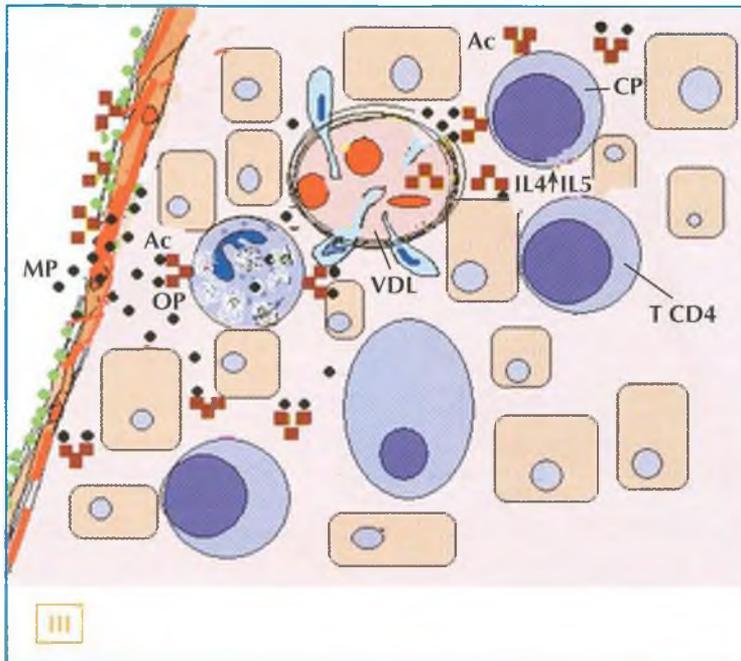
Figura 21.1. Mecanismos de defensa.

En esta figura se esquematizan los mecanismos de defensa antiinfecciosa. La realidad del proceso defensivo es mucho más compleja y en algún aspecto poco conocida.

I. Aspecto de un órgano normal (piel, tubo digestivo, vía respiratoria, vía urinaria, etc.), con un epitelio (E), el tejido conjuntivo intersticial (CI), las células parenquimatosas del tejido (CP) y los capilares sanguíneos (CS). La primera barrera defensiva está constituida por la piel y las mucosas (E) que se hallan colonizadas por la flora normal (FN). La segunda barrera está formada por los fagocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y macrófagos (MØ) y la tercera por la respuesta inmune vehiculada por los linfocitos T CD4 y T CD8 y los linfocitos B (LB).

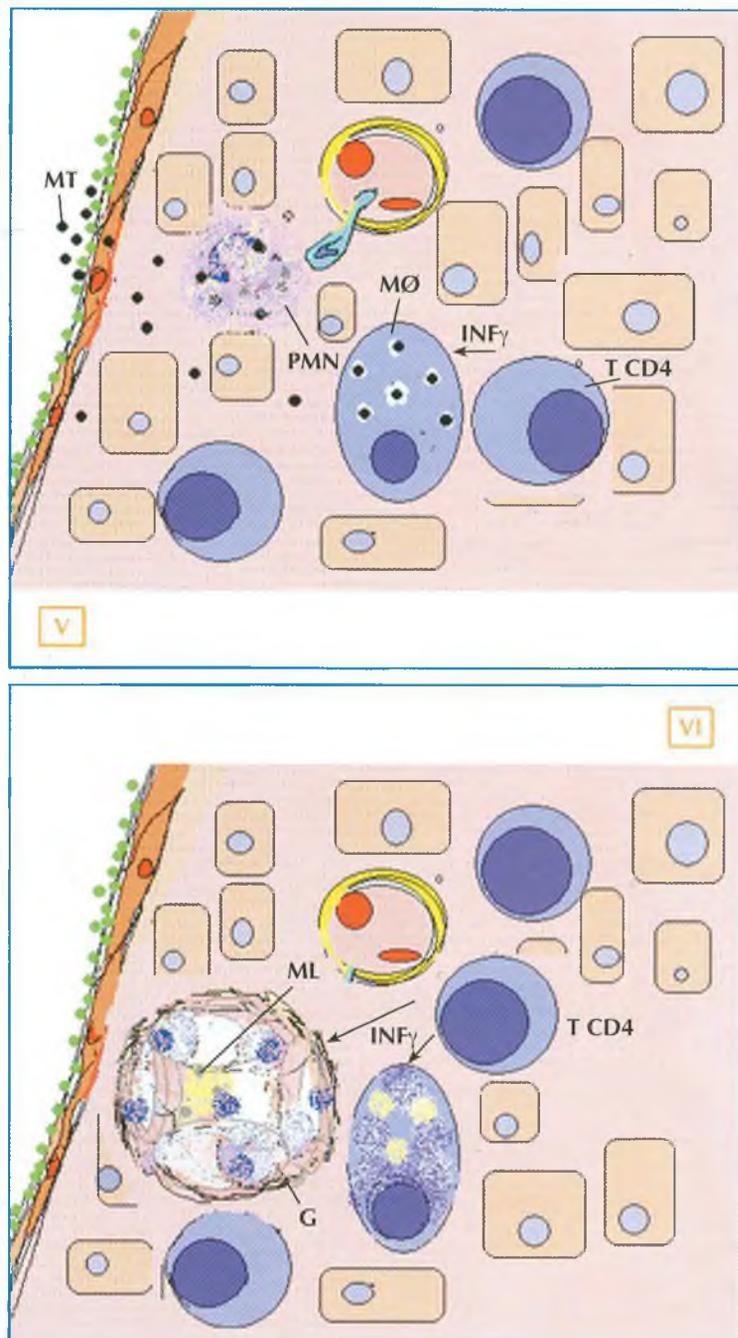
Excepto contadas excepciones, todos los microbios patógenos penetran por una mucosa y a través de los vasos sanguíneos pueden alcanzar órganos distantes. Algunos órganos (pulmón, riñón, etc.) también pueden ser invadidos a través de sus conductos naturales (vía respiratoria, vía urinaria, etc.). El ejemplo de patogenia y defensa mostrado en este esquema es trasladable a cualquier órgano.

II. Los microorganismos de la flora normal (FN) o del medio ambiente —no patógenos— no pueden atravesar la piel ni las mucosas intactas. Si se produce una herida o lesión (L), incluso microscópica, entonces los microorganismos comensales penetran en los tejidos y promueven rápidamente un proceso inflamatorio, caracterizado por una vasodilatación local (VDL) con salida a los tejidos de plasma con el complemento y células fagocitarias, como los neutrófilos y los monocitos, que son precursores de los macrófagos. La mayoría de los microorganismos comensales son inmediatamente lisados por la acción del complemento y otras sustancias microbicidas del plasma y el resto son rápidamente fagocitados y destruidos por los neutrófilos y los macrófagos, restituyéndose la normalidad sin secuelas (el tejido recupera el aspecto representado en I).



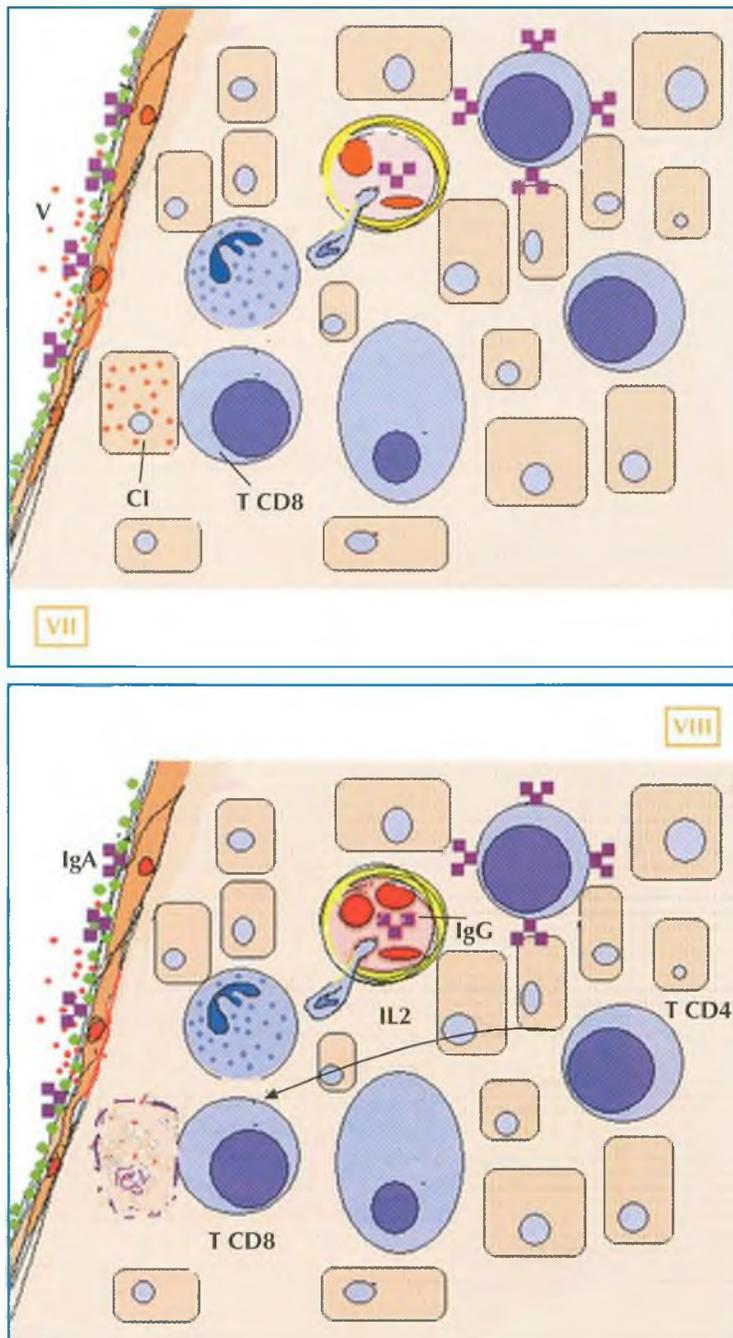
III. Una capacidad específica de los microbios patógenos (MP), como el meningococo, la salmonela, el gonococo, etc., es la de atravesar las mucosas intactas y penetrar a los tejidos. Inicialmente se desencadena una reacción inflamatoria (VDL) y los neutrófilos y los macrófagos fagocitan a los invasores, a los que en muchos casos consiguen destruir. Sin embargo, si la fagocitosis no es eficaz, porque los microbios patógenos poseen cápsulas u otros elementos antifagocitarios, entra en acción la respuesta inmune a través de los linfocitos B. La activación y maduración de los linfocitos B a células plasmáticas (CP), productoras de anticuerpos (Ac), dirigidos contra las estructuras antigénicas de superficie de los microbios, requiere la acción cooperadora de los linfocitos T CD4 a través de las interleucinas 4 y 5 (IL4, IL5) (vease figura 8.1). Los anticuerpos aglutinan y neutralizan a los microorganismos, siendo, en ocasiones, la aglutinación suficiente para inactivarlos. Además, facilitan su fagocitosis y posterior destrucción por los PMN. Los neutrófilos no pueden ingerir fácilmente a las bacterias capsuladas, pero tienen receptores en su superficie para los anticuerpos; si estos se unen a las bacterias, entonces los neutrófilos las endocitan fácilmente (OP). En estas infecciones por patógenos, el proceso de agresión y defensa suele ser prolongado y se acompaña de inflamación importante, por lo que pueden quedar secuelas anatómicas o fisiológicas en los territorios infectados.

IV. En la figura puede observarse las pequeñas cicatrices que quedan en el tejido después de la erradicación del microorganismo (Cz).



V. Algunas bacterias, hongos y protozoos patógenos de multiplicación extracelular, como *Mycobacterium tuberculosis*, histoplasma o leishmania (MT) no son destruidos por los PMN y requieren la acción fagocitaria de los macrófagos (MØ); pero, incluso éstos, no pueden erradicar totalmente los microorganismos, por lo que persiste la infección y se induce la activación de los linfocitos T CD4. Estos linfocitos, mediante receptores específicos, reconocen en la superficie de los macrófagos antígenos de los microbios fagocitados. Los linfocitos CD4, al reconocer al antígeno y contactar con el macrófago, producen interferón γ (INF γ) que activa a los macrófagos, incrementando su eficacia fagocitaria.

VI. Ante la imposibilidad inicial de destruir las bacterias, los macrófagos se agrupan para formar un granuloma (G) y bajo el estímulo del INF γ , incrementan su capacidad lítica y finalmente pueden erradicar a los microbios. Sin embargo, como se observa en esta figura, algunos microorganismos pueden persistir en latencia (ML) en el centro de los granulomas (G). Estos microorganismos latentes pueden reactivarse años después.



VII. Por último, los microbios que han de multiplicarse obligatoriamente en el interior de las células del huésped, como las clamidias o los virus (V), no son susceptibles a la acción del complemento, de los anticuerpos, ni de los fagocitos, debido a su localización intracelular. Las células infectadas (CI) no se estimulan por acción del INF γ , ya que son células parenquimatosas (enterocitos, células ciliadas respiratorias, hepatocitos, neuronas, etc.), no son fagocitos profesionales y por tanto no responden al estímulo del INF γ .

VIII. La respuesta inmune frente a estos microbios de replicación intracelular, tal como se representa en esta figura, está vehiculada por los linfocitos T CD8 (citocidas) que al reconocer en la superficie de las células infectadas antígenos de los microorganismos que las parasitan, y ser activados por los CD4 mediante la IL2, destruyen las células infectadas por diversos mecanismos (acción de granzimas y estimulación de la apoptosis) antes de que los microbios puedan replicarse en ellas, abortando de esta manera su multiplicación y difusión.

En las infecciones por estos microorganismos la rápida penetración al interior de las células en la puerta de entrada y la precoz difusión hemática, para penetrar en las células de órganos distantes, hace que cuando se empiezan a producir anticuerpos, los microorganismos han abandonado ya su localización extracelular y están en el interior del santuario intracelular donde estos no pueden penetrar. Sin embargo, posteriormente estos anticuerpos son secretados a las mucosas (IgA) y circulan por la sangre (IgG), por lo que son capaces de prevenir una infección posterior por el mismo microorganismo.

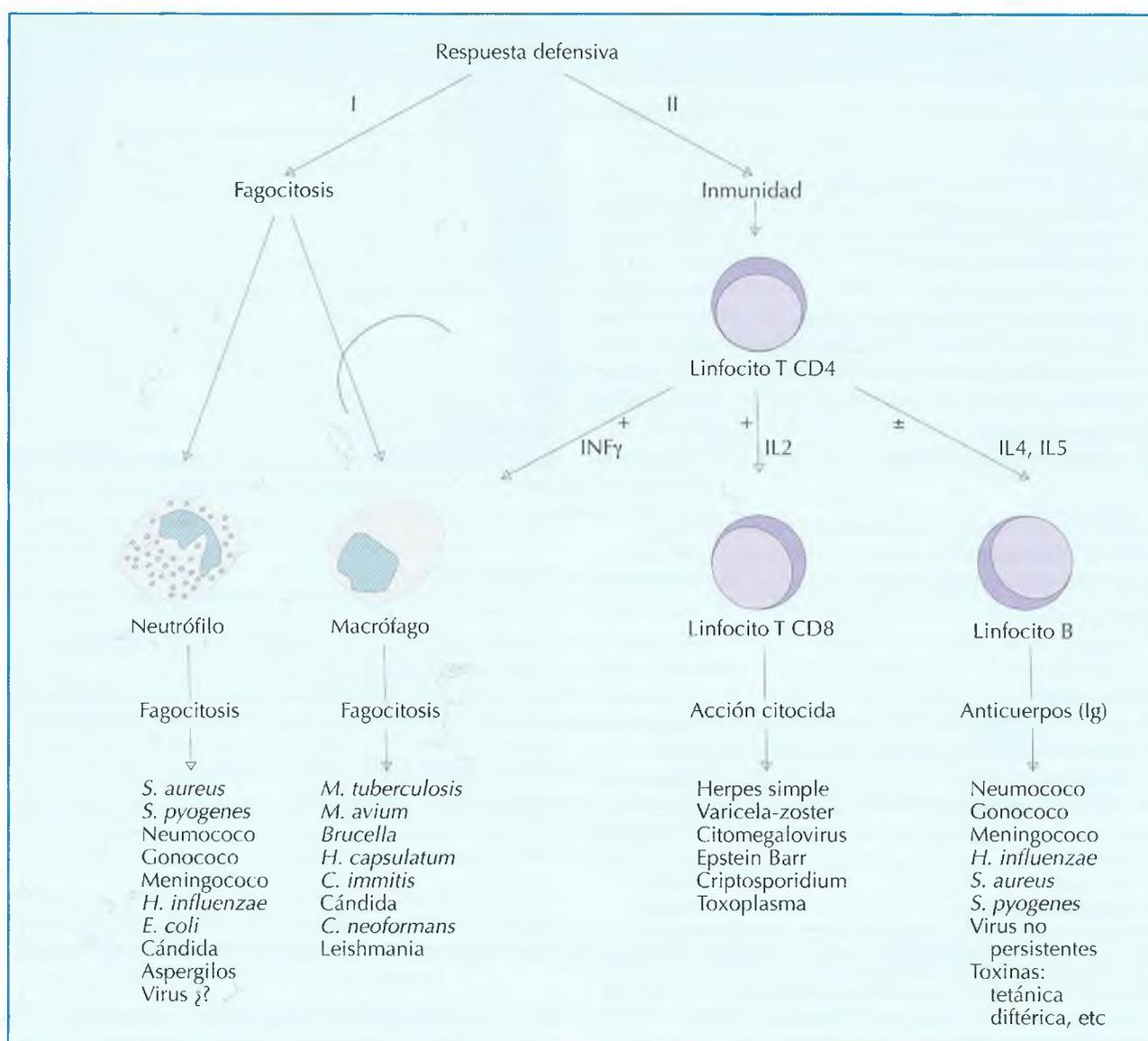


Figura 21.2. Correlación entre los mecanismos de defensa y los microorganismos patógenos.

En este esquema —que no pretende ser exhaustivo— se señalan las diferentes vías de respuesta defensiva, descritas en la figura 1.5 y en la 21.1, y los microorganismos frente a los que actúan. La fagocitosis (I) es un mecanismo de defensa inespecífico que descansa en la acción de los leucocitos polinucleares neutrófilos (PMN) y los macrófagos (M_{ϕ}). La respuesta inmunitaria (II) tiene dos ramas la humoral y la celular. Ambas ramas requieren el estímulo cooperador de los linfocitos T CD4 a través de diversas linfocinas (interleucinas, IL). La respuesta inmunitaria humoral corre a cargo de los linfocitos B que al reconocer el antígeno y bajo el estímulo de los CD4 maduran a células plasmáticas que producen anticuerpos. La respuesta celular posee a la vez dos ramas efectoras, una consiste en la activación de los M_{ϕ} por acción del $INF\gamma$ producido por los CD4 al reconocer antígenos microbianos procesados y expuestos en la superficie del M_{ϕ} , transformando una fagocitosis inespecífica y débil, «no inmunitaria», en «inmunitariamente activada», lo que permite actuar con eficacia frente a *Mycobacterium tuberculosis*, brucela, leishmania y otros. La otra respuesta depende de la acción de los linfocitos T CD8 citocidas, que reconocen las células infectadas por microbios de multiplicación intracelular obligada y, activados por los T CD4, las destruyen bloqueando así la difusión de esos microorganismos. Aparte de la destrucción de las células, los T CD8 desarrollan otros mecanismos no líticos de bloqueo microbiano.

Puede verse que el fracaso de los T CD4 afecta tanto a la función fagocitaria de los macrófagos, a los que estimula a través de $INF\gamma$, como a la acción de los T CD8 citocidas, a los que ayuda a madurar mediante la IL2, y en menor proporción a los linfocitos B.

En cada línea defensiva se señalan los microorganismos controlados por ella, que son, obviamente, los que producen infección cuando la línea falla. El fracaso de los CD4 (sida y otros) comporta el fracaso más o menos intenso de todas las líneas y por tanto la posibilidad de múltiples y variadas infecciones.

vital. En las quemaduras además de la afectación de la barrera limitante existe una alteración importante de la inmunidad y una depresión de la función de los neutrófilos.

Los agentes causales más frecuentes están en relación a la flora hospitalaria predominante e incluyen *Pseudomonas aeruginosa*, enterobacterias, como *Enterobacter* y *Serratia*, *Staphylococcus aureus* y enterococos. Muchos

Tabla 21.1
Algunos factores predisponentes locales y generales de infección oportunista

Factores predisponentes	Localización de la infección ¹
Factores locales	
Ruptura de la barrera cutaneomucosa	
Heridas traumáticas	En la zona lesionada
Incisiones quirúrgicas	En la zona de la incisión
Catéteres intravasculares	En la vena donde está insertado (flebitis). Sepsis
Sonda o litiasis urinaria	En la vía urinaria (infección del tracto urinario: cistitis o pielonefritis)
Traqueotomía, intubación endotraqueal	En el pulmón (neumonía)
Quemaduras	En la zona quemada
Derivaciones del sistema nervioso central	En las meninges
Diálisis peritoneal y hemodiálisis	En el peritoneo
Cuerpos extraños	
Prótesis (articulares, valvulares)	En la prótesis y su contigüidad Las endocarditis protésicas causan bacteriemia persistente
Marcapasos	En el marcapasos y tejidos circundantes
Cirugía contaminada	
Orofaringea/Intestinal/Genital	En la proximidad de la zona intervenida
Factores generales	
Granulopenia	Se producen infecciones locales en la mucosa oral, en la piel especialmente perineal, y/o infección generalizada (sepsis)
Trasplantes	Se producen infecciones de la herida quirúrgica y otras de causa, topografía y tiempo de aparición muy variados según el grado de inmunodeficiencia
Inmunodeficiencia humoral (Mieloma y otras)	Infecciones por bacterias capsuladas (neumococo, meningococo)
Inmunodeficiencia celular ³	Infecciones de topografía diversa (pulmón, SNC, sangre) y etiología variada (véase la figura 21.1)
Cirrosis	Se produce infección del líquido ascítico y sepsis
Insuficiencia renal crónica	Variada
Diabetes mellitus	Variada

¹ En los procesos predisponentes generales, se señalan a modo de ejemplo las localizaciones más frecuentes de las infecciones, pero pueden producirse también en otras localizaciones.

² Existen otros factores que se señalan más adelante.

³ La inmunodeficiencia más característica de la vía celular es el sida, pero también se da en pacientes con leucosis y en los trasplantados tratados con inmunosupresores.

otros microorganismos de la flora comensal o telúrica pueden infectar las quemaduras.

Infecciones quirúrgicas

La incidencia de las infecciones de las incisiones quirúrgicas es de alrededor del 7,5% de los pacientes operados. La menor tasa corresponde a las operaciones de cirugía limpia, como la cirugía ortopédica electiva o herniorrafias, en que la única fuente de posible contaminación es exógena, a partir de la piel del paciente o del personal sanitario; no suelen aparecer en más del 2% de estas intervenciones y generalmente están causadas por *S. aureus*. La hospitalización previa prolongada, el afeitado de la zona de incisión el día anterior sin tratamiento antiséptico y la prolongación de la intervención son factores favorecedores de la infección. Estas infecciones suelen aparecer alrededor del quinto día después de la

intervención, afectan a la piel y al tejido celular subcutáneo y raramente progresan para convertirse en infecciones necrotizantes extensas, afectando las fascias y los músculo. Las infecciones precoces, que aparecen en las primeras 48 horas y presentan síntomas graves, están causadas generalmente por estreptococo β hemolítico y clostridios. A diferencia de las de aparición tardía, que en ocasiones basta con el drenaje y cuidado de la herida, éstas son tributarias de un tratamiento local y sistémico intenso.

En las intervenciones sobre zonas con flora normal (cirugía orofaríngea, intestinal, ginecología, etc.), pueden producirse infecciones que alcanzan tasas entre el 10 y el 20%, se suelen localizar en la proximidad de la zona operada y/o en la incisión quirúrgica. La mayoría de ellas están causadas por la flora mixta aerobia y anaerobia propia de la zona intervenida como estreptococos *viridans*

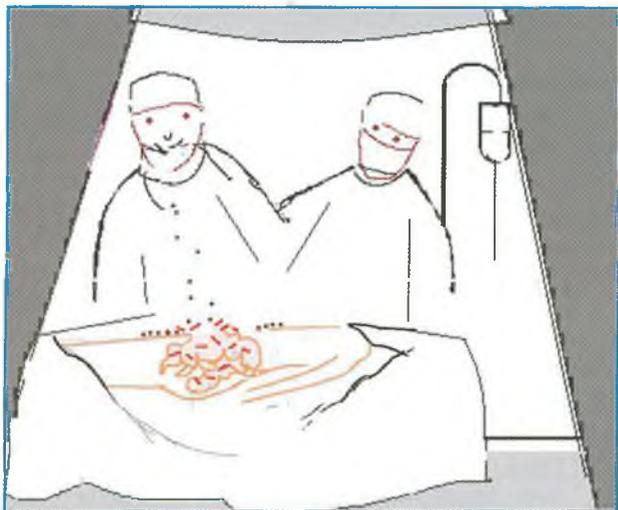


Figura 21.3. Esquema de la infección quirúrgica.

Las infecciones en cirugía pueden darse en intervenciones sobre territorios estériles (cirugía limpia) o después de intervenciones sobre territorios con flora normal o áreas infectadas. Los microorganismos que causan infecciones en cirugía limpia, suelen provenir de la piel del propio paciente y excepcionalmente, de la nariz, boca o cabello del personal que practica la intervención (por llevar las mascarillas o los gorros mal colocados). Cuando la zona intervenida es séptica (orofaringe, intestino, uretra, vagina, etc.) el origen de la infección próxima al área intervenida o/y de la herida quirúrgica es la flora propia de esa zona. En el primer caso las infecciones suelen ser monomicrobianas y causadas por *Staphylococcus aureus* y en el segundo suelen ser polimicrobianas y, como se ha señalado, causadas por la flora del lugar intervenido.

Una técnica quirúrgica depurada y el cambio de guantes al cerrar los planos musculocutáneos ayuda a evitar estas últimas infecciones.

dans y fusobacterias en cirugía otorrinolaringológica o *E. coli*, enterococo, *Bacteroides*, *Prevotella* y otras en la cirugía abdominal (Fig. 21.3). En el capítulo 18 se ha expuesto los métodos de diagnóstico de estas infecciones.

La profilaxis con antibióticos está estandarizada e indicada para algunas intervenciones quirúrgicas.

Cateterización intravascular

Los catéteres para perfusión u otras funciones, se insertan en las venas y por su localización pueden ser periféricos o centrales⁵. Los catéteres venosos facilitan las infecciones en el lugar de la cateterización (celulitis, tromboflebitis). Son diversas las vías por las que puede contaminarse un sistema de perfusión. El lugar más frecuente de contaminación es la zona de penetración del catéter a través de la piel. También puede contaminarse a través de los puntos de conexión a lo largo del sistema. El líquido de perfusión puede contaminarse durante su manipulación o, excepcionalmente, durante su fabricación.

Los principales factores de riesgo de infección del catéter son la mala técnica de colocación, la manipulación inadecuada o excesiva del sistema tras su implantación y el tiempo que permanece colocado (más de 72 horas).

La mayoría de las infecciones están causadas por la flora cutánea. *S. epidermidis* y otros estafilococos coagulasa negativa y en menor frecuencia *S. aureus* son responsables en su conjunto de más de dos tercios de los casos. La capacidad de *S. epidermidis* de adherirse a los plásticos y formar biofilms ha sido postulada como factor favorecedor. Las corinebacterias también pueden causar infecciones originadas en los catéteres, y hay que tener presente que algunas como *Corynebacterium jeikeium* son multirresistentes. Las enterobacterias y bacilos gramnegativos no fermentadores han sido asociados a contaminación de las conexiones de los sistemas de perfusión⁶.

Mediante los sistemas de alimentación parenteral se perfunden soluciones complejas conteniendo lípidos. Estos sistemas se colonizan fácilmente porque se suelen mantener largo tiempo y porque la composición de la infusión facilita su contaminación. Como su hipertonicidad facilita las flebitis y se administran a pacientes graves, a menudo tratados con antibióticos de amplio espectro, las infecciones de este origen son frecuentes y están causadas por bacilos gramnegativos, diferentes especies de *Candida* y con menor frecuencia por levaduras lipofílicas como *Malassezia furfur*. El mantenimiento de la integridad del sistema y su manipulación mínima son los factores de prevención más importantes.

Estas infecciones son fuente de bacteriemia y sepsis. Los factores de sospecha de que una sepsis tiene su origen en el catéter son, además de la celulitis o flebitis en el lugar de la inserción —que sólo se observa en menos de la mitad de los casos— la ausencia de otra fuente o factor de bacteriemia, las embolias distales en la canulación arterial, la falta de respuesta de un síndrome febril a la terapéutica antibiótica empírica y la posterior resolución del cuadro tras la retirada del catéter.

Los catéteres venosos centrales presentan factores adicionales de riesgo de infección debido a su mayor permanencia, mayor manipulación (administración intermitente de medicamentos, toma de presión central, etc.). Los catéteres umbilicales de los recién nacidos también presentan mayor riesgo.

Un caso especial lo constituyen los catéteres y electrodos de los marcapasos que atraviesan la tricúspide y pulmonar. Aparte del riesgo de infección pueden causar vegetaciones en las válvulas con peligro de endocarditis, aunque éste es bajo.

⁵ Los catéteres venosos periféricos consisten en una simple aguja («palomita») o un catéter corto de unos centímetros (bránula); los catéteres centrales que llegan hasta la aurícula derecha, pueden ser de inserción periférica (drum) o en la subclavia o yugular.

⁶ *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pantoea agglomerans*, *P. aeruginosa*, *Stenothrophomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia* entre otras.

La extracción de sangre para hemocultivo debe hacerse siempre por otra vía distinta a la del catéter. Los recuentos comparativos del número de bacterias aisladas de una muestra de sangre tomada por una vena con otra muestra tomada a través del catéter, permite sospechar, cuando los recuentos de esta última son cuatro veces superiores a los de la vena, que el origen de la bacteriemia es el catéter (capítulo 19).

Cuando se extrae un catéter, en particular cuando se hace por sospecha de infección, debe cultivarse la punta por la técnica de Maki para determinar la contaminación de la parte terminal exterior y por la de Cleri para detectar la contaminación intraluminal. La técnica de Maki consiste en cortar los 5 cm del extremo distal del catéter y hacerlo rodar cuatro veces por la superficie de una placa de agar sangre. Si crecen más de 15 colonias del mismo tipo que las aisladas por el hemocultivo se considera el catéter como el origen de la sepsis. La técnica de Cleri evalúa el grado de colonización intraluminal de los segmentos subcutáneo e intravascular. Para ello, una vez extraído el catéter se cortan ambos segmentos y se arrastra de cada uno de ellos las bacterias intraluminales con un volumen conocido de caldo de cultivo, lo que permite su cuantificación. También se efectúan cultivos cualitativos de ambos segmentos. Valores $> 10^3$ ufc se asocian significativamente a bacteriemia a diferencia de lo que sucede con los recuentos inferiores (Fig. 21.4).

Se han sugerido numerosas variantes a las técnicas originales de Maki y Cleri y existen diversas opiniones respecto a la interpretación de los resultados y a la utilidad de la aplicación sistemática de estas técnicas.

Cateterización urinaria

Entre el 1 y 3% de todos los pacientes ingresados en un hospital adquieren una infección urinaria. Alrededor del 15% de los pacientes hospitalizados llevan una sonda permanente y en torno al 25% de los sondados sufren infección urinaria cuando la sonda permanece de cinco a siete días. El incremento diario de riesgo de infección es de alrededor del 5%.

Con frecuencia estas infecciones son polimicrobianas y los microorganismos causantes proceden de la flora intestinal, de otros pacientes por contaminación cruzada o de la flora ambiental (Tabla 13.1). En general, son

microorganismos que presentan una resistencia elevada a los antibióticos. La contaminación cruzada entre pacientes facilita la aparición de brotes nosocomiales.

Aunque la infección puede ser ascendente desde la bolsa de drenaje, esta patogenia es excepcional en los sistemas cerrados. La vía de infección más usual es la periuretral por multiplicación en el moco formado entre el catéter y la mucosa uretral. Una buena técnica de colocación de la sonda, el mantenimiento del sistema cerrado, evitar el reflujo de orina no elevando la bolsa y mantener el mínimo tiempo posible el sondaje, son factores que disminuyen las infecciones. La colocación de pomadas antisépticas uretrales, irrigaciones con antisépticos u otros procedimientos no se han demostrado eficaces.

Cuando se deba estudiar la posible presencia de infección debe tomarse la orina con una jeringa de la sonda y no de la bolsa (véase el capítulo 13 y figura 13.1).

La bacteriuria asintomática requiere vigilancia, pero no tratamiento antibiótico.

Intubación traqueal

Las neumonías de aparición intrahospitalaria son cuantitativamente significativas, dándose en alrededor de seis casos por cada 1.000 altas y la mayoría de ellas se producen en las unidades de cuidados intensivos o salas de recuperación postquirúrgica, donde la incidencia puede alcanzar alrededor del 10% de los pacientes atendidos.

El factor predisponente más importante de la neumonía intrahospitalaria es la intubación traqueal y la ventilación mecánica, pudiendo darse en el 15 al 20% de estos pacientes.

En las formas de aparición temprana (≤ 72 horas), que son poco frecuentes, los agentes causales proceden de la flora endógena del paciente (*S. aureus*, neumococo, *Haemophilus influenzae*).

En las formas de aparición tardía los agentes más frecuentes de infección son *P. aeruginosa* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores así como enterobacterias y su origen es el propio equipo de ventilación, fundamentalmente los nebulizadores, la flora de la orofaringe modificada por tratamientos antibióticos previos o la infección cruzada desde otros enfermos.

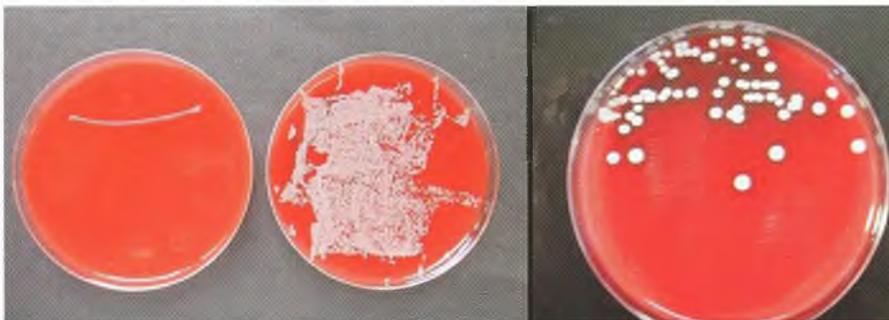


Figura 21.4. Técnicas de recuento de Maki y Cleri.

En un paciente con un cuadro de bacteriemia, el recuento del número de bacterias existente en la punta del catéter después de su extracción, permite confirmar si el catéter era el foco de la bacteriemia. El recuento de las bacterias existentes en la parte exterior distal del catéter se hace por la técnica de Maki consistente en rodar el fragmento del catéter por la superficie de la placa (izquierda). El recuento de la colonización de la parte interior del catéter se efectúa por la técnica de Cleri (derecha) (véase texto).

En estos pacientes el diagnóstico etiológico de la infección pulmonar es difícil porque la colonización de las secreciones bronquiales está causada por bacterias que no siempre son las mismas que están produciendo la infección en el parénquima pulmonar. Por ello, el cultivo de una muestra tomada por aspirado traqueal tiene escasa especificidad, siendo recomendable tomar la muestra mediante cepillo protegido, aunque no siempre es posible aplicar esta técnica en estos pacientes (Fig. 12.4).

ALTERACIONES DE LA FAGOCITOSIS

Neutropenia

La disminución del número de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos por debajo de 1.000/ μ l (neutropenia) facilita las infecciones, que son muy frecuentes y graves cuando los granulocitos alcanzan cifras inferiores a 500/ μ l. En los pacientes en los que la neutropenia dura más de 10 días aparece fiebre y en los que tienen recuentos por debajo de 100/ μ l las infecciones son extremadamente graves. La neutropenia según su causa se acompaña de disminución de todos los granulocitos, de anemia y plaquetopenia (Tabla 21.2).

En este momento, la causa más frecuente de granulopenia es la administración de citostáticos o irradiación para el tratamiento de diversos tipos de neoplasias, en los que la intensidad y la duración de la granulopenia es variable; en segundo lugar, la aplasia terapéutica preparatoria para el trasplante de progenitores hematopoyéticos y por último la invasión medular en leucosis u otras neoplasias muy agresivas.

Tabla 21.2
Recuento de leucocitos en la sangre en personas adultas

Tipo de célula	Núm./ μ l
Granulocitos	5.200
Neutrófilos	5.000
Eosinófilos	150
Basófilos	50
Monocitos	500
Linfocitos	2.300
T	1.800
CD4	1.200
CD8	600
B	300
NK	200
Total	8.000

Trasplante de progenitores hematopoyéticos

Los trasplantes de progenitores hematopoyéticos están indicados en el tratamiento de la anemia aplásica y de las leucemias y linfomas y de algunos tumores sólidos después de suprimir las células malignas. El trasplante puede efectuarse con células pluripotenciales propias o bien de donante adulto o cordón umbilical⁷. La preparación para el trasplante supone la irradiación y la administración de citostáticos para suprimir las células de la médula ósea. A la semana del inicio de la terapéutica citorredutora aparece la granulopenia, que a las dos semanas suele ser absoluta, pudiéndose profundir los progenitores.

En este contexto aparecen las lesiones mucosas que son de origen mixto, por acción de la quimioterapia, la irradiación y la plaquetopenia y que regularmente se infectan. Otro factor de riesgo de infección lo constituyen los catéteres venosos. Asimismo, se produce linfopenia y por tanto un déficit de la respuesta inmune de intensidad variable. Durante este período de aplasia total las infecciones suelen ser devastadoras.

Puede decirse que en estas condiciones el 25% de los pacientes presenta infecciones focales sin sepsis, el 35% bacteriemia y otro 40% clínica de infección (fiebre) que no puede documentarse microbiológicamente y que es objeto de tratamiento empírico.

Los lugares más frecuentemente afectados en las infecciones locales en los pacientes granulopénicos son la boca y la orofaringe; estas mucositis frecuentemente son polimicrobianas, causadas por estreptococos y candida generalmente sobre lesiones herpéticas. Asimismo pueden afectarse el esófago y el intestino y en este último caso además del herpes puede estar involucrado el citomegalovirus (Fig. 21.5).

Las infecciones de la piel son también frecuentes, muchas se asocian a catéteres y están causadas por muy diversas bacterias u hongos. Otras pueden ser consecuencia de inoculaciones locales o bien de metástasis de bacteriemias o fungemias y clínicamente aparecen como ectimas o pequeños abscesos (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Candida*, *Aspergillus*, *Nocardia*, *Fusarium*, etc.). En estos pacientes se producen celulitis perianales muy dolorosas. Cuando se asocia déficit de inmunidad, aparecen infecciones cutáneas causadas por el virus de la varicela-zoster que pueden afectar trayectos metaméricos o ser generalizadas e incluso viscerales. En la actualidad se administra quimioprofilaxis frente al herpes, varicela y citomegalovirus.

Las infecciones pulmonares, que en estos pacientes se expresan radiológicamente de forma atípica o evanescente, por la ausencia de infiltración celular inflamato-

⁷ Según se trasplanten 1) las células pluripotenciales propias, extraídas previamente durante una fase de remisión, o 2) las de un donante, el trasplante se denomina autotrasplante y alotrasplante respectivamente. El rechazo aparece únicamente en el contexto del alotrasplante.



Figura 21.5. Mucositis oral.

Estas infecciones son de aparición temprana en los pacientes granulopénicos, asentando sobre pequeñas lesiones de la mucosa. Están causadas por estreptococos del grupo *viridans*, *Candida* y otros microorganismos simultáneamente. Otras veces se trata de lesiones herpéticas sobreinfectadas por esos mismos microorganismos.

ria local, están causadas por muy diversos microorganismos según el balance entre granulopenia y déficit de la inmunidad celular. Los microorganismos patógenos primarios que causan neumonías en personas previamente sanas (neumococo, micoplasma, gripe, respiratorio sincitial, etc.), lógicamente, también las causan en los pacientes inmunodeprimidos, junto a bacterias oportunistas como *P. aeruginosa* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores, *S. aureus*, *Candida* y aspergilos y todas ellas poseen mal pronóstico (Figs 21.6 y 21.7). Las infecciones por citomegalovirus y pneumocistis son menos frecuentes por la profilaxis (Fig. 22.6). En ausencia de sondaje las infecciones urinarias son poco frecuentes.

En estos pacientes las infecciones más graves son las septicemias que suelen estar relacionadas con las lesiones mucosas, orales e intestinales, o con los catéteres. Las septicemias se presentan con síntomas atípicos, por lo que debe realizarse un hemocultivo en todo paciente febril. Los agentes causales incluyen *S. epidermidis*, *S. aureus*, estreptococos *viridans*, *E. faecalis* y *E. faecium*, *E. coli* y otras enterobacterias, bacilos gramnegativos no fermentadores, levaduras, aspergilos o *Fusarium*, que es uno de los escasos hongos filamentosos que causa fungemia, y muchos otros microorganismos que desde distintos focos pasan a la sangre. Cuando la clínica se inicia con un shock séptico el pronóstico suele ser ominoso.

Un aspecto interesante de las infecciones oportunistas es el cambio de los agentes etiológicos en el tiempo como consecuencia de la introducción de nuevos antimicrobianos. Así, el cambio de los bacilos gramnegativos a los cocos grampositivos como principales agentes



Figura 21.6. Aspergilosis sistémica.

Nódulo subcutáneo abscesado en un paciente inmunodeprimido con aspergilosis diseminada.

Cortesía del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Vall d'Hebron.

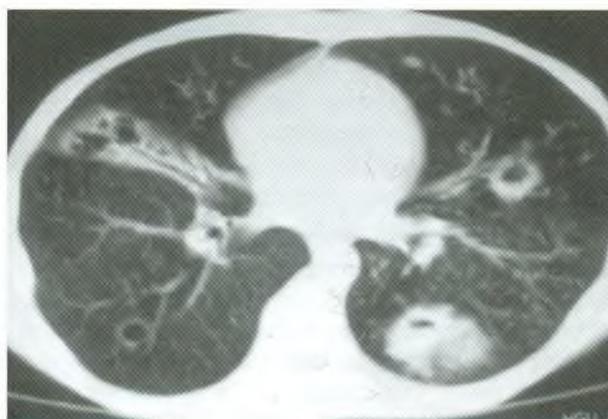


Figura 21.7. Aspergilosis pulmonar.

Nódulos pulmonares múltiples cavitados correspondientes a aspergilosis pulmonar en un paciente neutropénico. La tomografía axial computarizada en la aspergilosis pulmonar suele ofrecer imágenes muy sugerentes.

Cortesía del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Vall d'Hebron.

de infección, y en particular de sepsis, (estreptococos *viridans*, enterococos, estafilococos coagulasa negativa) se produjo a finales de la década de los setenta e inicio de la de los ochenta tras la introducción de las cefalosporinas de tercera generación. También en las infecciones por *Candida*, como consecuencia de la profilaxis y el tratamiento empírico, se ha observado la incorporación de especies resistentes a los azoles como *C. krusei* o *C. guilliermondii* junto a las especies prevalentes del pasado, como *C. albicans*, *C. tropicalis* o *C. glabrata*. También se detectan otros hongos además de aspergilos como *Blastoschizomyces capitatus*, *Trichosporon*, *Malassezia furfur*, *Pseudoallescheria*, *Fusarium* y *Alternaria* y últimamente se está observando un incremento de las infecciones por mucorales (zigomicetos).

Las hepatitis están relacionadas con las transfusiones y actualmente son excepcionales por el control de la donación.

Con una buena evolución la recuperación de los granulocitos suele obtenerse alrededor del día 100, pero no se sigue de un funcionalismo normal inmediato de los linfocitos B y T por lo que existe un riesgo de infección. En los alotrasplantes de progenitores, la administración de inmunosupresores para evitar el rechazo facilita la aparición precoz de infecciones por virus del herpes simple y otras. La enfermedad de «injerto contra huésped» requiere tratamiento inmunosupresor intenso, lo que facilita las infecciones por microorganismos frente a los que la respuesta celular es fundamental (véase figura 21.2). Por todo ello, después del primer mes del trasplante y en función de la gravedad de la inmunosupresión, por los factores señalados, pueden aparecer infecciones por citomegalovirus (neumonía, hepatitis, úlceras esofágicas e intestinales), por el virus Epstein-Barr (síndromes linfoproliferativos), por el herpesvirus humano 6 (exantema, neumonitis, encefalitis o fiebre), por el virus de la varicela-zoster (varicela, herpes zoster o enfermedad generalizada con afectación visceral). El parvovirus B19 puede causar anemia aplásica en estos pacientes. Más raramente se han documentado infecciones, en ocasiones muy graves, por adenovirus (neumonía, hepatitis y afectación renal). Estos

pacientes pueden padecer infecciones respiratorias víricas convencionales en función de la exposición a estos virus. Las infecciones pulmonares por *Pneumocystis jiroveci*, así como las causadas por herpes simple, varicela y citomegalovirus han disminuido su incidencia por el uso generalizado de profilaxis. Estos procesos, incluyendo las reactivaciones cerebrales de la toxoplasmosis, suelen ocurrir por la disminución de la inmunidad celular.

El contexto y la evolución clínica de los pacientes tratados con un trasplante de progenitores hematopoyéticos son muy variados y en cualquier caso la complejidad de la problemática de la infección en estos pacientes desborda la descrita en este breve resumen.

En la tabla 21.3 se resumen los aspectos relativos a la infección en los pacientes trasplantados con progenitores hematopoyéticos.

DÉFICIT DE LA INMUNIDAD

Aparte de las raras enfermedades congénitas que comportan déficit de la inmunidad humoral, celular o de ambas, existen diferentes enfermedades o actuaciones terapéuticas que causan disminución de la inmunidad, entre ellas la administración de corticoides a dosis altas y prolongadas, las neoplasias hematológicas invasoras

Tabla 21.3
Cronología de las infecciones en el trasplante de progenitores hematopoyéticos

	Preinjerto (0 a 30 días)	Postinjerto (de 31 a 100 días)	Tardías (más de 100 días)
Factores de riesgo	Neutropenia Mucositis Catéteres	EICH aguda Alteración inmunidad celular y en menor grado la humoral	EICH crónica Alteración inmunidad celular y humora
Microorganismos causales			
Bacterias	Estafilococos. Estreptococo grupo <i>viridans</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Estafilococos <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Hongos	<i>Candida</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp <i>Pneumocystis jiroveci</i>	<i>Aspergillus</i> spp <i>Pneumocystis jiroveci</i>
Virus	HHV 1 y 2; HHV-6; VR	HHV-5; HHV-6; HHV-3; adenovirus; virus BK	HHV-3; HHV-5; VR
Protozoos		<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Infecciones	Mucositis Sepsis de catéter o primaria Neumonía	Sepsis de catéter o primaria Neumonía Infecciones diseminadas	Neumonía Infecciones cutáneas Infecciones diseminadas

EICH: enfermedad del injerto contra el huésped; HHV 1 y 2: virus del herpes humano 1 y 2; HHV-6: virus del herpes humano tipo 6; HHV-3: virus de la varicela-zoster; HHV-5: citomegalovirus; VR: virus respiratorios.
Tomada de Merçè Gurguí (modificada).

(leucosis y linfomas) y su terapéutica citostática y los trasplantes debido a la terapéutica inmunosupresora para evitar el rechazo.

En las neoplasias sólidas no suelen ser frecuentes las infecciones, excepto que los pacientes estén tratados con citostáticos u otras medicaciones que faciliten la granulopenia o la inmunodepresión.

Corticoides

Los glucocorticoides se utilizan en el tratamiento de diversas enfermedades y de algunos procesos inflamatorios con gran eficacia. Entre otras muchas funciones poseen una actividad inmunosupresora, por lo que cuando se dan por períodos de tiempo prolongados y a dosis elevadas, pueden facilitar la aparición o reactivación de algunas infecciones. Entre éstas destacan la tuberculosis, la nocardiosis y algunas micosis invasivas como la aspergilosis en los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y las infecciones por el virus de la varicela zoster (Figs 21.8, 21.9 y 21.10).

Neoplasias hematológicas

Las neoplasias hematológicas, según la clase pueden producir déficit de la inmunidad celular y/o humoral. El tratamiento con citostáticos puede causar una granulopenia de intensidad variable.

Leucemias agudas

En las leucemias agudas la población de células tumorales invade los tejidos linfoides y la médula ósea, destruyendo y suplantando los linfocitos inmunocompetentes. Las escasas células funcionales son afectadas por la agresiva terapéutica quimioterápica que, además, causa una intensa granulocitopenia. Los factores predisponentes de infección son por tanto la granulopenia y el déficit inmunitario. La plaquetopenia asociada favorece la formación y persistencia de microheridas en las mucosas oral y digestiva que facilitan la aparición de mucositis y constituyen junto con los catéteres la puerta de entrada de muchas infecciones.



Figura 21.9. Nocardiosis pulmonar.

Lesiones nodulares múltiples secundarias a nocardiosis pulmonar en un paciente inmunodeprimido

Cortesía del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Vall d'Hebron.



Figura 21.10. Lesiones versiculocostosas de distribución metameral a nivel intercostal (zoster) típicas de la reactivación del virus de la varicela-zoster.

Cortesía del servicio de Dermatología del Hospital Vall d'Hebron.

Las infecciones que aparecen como consecuencia de la granulopenia se asemejan a las descritas en los pacientes con trasplante de progenitores hematopoyéticos. De hecho la mayoría de trasplantes de progenitores hematopoyéticos se efectúan para el tratamiento de estos pacientes.

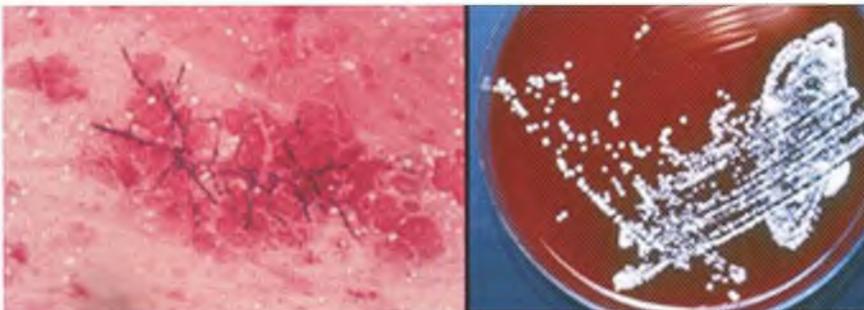


Figura 21.8. Nocardiosis. Tinción de Gram y cultivo.

En los productos patológicos teñidos por el método de Gram, las nocardias se observan formando largos filamentos entrecruzados o radiales, de tinción irregular y con ramificaciones características. Las nocardias son débilmente alcohol-ácido resistentes. Forman colonias diferentes según el medio en que crecen, pero la característica distintiva es la formación de un micelio aéreo que puede observarse directamente o con la ayuda de una pequeña lupa.

Leucemia linfática crónica

Estos pacientes, aunque presentan más riesgo de infección que las personas normales, debido fundamentalmente a la disminución de las inmunoglobulinas, no suelen adquirir infecciones graves.

Enfermedad de Hodgkin

En esta enfermedad, la esperanza de mejoría o cura dependiente del estadio evolutivo es elevada. Las complicaciones más importantes como consecuencia de la enfermedad, la quimioterapia y la radiación son las infecciones y las neoplasias secundarias.

Los pacientes con Hodgkin presentan relativamente pocas infecciones y su principal factor predisponente es la depresión de la inmunidad celular que aparece simultáneamente con la enfermedad y se agrava por el tratamiento, quimioterapia e irradiación, que también pueden causar granulopenia.

Las infecciones más frecuentes son las causadas por virus de la varicela, citomegalovirus, micobacterias, *Toxoplasma gondii* y *P. jiroveci*.

Cuando se asocia inmunodepresión humoral por la quimioterapia, la esplenectomía y otras alteraciones asociadas de la función inmune, existe predisposición a las infecciones bacterianas.

Linfoma no Hodgkiniano

En estos procesos la infección constituye la principal causa de complicación y mortalidad. La mayoría de los pacientes que fallecen por una infección grave están granulopénicos y presentan sepsis o neumonía. El espectro de la infección es similar al del linfoma de Hodgkin, pero la infección por granulopenia es más frecuente por la mayor intensidad y persistencia de la terapéutica utilizada en este grupo de pacientes.

Tabla 21.4

Cronología de las infecciones en el trasplante de órgano sólido

	Período		
	Primer mes	Segundo al sexto mes	Después del sexto mes
Factores de riesgo	Cirugía Ventilación mecánica Catéteres y sondas Inmunosupresión	Inmunosupresión Rechazo Alteración de la inmunidad celular	Inmunosupresión Rechazo crónico Alteración de la inmunidad celular
Microorganismos causales			
Bacterias	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Estafilococos	<i>Nocardia asteroides</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Legionella pneumophila</i> Micobacterias Salmonela	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> * <i>Nocardia asteroides</i> * <i>Listeria monocytogenes</i> * <i>Legionella pneumophila</i> * Micobacterias*
Hongos	<i>Candida</i> <i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> spp <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Pneumocystis jiroveci</i>	<i>Aspergillus</i> spp* <i>Pneumocystis jiroveci</i> *
Virus	HHV 1 y 2	HHV-5; HHV-6; HHV-3; adenovirus, virus BK	HHV-3*; VR*; HHV-5*; HHV-4*
Protozoos		<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i> *
Infecciones	Infección herida Neumonía Sepsis de catéter o primaria Colangitis Infección del tracto urinario	Neumonía Infecciones diseminadas Gastroenteritis Meningitis	Infecciones comunitarias habituales Neumonías Infecciones cutáneas Infecciones diseminadas

HHV 1 y 2: virus del herpes humano tipo 1 y 2; HHV-3: virus de la varicela-zoster; HHV-4: virus de Epstein Barr; HHV-5: citomegalovirus; HHV-6: virus del herpes humano tipo 6; VR: virus respiratorios.

* En pacientes con rechazo crónico y tratamiento inmunosupresor intenso.

Tomada de Mercè Gurguí (modificada).

Mieloma y macroglobulinemia

Los pacientes con mieloma son más susceptibles a las infecciones que los que presentan macroglobulinemia. En el mieloma no tratado las infecciones por *Streptococcus pneumoniae* y otras bacterias capsuladas son las más frecuentes. Debido al tratamiento antibiótico y la consecuente selección de cepas resistentes se producen infecciones por bacilos gramnegativos.

En estos pacientes hay una disminución de Ig por mecanismos no precisados. La inmunidad celular está bien conservada por lo que son poco frecuentes las infecciones por virus, hongos y protozoos así como por bacterias de persistencia intracelular.

Trasplante de órganos sólidos

Los pacientes trasplantados presentan una susceptibilidad especial a las infecciones por 1) la intervención quirúrgica que suele ser prolongada y compleja, 2) la inmunosupresión medicamentosa a que son sometidos para evitar el rechazo del órgano trasplantado y también 3) la posible existencia de microorganismos en el órgano del donante, en particular de virus y protozoos latentes, que cuando se trasplanta a receptores seronegativos (no infectados) pueden producir infecciones muy graves.

En el primer mes después del trasplante las infecciones más frecuentes están en relación con la cirugía y con las instrumentaciones (catéteres, sondas, etc.). A partir del segundo mes y hasta el cuarto al sexto mes las infecciones están en relación con la terapéutica inmunosupresora (corticoides, ciclosporina, tacrolimus, micofenolato, etc.). A partir de los seis meses se disminuye la intensidad de la inmunosupresión y se reduce el riesgo de infección, sin embargo, en pacientes con rechazo se ha de incrementar de nuevo la dosis de inmunosupresor incrementando por tanto la susceptibilidad a las infecciones. En la tabla 21.4 se resumen los aspectos relativos a las infecciones en los pacientes trasplantados de órgano sólido

Infección oportunista en el trasplante renal

La infección urinaria es el problema precoz más importante en estos pacientes. En los períodos tardíos las infecciones más frecuentes están causadas por citomegalovirus, herpes simple y varicela-zoster y con menor frecuencia por *Candida* y *Cryptococcus*; las infecciones bacterianas son de etiología variada.

Trasplante cardíaco

La patogenia general de las infecciones en estos pacientes se debe a los mismos factores señalados más arriba, aunque en relación a las fases iniciales son más

frecuentes la neumonía y la mediastinitis bacterianas. Posteriormente pueden presentar infecciones diseminadas por citomegalovirus y *T. gondii*. Ambas infecciones pueden ser una complicación muy grave en los receptores seronegativos a los que se trasplanta un corazón de un donante positivo. Los aspergilos y las nocardias causan infecciones con menor frecuencia.

Otros trasplantes

Los trasplantes de pulmón, hígado, páncreas e intestino son técnicamente muy complejos. Las infecciones intraabdominales relacionadas con la cirugía son graves y pueden afectar a las zonas anastomóticas y seguirse de bacteriemia aunque la profilaxis ha disminuido su número. Las infecciones fúngicas, como candidiasis y aspergilosis, son relativamente frecuentes en los trasplantados hepáticos. La aspergilosis pulmonar es muy frecuente en el trasplantado pulmonar, por lo que se requiere una profilaxis antifúngica prolongada y a menudo indefinida.

INFECCIONES EN ADICTOS A DROGAS POR VÍA PARENTERAL

En principio, estas personas, si no están infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana no tienen alteraciones de los mecanismos de defensa; pero progresivamente pueden aparecer déficits de los mismos poco precisados. La hipergammaglobulinemia (IgM) que suelen presentar puede deberse a la repetida inocula-



Figura 21.11. Corioretinitis por *Candida*.

La corioretinitis candidiásica es frecuente en las personas que se administran drogas por vía parenteral y se producen como metástasis de una fungemia. En los pacientes inmunodeprimidos, en particular con el sida, antes de la introducción del tratamiento antiretroviral muy activo, la corioretinitis por citomegalovirus era muy frecuente. Las causadas por *Mycobacterium tuberculosis* y por toxoplasma pueden aparecer también en personas inmunocompetentes.

ción de antígenos microbianos y otros. También se han demostrado alteraciones de la inmunidad celular posiblemente relacionadas con la malnutrición que suele padecer este grupo de pacientes.

Los microorganismos que los drogadictos se inoculan endovenosamente con las drogas contaminadas, sobrepasan masivamente la barrera cutánea o mucosa. El espectro de enfermedades infecciosas, incluye infecciones de la piel y de tejido celular subcutáneo generalmente en el lugar de la inyección, causadas por *S. aureus*; tromboflebitis por *S. aureus* y *P. aeruginosa*; osteomielitis y artritis secundarias a las siembras hematógenas causadas por *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *Candida*; endocarditis, particularmente tricuspídea que da lugar a embolias pulmonares, causada por *S. aureus*, estreptococos de los grupos A y B, *P. aeruginosa* y *C. albicans*, aun-

que cabe señalar que la lista de agentes etiológicos de endocarditis es muy larga cuando se incluyen microorganismos cuya incidencia es anecdótica. La endoftalmítis hematógena por *Candida* es un proceso frecuente en esta población (Fig. 21.11). Las infecciones pulmonares pueden corresponder a neumonías primarias convencionales o aspirativas (las alteraciones del estado mental con depresión de los reflejos facilitan la aspiración) o a metástasis pulmonares de las bacteriemias de los microorganismos inoculados. Otros factores como el multiu- so de jeringuillas facilitan la difusión de las hepatitis y del sida y, por otra parte, hay que atender a las infecciones de transmisión sexual, particularmente en las personas que ejercen la prostitución. Las infecciones oportunistas en los pacientes drogadictos infectados por el HIV se describen en el capítulo siguiente.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de la inmunodeficiencia adquirida, denominado sida, es el estadio final de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana y se caracteriza por la presencia de infecciones oportunistas graves y procesos neoproliferativos. Se inicia después de un proceso biológico muy complejo, pero esquemáticamente puede decirse que el virus induce la destrucción progresiva de los linfocitos T CD4 involucrados en la coordinación de la respuesta inmune, lo que permite la aparición de infecciones y neoplasias, fundamentalmente aquellas cuya defensa se basa en la respuesta inmune celular, que es la más afectada (véase en el capítulo 21 Mecanismos de defensa y las figuras 21.1 y 21.2).

ESTRUCTURA Y REPLICACIÓN DEL HIV

El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) es un retrovirus (RNA de polaridad positiva) perteneciente al género *Lentivirinae*, familia *Retroviridae*, que tiene una forma esférica de unos 110 nm de diámetro. Está formado por una zona interna en la que se sitúan dos moléculas idénticas de RNA monocatenario junto a proteínas nucleares de función estructural (p9 y p7), la transcriptasa inversa (heterodimérica, formada por las proteínas p66 y p51), una integrasa (homodimérica, p31) y una proteasa (homodimérica, p10). Estas estructuras se hallan rodeadas por los capsómeros (p24) para formar la nucleocápsida que está recubierta por proteínas de la matriz (p17 y otras) sobre las que se sitúa la envoltura lipídica, que procede de la membrana de la célula infectada en la que se hallan presentes las glicoproteínas codificadas por el virus (gp120 y gp41 originadas de la proteína precursora gp160) (Fig. 22.1).

Existen dos HIV considerados como «especies», el *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1) y el *Human immunodeficiency virus 2* (HIV-2), con una homología genómica entre ambos de alrededor del 50%. El HIV-1 se ha dividido en tres grupos, el M (*main*, principal), el O (*outlier*, alejado) y un tercero denominado N. Los grupos O y N son minoritarios y se describieron inicialmente en África ecuatorial. El grupo M es mayoritario y se subdivide en subtipos (de A a K) que presentan diferen-

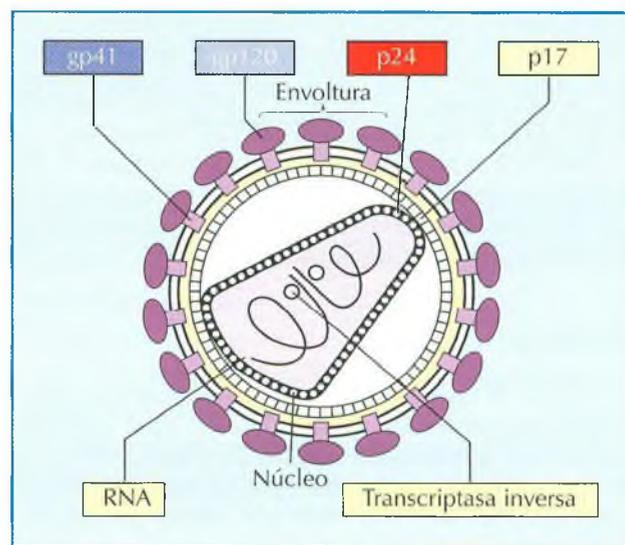


Figura 22.1 Estructura del virus de la inmunodeficiencia humana.

El virión del HIV tiene unos 110 nm de tamaño. Está formado por una nucleocápsida que contiene dos copias idénticas de RNA de 10 kb, que es su genoma, junto a una transcriptasa inversa (p66/51), una proteasa (p10), una integrasa (p31) y pequeñas proteínas estructurales (p7, p9) rodeadas por los capsómeros (p24). Por fuera de la nucleocápsida se sitúan las proteínas de la matriz (p17) y la envoltura originada a partir de la membrana de la célula infectada, con las glicoproteínas inmersas en ella (gp120 y gp41, de las que es precursora la gp160).

te distribución geográfica. En Europa occidental y Norteamérica prevalece el subtipo B.

Una vez que los viriones han penetrado en el interior del organismo humano se unen a través de la glicoproteína de superficie gp120 a las células en cuya membrana se expone la molécula CD4, que actúa como receptor del virus (fundamentalmente en los linfocitos T CD4 y en células de la línea mononuclear fagocitaria). La unión de gp120 a CD4 crea un cambio conformacional que permite la interacción de las glicoproteínas de superficie víricas con un segundo grupo de receptores celulares pertenecientes a la familia de receptores de quimiocinas. La capacidad de unión a los diferentes correceptores varía según la cepa vírica. La presencia en los pacientes de determinadas mutaciones homocigotas se ha asociado a resistencia a la infección por el HIV.

Una vez que el RNA ha penetrado al citoplasma de las células diana, la transcriptasa inversa, tomándolo como molde hace una copia de DNA de cadena doble, que se integra al DNA de la célula huésped (cDNA, DNA proviral). La activación del DNA proviral integrado comporta la transcripción y por tanto la producción del RNA mensajero, que dirige la biosíntesis de las proteínas, y del RNA genómico. Todo ello se sigue del ensamblaje del virus y posterior envoltura por un fragmento de la membrana citoplasmática durante su salida de la célula. No se conocen con precisión los mecanismos responsables de la destrucción de los linfocitos T CD4 en los que se replica, pero entre otros figuran el efecto citolítico directo del virus, la activación de la apoptosis celular¹ y la alteración de las funciones específicas de esta población celular en la respuesta inmunitaria.

El HIV-2 se ha subdividido en cinco subtipos (A-E), es menos patógeno que el HIV 1 y su transmisibilidad muy inferior, la mayoría de las infecciones son asintomáticas y raramente causan el sida.

CLÍNICA DEL SIDA

El HIV se transmite a través de la sangre y sus derivados (transfusiones, jeringuillas, etc.) por contacto sexual, por transmisión vertical (fundamentalmente durante el parto, pero también por vía transplacentaria) y por la lactancia.

La infección por el HIV-1 presenta diversos estadios clínicos. El primero, denominado síndrome retroviral agudo, aparece entre dos a seis semanas después del contagio y se expresa por un cuadro de mononucleosis caracterizado por fiebre, astenia, faringitis, exantema, linfadenomegalia generalizada y linfomonocitosis periférica, que hay que diferenciar de los de otra etiología². También se puede manifestar por un cuadro inespecífico similar a una gripe. Durante este período los linfocitos T CD4 pueden disminuir por debajo de su cifra normal (normal: entre 750 y 2000/ μ l) y el RNA del virus es detectable en el plasma (carga viral plasmática) a títulos muy elevados, en general superiores a 10^5 copias de RNA/ml; detectándose también el antígeno p24. Después de unos 5 a 20 días de evolución, el cuadro revierte espontáneamente y aparecen los anticuerpos específicos. Esta fase puede seguirse de un estadio de inmunodepresión precoz transitorio, que facilita las infecciones por *Candida*, herpes o citomegalovirus de carácter autolimitado.

El segundo estadio se caracteriza por un largo período asintomático asociado o no a linfadenomegalias y/o trombocitopenia. El virus se replica continuamente a bajo nivel en los linfocitos T CD4, en las células del sistema

mononuclear fagocítico, como los macrófagos, y otras, como se demuestra por la presencia de una carga vírica plasmática detectable en la mayoría de pacientes. Dado que el virus se multiplica permanentemente en el sistema linfóide durante el período asintomático, va infectando progresivamente nuevos linfocitos T CD4. Este período es de duración variable, ya que después de la primoinfección unas personas evolucionan con bastante rapidez hacia el sida (dos a tres años, progresores rápidos) y otros de modo más lento (7 a 10 años) o incluso un pequeño grupo de personas no desarrollan la enfermedad después de 10 años.

Los CD4 disminuyen a cifras inferiores de 500 células/ μ l, constituyendo generalmente el inicio del tercer estadio que se asocia a un estado general muy afectado y a la aparición de muy frecuentes y diversas infecciones oportunistas y neoplasias (Sarcoma de Kaposi, linfomas no hodgkinianos o de Hodgkin, carcinoma de cérvix y otras), que se van sucediendo hasta llegar a los estadios finales de consunción progresiva, demencia, mielopatía vacuolar o neuropatía sensorial por afectación del SNC por el virus y finalmente la muerte. Esta evolución es la clásica y corresponde al período anterior a la introducción de las terapéuticas combinadas de elevada eficacia (HAART).

En los niños infectados por la madre también hay un grupo que presenta síntomas precoces, entre seis y doce meses, y mueren antes de los cuatro años, mientras que otros no presentan síntomas de sida antes de los tres años y sobreviven más de seis años.

Sin embargo, tanto los adultos como los niños infectados pueden clasificarse desde el punto de vista clínico biológico en varios estadios propuestos por los CDC (véase más adelante).

En las infecciones por HIV-2, que se halla principalmente en África occidental, la transmisión heterosexual y maternoinfantil es rara y el sida también es infrecuente y aparece después de un período de latencia más largo, alrededor de 20 años o más.

Características biológicas

La primera exploración que se solicita en todo paciente sospechoso de una infección por HIV es la determinación de los anticuerpos contra el virus que permiten confirmar el diagnóstico clínico.

Constituyen datos complementarios para el diagnóstico, cuando son necesarios, la determinación de la p24 y el cDNA.

Otra determinación biológica a efectuar en los pacientes infectados por el HIV es el número de viriones libres

¹ Apoptosis: muerte celular programada.

² También ocasionan un cuadro de mononucleosis el virus de Epstein-Barr, el citomegalovirus, el virus de la rubéola y el toxoplasma entre otros microorganismos (ver el capítulo I).

(RNA), parámetro conocido como «carga vírica» que posee un valor pronóstico. Por otra parte es importante determinar el número de linfocitos T CD4 y CD8, así como la β_2 -microglobulina y la neopterina que también poseen valor pronóstico.

Durante la primoinfección hay una replicación del virus que se traduce en un incremento progresivo de la carga vírica en el plasma que puede llegar a valores entre 10^4 a 10^7 copias por ml y de la proteína p24, que alcanzan un máximo alrededor de las tres semanas de iniciada la sintomatología. Asimismo se produce una disminución de los CD4 con inversión del cociente CD4/CD8 (normal 2). Los anticuerpos son detectables a partir de las cuatro semanas, lo que junto al incremento de los CD8 específicos condiciona la disminución de la carga vírica y de la p24.

Después de desaparecer los síntomas asociados a la primoinfección, la carga vírica baja y al cabo de unos meses se estabiliza a un nivel basal (*set-point*) que posee valor pronóstico (umbral 10^4 - 10^5).

A pesar de la importancia pronóstica que se ha dado a la carga la vírica, la disminución del número de CD4 (por debajo de 500/ μ l), el incremento de la β_2 -microglobulina (> 5 mg/l) y la neopterina (> 20 nmol/l) son marcadores muy útiles del estadio y pronóstico de la infección. La cifra de CD4 ha sido considerada por los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) como criterio de clasificación de los estadios de la infección.

Infecciones oportunistas

Hay que diferenciar la infección por el HIV del sida que es el estadio de la infección que se caracteriza y define por la aparición de determinadas infecciones oportunistas o neoplasias, que son atribuibles al estadio de inmunodeficiencia. Esquemáticamente se ha hablado de: 1. primoinfección y su sintomatología asociada; 2. período de latencia y 3. sida, como tres estadios definidos de la infección.

Sin embargo, existe una clasificación de la infección propuesta por los CDC teniendo en cuenta simultáneamente el número de CD4 y la clínica del paciente (Tabla 22.1). Las infecciones oportunistas que permiten catalogar los diversos estadios y definir el inicio del sida han sido publicadas por diferentes organizaciones (Tabla 22.2).

Las infecciones oportunistas iniciales suelen ser relativamente benignas, como candidiasis oral o el herpes simple recidivante, y aparecen junto con síntomas constitucionales, como fiebre y pérdida de peso. Sin embargo, en algún caso, la infección oportunista detectada inicialmente puede ser grave, como la infección pulmonar por *Mycobacterium tuberculosis* o *Pneumocystis jiroveci*, o tratarse de neoplasias, como el sarcoma de Kaposi. En general cuando los linfocitos T CD4 caen por debajo de

Tabla 22.2
Procesos patológicos que definen la categoría B

- Angiomatosis bacilar
- Candidiasis orofaríngea
- Vulvovaginitis candidiásica persistente, frecuente o que responde mal al tratamiento
- Displasia cervical (moderada o grave)/carcinoma cervical *in situ*
- Síntomas generales, como fiebre (38,5° C)
- Leucoplasia oral
- Herpes zoster: dos episodios o uno afectando a más de un dermatoma
- Púrpura trombocitopénica idiopática
- Listeriosis
- Enfermedad inflamatoria pélvica, particularmente si está complicada con absceso tubo-ovárico
- Neuropatía periférica

Tabla 22.1
Clasificación de los Centers for Disease Control and Prevention (CDC)¹

Categoría según T CD4	Categoría clínica		
	A Primoinfección, PGL Asintomático	B Sintomático ²	C Factores indicadores de sida ³
1: \geq 500/ μ l	A1	B1	C1
2: 200-499/ μ l	A2	B2	C2
3: < 200/ μ l	A3	B3	C3

La clasificación de los estadios de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana se basa en el número de linfocitos T CD4 y en el cuadro clínico del paciente o las complicaciones asociadas.

¹ MMWR 1993,41:1-19.

² Tabla 22.2.

³ Tabla 22.3.

PGL: linfadenomegalia generalizada persistente (en inglés PGL).

Tabla 22.3
Procesos patológicos que definen la categoría C

Candidiasis traqueal, bronquial o pulmonar
Candidiasis esofágica
Cáncer cervical invasivo
Coccidioidomicosis diseminada o extrapulmonar
Criptococosis extrapulmonar
Criptosporidiosis intestinal crónica (más de 1 mes de duración)
Enfermedad por citomegalovirus
Retinitis por citomegalovirus
Encefalopatía relacionada con HIV
Úlcera crónica de más de 1 mes de duración causada por herpes simple
Bronquitis, neumonitis o esofagitis herpética
Histoplasmosis diseminada o extrapulmonar
Isosporiasis intestinal crónica (más de 1 mes de duración)
Sarcoma de Kaposi
Linfoma de Burkitt
Linfoma inmunoblástico
Linfoma primario cerebral
<i>Mycobacterium avium complex</i> o <i>M. kansasii</i> diseminado o extrapulmonar
<i>M. tuberculosis</i> pulmonar o extrapulmonar
Infección diseminada o extrapulmonar por otras especies de <i>Mycobacterium</i>
Neumonía por <i>Pneumocystis (carini) jiroveci</i>
Neumonía recurrente
Leucoencefalopatía multifocal progresiva
Sepsis por salmonela
Toxoplasmosis cerebral
Síndrome de consunción debido a HIV

200/ μ l las infecciones son muy frecuentes y extremadamente graves. Los agentes causales de estas infecciones incluyen tanto patógenos primarios, como el virus del herpes, citomegalovirus, *M. tuberculosis*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Campylobacter jejuni*, salmonela, o giardia —que generalmente dan cuadros mucho más graves que en los pacientes inmunocompetentes— como microorganismos oportunistas, como las micobacterias ambientales, el criptococo o el neumocistis. En cualquier caso la defensa frente a estos microorganismos descansa en la inmunidad celular coordinada por los CD4, cuya función es activar la fagocitosis por los macrófagos y la destrucción de las células infectadas por los CD8. Sin embargo, las infecciones por bacterias capsuladas como el neumococo, cuya defensa depende de la presencia de anticuerpos, también pueden aparecer en estos enfermos por la ausencia de cooperación entre los CD4 y los linfocitos B (capítulo 21).

En ocasiones, en un paciente diagnosticado de sida, frente a un cuadro de enteritis, encefalopatía o consunción graves, se busca un agente causal oportunista (citomegalovirus, criptosporidio, criptococo, *M. tuberculosis*, etcétera); sin embargo, en los estadios avanzados esas manifestaciones pueden ser debidas a la acción directa del propio HIV.

Los pacientes adictos a drogas por vía parenteral suelen estar coinfectados por los virus de las hepatitis B/D o C y también presentan infecciones específicas, como endocarditis, osteoartritis y otras, causadas por estafilococo y cándida inoculados durante la inyección de las drogas y sus diluyentes con jeringas compartidas (capítulo 21).

La disponibilidad de nuevos medicamentos contra el HIV y en particular su administración múltiple (HAART) ha modificado la historia natural de la enfermedad y de las infecciones oportunistas que se han descrito previamente, consiguiéndose períodos asintomáticos muy largos, aunque en ocasiones con importantes efectos secundarios al tratamiento, como la lipodistrofia (Figs. 22.2 y 22.3). El futuro en este aspecto es difícil de predecir.

La evolución de los parámetros biológicos de las personas infectadas por el HIV se muestra en la figura 22.4.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

En los últimos años, la virología clínica, junto a la detección de los virus causales de las enfermedades infecciosas —objetivo estricto del diagnóstico— ha incorporado dos elementos de interés:

1. La determinación de los diferentes tipos o subtipos de virus cuando se correlacionan con diferentes niveles de virulencia o con la respuesta a la terapéutica y por tanto con el pronóstico.



Figura 22.2. Lipodistrofia.

Lipoatrofia facial por administración de antirretrovirales.

Cortesía del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Vall d'Hebron.



Figura 22.3. Lipodistrofia.

Lipodistrofia en «giba de búfalo» por administración de antirretrovirales.

Cortesía del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Vall d'Hebron.

2. La cuantificación de los virus en la sangre (carga vírica) como indicador de su actividad replicativa y, por tanto, también del pronóstico. Este enfoque cuantitativo, con sus ventajas y sus inconvenientes, se ha desarrollado fundamentalmente a partir de los estudios sobre el HIV y el sida.

Los métodos utilizados para el diagnóstico de la infección por el HIV son las pruebas serológicas, la detección de antígeno de la cápsida (p24) y la detección del DNA proviral integrado en el genoma de las células infectadas. Para el seguimiento de la enfermedad se utiliza la determinación cuantitativa del RNA de los viriones que circulan libremente por el plasma, así como el número de CD4 y otros marcadores señalados anteriormente. Las variantes de cada una de estas pruebas, por razones técnicas y comerciales, son numerosas y cae fuera del objetivo de este texto efectuar una presentación de cada una de ellas. Las bases conceptuales de estas técnicas se han presentado en los capítulos 8 y 9.

En general, los diferentes equipos de reactivos que se ofrecen en el comercio incorporan una descripción teórica y metodológica de la técnica. A este respecto, cabe destacar algunos puntos: los antígenos para las pruebas serológicas pueden obtenerse por lisado de cultivos víricos o bien por técnicas recombinantes o por síntesis artificial de los péptidos; en este caso los antígenos están altamente purificados y no incorporan material contaminante de las células en las que se han propagado los virus. La detección de anticuerpos se hace por técnica de ELISA de primera o segunda generación, que comporta la fijación de los antígenos en los pocillos de una placa de tipo «microtiter» y la detección de los anticuer-

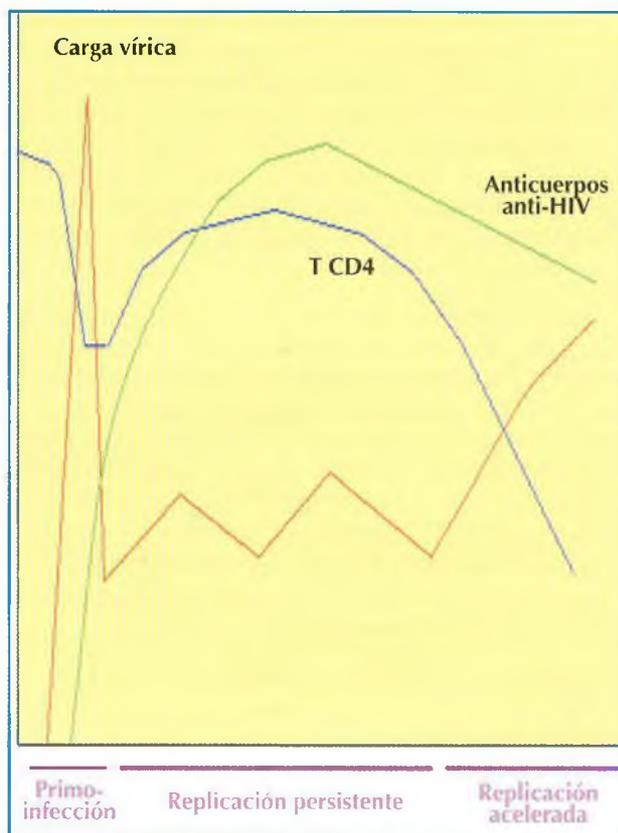


Figura 22.4. Evolución de los parámetros biológicos en personas infectadas por el HIV.

Se muestra la evolución de diversos parámetros biológicos en el tiempo y su relación con el estadio de la enfermedad en pacientes infectados por el HIV, antes de la introducción de la terapéutica antirretroviral de alta eficacia (HAART).

PI: primo infección; RC: replicación crónica; RA: replicación acelerada.

pos del suero que se han unido a los antígenos con una antiglobulina humana marcada. Los de primera generación utilizan lisado vírico y los de segunda utilizan proteínas recombinantes o péptidos sintéticos. También están disponibles pruebas basadas en técnicas de captura. En estas, en los pocillos de las placas se fijan anticuerpos anti-Fc, proteína A, etc., que captan las inmunoglobulinas del suero. Si existen anticuerpos específicos, al añadir antígeno del HIV marcado será captado por los anticuerpos emitiendo la señal correspondiente.

Las técnicas de tercera generación comportan la fijación del antígeno de HIV a una fase sólida (pocillo de una placa, etc.) que captura los anticuerpos específicos, presentes en el suero, que son revelados por un antígeno marcado (sándwich con doble antígeno). Las pruebas de cuarta generación permiten la detección simultánea del antígeno p24 y de anticuerpos³.

³ Primera generación: antígeno lisado en formato EIA, IF, WB. Segunda: antígeno recombinante o sintético en EIA, LIA. Tercera: lisado, recombinante o sintético en sandwich entre antígenos o aglutinación. Cuarta: detección simultánea de anticuerpos y antígeno (p24). Numerosas compañías poseen reactivos de varias generaciones (Abbott Laboratories; biokit SA.; bioMerieux; DiaSorin; Innogenetics y Roche entre otras). Poseen reactivos de cuarta generación: Abbott Laboratories; bioMerieux, Bio-Rad Laboratories Inc.; Roche y Dade Behring.

En los adultos, el diagnóstico de la infección se efectúa por técnicas serológicas, en general EIA de alguna de las generaciones señaladas, las cuales en Europa utilizan simultáneamente antígenos del HIV-1 y HIV-2, por lo que pueden detectarse las infecciones por cualquiera de ambos virus. En la mayoría de estas técnicas de EIA los reactivos comercializados incluyen antígenos de los grupos M y O, aunque este último se halla restringido a áreas geográficas muy limitadas.

Existen pruebas de diagnóstico serológico rápido que permiten obtener resultados en menos de 30 minutos y, sobre todo, son de realización muy sencilla, por lo que pueden practicarse en cualquier laboratorio. Las más utilizadas son las de aglutinación en las que el antígeno se ha fijado a partículas de látex y las de ELISA de membrana (*dot blot*). Poseen una aceptable sensibilidad y especificidad, pero inferior a las técnicas serológicas convencionales. Recientemente se han introducido técnicas de inmunocromatografía para este propósito (véase capítulo 8).

Por otra parte, las técnicas de detección de anticuerpos en saliva u orina sólo se recomiendan para estudios epidemiológicos.

Cuando se detecta por primera vez en un paciente un resultado positivo por serología, debe confirmarse mediante *Western blot* (WB), *line immunoassay* (LIA) o *recombinant immunoblot assay* (RIBA). Estas técnicas consisten en enfrentar el suero del paciente a los antígenos purificados y separados en una tira de nitrocelulosa. Los resultados de estas pruebas se considerarán positivos según el CDC cuando se detecten anticuerpos contra, al menos, dos de las tres proteínas de envoltura del virus, gp160/120, gp41 y p24 o según la OMS, contra dos de entre las gp160 (la gp160 es la poliproteína precursora de la gp120 y gp41). Los criterios de la FDA sugieren considerar el resultado positivo cuando se detectan las bandas de la p24 o la p31 y de una glicoproteína de envoltura (gp160/120 o gp41). Se considera un resultado negativo cuando no aparece ninguna banda. Todo WB con alguna banda, pero que no cumpla los criterios de positividad señalados, se considerara indeterminado y deberá complementarse preferentemente mediante la detección de la p24 o del genoma vírico. Existen WB para el HIV2 y LIA que incorporan antígenos de ambos virus⁴ (Fig. 22.5).

Como las personas infectadas presentan anticuerpos anti HIV durante toda la vida, la serología permite efectuar siempre el diagnóstico, excepto en un período inicial denominado «período de ventana», en el que aún

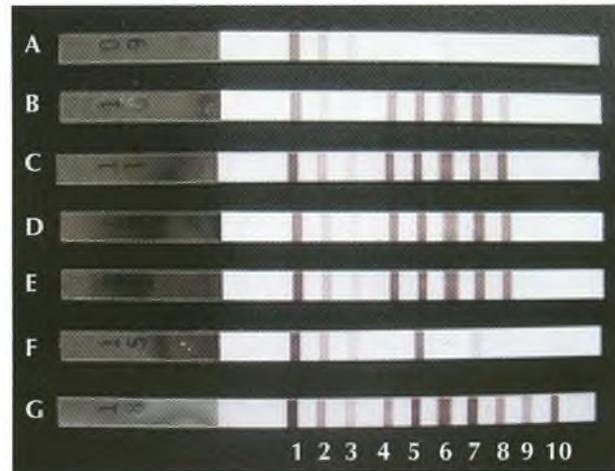


Figura 22.5. Line immunoassay.

LIA (*Line immunoassay*) para confirmación de anticuerpos anti HIV 1 y 2.

Bandas 1, 2, y 3: controles de muestra de diferentes intensidades (IgG anti-humana). Bandas 4, 5, 6, 7 y 8 con las proteínas gp 120, gp 41, p 31, p 24 y p 17 respectivamente de HIV 1. Bandas 9 y 10 con las proteínas gp 105 y gp 36 de HIV 2.

Tiras A control negativo y G positivo para HIV 1 y 2. Tiras B, C, D y E muestras positivas para anticuerpos anti HIV 1. Tira F muestra indeterminada para HIV 1 y 2.

no han aparecido los anticuerpos. Este período se prolonga de tres semanas a tres meses después de la infección. En este estadio inicial, cuando el paciente es aún seronegativo, se puede efectuar el diagnóstico mediante la detección del antígeno p24 (proteína de la cápsida) por técnica de EIA⁵.

Sin embargo, cuando esta prueba se realiza en estadios posteriores puede ser falsamente negativa cuando hay niveles elevados de anticuerpos que bloquean el antígeno, por lo que conviene disociar los complejos inmunes. También puede dar falsos positivos por el factor reumatoide, que enlaza por un lado el anticuerpo de captura del antígeno (reactivo fijado a la placa) y por otro el anticuerpo añadido como marcador (capítulo 8). En la detección de antígeno, recientemente, se ha introducido un sistema de señal basado en la amplificación de DNA unido al anticuerpo que eleva la sensibilidad de la técnica (Fig. 8.15).

Cuando la serología y la detección de antígeno no son útiles o concluyentes cabe confirmar la infección detectando el DNA proviral que se integra al DNA de las células diana al inicio de la infección y permanece de por vida, constituyendo la prueba estándar para este fin. Roche Mol Diag dispone de un sistema de amplificación del DNA proviral del HIV 1.

⁴ Estos reactivos para HIV1 están comercializados por diversas compañías como biokit SA; bio Merieux; Bio-Rad Laboratories Inc.; Chiron Diagnostics e Innogenetics entre otras y OraSure Technologies Inc. para muestras de saliva. Alguna de estas compañías poseen reactivos para HIV2. Bio-Rad Laboratories Inc.; bio Merieux; Chiron Diagnostics; Innogenetics poseen LIA con antígenos de ambos virus.

⁵ La mayoría de las compañías que comercializan kits para serología disponen de reactivos para detección de la p24.

La cuantificación del RNA viral se efectúa mediante diferentes técnicas de amplificación (RT-PCR, NASBA, bDNA, LCR; véase el capítulo 9) que permiten detectar cifras tan bajas como 20 a 50 unidades genómicas del virus por ml de plasma según la técnica. La finalidad de estas pruebas es establecer el pronóstico de la infección, la actividad del virus y la respuesta al tratamiento. Los pacientes que mantienen recuentos de $\geq 10^5$ copias/ml después de los primeros seis meses de la seroconversión tienen mayor riesgo de progresión a sida en los siguientes cinco años que los que tienen recuentos $< 10^4$ copias en los primeros estadios de la infección. Sin embargo, la evaluación clínica del paciente y la determinación del número de linfocitos CD4, la neopterina, la $\beta 2$ microglobulina o el interferón constituyen buenos indicadores subrogados de la situación de la enfermedad y de respuesta a la terapéutica.

Teniendo en cuenta que en las fases iniciales de la enfermedad, en ausencia de tratamiento, la carga vírica puede situarse entre 10^4 a 10^7 copias del genoma por ml de plasma, puede deducirse que es un método sensible para el diagnóstico durante el período ventana a pesar de que no es un método diseñado para el diagnóstico. En ningún caso debe considerarse en solitario como una técnica diagnóstica ya que puede pecar de falta de sensibilidad como de especificidad.

En los hijos de madres infectadas, la presencia de anticuerpos maternos que pueden persistir hasta los 18 meses de edad dificulta el diagnóstico, por lo que éste debe efectuarse mediante la detección de la p24 o mejor, por su mayor sensibilidad, del DNA proviral. Probablemente la detección cuantitativa del RNA posee también una sensibilidad adecuada para este objetivo. Estas pruebas deben hacerse con sangre del niño y no con sangre de cordón. Más del 90% de los niños infectados intraútero son positivos a los diez días y la casi totalidad al mes. Si los resultados son negativos deben repetirse a los dos y cuatro meses para descartar una infección adquirida durante el parto.

En caso de que los resultados de laboratorio no coincidan con el perfil clínico-epidemiológico de la persona estudiada, debe repetirse las pruebas con la sangre obtenida en una nueva extracción para descartar un posible error de etiquetado de la muestra.

Hay pruebas fenotípicas y genotípicas para la detección de la resistencia a los antirretrovirales con sus ventajas y dificultades. Las primeras son de realización extraordinariamente laboriosa. Entre las segundas las pruebas de amplificación genética, seguidas de secuenciación de zonas específicas del genoma permiten detectar mutaciones que causan resistencia a los antirretrovirales. Existen kits de hibridación inversa, (INNO-LiPA, Innogenetics) y chips (Microarray, Affymetrix) que permiten detectar mutaciones que se han asociado inequívocamente a la resistencia.

ESTRATEGIA DEL DIAGNÓSTICO

Cuando una prueba de EIA para HIV 1 y 2 con un kit certificado es negativa el resultado se considera negativo. Si la prueba es positiva debe practicarse una prueba confirmatoria (WB, LIA). Si ésta es positiva el resultado se considera positivo. Si la prueba confirmatoria es indeterminada se puede efectuar una prueba de detección de antígeno (p24) o estudiar el DNA proviral o el RNA vírico o alternativamente, esperar un mes y repetir las pruebas serológicas.

También se ha recomendado repetir la prueba positiva en una nueva extracción de sangre utilizando un kit de EIA de diferente generación. Si los resultados son coincidentes se aceptan y si son discrepantes se realiza la prueba confirmatoria (WB, LIA); esta estrategia es más económica e igual de sensible y específica cuando la prevalencia de infección es elevada.

Cuando una persona está en un posible período de ventana debe estudiarse el antígeno p24 o bien el DNA provírico o RNA vírico. Una alternativa es la de utilizar equipos de EIA con antígenos específicos de HIV1 y HIV2 de cuarta generación que permiten la detección simultánea de anticuerpos anti HIV 1, 2 y antígeno p24.

Todos estos resultados deben ponerse a la luz de la clínica y del riesgo epidemiológico de la persona estudiada.

Los resultados positivos deben complementarse, si es necesario, determinando la carga vírica, realizando el tipado del virus y estudiando las posibles resistencias a los antirretrovirales.

DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES OPORTUNISTAS

En los capítulos precedentes se han descrito los métodos para el diagnóstico de los diferentes síndromes en patología infecciosa (neumonía, enteritis, meningitis, etcétera) incluyendo los que aparecen en los pacientes con sida.

Un elemento fundamental para el diagnóstico correcto de estas infecciones, consiste en pensar en ellas, ya que muchas están causadas por microorganismos que infectan casi exclusivamente a los pacientes con sida, y para su detección se requieren técnicas especiales sin las cuales no puede efectuarse el diagnóstico, pruebas que no suelen realizarse si no es bajo solicitud o sospecha específica, como en el caso del virus JC o de *Bartonella henselae*.

En este sentido debe recordarse que para el diagnóstico de las infecciones respiratorias, además de los

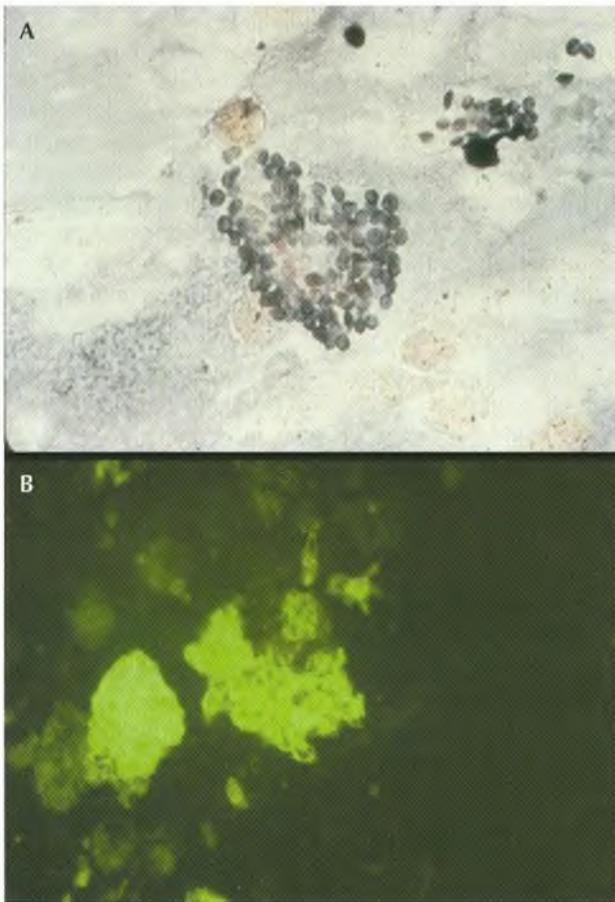


Figura 22.6. *Pneumocystis (carinii) jirovecii*.

Pneumocystis jirovecii es un hongo con unas características peculiares. Produce una infección pulmonar oportunista muy grave, específicamente en los pacientes con afectación de la inmunidad celular (linfocitos CD4).

Pueden observarse los quistes de *P. jirovecii* en una tinción de plata metenamina (A) y los trofozoitos y quistes teñidos mediante tinción fluorescente con anticuerpos monoclonales (B).

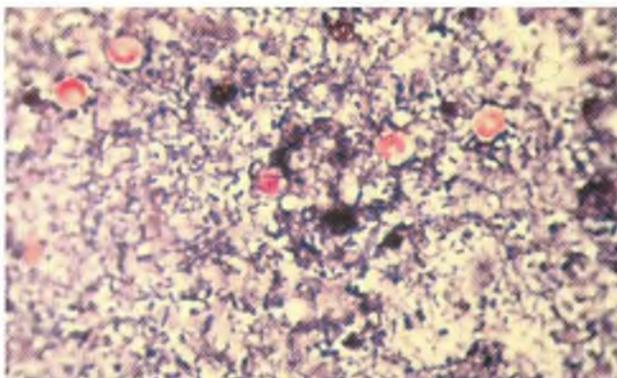


Figura 22.7. *Cryptosporidium parvum*.

Aunque este protozoo produce enteritis en personas sanas, particularmente niños, y causa pequeños brotes en guarderías y escuelas, el cuadro clínico en ese contexto es extremadamente benigno y autolimitado. Por el contrario, en los pacientes con sida el cuadro de enteritis es muy grave y prolongado y en ocasiones tiene un pronóstico infausto, ya que se carece de tratamiento específico.

métodos convencionales, cabe introducir las técnicas adecuadas para el diagnóstico de las diferentes micobacterias, neumocistis o histoplasma en viajeros a zonas endémicas; en las infecciones intestinales, las técnicas que permiten detectar criptosporidio, isospora y microsporidios y en su caso micobacterias así como el citomegalovirus; en las meningitis, hay que pensar en el criptococo y *M. tuberculosis* y en las encefalitis y cuadros pseudotumorales cerebrales en esos microorganismos y en el virus JC y toxoplasma. Las corioretinitis pueden estar ocasionadas por citomegalovirus, *M. tuberculosis*, toxoplasma o cándida (Figs. 22.6 a 22.9).

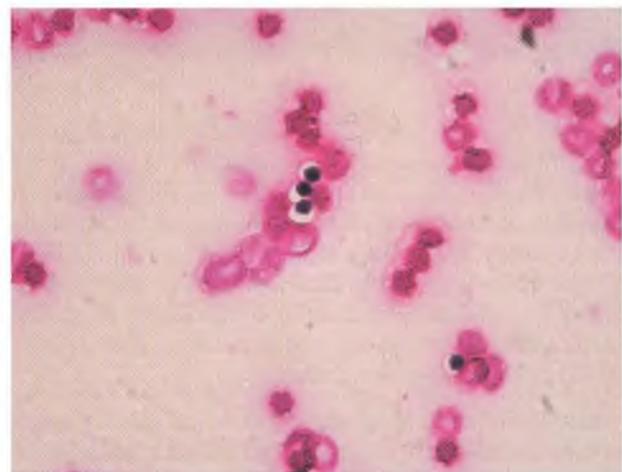


Figura 22.8. *Cryptococcus neoformans*.

Otro microorganismo que causa infecciones oportunistas de manera muy específica en los pacientes con sida es el hongo capsulado *Cryptococcus neoformans*. Habitualmente, produce meningitis de curso subagudo, que puede diagnosticarse mediante un examen microscópico del LCR con tinta china. Sin embargo en pacientes con inmunodepresión importante puede detectarse en la sangre causando fungemia. Se muestra un Gram de un hemocultivo con un criptococo.

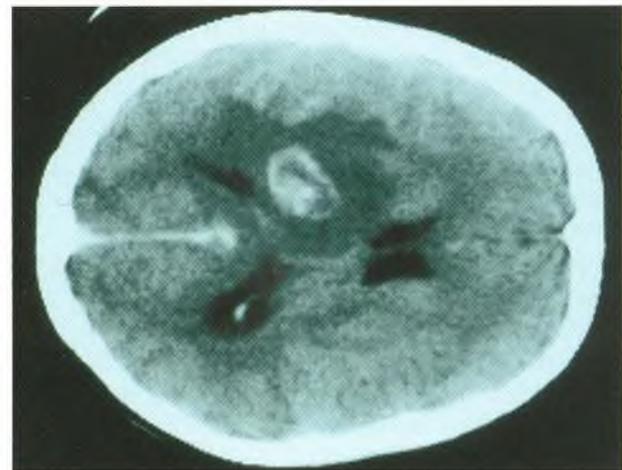


Figura 22.9. Toxoplasmosis cerebral.

La toxoplasmosis presenta un curso grave en los pacientes con sida. Puede dar cuadros de pseudotumor cerebral, cuadro que también pueden dar en estos pacientes las infecciones por criptococo.

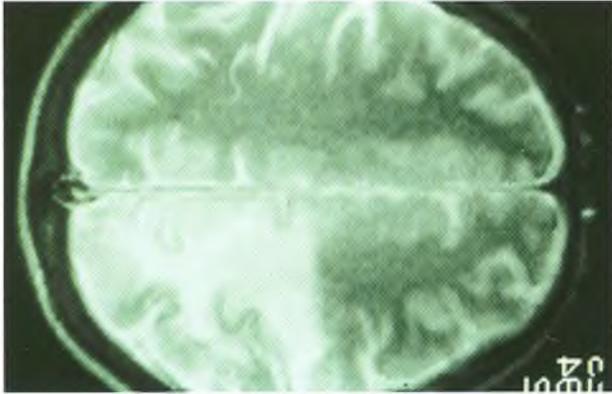


Figura 22. 10. Leucoencefalitis multifocal progresiva.

Imagen por resonancia nuclear del encéfalo de un paciente con sida afecto de leucoencefalitis multifocal progresiva causada por el virus JC. Secuencia T2 que muestra una hiperseñal que afecta al lóbulo parietal y occipital derecho. Característicamente se afectan las fibras radiadas respetándose la zona cortical.

Cortesía del doctor P. Domingo. Servicio de Medicina Interna. Hospital de Sant Pau.

En las sepsis hay que pensar en todos y cualquiera de los microorganismos convencionales y en los anteriores, así como *Mycobacterium avium*, *M. genavense* y *B. henselae* entre otros.

Asimismo, es complejo el diagnóstico directo de las infecciones en lugares de difícil acceso, como el pulmón (neumonía), pero sobre todo el SNC (encefalitis, toxoplasmosis cerebral, infección por el virus JC, tumores), el globo ocular (retinitis por citomegalovirus), huesos y articulaciones y pared del tubo digestivo (CMV y *M. tuberculosis*). En estos casos las muestras de fácil obtención (esputo, heces, etc.) son de escaso rendimiento, requiriéndose, cuando es imprescindible, la biopsia. Sin embargo, el LCR es una buena muestra para el diagnóstico mediante técnicas moleculares de infecciones del sistema nervioso central por el virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, virus varicela-zoster, virus JC, *Toxoplasma gondii* y *Cryptococcus neoformans*.

Protocolos técnicos

CAPÍTULO 2

Protocolo técnico 2.1. Esterilización del asa de nicrom

Las asas de nicrom pueden esterilizarse en mecheros eléctricos o de gas tipo Bunsen (Fig. 2.4):

1. Debe evitarse esterilizar el asa cargada con material, ya que puede salpicar durante su calentamiento; por ello, antes de acercarla a la fuente de calor, hay que eliminar el exceso de material que pueda llevar, depositándolo en el tubo o la placa de los que se ha tomado el material.
2. Si se esteriliza en un mechero de gas, se dispondrá el extremo de nicrom con el bucle en la parte central baja de la llama, ascendiendo lentamente para evitar salpicaduras situándolo finalmente en la parte superior hasta que el metal llegue al rojo.
3. Ha de apartarse el asa de la fuente de calor para que se enfríe. A los 5-15 segundos el asa está en condiciones de ser utilizada de nuevo.

Nota: cuando los mecheros no se utilizan, es recomendable mantenerlos apagados.

Protocolo técnico 2.2. Preparación de una extensión (frotis)

Las extensiones para observación microscópica pueden hacerse de material clínico (orina, pus, etc.), de cultivos en medio líquido o de colonias crecidas en medios sólidos.

1. Tomar un portaobjetos que deberá estar perfectamente limpio y desengrasado. Se constata que el porta está desengrasado porque el agua se deposita y extiende bien sobre él.
2. Para identificar la muestra, se rotula el portaobjetos adecuadamente con un diamante o con un rotulador indeleble, para que no se borre durante las manipulaciones. Puede ser útil marcar con un rotulador en la cara inferior del portaobjetos un círculo para indicar el lugar donde se va a depositar el material.
3. Si se parte de un material fluido (orina, líquido cefalorraquídeo, etc.) o de un cultivo en medio líquido, se carga el asa estéril con ese material, se deposita una cantidad que no sea excesiva en el centro del porta y se extiende por rotación del asa en un pequeño círculo de alrededor de 1-2 cm de diámetro, que facultativamente ha sido marcado en la cara inferior del portaobjetos (si el portaobjetos está bien desengrasado, el material se dispersará bien).
4. Si se parte de una colonia crecida en un medio sólido, se deposita primero con el asa o con una pipeta Pasteur una gota de agua destilada estéril en el portaobjetos y se efectúa en ella la emulsión de una pequeña porción de la colonia tomada con el asa estéril.
5. Una vez efectuada la extensión, secar la preparación a temperatura ambiente, en la estufa a 37 °C o por pases rápidos por la llama, controlando que la temperatura no sea excesiva. La preparación está en condiciones de ser fijada y teñida.

Protocolo técnico 2.3. Tinción de Gram

Las manipulaciones del portaobjetos deben efectuarse mediante unas pinzas, para evitar mancharse los dedos con los colorantes.

1. Tomar el porta con la extensión a teñir, efectuada según se señala en el Protocolo 2.2.
2. Fijar la preparación, recubriéndola delicadamente con una capa fina de alcohol. Decantarlo. Flamear, encendiendo los restos de alcohol con un flameador o una cerilla. Esperar que se apague. Dejar enfriar un instante.

(Protocolo técnico 2.3. continuación)

3. Recubrir la preparación con la solución de violeta de genciana. Dejar actuar durante 1 minuto.
4. Decantar y lavar suavemente con agua, de modo que no se desprenda el material fijado.
5. Recubrir la preparación con lugol. Dejar actuar durante un minuto.
6. Decantar y lavar suavemente con agua.
7. Decolorar, bañando con alcohol-acetona hasta que la preparación no desprenda colorante (30 segundos, aproximadamente).
8. Decantar y lavar suavemente con agua.
9. Recubrir la extensión con la solución de fucsina diluida (o safranina). Dejar actuar durante 30 segundos.
10. Decantar. Lavar suavemente. Dejar secar. Llevar al microscopio.

Nota: los colorantes y reactivos mencionados se encuentran en el comercio preparados para su uso.

Protocolo técnico 2.4. Iluminación de Köhler

Para microscopios con diafragma de campo.

1. Encender la luz.
2. Poner un portaobjetos con una preparación. Enfocarla x 100.
3. Cerrar el diafragma de campo casi completamente.
4. Ajustar el condensador con su tornillo de enfoque, subiéndolo o bajándolo, hasta observar muy nítida la periferia del anillo luminoso del diafragma de campo. El borde se verá con una iridescencia azul o roja.
5. Centrar con los tornillos de centrado del condensador la imagen luminosa del diafragma de campo.
6. Abrir el diafragma de campo hasta los extremos del campo visualizado. Si no se consigue una coincidencia entre ambos bordes, recentrar de nuevo.
7. No tocar más el diafragma de campo ni el tornillo de enfoque del condensador.
8. La intensidad de la luz debe controlarse con filtros neutros y con el reostato del transformador que alimenta la lámpara.

Protocolo técnico 2.5. Observación microscópica

Los microscopios habrán sido ajustados previamente, por lo que no es necesario alinear las lentes del condensador ni modificar el diafragma de campo.

1. Elevar con el tornillo macrométrico el tubo del microscopio.
2. Poner la preparación teñida sobre la platina del microscopio.
3. Encender la luz y dar la intensidad adecuada.
4. Enfocar con el objetivo x 10, con el tornillo macrométrico.
5. Girar el revólver para introducir el objetivo x 40. Ajustar la iluminación. Enfocar con el micrométrico.
6. Girar el revólver para dejar libre la preparación (sin ningún objetivo encima). Añadir una gota de aceite y girar el revólver para introducir el objetivo de x 100 (inmersión). Ajustar la iluminación.

Nota: después de la observación, limpiar cuidadosamente el objetivo con un papel específico para esta óptica.

Protocolo técnico 2.6. Siembra por agotamiento

Este tipo de siembra tiene por objetivo depositar separadamente sobre el medio de cultivo sólido las diferentes bacterias existentes en una muestra clínica, para que tras la incubación cada bacteria diferente forme colonias separadas entre sí.

1. Tomar una placa de Petri conteniendo el medio sólido a sembrar. El medio, en la placa, no debe estar reseco. Por el contrario, si la superficie del medio está muy húmeda (mojada), hay que dejarla abierta boca abajo en un ambiente sin corriente de aire, hasta que desaparezca el exceso de humedad (~10-20 minutos).
2. Rotular las placas para identificar el material sembrado. Es recomendable poner la fecha.
3. En un lado de una placa de Petri, cerca del borde, pero sin tocarlo (Fig. 2.10), se deposita sobre el medio de cultivo el material a sembrar (puede tratarse de material tomado con un escobillón; material pastoso o líquido como heces, fluido como orina, o incluso un cultivo bacteriano en medio líquido). Si se trata de un escobillón, se toca con él la superficie de la placa, y si es un material fluido, se coge y se deposita sobre el medio con el asa de nicrom previamente esterilizada. Si se pretende hacer una siembra por agotamiento a partir de

(Protocolo técnico 2.6. continuación)

un cultivo en medio líquido, se toma directamente una pequeña cantidad con el asa que se deposita sobre el medio como se acaba de explicar. Si se pretende hacer la resiembra a partir de las colonias crecidas en un medio sólido, es preferible hacer una suspensión de la colonia en un tubo con solución salina estéril, sembrando a partir de ella.

4. El material que ha sido depositado en el primer cuadrante de la placa se extiende con el asa, en zigzag, al segundo cuadrante. Se esteriliza el asa y del segundo cuadrante se extiende al tercero, y de éste al cuarto, según se representa en la figura 2.10.

Protocolo técnico 2.7. Resiembra en cultivo puro

1. Preparar los tubos o las placas con los medios de cultivo adecuados al microorganismo que se va a resembrar.
2. Observar cuidadosamente con una lupa las colonias formadas sobre el agar de la placa de Petri para distinguir la posible existencia de distintos tipos de colonias. Para confirmar la existencia de colonias de distintos tipos, puede ser útil efectuar una tinción de Gram a partir de cada una de las diferentes colonias y observarlas al microscopio. En este caso, se procederá según se indica en los protocolos 2.2 a 2.5. Rotular los tubos o las placas (uno por cada colonia diferente).
3. Tocar la colonia con el asa sin tocar el agar en su contigüidad.
4. Para efectuar la resiembra: depositar la colonia, tocada con el asa, en el tubo con el medio líquido, frotando en la interfase vidrio-líquido o en el tubo con el medio sólido (agar inclinado) o la placa resiguiendo lentamente, en zigzag, la superficie del agar.
Repetir la operación con cada una de las diferentes colonias existentes, sembrando, lógicamente, cada una en un tubo o placa diferente (perfectamente rotulado).
5. Llevar a la estufa a incubar 18-24 horas, si es suficiente.

Nota: si las colonias en las placas de aislamiento (Protocolo 2.6) son suficientemente grandes y están bien separadas, se puede practicar una suspensión de la colonia en un tubo conteniendo aproximadamente 1 ml de solución salina fisiológica estéril. Con esta suspensión se puede proceder a realizar la identificación, antibiograma, etc., sin requerir una noche de incubación.

CAPÍTULO 3

Protocolo técnico 3.1. Prueba de la catalasa

Técnica

Pueden utilizarse varios procedimientos:

I:

1. Preparar un tubo de 12 x 100 mm con 3-4 ml de una solución de agua oxigenada de 110 volúmenes diluida al 1/3 en agua destilada estéril.
2. Tomar el microorganismo del cultivo con un palillo. Introducir el palillo en el agua oxigenada sin que se desprenda el cultivo (Fig. 3.2).

Nota: una vez observada la reacción, se desecha el palillo con el cultivo. El tubo puede guardarse en poyata varias horas para efectuar otras reacciones. Después se esteriliza.

II:

1. Preparar un portaobjetos limpio.
2. Depositar con una pipeta una gota de agua oxigenada de 110 volúmenes, previamente diluida al 1/3 en agua destilada.
3. Tomar el microorganismo con un palillo de madera o plástico a partir de la colonia y efectuar una suspensión espesa del mismo en el agua oxigenada del porta.

Nota: el agua oxigenada debe guardarse en la nevera y la dilución debe ser efectuada inmediatamente antes de su utilización.

(Protocolo técnico 3.1. continuación)

Interpretación del resultado

Si la reacción es positiva, se observa que a partir del microorganismo se originan abundantes burbujas. Estas burbujas no se producen si la reacción es negativa.

Si la bacteria se manipula con el asa de nicrom, pueden producirse reacciones positivas falsas. Se evitará realizar la reacción a partir de cultivos en agar sangre, pues también puede dar falsos positivos. Si es inevitable, procurar no tocar ni arrastrar el medio.

Protocolo técnico 3.2. Prueba de la oxidasa

Técnica

1. Preparar extemporáneamente una suspensión de N-dimetil-p-fenilendiamina (o tetrametil-p-fenilendiamina) en agua destilada poniendo el equivalente de un grano de arroz del reactivo en 2-3 ml de agua destilada. No agitar excesivamente.
2. Impregnar un papel de filtro (1,5 x 4 cm aproximadamente) colocado sobre un portaobjetos con una o dos gotas de esta suspensión. Alternativamente, poner un papel de filtro circular dentro de una placa de Petri vacía. Impregnar con unas gotas hasta que quede bien húmedo, pero sin exceso de líquido.
3. Con la ayuda de un palillo de madera o de plástico, depositar sobre el papel una colonia de la bacteria a estudiar.
4. Realizar la lectura de la reacción de forma inmediata (segundos).

Interpretación de los resultados

Oxidasa positiva: coloración violeta.

Oxidasa negativa: incolora.

Nota: el papel puede mantenerse dentro de la placa de Petri cerrada durante algunas horas, para realizar varias pruebas a lo largo de la jornada de trabajo (Fig. 3.3).

Evitar la utilización del asa de nicrom para realizar esta prueba; puede dar lugar a falsos positivos.

No debe realizarse la prueba a partir de cultivos realizados en medios con azúcares ni medios con sangre, pues puede dar lugar a reacciones falsamente negativas o positivas respectivamente.

Protocolo técnico 3.3. Prueba de la coagulasa

Técnica

En tubo: detección de la coagulasa libre

- Con una pipeta estéril, transferir tres gotas de una suspensión del estafilococo en suero fisiológico estéril a un tubo conteniendo 1 ml de plasma de conejo citratado.
- Llevar a la estufa a 37 °C. Leer a la hora y a las cuatro horas.

Interpretación del resultado

- Cuando la prueba es positiva, se forma un coágulo firme que se adhiere a las paredes del tubo. Con el tiempo el coágulo se retrae. Si la prueba es negativa, el plasma permanece fluido.
- Si a las cuatro horas no se ha positivizado la reacción, debe efectuarse una nueva lectura a las 24 horas.

En porta:

- Detección de la coagulasa ligada o *clumping factor*.
- Efectuar en un porta una suspensión espesa y muy homogénea del microorganismo en agua destilada estéril, añadir una gota de plasma de conejo citratado, homogeneizar y leer la reacción inmediatamente; la lectura en tiempo superior a 10 segundos puede dar lugar a falsos positivos. No practicar la reacción con bacterias crecidas en medios hipersalinos.
- Existen métodos alternativos a la coagulasa en porta, entre ellos:
 - Prueba de aglutinación en porta para detectar *clumping factor* que utiliza hematíes sensibilizados con fibrinógeno.

(Protocolo técnico 3.3. continuación)

- Prueba de aglutinación en látex para detectar *clumping factor* y proteína A: utiliza partículas de látex cubiertas de fibrinógeno y IgG.
- Prueba de aglutinación en látex para detectar *clumping factor* proteína A y antígenos capsulares de *S. aureus*.
- Todas estas pruebas se hallan comercializadas.
- Con un asa estéril, transferir el microorganismo desde el cultivo al soporte rotulado como «test» y otra al rotulado como «control». Homogeneizar las colonias en una gota de reactivo «test» y «control» respectivamente. Leer la reacción inmediatamente, en no más de 10 segundos.

Interpretación del resultado

En las cepas de estafilococo plasmacoagulasa positiva, se observará una aglutinación del reactivo «test», pero no del control dentro de los 10 segundos siguientes a su realización. En las cepas plasmacoagulasa negativa, no aglutinará ninguno de los reactivos. Hay un porcentaje variable de falsos negativos. Si se observa aglutinación de los dos reactivos, el resultado es ininterpretable.

Nota: no debe realizarse la prueba a partir de colonias crecidas en medios con alto contenido en sal ni realizar la lectura de las pruebas en porta en tiempo superior a 10 segundos, pues puede dar lugar a reacciones falsas positivas.

Siempre que se sospeche la presencia de *S. aureus* y el resultado de la coagulasa en porta es negativo, hay que confirmar por la técnica de coagulasa en tubo.

Protocolo técnico 3.4. Crecimiento en NaCl al 6,5%

Técnica

Sembrar el microorganismo en el caldo con NaCl al 6,5% e incubar a 35-37 °C durante 18-24 horas.

Interpretación del resultado

- Se evalúa el crecimiento del microorganismo en el medio.
- Positivo: enturbiamiento del caldo.
- Negativo: caldo transparente.

Protocolo técnico 3.5. Siembra del medio de Kligler

El medio está intubado en pico de flauta, con una base (fondo) y una zona inclinada (pendiente), presenta un color rojo y es relativamente rico.

Técnica

Cargar el asa estéril con el microorganismo, sembrar el medio de Kligler sobre la superficie inclinada (pendiente) y por picadura en la base (fondo). Incubar a 35-37 °C durante 18-24 horas.

Interpretación de los resultados

Utilización de la glucosa:

- Positivo: acidificación del fondo que vira a amarillo.
- Negativo: el fondo permanece invariable de color rojo.

Utilización de la lactosa:

- Positivo: acidificación de la pendiente que vira a amarillo.
- Negativo: la pendiente permanece invariable de color rojo.

Producción de gas:

- Positivo: ruptura del agar o formación de burbujas en el fondo.
- Negativo: ausencia de ruptura o de burbujas.

Producción de SH₂:

- Positivo: ennegrecimiento del medio.
- Negativo: ausencia de ennegrecimiento.

(Protocolo técnico 3.5. continuación)

Cuando el medio está muy acidificado (bacterias glucosa y lactosa positiva), no se produce precipitado de la sal férrica, por lo que no hay ennegrecimiento o éste es muy ligero (falso negativo).

Nota: este medio, además de permitir estudiar los caracteres señalados, se utiliza para determinar (presuntivamente) el tipo respiratorio de la bacteria gramnegativa. La falta de crecimiento en la base (por lo que el fondo no es acidificado y permanece rojo) con crecimiento en la pendiente sugiere que se está ante un bacilo gramnegativo aerobio estricto (*Pseudomonas*, etc.). Esta técnica no es adecuada para el estudio del tipo respiratorio de las bacterias anaerobias estrictas.

Protocolo técnico 3.6. Medio de movilidad-indol-ornitina (MIO)

Este medio sólido, dispuesto en un tubo, permite detectar la movilidad de la bacteria, la producción de indol y la decarboxilación de la ornitina. El medio es de color violeta.

Técnica

1. Sembrar por picadura central la suspensión de la bacteria con la ayuda de un asa de nicrom o una pipeta Pasteur. Incubar a 35-37 °C durante 18-24 horas.
2. Una vez realizada la lectura de la decarboxilación de la ornitina y de la movilidad, añadir unas gotas del reactivo de Kovacs y agitar ligeramente.

Interpretación de los resultados

Movilidad:

- Positiva: enturbiamiento del medio.
- Negativa: crecimiento sólo en la zona central de siembra (picadura); resto del medio límpido.

Decarboxilación de la ornitina:

- Positiva: coloración violeta.
- Negativa: coloración amarilla.

Producción de indol:

- Positivo: al añadir el reactivo de Kovacs, éste adquirirá una coloración roja.
- Negativo: el reactivo de Kovacs permanece amarillo pálido.

Protocolo técnico 3.7. Medio de agar lisina hierro (LIA)

El medio está intubado en pico de flauta, con una base (fondo) y una zona inclinada (pendiente). Posee color violeta.

Técnica

Cargar el asa estéril en el tubo conteniendo la suspensión del bacilo gramnegativo a estudiar, sembrar el medio de LIA sobre la superficie inclinada y por picadura en la base. Incubar a 35-37 °C durante 18-24 horas.

Interpretación de los resultados

Decarboxilación de la lisina:

- Positivo: pendiente y fondo violeta.
- Negativo: fondo amarillo y pendiente violeta.

Deaminación de la lisina:

- Positivo: color rojo vinoso de la superficie inclinada del medio (se observa mejor a trasluz).
- Negativo: ausencia de coloración rojiza en la pendiente.

Producción de SH₂:

- Positivo: ennegrecimiento del medio.
- Negativo: ausencia de ennegrecimiento.

Cuando el medio está muy acidificado (decarboxilación negativa), no se produce precipitado de la sal férrica, por lo que no hay ennegrecimiento o es muy ligero (falso negativo).

Protocolo técnico 3.8. Prueba de glucosalgas

Técnica

Añadir dos o tres gotas de la suspensión del microorganismo al tubo conteniendo caldo, una solución de glucosa, el indicador rojo de fenol, que lleva incorporada una campana de Durham (invertida). Incubar a 35-37 °C durante 18-24 horas.

Interpretación de los resultados

Fermentación de la glucosa

- Positiva: viraje del medio de rojo a amarillo.
- Negativa: coloración roja.

Producción de gas:

- Positiva: se observan burbujas de gas dentro de la campana.
- Negativa: ausencia de burbujas.

Nota: la ausencia de producción de gas es un carácter diferencial propio de *Salmonella* ser. Typhi, *Shigella*, *Yersinia* y *Vibrio*. La producción de gas también puede estudiarse en el medio de Kligler. Si la campana es ligera, esta técnica es más sensible.

Protocolo técnico 3.9. Producción de indol

Técnica

Transferir con el asa la suspensión del bacilo gramnegativo al tubo de caldo para el estudio del indol. Incubar a 35-37 °C durante 18-24 horas.

Interpretación de los resultados

Añadir 5 a 10 gotas del reactivo de Kovacs con una pipeta. Agitar suavemente. Leer la reacción del indol.

- Positivo: el reactivo añadido sobrenada y toma un color rojo intenso.
- Negativo: el reactivo sobrenadante permanece de color amarillo.

Nota: el medio de agar movilidad indol ornitina (MIO) permite estudiar simultáneamente estos tres caracteres.

Protocolo técnico 3.10. Prueba de Voges-Proskauer (VP)

Técnica

Sembrar con el asa el medio glucosado para el estudio del VP (Medio de Clark-Lubs). Incubar a 35-37 °C durante 48 horas.

Interpretación de los resultados

Sacar de la estufa, transferir el caldo a un tubo ancho de 18 x 180. Añadir 0,5 ml de la solución de α -naftol y 0,5 ml de la solución de KOH (potasa). Dejar reposar y leer entre 10 y 15 minutos.

- Positivo: aparece un color rojo cereza intenso.
- Negativo: no se produce la coloración roja.

Nota: la reacción puede revelarse después de 18-24 horas de incubación. Añadir los reactivos y calentar el tubo muy suavemente al mechero durante 5 minutos evitando que hierva, agitarlo suavemente durante unos segundos o dejarlo en reposo 15 minutos. Leer.

Muy importante: en *Yersinia* la incubación a 28 °C da una reacción positiva, mientras que a 37 °C es negativa.

Protocolo técnico 3.11. Prueba de la fenilalanina deaminasa (FDA)

Técnica

Sembrar con un asa la suspensión del microorganismo en la pendiente del agar fenilalanina. Incubar a 35-37 °C durante 18-24 horas.

(Protocolo técnico 3.11. continuación)

Interpretación del resultado

Añadir unas gotas del reactivo de cloruro férrico, bañando la superficie del agar. La reacción es inmediata.

- Positivo: coloración verde botella.
- Negativo: incoloro.

Hay que realizar la lectura inmediatamente después de añadir el reactivo, ya que la reacción sólo es estable unos minutos.

Nota: puede realizarse una prueba de la fenilalanina deaminasa rápida efectuando una suspensión muy espesa del microorganismo en una solución de L-fenilalanina al 0,5% en agua destilada estéril (la solución puede mantenerse en nevera durante 7-15 días). Se incuba durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. Añadir una gota de cloruro férrico. Leer como en el medio sólido.

Si la solución se efectúa con D-L fenilalanina, preparar una solución al 1%.

Protocolo técnico 3.12. Pruebas de identificación rápidas

Algunas pruebas metabólicas para identificación pueden realizarse de forma rápida tras una incubación de aproximadamente cuatro horas. En general, se trata de reacciones enzimáticas cromogénicas o pruebas convencionales modificadas.

Aminopeptidasas

γ -glutamil amino peptidasa (γ -GT)
Leucina amino peptidasa (LAP)
Pyrrolidionil amino peptidasa (PYR)
Tripsina amino peptidasa (TRYP)

Glicosidasas

β -galactosidasa (β -GAL)
 β -glucuronidasa (β -GLU)
 β -xilosidasa (β -XYL)
 α -manosidasa (α -MAN)

Decarboxilasas

Lisina decarboxilasa (LDC)
Ornitina decarboxilasa (ODC)
Arginina dehidrolasa (ADH)

Ureasa

Triptofano-deaminasa/indol
Fosfatasa alcalina
Tetracionato reductasa
Nitrataza
Hidrólisis del hipurato
Hidrólisis de la acetamida
Bilis esculina
Indoxil acetato
Voges-Proskauer
Pseudomonas aeruginosa screen
Deferoxamina
Fermentación de carbohidratos

Técnica

Poner 0,25 ml de solución salina en un tubo de 12 x 120 mm. Hacer una suspensión bacteriana densa de la cepa a identificar (MacFarland 4. Véase tabla 3.14). Añadir la tableta del sustrato a estudiar. (En las pruebas de las decarboxilasas, añadir tres gotas de aceite de parafina estéril). Cerrar el tubo e incubar a 35-37 °C durante cuatro horas.

Los comprimidos de carbohidratos se añaden a un medio convencional para estudio de la fermentación de azúcares y se siembran y procesan por métodos convencionales. Incubar 24-48 horas.

Interpretación

La lectura de las pruebas puede hacerse directamente observando el cambio de color. Sin embargo, en las pruebas de amino peptidasas, hidrólisis del hipurato, Voges-Proskauer, triptofano-deaminasa, indol y reducción de nitratos debe añadirse un reactivo siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Nota: existen tabletas comercializadas de uso práctico para realizar estas pruebas de modo individualizado (Neo-Sensitabs®, Diatabs® (Rosco). Wee-Tabs (Key Scientifics Products). La normativa de empleo viene indicada por el fabricante.

Rosco comercializa dos productos para la identificación manual de estafilococos (STAPH-ZYM®) y de enterobacterias (ROSCOZYM®). Estos productos utilizan 10 tabletas cargadas con sustratos convencionales modificados y cromogénicos; pueden detectar enzimas preformados de forma rápida o convencional (4 ó 18 horas de incubación respectivamente).

Protocolo técnico 3.13. Antibiograma

I. Técnica de difusión

1. Transferir el microorganismo a un tubo con 2-3 ml de solución salina hasta conseguir una turbidez correspondiente al estándar Mac Farland 0,5 (ver tabla 3.14).
2. Empapar en esta suspensión un escobillón, exprimiéndolo en las paredes del tubo para eliminar el exceso de líquido absorbido.
3. Frotar con el escobillón toda la superficie del medio de la placa en tres direcciones sucesivamente para sembrarla homogéneamente.
4. Dejar secar la superficie inoculada durante 10 minutos, reposando la placa en la poyata con la tapa ligeramente abierta.
5. Depositar con dispensador los discos conteniendo los antibióticos distribuyéndolos en la periferia de la placa, equidistantes entre sí. Presionar suavemente con el asa o unas pinzas estériles para que contacten bien con la superficie del agar. Flamear suavemente las pinzas después de depositar cada disco sobre el agar. El número de discos por placa que es recomendable utilizar depende del tamaño de la misma. Existen dispensadores de discos semiautomáticos.
6. Dejar la placa 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la difusión del antibiótico.
7. Llevar la placa a la estufa a 35-37 °C. Incubar durante 18-24 horas.

Interpretación de los resultados

Medir con un pie de rey el diámetro de los halos de inhibición, si se han formado, interpretándolos según las tablas adecuadas a cada microorganismo (Tablas 3.15 a 3.21).

Nota: el medio recomendado es el agar Mueller-Hinton. Para el estudio de bacterias exigentes el medio se enriquecerá con sangre de carnero al 5%; para el estudio de hemófilos, se utilizará el medio HTM (*Haemophilus test medium*).

Si no es estrictamente necesario, no se incubará en atmósfera enriquecida con CO₂.

II. Técnica de microdilución

Es una técnica de dilución en caldo que utiliza placas de poliestireno con micropocillos, generalmente comercializadas. Contienen varios antimicrobianos, desecados o liofilizados, en diluciones dobles progresivas para ser estudiados simultáneamente. Esta técnica permite el estudio de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de diversos antibióticos frente a una bacteria.

Técnica

1. Preparar el inóculo del mismo modo que para la técnica de difusión. Diluir para que la concentración sea de 5×10^5 ufc/ml (5×10^4 ufc/pocillo). Puede ser adecuado subcultivar una alícuota para comprobar la pureza del inóculo.
2. Inocular cada placa, depositando en cada pocillo 100 µl de la suspensión del microorganismo.
3. Cubrir la placa con una tapa de plástico o sellarla con papel adhesivo para evitar la evaporación durante la incubación.
4. Incubar a 35-37 °C durante 18 horas.

Lectura e interpretación de los resultados

Comprobar los controles de crecimiento y la pureza del inóculo.

Determinar el valor de la CIM de cada antibiótico que corresponderá al pocillo con la menor concentración de antibiótico en la que el crecimiento bacteriano está inhibido. Interpretar los resultados según las tablas adecuadas a cada microorganismo (Tablas 3.15 a 3.21).

Nota: el medio recomendado es el caldo Mueller Hinton suplementado con cationes. Para el estudio de bacterias exigentes el medio se enriquecerá con sangre de carnero al 5%; para el estudio de hemófilos se utilizará el medio HTM (*Haemophilus test medium*), y para el estudio de la oxacilina en estafilococos, se suplementará el caldo con NaCl al 2%.

Si no es estrictamente necesario, no se incubará en atmósfera enriquecida con CO₂.

(Protocolo técnico 3.13. continuación)

III. Técnica de Etest

Cuantifica la actividad antimicrobiana determinando la CIM por técnica de difusión.

1. Siguiendo la metodología de difusión descrita anteriormente y utilizando los mismos medios de cultivo, una vez se ha inoculado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de Etest sobre su superficie.
2. Dejar la placa a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir la difusión del antibiótico.
3. Incubar a 35-37 °C durante 18 horas.

Interpretación de los resultados

Tras la incubación se formará una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. La tira lleva grabadas las distintas concentraciones del gradiente. El punto en que el extremo de la zona de inhibición intersecciona con la tira es el valor de la CIM.

Llevando este valor a unas tablas de interpretación se conocerá si la bacteria es sensible o resistente al antimicrobiano estudiado.

CAPÍTULO 4

Protocolo técnico 4.1. Identificación cromatográfica de los anaerobios

A partir de un cultivo en caldo PY con glucosa en el que se observa un crecimiento abundante se realizan las siguientes extracciones:

Ácidos volátiles y alcoholes:

1. Pipetear 1 ml de caldo de cultivo y llevarlo a un tubo de 12 x 75 mm.
2. Añadir sucesivamente: 0,2 ml de H₂ SO₄ al 50% en agua; 0,4 g de cloruro sódico y 1 ml de éter etílico.
3. Tapar el tubo y mezclar el caldo con el éter invirtiendo el tubo unas 20 veces.
4. Centrifugar suave y brevemente para separar la emulsión éter-caldo.
5. Recoger con una pipeta Pasteur la fase superior (éter) teniendo cuidado de no contaminarla con la fase inferior (caldo) llevándola a un tubo de 12 x 75 mm.
6. Añadir CaCl₂ anhidro al caldo en la proporción 1/4 (v/v). Tapar y dejar reposar unos cinco minutos.
7. Inyectar de 2 a 14 µl del extracto en la columna del cromatógrafo (según instrumento).

Ácidos no volátiles (derivados metilados):

1. Pipetear 2 ml de caldo de cultivo y llevarlo a un tubo de 12 x 75 mm.
2. Añadir 2 ml de metanol y 0,4 ml de H₂ SO₄ al 50% en agua.
3. Tapar el tubo y calentar en un baño a 60 °C durante 30 minutos.
4. Añadir 1 ml de agua y 1 ml de cloroformo.
5. Tapar el tubo y mezclar bien invirtiendo el tubo unas 20 veces.
6. Centrifugar suave y brevemente para separar la emulsión.
7. Recoger la fase inferior (cloroformo) teniendo cuidado de no contaminarla con la fase superior.
8. Inyectar de 2 a 14 µl del extracto en la columna del cromatógrafo (según instrumento).

Interpretación

El patrón de ácidos volátiles y no volátiles define el tipo metabólico de la bacteria anaerobia. Los diferentes compuestos se identifican en función del tiempo de retención y por comparación con controles externos.

Protocolo técnico 4.2. Tinción de Ziehl-Neelsen

Técnica

1. Practicar sobre un portaobjetos una extensión del material clínico como se ha señalado para el Gram (véase protocolo técnico 2.3).

(Protocolo técnico 4.2. continuación)

2. Secar la preparación a temperatura ambiente o en la estufa a 37 °C o por pases por la llama controlando que la temperatura no sea excesiva.
3. Recubrir la preparación con alcohol. Decantar. Flamear. Dejar enfriar un instante (fijado).
4. Recubrir la preparación con fucsina fenicada. Calentar con un flameador por debajo de la preparación hasta que empiece a desprender vapor. Repetir el flameado dos veces más, dejando 10 minutos entre cada operación de flameado. El colorante debe mantenerse un total de 20 minutos.
5. Decantar el colorante. Lavar con agua.
6. Añadir alcohol-ácido para decolorar durante dos minutos.
7. Lavar con agua.
8. Recubrir la preparación con azul de metileno durante un minuto.
9. Decantar. Lavar con agua. Secar.
10. Observar al microscopio con el objetivo de inmersión (x1.000).

Interpretación

Las bacterias alcohol ácido resistentes se observan teñidas de rojo intenso contra un fondo azul. Las bacterias no alcohol ácido resistentes se observan de color azul como el resto del fondo de la preparación.

Nota: los reactivos para la tinción se hallan en el comercio preparados para su uso.

Precaución. Los vapores de la fucsina fenicada son tóxicos, por lo que esta tinción debe realizarse en una campana de gases.

Protocolo técnico 4.3. Sondas genéticas

Cultivos líquidos con sangre

Los medios de cultivo líquidos o los sedimentos celulares que contienen sangre total o lisada (sangre, médula ósea, muestras hemoptóicas, líquidos hemáticos), se han de sembrar en medio líquido y procesar como los cultivos sin sangre.

Cultivos líquidos sin sangre

Procedimiento:

1. Se parte de viales de sistemas automatizados no radiométricos (M-BacTR, bio Merieux; MGIT, Becton Dickinson) o radiométricos (BACTEC-12B, Becton Dickinson) detectados como positivos.
2. Dispensar 2 ml del medio líquido en un tubo de microcentrífuga de 3,6 ml de tapón de rosca.
3. Centrifugar a 9.000 g durante cinco-siete minutos. Si no se dispone de este tipo de centrifuga, centrifugar a 3.800 rpm durante 20 minutos.
4. Decantar completamente el sobrenadante y resuspender el sedimento en 100 µl de reactivo 1 GEN-PROBE y 100 µl de reactivo 2. Agitar enérgicamente hasta la total resuspensión del sedimento.
5. Transferir 200 µl de la suspensión al tubo de reactivo de lisis GEN-PROBE. Agitar.
6. Sonicar en el sonicador a temperatura ambiente durante 15 minutos.
7. Inactivar a 95 °C durante 10 minutos.
8. Transferir 100 µl del lisado al tubo con sonda liofilizada. Agitar.
9. Incubar a 60 °C durante 15 minutos.
10. Añadir 300 µl de reactivo 3. Agitar.
11. Incubar a 60 °C durante:
 - 10 minutos en sonda de *M. tuberculosis complex*.
 - 8 minutos en sonda de *M. kansasii*.
 - 5 minutos en el resto de sondas: *M. avium complex*, *M. avium*; *M. intracellulare*, *M. gordonae*.
12. Enfriar a temperatura ambiente durante cinco minutos.
13. Leer en el luminómetro AccLDR o en el Leader 50i.

Cultivos sólidos

1. Poner 100 ml de reactivo 1 y 100 µl de reactivo 2 en el tubo de lisis.
2. Hacer una suspensión de la cepa.
3. Proceder a la sonicación e hibridación, tal como se indica en el protocolo de cultivos líquidos sin sangre.

CAPÍTULO 5

Protocolo técnico 5.1. Tinción con azul de lactofenol

Técnica

1. Colocar una o dos gotas de azul de lactofenol sobre un portaobjetos.
2. Añadir una pequeña porción de la muestra clínica a estudiar (si es líquida, depositar una gota, si es pastosa, emulsionar). Mezclar con ayuda del asa para homogeneizar.
3. Cubrir con un cubreobjetos.
4. Dejar la muestra a temperatura ambiente unos tres minutos.
5. Observar al microscopio (x400). Las estructuras fúngicas se ven de color azul sobre fondo incoloro.

Azul algodón: ácido láctico 20 ml; fenol concentrado 20 ml; glicerol 40 ml; agua destilada 20 ml. Azul algodón 0,05 g (2 ml de solución acuosa al 1%). Disolver el fenol en el ácido láctico, glicerol y agua; añadir el azul algodón.

Existe una coloración permanente comercializada basada en este colorante (MycPerm-BLUE, Scientific Device Laboratory).

Protocolo técnico 5.2. Preparación con hidróxido potásico

Técnica

1. Colocar una o dos gotas de KOH al 20% sobre un portaobjetos¹.
2. Añadir una pequeña porción de la muestra a estudiar. Mezclar con ayuda del asa para homogeneizar.
3. Cubrir con un cubreobjetos.
4. Calentar suavemente pasando la preparación sobre la llama de un mechero (con ayuda de unas pinzas) evitando que hierva.
5. Dejar la muestra de tres a cinco minutos a temperatura ambiente.
6. Observar al microscopio (x100 y x400).

Nota: esta preparación para examen en fresco se efectúa sobre todo con muestras cutáneas y de faneras, por lo que, en ocasiones, es necesario repetir los pasos 4, 5 y 6 hasta que se aprecie la disolución completa de la muestra. La potasa disgrega la muestra y digiere los restos celulares sin afectar a las estructuras fúngicas, que pueden visualizarse con mayor facilidad.

¹ La adición de DMSO permite el examen directo sin que sea necesario el calentamiento. Se prepara añadiendo 20 g de KOH, 40 ml de DMSO y 60 ml de agua destilada (por este orden).

Protocolo técnico 5.3. Observación del LCR con tinta china

Técnica

1. Centrifugar la muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) a 3.000 rpm durante 10 minutos.
2. Separar el sobrenadante y guardarlo para detección de antígeno.
3. Depositar una gota del sedimento sobre un portaobjetos.
4. Añadir una gota de tinta china y mezclar con el asa.
5. Cubrir con un cubreobjetos.

Observar al microscopio (x100 y x400).

Interpretación

La cápsula se evidencia sobre el fondo negro de la preparación como un halo claro, bien delimitado, alrededor de levaduras redondas característicamente refringentes. El diámetro total de la levadura y la cápsula puede oscilar entre 10 y 20 μm , o incluso más. La presencia de cápsula permite identificar a *Cryptococcus neoformans*.

Nota: para evitar la confusión del hongo con los hematíes, éstos pueden lisarse mezclando en el porta el sedimento de LCR con KOH al 10% antes de añadir la tinta china.

Protocolo técnico 5.4. Examen microscópico a partir de colonias fúngicas

Colonias de hongos levaduriformes

Tienen aspecto cremoso semejante al de las colonias bacterianas.

1. Para examen microscópico, identificación y estudio de la sensibilidad manipular como si se tratara de una colonia bacteriana.

Colonias de hongos filamentosos

Tienen aspecto micelial característico:

1. Preparar un portaobjetos sobre el que se ha depositado una gota de azul de lactofenol.
2. Tomar el tubo conteniendo el hongo filamentosos.
3. Cortar con el asa micológica en el borde de la colonia un pequeño fragmento de la misma, efectuando dos cortes en cuña sin temor a incluir un pequeño fragmento de agar. Tomar el fragmento de colonia y del agar cortado y depositarlo en el azul de lactofenol del portaobjetos. Poner un cubreobjetos. Si se ha incluido agar, tomar el portaobjetos con unas pinzas y calentarlo muy suavemente al mechero para fundirlo. Ajustar el cubreobjetos apretando levemente con el mango del asa cuidando que no se rompa (toda la operación es muy delicada).
4. Observar con el microscopio (x100, x400).

Determinar las características generales del hongo: la anchura del micelio, su septación y la presencia de conidióforos y conidias.

Nota: preferentemente, puede practicarse el examen microscópico de las colonias de los hongos filamentosos tocando la superficie de la colonia con la cara adhesiva de un fragmento (1 x 1 cm) de cinta adhesiva transparente y montándolo sobre un portaobjetos en el que se ha depositado una gota de azul de lactofenol (Fig. 5.11).

Protocolo técnico 5.5. Filamentación en suero

Técnica

1. Tomar un tubo de 12 x 120 conteniendo 1-2 ml de suero humano o animal estéril.
2. Efectuar mediante un asa bacteriológica una suspensión ligeramente opalina de un cultivo joven de la levadura.
3. Incubar a 37 °C durante dos-cuatro horas.
4. Tomar una gota de la suspensión con una pipeta Pasteur y colocarla entre cubreobjetos y portaobjetos. Observar con el microscopio (x400) buscando la formación de verdaderos filamentos (tubos germinales) a partir de las levaduras, carácter que permite identificar a la especie *Candida albicans*.

Protocolo técnico 5.6. Formación de clamidosporas (morfología en medio PCB)

Técnica

1. Seleccionar una colonia de la levadura a estudiar y con el asa micológica sembrar ligeramente en profundidad, practicando una estría longitudinal que corte el medio de PCB (patata-zanahoria-bilis).
2. Incubar a 25-30 °C durante 72 horas.
3. Con el asa micológica, coger de las zonas crecidas un fragmento de agar y colocarlo entre cubreobjetos y portaobjetos. Calentar suavemente para fundir el agar si es necesario.

Observar con el microscopio (x100 y x400) buscando la presencia de pseudohifas, blastosporas y clamidosporas (Fig. 5.13).

Protocolo técnico 5.7. Fermentación de hidratos de carbono

Técnica

1. Efectuar con el asa bacteriológica, a partir de una colonia de levadura, una suspensión en agua destilada estéril (no superior a 1 McFarland).

(Protocolo técnico 5.7. continuación)

2. Inocular, con una pipeta Pasteur estéril, dos-tres gotas de la suspensión en cada uno de los tubos con las diferentes soluciones de azúcares (glucosa, maltosa, sacarosa, galactosa).
3. Incubar en la estufa a 25-30 °C durante 10 días.

Interpretación

La fermentación de los azúcares se detecta por la acumulación de gas en los tubos con campana de Durham (Fig. 5.17). Para interpretar los resultados, consultar la tabla 5.3.

Para la formulación del medio y los azúcares, véase cap. 5: Medios de cultivo.

Protocolo técnico 5.8. Auxonograma de carbono (asimilación de azúcares)

Técnica

1. Efectuar con el asa bacteriológica, a partir de una colonia de levadura, una suspensión opalina en agua destilada estéril.
2. Empapar en esta suspensión un escobillón, exprimiéndolo después por presión sobre las paredes del tubo para eliminar el exceso de líquido absorbido.
3. Frotar la superficie de la placa de 120 cm conteniendo el agar para auxonograma con el escobillón, en tres direcciones sucesivamente para sembrarla homogéneamente (como para un antibiograma) (Alternativamente 2 ml de una suspensión 4 McFarland, se añade al tubo conteniendo el agar para auxonograma fundido [~40 ml] y se vierte en una placa de Petri de 120 mm. Dejar solidificar).
4. Secar el exceso de humedad de la superficie inoculada, dejando la placa boca abajo con la tapa ligeramente abierta durante 10 minutos.
5. Depositar en la placa con las pinzas de forma equidistante seis discos impregnados con diferentes azúcares: glucosa, maltosa, sacarosa, galactosa, lactosa y rafinosa. Presionar suavemente con las pinzas para que contacten bien con la superficie del agar.
6. Dejar la placa 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la difusión de los azúcares.
7. Llevar la placa a la estufa a 30 °C. Incubar durante 24-48 horas.

Interpretación

Se observará crecimiento alrededor de los discos conteniendo los azúcares que la levadura es capaz de asimilar. Para interpretar los resultados, consultar la tabla 5.3.

Para la preparación del medio, véase Apéndice. Medios de cultivo.

Nota: existen sistemas comercializados para la identificación de levaduras que se fundamentan en esta misma técnica. Para su empleo deben seguirse estrictamente las indicaciones del fabricante.

Protocolo técnico 5.9. Microcultivo

Técnica

La técnica del microcultivo se ilustra en la figura 5.19.

1. Colocar en el fondo de una placa de Petri una varilla de vidrio en U o dos cartoncitos, para depositar sobre ellos un portaobjetos.
2. Tomar un portaobjetos estéril con pinzas flameadas y depositarlo sobre la varilla o los cartoncitos.
3. Cortar y tomar con el asa micológica una pieza (un cubo) de agar de 1 x 1 cm del medio de Sabouraud estéril contenido en una placa de Petri y depositarla sobre el portaobjetos, aproximadamente en el centro.
4. Tomar con el asa una pequeña porción del cultivo del hongo filamentoso a estudiar y depositarla en las caras laterales del cubo de agar.
5. Poner sobre el agar un cubreobjetos estéril.
6. Colocar en la placa de Petri un algodón o un papel absorbente humedecido, evitando contaminar el agar.
7. Poner la tapa de la placa de Petri y sellarla (esparadrapo, cinta adhesiva, etcétera).
8. Incubar a 28 °C, durante dos a cinco días o hasta que se observe crecimiento.

(Protocolo técnico 5.9. continuación)

9. Depositar en un portaobjetos una gota de azul de lactofenol. Tomar con pinzas el cubreobjetos y, con cuidado para no destruir las estructuras fúngicas, colocarlo sobre el azul de lactofenol en la misma posición en que estaba.
10. Observar al microscopio (x100, x400).

Nota: Scientific Device Laboratory Inc ha comercializado el sistema MycoEase® que facilita la realización del microcultivo.

CAPÍTULO 6

Protocolo técnico 6.1. Propagación de una línea celular

1. Tomar el frasco con las células a propagar (frasco madre de 275 ml).
2. Preparar los nuevos frascos a los que se va a efectuar el pase de las células. Es deseable utilizar frascos de plástico aptos para cultivo celular de una marca con garantía.
3. Preparar una botella con 30 ml de versene¹. Añadir al versene mediante pipeta estéril 3 ml de tripsina comercializada (viene a la dilución 1/250). Calcular el volumen de la mezcla de tripsina/versene en función del número de frascos a tripsinar (33 ml de mezcla/frasco de 275 ml o 75 cm²).
4. Poner la mezcla al baño María a 37 °C durante 10 minutos.
5. Vaciar, desechando el medio de mantenimiento del frasco con las células a propagar.
6. Introducir con precauciones estériles los 33 ml de la mezcla de versene y tripsina dentro del frasco madre.
7. Dejar reposar el frasco en posición horizontal de modo que las células queden bañadas por la mezcla durante uno a dos minutos. Durante ese tiempo, se observa al trasluz la aparición de alguna grieta en la monocapa que indique que empieza a desprenderse de la superficie.
8. Cuando esto empieza a ocurrir, rápido, pero suavemente, se vacía el contenido procurando que no se desprendan las células y dejando una mínima cantidad de la mezcla (1-2 ml).
9. Se agita el frasco manualmente para que las células se desprendan.
10. Se añaden 4 ml de medio de crecimiento (ver Cap. 6. Medios de cultivo) dejando que el líquido se deslice por las paredes para que arrastre las células que no se han desprendido.
11. Con una pipeta estéril de 10 ml, se aspira y expulsa el medio varias veces para desprender, disgregar y homogeneizar las células.
12. Dado que se considera que las células que existen en el frasco se triplicarán al cabo de unos cuatro días, se reparte el contenido del frasco en tres nuevos frascos del mismo tamaño a partes iguales.
13. Añadir estérilmente 30 ml de medio de crecimiento a cada uno de los tres nuevos frascos. Incubar a 37 °C, 18-24 horas en posición plana para que el medio bañe las células.
14. Cuando se ha formado una monocapa homogénea de células, se desecha el medio de crecimiento y se pone medio de mantenimiento.
15. Para preparar cultivos celulares en tubos de 16 x 100 mm, que son los tubos habitualmente utilizados para inocular las muestras clínicas, se procede de la misma manera, tratando con tripsina el frasco madre, pero después es preferible determinar el número de células/ml que hay en el frasco madre mediante recuento en una cámara de Neubauer (previa tinción con azul Trypan² para diluirlas en el volumen adecuado de medio de crecimiento, de modo que al repartir 1 ml por tubo se haya inoculado la cantidad deseada (en general alrededor de 75.000 células/tubo, aunque la cantidad recomendada depende del tipo de células).
16. Las placas o tubos después de la formación de la monocapa hasta su utilización pueden guardarse en estufa a 35-37 °C durante un tiempo que depende del tipo de células y de la finalidad para la que se hayan preparado.

Nota: las células pueden obtenerse por primera vez de suministro comercial o de colecciones.

¹ Versene: para su preparación se disolverán 0,2 g de EDTA, 0,2 de H₂K PO₄, 1,11 g de H₂Na₂PO₄, 0,2 g de KCl y 8 g de NaCl en 1.000 ml de agua destilada. Se ajustará el a pH 7,4. Repartir en frascos de 100 ml y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Guardar a 4 °C.

² Azul de trypan: se prepara disolviendo 0,1 g de azul Trypan en 50 ml de PBS (*Phosphate buffered saline*) comercializado por diversas compañías.

Protocolo técnico 6.2. Preparación de la muestra clínica

Muestras estériles: líquido cefalorraquídeo, pericárdico, amniótico y otros

Para la inoculación al cultivo celular:

- Las muestras estériles se inoculan directamente.
- Véase el protocolo técnico 6.3.
- En el caso de que se sospeche una encefalitis, se separa una alícuota de LCR (0,3 ml) para realizar una técnica de amplificación (PCR u otras).

Muestras respiratorias: moco nasofaríngeo y lavado broncoalveolar

Para la detección de antígeno por inmunofluorescencia:

- Homogeneizar bien la muestra en mixer añadiendo suero fisiológico si es necesario (muestras espesas) para dar la consistencia adecuada que permita la manipulación. Depositar con pipeta una gota (30-40 μ l) en el círculo de un portaobjetos adecuado para inmunofluorescencia. Debe depositarse la muestra en tantos círculos como antígenos quieran determinarse.
- Dejar secar 10-15 minutos. Comprobar que está seco.
- Fijar por inmersión en acetona¹ durante 10 minutos.
- Proceder según la técnica de inmunofluorescencia, que puede ser directa o indirecta (atender a las indicaciones del prospecto del reactivo).

Para la inoculación al cultivo celular:

- Añadir a la muestra la mezcla de antibióticos² en la proporción 1/10 (vol. mezcla/vol. muestra) y dejar en contacto durante 30 minutos a 4 °C (nevera).
- Véase el protocolo técnico 6.3.

Heces

Para la inoculación al cultivo celular:

- Diluir la muestra en PBS estéril, en tubo con bolas de vidrio de 3 mm de \varnothing en la siguiente proporción: PBS: 7 ml; heces: (el volumen de un guisante) 2 g; mezcla de antibióticos: 1 ml.
- Agitar con el mixer durante 30 segundos.
- Dejar la muestra 30 minutos a 4 °C de forma que los antibióticos actúen sobre las bacterias y hongos³. Centrifugar a 3.000 rpm durante 20 minutos.
- Recuperar el sobrenadante para inocular, descartando el sedimento.
- Véase el protocolo técnico 6.3.

¹ Conservar la acetona a -20 °C.

² Mezcla de antibióticos. Para un volumen final de 100 ml: penicilina 5 millones UI, estreptomycin 5.000 mg, gentamicina 250 mg, anfotericina 5 mg. Añadir 5 ml de Hepes y medio de mantenimiento MRC-5 hasta 100 ml. Ajustar el pH a 7. Alicuotar en tubos de rosca a razón de 5 ml por tubo y congelar a -20 °C.

³ Alternativamente se recomienda congelar a -30 °C la suspensión de heces en la mezcla de antibióticos durante 20 minutos.

Protocolo técnico 6.3. Inoculación e incubación de los cultivos celulares

De las muestras procesadas según las normas del Protocolo técnico 6.2 se repartirán con pipeta estéril a razón de 0,3 ml en cada uno de los tubos con las líneas de cultivo celular escogidas para ser inoculadas (Tabla 6.4). Previamente, es muy recomendable cambiar el medio de los tubos con medio de mantenimiento (el mismo volumen del medio desechado). El resto de la muestra se guarda en la nevera para su posterior congelación, si está indicada. Después de inocular la muestra, se dejan los tubos en la estufa a 35-37 °C durante tres horas en posición horizontal para favorecer al máximo el contacto de la muestra con la monocapa celular.

Unas horas después (tres-cinco horas), debe cambiarse el medio, descartando el que hay en el tubo y añadiendo 3 ml de medio de mantenimiento.

Colocar los tubos en el tambor giratorio o en gradillas. Incubar a 35-37 °C. Los tubos de MRC-5 y MDCK para aislamiento de virus respiratorios se incuban en la estufa a 33 °C.

Nota: si hay poco volumen de líquido cefalorraquídeo para todas las líneas, se inocula el tubo de MRC-5 y al día siguiente se tripsina, pero conservando el medio del tubo, inoculándolo junto con las células tripsinadas en cuatro tubos con MRC-5, A-549, Vero y RD respectivamente.

Protocolo técnico 6.4. Lectura de los tubos

Los tubos inoculados se leerán diariamente, observando las monocapas al microscopio invertido (x40) para detectar alguna alteración en el cultivo. En caso de que esto no sea posible, se leerán cada día durante la primera semana después de su inoculación y posteriormente se leerán cada dos días hasta completar el período de incubación.

En las líneas MDCK y RD, si a los siete días no se observa un efecto citopático, se efectuará un subcultivo en la propia línea que se mantiene siete días adicionales antes de descartar. Para el resto de las líneas, el período de incubación se recoge en la tabla 6.4.

Detección de la multiplicación de un virus

1. Mirar los tubos al microscopio invertido a x40 para observar:
 - a) La aparición de un efecto citopático que casi siempre es característico para cada virus.
 - b) La existencia de un posible efecto tóxico que dificulte la lectura o que pueda impedir la multiplicación del virus sospechado. En este caso, se elimina el efecto tóxico cambiando el medio repetidas veces (dos-tres). Observar a las 24 horas; en caso de que este efecto sea muy intenso o se mantenga, efectuar un pase a otro tubo. Si un cultivo celular de más de 24 horas está contaminado por hongos o bacterias, se puede sembrar el sobrenadante después de filtrar, siempre que el virus buscado sea un virus que no esté asociado a las células. Si el cultivo tiene menos tiempo de incubación, se podrá volver a tratar la muestra con doble concentración de antibiótico y volver a inocular.
2. Para la detección de la multiplicación del virus de la rubéola en células Vero debe realizarse a los 7-10 días un pase congelando y descongelando las células hasta tres veces.
La confirmación de la multiplicación vírica se realiza mediante inmunofluorescencia.

Identificación

Puede llevarse a cabo:

1. A partir de los tubos de rosca con un efecto citopático aproximado del 50-75%, por técnica de inmunofluorescencia (véase protocolo técnico 6.5.).
2. En el caso del citomegalovirus (HHV 5) por la detección precoz de la multiplicación vírica en cultivo por técnica de *shell-vial*.
3. Puede sembrarse en un tubo de Leighton y, cuando se observa un efecto citopático del 75%, se tiñe mediante la tinción de Harris-Shorr para observar el efecto citopático a través del cual podrá identificarse el virus.

Casos en los que la técnica de inmunofluorescencia no permite la identificación

1. Efectuar un subcultivo en un tubo Leighton con una monocapa de la misma línea celular en la que se ha detectado el efecto citopático hasta que afecte del 75 al 100% del cultivo celular.
2. Teñir el cubreobjetos siguiendo la técnica de coloración de Harris-Shorr modificada (ver más abajo).
3. Observar a x400 el tipo de efecto citopático.

La situación más frecuente en la que se requiere la realización de esta coloración es la identificación de los picornavirus.

Efecto citopático de los picornavirus tras la coloración de Harris-Shorr modificada: aparición de un gran «cuerpo de inclusión», ligeramente eosinofílico, en el citoplasma de la célula (lugar de replicación de los picornavirus) que desplaza y comprime el núcleo acantonándolo y adquiriendo éste un plegamiento considerable y un aspecto picnótico.

Ante un efecto citopático atípico, la técnica de sensibilidad al cloroformo es sencilla y permite diferenciar los virus con envoltura (sensibles) de los que carecen de ella (resistentes). Del sobrenadante de un cultivo crecido se hacen dos alícuotas de 1 ml; una estará en contacto con cloroformo durante cinco minutos en agitación, ya que los dos líquidos no son miscibles. Posteriormente se separa la fase acuosa dejándola unos minutos para que se evaporen las trazas de cloroformo. Finalmente se inocula un volumen, por ejemplo 0,250 ml, en el mismo tipo de cultivo donde creció. Se inocula el mismo volumen de la alícuota no manipulada que servirá de control. La multiplicación por igual de las dos alícuotas indicará resistencia al cloroformo (por ejemplo, adenovirus y enterovirus). La no multiplicación de la alícuota tratada con cloroformo y crecimiento del control corresponderá a una cepa sensible, con envoltura, perteneciente a la familia *Herpesviridae*, *Paramyxoviridae*, etcétera.

La presencia de rinovirus se puede sospechar por su replicación única en fibroblastos MRC-5 a 33 °C, con un efecto citopático similar al de los enterovirus, que se extienden más lentamente, y no resiste el pH3.

Protocolo técnico 6.5. Identificación por técnicas de inmunofluorescencia

La identificación de los virus que se han replicado en los cultivos celulares puede efectuarse por técnica de IF directa o indirecta. En este caso, se hace referencia a la técnica directa. Para desarrollar la prueba se recomienda seguir las instrucciones del fabricante de los reactivos utilizados.

El desarrollo de un protocolo sigue la secuencia que se indica a continuación:

1. Cuando la monocapa del tubo presenta un efecto citopático en aproximadamente el 75% de las células se rasca con una pipeta para conseguir la suspensión de las células en el medio.
2. Centrifugar el tubo a 3.000 rpm durante 10 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante con una pipeta.
4. Homogeneizar el sedimento con la misma pipeta.
5. Dispensar una gota (30 μ l) de la suspensión en un portaobjetos adecuado para inmunofluorescencia.
6. Dejar secar al aire (10-15 minutos).
7. Sumergir en una cubeta con acetona durante 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Dejar secar al aire durante 20 segundos. Controlar el secado.
9. Depositar 30 μ l del anticuerpo marcado en cada pocillo.
10. Incubar el porta a 37 °C durante 30 minutos en una cámara húmeda.
11. Eliminar el reactivo sobrante.
12. Lavar con PBS durante cinco minutos, dos veces sucesivas.
13. Pasar por agua destilada. Dejar secar al aire.
14. Poner líquido de montaje (glicerol tamponado a pH 7,8-8,5) y un cubreobjetos con cuidado de no dejar burbujas de aire.
15. Observar al microscopio de fluorescencia x400.

Nota: Incluir un control positivo y otro negativo. Sacar los reactivos de la nevera antes de su uso (~30 minutos) para que se atemperen. Homogeneizarlos antes de su uso con un movimiento rotatorio suave.

Protocolo técnico 6.6. Detección precoz de la multiplicación vírica (shell-vial)

El shell-vial consiste en un tubo de fondo plano en el que se ha depositado una laminilla redonda de 12 mm de diámetro en la que hay una monocapa de cultivo celular (Fig. 6.12).

Esta técnica se ha aplicado para el aislamiento de diversos virus, siendo especialmente recomendable para la detección de citomegalovirus en las muestras de lavado broncoalveolar, biopsias, médula ósea, orina de pacientes inmunodeprimidos y de neonatos con infección congénita (primeros 14 días de vida). También puede ser útil para muestras de sangre.

Inoculación de la muestra en el shell-vial

1. Disponer dos tubos (*shell-vial*) para cada muestra de la línea celular MRC-5 (fibroblastos de pulmón de embrión humano) (para HHV5) con la monocapa formada (no utilizar viales de más de siete días después de su preparación debido al envejecimiento de las células).
2. Extraer el medio de mantenimiento de los tubos con pipeta Pasteur de forma estéril cuidando no tocar la monocapa.
3. Inocular directamente 0,3 ml de la muestra a cada uno de los dos tubos. En el caso de la sangre se inoculará la muestra diluida a la mitad en medio de mantenimiento.
4. Centrifugar los tubos a 2.500 rpm, durante 40 minutos.
5. Después de la centrifugación, se añaden estérilmente 2 ml de medio de mantenimiento (a temperatura ambiente) a cada tubo. En el caso de la sangre y alguna muestra probablemente tóxica (moco, médula ósea), aspirar el inóculo, lavar con medio de mantenimiento y añadir 2 ml de medio de mantenimiento.
6. Incubar los tubos a 37 °C.
7. A las 16-24 horas, aspirar con pipeta el medio de uno de los viales inoculados con cuidado de no estropear la monocapa y lavar dos veces con 1 ml de PBS.
8. Extraer todo el PBS que se pueda (a fin de evitar la dilución del fijador, pero evitando tocar la monocapa) y añadir 1 ml de acetona (conservada en recipiente de vidrio a -20 °C). Dejar 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Aspirar la acetona con la pipeta y descartarla.

(Protocolo técnico 6.6. continuación)

10. Lavar con 1-2 ml de PBS, añadiendo el PBS al tubo agitando suavemente y eliminándolo.
11. Procesar inmediatamente. Si no es posible, conservar los viales a -20 °C hasta el momento de la tinción.

Nota: es importante que al descongelar las laminillas guardadas a -20 °C se laven con PBS durante cinco minutos.

Procesamiento de las laminillas para la identificación

Identificación: tinción por inmunofluorescencia

1. Después de lavar con PBS, con unas pinzas trasladar las laminillas de los tubos a los pocillos de una placa de vidrio (ya preparada al efecto) asegurando que durante todo el proceso la superficie con la monocapa quede en la parte superior.
2. Añadir 30 µl del anticuerpo monoclonal específico (diluido previamente según indicación del fabricante para el lote) asegurándose de que se extiende por la totalidad de la laminilla (véase el capítulo 8). Comprobar también que ésta no quede flotando sobre el reactivo. En este caso presionar la laminilla ligeramente hacia abajo con una pipeta Pasteur.
3. Incubar en la estufa de 37 °C durante 30 minutos en cámara húmeda. Aspirar el reactivo y lavar cada laminilla con agua destilada (durante cinco minutos). Después del segundo lavado aspirar con cuidado. Trasladar las laminillas a un nuevo pocillo de la placa de vidrio.
4. Añadir 30 µl del conjugado de fluoresceína (diluido al 1:20 en azul de Evans) asegurándose de que la laminilla está totalmente cubierto o que no flota sobre el reactivo. El azul de Evans se diluye previamente al 0,02% en agua destilada.
5. Incubar a 37 °C en cámara húmeda durante 30 minutos.
6. Aspirar el reactivo y lavar dos veces como en el paso 5 y una tercera con agua destilada durante cinco minutos más.
7. Aspirar con pipeta Pasteur el agua destilada con cuidado de no dañar la monocapa.
8. Montar el cubreobjetos sobre un portaobjetos de la siguiente manera:
 - Colocar una gota de líquido de montaje (glicerina tamponada) sobre un portaobjetos.
 - Colocar el cubreobjetos de modo que el lado que contiene las células contacte con la glicerina del porta.
 - Presionar ligeramente con tal de asegurar el contacto del cubre con el portaobjetos.
9. Leer inmediatamente. En caso contrario, conservar en la oscuridad a 2-8 °C y leer en 24 horas.
10. Después de la lectura conservar los portaobjetos positivos y negativos verticalmente dentro de una caja cerrada a -70 °C colocando un papel de filtro con tal de absorber restos de glicerina, en espera del resultado del cultivo celular. Los cubreobjetos negativos para IFI se descartan posteriormente si el cultivo es negativo.

Tinción de Harris-Shorr modificada

1. Vaciar el medio contenido en el tubo Leighton.
2. Lavar tres veces la laminilla en el propio tubo con suero fisiológico (no hace falta que sea estéril), evitando que se mueva de su lugar.
3. Poner fijador de Bouin¹ hasta que cubra la preparación.
4. Se deja en contacto una hora y 30 minutos.
5. Sacar la laminilla del tubo para teñir. Si no se puede teñir de inmediato, se vacía el fijador de Bouin¹ y se añade al tubo alcohol de 70° hasta que se pueda iniciar la tinción.
6. Se pasa la laminilla consecutivamente por una serie de recipientes, para ello se toma la laminilla con unas pinzas y se deja varios segundos en cada recipiente:
 - Alcohol 70°.
 - Alcohol 50°.
 - Agua del grifo (enjuagar bien).
 - Hematoxilina de Harris seis-ocho segundos (filtrarla cada vez que se utiliza).
 - Agua destilada (enjuagar bien renovando el agua una vez).
 - Alcohol amoniacal² un minuto.

¹ Preparar con 199 ml de una solución acuosa de ácido pícrico filtrado al 1,4%, 63,3 ml de formol al 40%, y 12,7 ml de ácido acético glacial. Conservar a temperatura ambiente.

² Alcohol amoniacal: 97 ml alcohol 70% y 3 ml de amoníaco.

(Protocolo técnico 6.6. continuación)

- Agua del grifo entre 30 segundos y un minuto.
 - Eritrosina (pH 6,2) un minuto.
 - Agua destilada.
7. Deshidratación:
- Alcohol 70°.
 - Alcohol 80°.
 - Alcohol 95°.
 - Alcohol absoluto.
 - Tolueno.
8. Dejar secar completamente y montar sobre un portaobjetos con DPX, con la monocapa teñida en contacto con DPX.
9. Observar al microscopio (x400).

CAPÍTULO 7

Protocolo técnico 7.1. Examen en fresco. Fijación de las heces: MIF, formol

EXAMEN EN FRESCO. FIJACIÓN DE LAS HECEs: MIF, FORMOL

Examen en fresco

Para observar las heces en fresco se pone una gota de suero fisiológico en un portaobjetos a la que se añade una mínima cantidad de heces con el asa bacteriológica, que se homogenizan en la gota de líquido.

Cuando las heces no pueden observarse inmediatamente (< 2 horas) deben fijarse para preservar la morfología de los parásitos. Los fijadores más utilizados son el MIF y el formol al 10%.

Fijación de MIF¹

El reactivo de MIF se prepara a partir de una solución de mertiolato y formol (MF), y otra de yodo (I). Ambas soluciones, una vez preparadas, se conservan en frascos individuales a temperatura ambiente. La solución madre de yodo debe conservarse al abrigo de la luz (en un frasco topacio).

Técnica

1. Añadir 0,30 ml de solución de yodo (I) a un frasquito de aproximadamente 2-3 cm de diámetro por 5 cm de alto con tapón hermético que contenga 4,7 ml de la solución MF.
2. Tomar, mediante una espátula que quepa a través de la boca del frasquito, una porción de heces equivalente a un garbanzo e introducirla en el frasco donde se ha realizado la mezcla anterior (MIF).
3. Con la misma espátula, se homogeneizan las heces en el líquido fijador hasta obtener una suspensión lo más perfecta posible. Tras tapar el frasco, se agita con suavidad para facilitar una buena suspensión de las heces. El frasco queda en reposo media hora como mínimo.
4. Con una pipeta Pasteur, tomamos una pequeña porción de la parte superior del sedimento formado y lo observamos al microscopio entre porta y cubre (x100, x400). A partir de las heces fijadas se puede realizar la concentración de las heces mediante la técnica de Blagg (MIF concentración) (ver *Protocolo técnico 7.4*).

Formol

Técnica

1. Tomar mediante una espátula una pequeña porción de heces equivalente a un garbanzo e introducirla en un frasco que contenga unos 5 ml de una solución acuosa de formol al 10% (V/V).

¹ Preparar el MIF y conservarlo a temperatura ambiente en dos frascos por separado: uno que contenga la solución MF y otro la solución I (pueden comprarse preparadas).

Solución MF: glicerina 5 ml, formol al 10% 25 ml; tintura de mertiolato, n.º 99 al 1% Lilly, 200 ml y agua destilada 250 ml.

Solución I: yodo 5 g; yoduro potásico 10 g; agua destilada 100 ml.

Si la tintura de mertiolato no puede conseguirse comercial, se debe formular: timerosal 1g, cosina 4g, alcohol 90 ° 525 ml, acetona 100 ml, etanolamina 1ml y agua destilada hasta 1l.

(Protocolo técnico 7.1. continuación)

2. Con la misma espátula, mezclar las heces en el formol hasta obtener una suspensión lo más homogénea posible. Dejar el frasco con las heces fijadas media hora como mínimo. A partir de las heces fijadas se pueden realizar técnicas de concentración, como la de Ritchie (ver protocolo técnico 7.3), y tinciones permanentes, como la de Ziehl-Neelsen (ver *Protocolo técnico 7.5*).

Protocolo técnico 7.2. Técnica de concentración de Kato

Técnica

1. Extender en un portaobjetos con una pequeña espátula de madera, un volumen importante de heces equivalente a unos 40-50 mg (como un guisante) sobre una superficie aproximada de 3x2 cm.
2. Cubrir el frotis con un rectángulo de papel de celofán (3x2 cm) húmedo, que haya estado previamente embebido en una solución de glicerina-verde de malaquita¹ durante un mínimo de 24 horas.
3. Presionar sobre el celofán que cubre el frotis de heces, con un papel de filtro para favorecer la extensión de las heces y eliminar el exceso de líquido. El celofán hace las veces de cubreobjetos.
4. Dejar la preparación bajo la acción del calor ligero producido por una lámpara durante unos 10 minutos. Si el frotis está poco clarificado, se puede prolongar el tiempo de calentamiento a 20 minutos.
5. Observar en el microscopio (x100 y x400).

Nota: esta técnica es muy apropiada para la visualización de huevos de helmintos; pero no puede practicarse con heces líquidas, debiéndose recurrir a otras técnicas de concentración, como la de Ritchie (protocolo técnico 7.3).

¹ Glicerina-verde de malaquita: glicerina anhidra 100 ml, agua destilada 100 ml y solución acuosa de verde de malaquita al 3% 1 ml.

Protocolo técnico 7.3. Técnica de concentración de Ritchie

Técnica

Puede utilizarse tanto heces frescas como fijadas previamente en formol al 10% (V/V), tal como se ha indicado en el protocolo técnico 7.1.

1. Si las heces son frescas, añadir un volumen equivalente a un garbanzo en un frasco que contenga unos 5 ml de formol al 10% (ver el protocolo 7.1).
2. Filtrar las heces fijadas con formol bien homogeneizadas a través de cuatro dobleces de gasa colocadas en un embudo o mediante un colador de malla fina. Recoger la suspensión filtrada en un tubo de centrifuga.
3. Añadir 5 ml de alcohol tamponado a pH 7 y agitar.
4. Añadir a la suspensión un volumen igual de éter etílico y emulsionar por agitación vigorosa.
5. Centrifugar 5 minutos a 1.500-2.000 r.p.m. Decantar el sobrenadante.
6. Coger una gota del sedimento y observarlo al microscopio entre porta y cubreobjetos (x100, x400).

En la actualidad existen en el mercado sistemas que permiten realizar la técnica de concentración evitando al máximo la manipulación durante el proceso, como el Mini Parasep[®] Faecal Pasite, Concentrator, Intersep.

Protocolo técnico 7.4. Técnica de Blagg o MIF concentración

Técnica

Se utiliza en heces fijadas previamente en MIF, tal como se ha indicado en el protocolo técnico 7.1.

1. Filtrar las heces fijadas con MIF bien homogeneizadas a través de cuatro dobleces de gasa colocadas en un embudo o mediante un colador de malla fina. Recoger la suspensión filtrada en un tubo de centrifuga.
2. Añadir a la suspensión un volumen igual de éter sulfúrico y emulsionar por agitación vigorosa.
3. Centrifugar 5 minutos a 1.500-2.000 r.p.m. Decantar el sobrenadante.
4. Coger una gota del sedimento y observarlo al microscopio entre porta y cubreobjetos (x100, x400).

En la actualidad existen en el mercado sistemas que permiten realizar la técnica de concentración evitando al máximo la manipulación durante el proceso, como el Mini Parasep[®] Faecal Pasite, Concentrator, Intersep.

Protocolo técnico 7.5. Tinción de Ziehl-Neelsen modificada (coloración en frío)

(Para estudio de *Cryptosporidium* y otros coccidios, como *Cyclospora*, *Isospora* y *Sarcocystis*)

Técnica

Preferentemente, debe realizarse a partir de heces concentradas por la técnica de formol-éter (Ritchie) (ver Protocolo técnico 7.3).

1. Extender en un portaobjetos una gota del sedimento de las heces concentradas (Ritchie) y dejar secar.
2. Bañar el frotis con metanol absoluto durante 5-10 minutos. Decantar, dejar evaporar y secar a temperatura ambiente.
3. Cubrir el portaobjetos con carbolfucsina fenicada¹ durante 5-10 minutos.
4. Decantar el colorante y lavar de 3 a 5 segundos con etanol al 50% (V/V).
5. Lavar suavemente con agua corriente.
6. Decolorar con ácido sulfúrico al 1% (V/V) cubriendo el portaobjetos durante 30 segundos o hasta que la preparación no pierda color.
7. Decantar el ácido sulfúrico y lavar con agua corriente.
8. Cubrir el portaobjetos con una solución alcohólica de verde malaquita al 5% (V/V) durante 2 minutos.
9. Decantar el colorante y lavar con agua corriente. Secar con cuidado con papel de filtro.
10. Observar la extensión al microscopio con el objetivo de inmersión (x1.000).

Existe una variante con calentamiento de la carbolfucsina que sigue el mismo protocolo, variando sólo en los puntos 3, 4 y 6:

3. Cubrir el portaobjetos con carbolfucsina fenicada durante 20 minutos. Durante este tiempo, calentar tres veces hasta emisión de vapor.
4. Decantar el colorante y lavar con agua corriente.
6. Decolorar con ácido sulfúrico al 7% (V/V) cubriendo el portaobjetos durante 60 segundos.

¹ Carbolfucsina fenicada:

Solución A: 4 g de fucsina básica en 20 ml de etanol al 95% (V/V).

Solución B: 8 g de cristales de fenol en 100 ml de agua destilada. Mezclar la solución A con la B. Conservarla a temperatura ambiente. La mezcla es estable durante 1 año.

Protocolo técnico 7.6. Preparación de un frotis sanguíneo

Obtención de la sangre

La sangre puede obtenerse por punción venosa con una jeringa y se deposita una pequeña gota en un portaobjetos. La sangre depositada no ha de ser excesiva para obtener una buena extensión.

Si no se puede disponer de sangre fresca, puede utilizarse sangre con EDTA, siempre y cuando se proceda a realizar el frotis antes de la primera hora después de su obtención. Transcurrido este tiempo, la morfología del parásito puede alterarse.

Procedimiento

Depositar una gota de sangre en el extremo derecho del portaobjetos. Coger otro porta que se coloca formando un ángulo de 30-45° a la izquierda de la gota. Desplazar el porta inclinado hacia la derecha hasta tocar la gota, de modo que la sangre se extienda a lo largo de la línea de contacto de ambos portaobjetos, y deslizar el portaobjetos suavemente hacia la izquierda para que se forme una fina capa de sangre con el fin de conseguir que las células se dispongan en monocapa (Fig. 7. 31).

Secado

Dejar secar en posición horizontal a temperatura ambiente durante una hora como mínimo. Después puede procederse a la tinción (véase protocolos técnicos 7.8 y 7.9).

Protocolo técnico 7.7. Preparación de una gota gruesa

Obtención de la sangre

La sangre puede obtenerse por punción venosa y se deposita una gota en el portaobjetos.

Si no se puede disponer de sangre fresca, puede utilizarse sangre con EDTA siempre y cuando se proceda a realizar la gota gruesa antes de la primera hora después de su obtención. Transcurrido este tiempo, la morfología del parásito puede alterarse.

Procedimiento

Con la esquina de otro portaobjetos se realiza en la gota de sangre un movimiento de rotación suave y continuado, raspando ligeramente la superficie del portaobjetos hasta que se vea aparecer una red de fibrina que se arrastra fuera de la gota. Para lograr una desfibrinación correcta, habitualmente se debe rotar durante 3-5 minutos. La gota así extendida debe alcanzar un diámetro aproximado de 1,5 cm² (Fig. 7.33).

Secado

Dejar secar en posición horizontal, a temperatura ambiente, durante 12-24 horas, en una placa de Petri o cajita para resguardarla del polvo y de los insectos. No se debe acelerar el secado de la gota mediante calor porque se pueden fijar los hematíes e impedir su lisis, proceso necesario en este método antes de proceder a la tinción. Si la preparación no se ha dejado secar el tiempo suficiente, la gota puede despegarse durante el proceso de tinción. Este riesgo se incrementa si se ha empleado sangre obtenida con anticoagulante.

Después puede procederse a la tinción (véase Protocolos técnicos 7.8 y 7.9).

Protocolo técnico 7.8. Tinción de Giemsa

Frotis sanguíneo

1. Practicar la extensión (frotis sanguíneo) como se ha señalado en el *Protocolo técnico 7.6*.
2. Fijar el frotis cubriéndolo con alcohol metílico durante 5 minutos, decantar y dejar secar.
3. Preparar agua destilada neutra (pH 7-7,2) añadiendo dos gotas de agua del grifo a 1 ml de agua destilada en un tubo de ensayo. Se calienta a 37° C aproximadamente, frotando unos segundos el tubo entre las manos, y con una pipeta se le añade el colorante de Giemsa a razón de dos gotas por ml de agua procurando mezclar bien después de la adición de cada gota.
4. Cubrir el portaobjetos con el colorante, añadiéndolo con cuidado, y dejar actuar durante 20 minutos.
5. Decantar el colorante y lavar la preparación con agua del grifo con cuidado, dejando caer suavemente un chorro de agua sobre el portaobjetos.
6. Dejar secar la preparación en posición vertical y mirar al microscopio, primero con bajo aumento (x100, x400) y luego con el objetivo de inmersión (x1.000).

Gota gruesa

1. Practicar una gota gruesa, como se ha señalado en el Protocolo técnico 7.7. No fijar nunca la preparación.
2. Hemolizar los hematíes cubriendo todo el portaobjetos con agua destilada durante 5-10 minutos. Decantar con cuidado el agua destilada. No secar la preparación.
3. Preparar el colorante, como en el apartado 3 de frotis sanguíneo de este protocolo (ver arriba).
4. Cubrir el portaobjetos con el colorante, añadiéndolo con cuidado, y dejar actuar durante 20 minutos.
5. Decantar el colorante y lavar la preparación con agua con gran cuidado para evitar el desprendimiento de la preparación.
6. Dejar secar la preparación en posición vertical y mirar al microscopio, primero con bajo aumento (x100, x400) y luego con el objetivo de inmersión (x1.000).

Cuantificación de la parasitemia en el paludismo. Debe realizarse en un frotis sanguíneo, y en zonas de la extensión donde los hematíes no se superpongan.

Se cuenta el número de hematíes de un cuadrante imaginario del campo y se multiplica por cuatro para calcular el número de hematíes por campo (Hc). Se cuentan los hematíes parasitados en diez campos (Hp). Se calcula el tanto por ciento de parasitación mediante la siguiente fórmula: porcentaje de parasitación = $H_p \times 10/H_c$.

Protocolo técnico 7.9. Tinción con Diff-Quik®

Frotis sanguíneo

1. Practicar la extensión (frotis sanguíneo) como se ha señalado en el protocolo técnico 7.6.
2. Fijar el frotis sumergiéndolo en la solución fijadora del kit (metanol) durante 1 minuto.
3. Decantar con cuidado la solución fijadora. Dejar escurrir durante unos segundos.
4. Bañar el portaobjetos con la solución I (colorante rojo: eosina G) durante 30 segundos. Dejar escurrir bien durante unos segundos.
5. Bañar el portaobjetos con la solución II (colorante azul: tiazina) durante un minuto. Dejar escurrir bien durante unos segundos.
6. Lavar suavemente la preparación con agua del grifo, dejando caer suavemente un chorro de agua sobre el portaobjetos.
7. Dejar secar la preparación en posición vertical y mirar al microscopio, primero con bajos aumentos (x100, x400) y luego con el objetivo de inmersión (x1.000).

Gota gruesa

1. Practicar una gota gruesa, como se ha señalado en el protocolo técnico 7.7.
2. Cubrir el portaobjetos con agua destilada durante 5 a 10 minutos para hemolizar los hematíes.
3. Decantar con cuidado el agua destilada. No secar la preparación. Dejar escurrir durante unos segundos.
4. Proceder como se señala en los apartados 4 al 7 de *Frotis sanguíneo*.

Nota: los reactivos de Diff-Quik®, soluciones I y II, están comercializados y listos para su uso (Dade Behring Inc. USA). El fijador puede ponerse en una cubeta de tinción.

Cuantificación de la parasitemia en el paludismo (ver el protocolo técnico 7.8).

CAPÍTULO 8

Nota importante:

Aunque en este apartado se describen técnicas que utilizan kits comercializados, en los laboratorios de diagnóstico clínico, para el desarrollo de estas pruebas, deben seguirse estrictamente los protocolos que los fabricantes describen en los prospectos que acompañan sus equipos de reactivos (kits).

Protocolo técnico 8.1. Detección de antígeno. Aglutinación indirecta (látex)

Se presenta como modelo la detección de antígeno de Cryptococcus neoformans en líquido cefalorraquídeo. Crypto-La Fumouze® (Laboratoires Fumouze).

Técnica

1. Centrifugar las muestras de LCR a 1.000 g durante 15 minutos. El sobrenadante debe ser transparente y se recogerá en tubo de vidrio con tapón.
2. Inactivar el sobrenadante al baño María a 56° C durante 30 minutos. En este momento pueden conservarse en nevera durante 24 horas. Si no se analiza en este intervalo de tiempo, se conservará a -20° C.
3. Reacción. Dispensar 50 µl de muestra en dos pocillos (superior e inferior) de la tarjeta de aglutinación. En el pocillo superior se dispensarán 50 µl de partículas de látex sensibilizados con globulinas de conejo anti-*Cryptococcus neoformans*, y en el pocillo inferior 50 µl de partículas de látex sensibilizadas con globulinas de conejo no inmune (este pocillo es el control de látex). Se mezclan bien con un bastoncillo. De la misma forma se procesan un control positivo y otro negativo suministrados en el kit. A continuación se coloca la tarjeta en un agitador rotatorio a 160 rpm durante 10 minutos.

Lectura

Una reacción positiva se manifiesta por una aglutinación de las partículas de látex en el pocillo de reacción, con ausencia de aglutinación en el pocillo control. Si en el pocillo control se detectara aglutinación, la reacción no puede valorarse.

Nota: Cuando se obtiene un resultado negativo en un paciente clínicamente sospechoso, puede tratarse la muestra con pronasa o ensayarse una dilución al 1/10 o 1/100 para evitar el fenómeno de prozona.

Protocolo técnico 8.2. Detección de antígeno. Inmunocromatografía

Nota previa: para el desarrollo de las técnicas de detección de antígeno, en particular en muestras de orina, en algunos casos se recomienda concentrar la muestra por filtración. Se seguirán las recomendaciones del fabricante.

Se presenta como modelo de inmunocromatografía la detección de antígeno de legionela en orina. Binax Now Legionella Urinary Antigen Test (Binax Inc).

Técnica

Pretratamiento de la muestra: hervir 10 ml de orina durante 5 minutos. Centrifugar a 1.000 g durante 15 minutos.

1. Concentrar la orina por filtración-centrifugación. (Amicon Ultra, Millipore Corp). Dispensar en el cono del tubo del filtro 4 ml de orina y centrifugar a 3.000 g durante 15 minutos.
2. Conservar a temperatura ambiente si la prueba va a realizarse antes de dos-tres horas, y en nevera si va a demorarse más tiempo (hasta 14 días).
3. Reacción. Se sumerge la torunda Binax, que incorpora el kit, en la orina concentrada cubriendo completamente la punta de la torunda.
4. Introducir la torunda en el agujero inferior del panel derecho (*insert swab*) hasta que se vea completamente por el agujero superior.
5. Poner dos gotas del reactivo A en el agujero inferior (el mismo por el que se ha introducido la torunda) y quitar la cobertura adhesiva del borde derecho del dispositivo. Cerrar las dos hojas y sellar bien.

Lectura

Leer los resultados en la ventana de lectura a los 15 minutos, únicamente si el control es correcto (Véase figura 8 6).

Protocolo técnico 8.3. Inmunofluorescencia indirecta

Como ejemplo de una prueba de IFI se presenta una detección de antígeno del virus de la gripe A por IFI en aspirado nasofaríngeo.

Anticuerpo monoclonal anti-virus de la gripe A: INFLUA MAB, Light Diagnostics®. Chemicon.

Conjugado: Anti-mouse IgG: FITC Conjugate, Light Diagnostics®. Chemicon.

Técnica

1. Tratamiento de la muestra. Si es muy espesa, se diluye a $1/2$ en PBS y se homogeneiza en vórtex. Depositar 30 μ l de la muestra procesada en un círculo-pocillo del portaobjetos. Dejar secar al aire.
2. Sumergir en una cubeta de tinción/lavado con acetona durante 10 minutos a temperatura ambiente. Dejar secar al aire.
3. Dispensar 30 μ l de anticuerpo monoclonal antiviral de la gripe A en el círculo-pocillo que tiene la muestra.
4. Incubar el portaobjetos a 37° C durante 30 minutos en cámara húmeda.
5. Lavar el portaobjetos en cubeta de tinción-lavado primero con PBS y después con agua destilada.
6. Dispensar 30 μ l del conjugado anti-IgG marcado con isotiocianato de fluoresceína en el círculo pocillo.
7. Incubar a 37° C durante 30 minutos en cámara húmeda.
8. Lavar el portaobjetos en cubeta de tinción-lavado primero con PBS y después con agua destilada.
9. Dispensar una gota de líquido de montaje y colocar un cubreobjetos.
10. Observar al microscopio de fluorescencia x400.

Nota importante: cada vez que se realiza una inmunofluorescencia, ha de incluirse un control positivo y uno negativo.

Antes de iniciar la técnica, los reactivos han de alcanzar la temperatura ambiente. Mover suavemente los reactivos con un movimiento circular suave para conseguir su homogeneización.

Protocolo técnico 8.4. Obtención de suero

Técnica

Trabajar siempre con guantes desechables

1. Colocar la banda elástica en el brazo por encima de la flexura del codo, elegir la vena a puncionar.
2. Limpiar la zona con alcohol isopropílico o etílico de 70 grados y dejar actuar durante 30 segundos.
3. Extraer mediante jeringa estéril 5-10 ml de sangre en adultos y 3-4 ml en niños. La extracción puede hacerse con sistemas tipo Safety-lok® (BD Diagnostic) si se dispone de tubos compatibles. Este sistema aporta mayor seguridad.
4. Introducir la sangre en un tubo limpio sin anticoagulante. Es muy recomendable utilizar tubos que aceleren la coagulación y la retracción del coágulo tipo Vacutainer SST II.
5. Desechar las agujas en un recipiente adecuado.
6. Dejar el tubo a temperatura ambiente en una gradilla durante 20-30 minutos para permitir que coagule.
7. Centrifugar durante 15 minutos a 1.000 g.
8. Decantar el suero a otro tubo limpio con cuidado de no transferir hematíes. Si no se procesa inmediatamente, guardar en nevera (máximo una semana); en caso contrario, congelar a -20°C .

Protocolo técnico 8.5. Aglutinación pasiva

La aglutinación pasiva se basa en la adsorción de antígenos no celulares, macromoléculas, a la superficie de hematíes o partículas de látex. Una de las pruebas más utilizadas que se muestra como modelo es la hemaglutinación pasiva de antígeno treponémico para el diagnóstico de la lúes. Syphagen TPHA (biokit SA).

Técnica cualitativa

Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente. Asegurarse de que el reactivo control (hematíes sin sensibilizar) y el reactivo antígeno (hematíes sensibilizados con el antígeno) estén bien resuspendidos.

Para cada test se necesitan 4 pocillos, 2 de los cuales se utilizarán para la preparación de la dilución de la muestra.

1. Distribuir 25 μl de diluyente en el pocillo 1, 100 μl en el pocillo 2 y 25 μl en cada uno de los pocillos 3 y 4.
2. Añadir 25 μl de la muestra en el pocillo 1. Mezclar el contenido del pocillo 1 y transferir 25 μl al pocillo 2. Mezclar y transferir 25 μl del pocillo 2 al pocillo 3, mezclar y desechar 25 μl del pocillo 3. Transferir otros 25 μl del pocillo 2 al pocillo 4, mezclar y desechar 25 μl del pocillo 4.
3. Añadir 75 μl de reactivo control al pocillo 3 y 75 μl de reactivo antígeno al pocillo 4.
4. Mezclar el contenido de los pocillos dando ligeros golpes en los lados de la placa o utilizar un agitador de placas durante al menos 30 segundos.
5. Cubrir la placa e incubar durante 45-60 minutos a temperatura ambiente. Evitar cualquier movimiento de la placa y mantener lejos de cualquier fuente de calor.
6. Incluir los controles positivo y negativo en cada serie de muestras teniendo en cuenta que los controles ya están prediluidos al 1/20. Añadir 25 μl de cada control directamente en los pocillos 3 y 4. No añadir solución diluyente.

Lectura de resultados

El resultado negativo se presenta como un botón de hematíes con una pequeña abertura central o totalmente compacto. Los resultados positivos se valoran de 1 a 4 cruces. Conforme aumenta la positividad, la abertura del botón se va haciendo mayor y aparece un tapiz cubriendo el fondo tanto mayor cuanto mayor sea la reacción positiva, hasta cubrir totalmente el fondo del pocillo.

Nota: Este reactivo puede utilizarse con suero y con plasma y permite titular los sueros positivos.

Protocolo técnico 8.6. Detección de IgM por ELISA de captura

La descripción técnica que se presenta sólo tiene valor de ejemplo. Existen comercializados diversos reactivos de diferentes compañías para detectar la IgM frente a diversos microorganismos por técnica de ELISA, y para cada uno de ellos el protocolo de trabajo debe ajustarse estrictamente a las instrucciones del fabricante. En este protocolo se va a describir la técnica bioelisa RUBELLA IgM (immunocaptura) (biokit SA).

(Protocolo técnico 8.6. continuación)

Técnica

1. Utilizar solamente el número de tiras necesario para el test. Reservar ocho pocillos para blanco y controles. Usar dos pocillos para probar los controles negativo y positivo alto y tres pocillos para el control positivo bajo. Pipetear 100 μ l de cada muestra diluida y de cada control en los pocillos correspondientes. Dejar vacío un pocillo para el blanco de sustrato.
2. Cubrir la microplaca con una lámina adhesiva e incubar durante 1 hora a 37° C.
3. Desechar la lámina adhesiva. Aspirar el contenido de los pocillos y llenarlos completamente (aproximadamente 350 μ l) con solución de lavado diluida. Repetir el proceso de aspiración y lavado tres veces más. Asegurarse de que cada columna de pocillos esté en remojo al menos 15 segundos antes del nuevo ciclo de aspiración. Después del último lavado, golpear la placa invertida sobre un papel absorbente para eliminar cualquier exceso de líquido en los pocillos.
4. Transferir 100 μ l de conjugado a cada pocillo a excepción del destinado al blanco de sustrato. Evitar la formación de burbujas.
5. Cubrir la placa con una lámina adhesiva e incubar durante 1 hora a 37° C.
6. Durante los últimos 5-10 minutos de esta incubación, preparar la solución de sustrato cromógeno. Para una placa añadir 280 μ l de la solución de cromógeno TMB a un vial de tampón sustrato (14 ml) y mezclar bien. La solución final debe ser incolora; descartar en caso de que se vuelva azul.

El TMB está disuelto en DMSO. Dado que la temperatura de fusión del DMSO es de 18° C, el cromógeno debe alcanzar una temperatura de 20-25° C y agitarse bien antes de usarlo. Es normal que el cromógeno presente un color amarillento.

7. Desechar la lámina adhesiva. Aspirar y lavar la placa como en el paso 3.
8. Añadir 100 μ l de sustrato TMB a todos los pocillos, incluso el blanco.
9. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-25° C).
10. Añadir 100 μ l de solución de parada a cada pocillo, guardando la misma secuencia y con los mismos intervalos observados en la adición del sustrato TMB.
11. Ajustar el cero del lector con el pocillo del blanco a 450 nm y leer la absorbancia de cada uno de los pocillos en el plazo máximo de 30 minutos. Se recomienda hacer lectura bicromática utilizando filtro de referencia de 620-630 nm.

Protocolo técnico 8.7. Detección de anticuerpos anti-HIV I/II. Western blot

Se muestra la técnica de Western blot como ejemplo de las pruebas que detectan anticuerpos frente a diferentes antígenos microbianos o víricos. Como ejemplo, se describe la técnica *bioblot HIV-1 plus* (biokit SA).

Precauciones analíticas

- Seguir estrictamente el procedimiento descrito a continuación.
- No utilizar reactivos de lotes diferentes.
- Trabajar asépticamente al abrir los reactivos y al extraer partes alícuotas de los viales originales.
- Los controles del kit deben analizarse al mismo tiempo que las muestras en cada serie de análisis. Para evitar la contaminación cruzada, usar una punta de pipeta nueva para cada alícuota de la muestra.
- Para obtener resultados óptimos, dispensar todos los reactivos mientras todavía estén fríos y volver a guardarlos a 2°-8° C lo antes posible.
- La solución de conjugado de trabajo, el tampón de lavado diluido y el tampón de *blotting* deben estar recién preparados.
- La solución de conjugado de trabajo debe prepararse en un recipiente de polipropileno.
- No exponer los reactivos ni realizar el análisis en un área cuyo nivel de vapores de desinfectantes químicos sea elevado; su contacto inhibe la reacción de color.
- En los ensayos de *Western-blot* es importante utilizar agitador con plato basculante. La velocidad de agitación y la inclinación del plato recomendado es de 12 a 16 ciclos por minuto y de 5 a 10 grados.
- Asegurarse de que al añadir las muestras no toquen la tira. Para ello, inclinar la bandeja y añadir la muestra en la parte baja donde se acumula el tampón.

Técnica

1. Utilizando unas pinzas, extraer con cuidado del tubo la cantidad de tiras necesaria y colocar cada tira en su pocillo con el número hacia arriba. Incluir tiras para los controles positivo fuerte, positivo débil y negativo.
2. Añadir 2 ml de solución de lavado diluida en cada pocillo.

(Protocolo técnico 8.7. continuación)

3. Incubar las tiras durante al menos 5 minutos a temperatura ambiente ($25 \pm 3^\circ \text{C}$) en un plato basculante. Extraer el tampón por aspiración.
4. Añadir 2 ml de tampón *blotting* de trabajo a cada pocillo.
5. Añadir 20 μl de suero de los pacientes o de controles en cada uno de los pocillos.
6. Cubrir la bandeja con la tapa suministrada e incubar 1 hora a temperatura ambiente en el plato basculante.
7. Destapar la bandeja con cuidado para evitar salpicaduras y la mezcla de las muestras. Inclinar la bandeja para aspirar la mezcla de los pocillos. Cambiar las puntas del aspirador entre muestras para evitar contaminación cruzada.
8. Lavar tres veces cada tira con 2 ml de solución de lavado diluida, dejando en remojo 5 minutos en el plato basculante entre los lavados.
9. Añadir 2 ml de solución de conjugado a cada pocillo.
10. Cubrir la bandeja con la tapa suministrada e incubar 1 hora a temperatura ambiente en el plato basculante.
11. Aspirar el conjugado de los pocillos y lavar como en el paso 8.
12. Añadir 2 ml de solución sustrato a cada pocillo.
13. Cubrir la bandeja e incubar 15 minutos en el plato basculante.
14. Aspirar el sustrato y aclarar las tiras un mínimo de tres veces con agua de calidad reactivo para detener la reacción.
15. Utilizando unas pinzas, colocar las tiras sobre papel de filtro y secar suavemente.
16. Colocar las tiras en una hoja de papel blanco no absorbente. Interpretar y calificar los resultados comparando con los controles y almacenar las tiras en la oscuridad.

CAPÍTULO 10

Protocolo técnico 10.1. Serotipado de Salmonella

Introducción

Existen más de 2.500 serotipos de salmonela. En un laboratorio de Microbiología clínica convencional es útil identificar los cuatro o cinco serotipos más frecuentes en su contexto. Los serotipos que comparten un antígeno somático forman grupos denominados por letras mayúsculas. Así, Typhimurium, Brandenburg y Paratyphi B pertenecen al grupo somático B por compartir el antígeno O:4; los serotipos Enteritidis y Typhi, del grupo D, comparten O:9; Infantis, Hadar y Virchow, al grupo C₁₋₃ (O: 6,7 -6,8 -8); London, Anatum y Give al grupo E₁₋₂₋₄ (O:3,10-3,15-3,19); Havana al grupo G₁₋₂ (O: 13,22-13,23), y el serotipo Paratyphi A, al grupo A (O: 1,2).

La gran mayoría de las salmonelas aisladas del hombre poseen un antígeno somático (O) cuyas aglutininas están contenidas en diversas mezclas de antisueros comercializados. Existe un polivalente para los grupos: A, B, D, E y L, y otro polivalente para los grupos: C, F, G y H. Toda salmonela que aglutine con una de estas mezclas se ha de aglutinar con cada uno de los antisueros específicos de grupo contenidos en la mezcla. Si se quiere llegar a nivel de serotipo, se aglutinará con los antisueros flagelares correspondientes, realizando una inversión de fases para conocer la otra fase flagelar, inicialmente no expresada (véase pie de Tabla 10.4).

Técnica

El serotipado de *Salmonella* se realiza determinando los antígenos O y las dos fases del H por técnica de aglutinación en porta:

1. *Preparación de las cepas.* Para la determinación del antígeno O se sembrará la cepa a estudiar en agar tripton de soja (TSA). Posteriormente, para determinar el antígeno H se utilizará un agar blando tipo Sven-Gard (caldo tripton de soja con 0,5% de agar), sembrando la cepa en el centro de una placa de 5 cm de diámetro. La incubación se realizará en los dos casos a 35-37 °C durante 18 horas.

(Protocolo técnico 10.1. continuación)

2. *Control de la cepa.* Antes de realizar la aglutinación, se controlará la posible rugosidad de la cepa. Para ello se pone en un porta una gota de solución hipersalina (2%) y se hace en ella una suspensión espesa de la cepa a estudiar. Si se observa aglutinación, la cepa es rugosa o autoaglutinable y no se proseguirá el estudio. Si por el contrario la suspensión es homogénea, se trata de una cepa lisa susceptible de ser estudiada.
3. *Determinación del antígeno O.* Se pone sobre un portaobjetos una gota de la mezcla de antisueros a estudiar (en nuestro medio se comenzará por la mezcla A, B, D E, L) y se hace en ella una suspensión de la bacteria con la ayuda del asa de siembra. Se mueve el porta de forma rotatoria y se observa la aparición de aglutinación en un tiempo que no supere un minuto. La observación de la reacción sobre un fondo negro favorece la lectura. En caso de aglutinación positiva, se aglutinará a continuación con los antisueños monovalentes contenidos en la mezcla (4; 9; 6,7, etc.). Si no aglutina con esta mezcla, se repetirá la aglutinación con la otra (C, F, G y H).
4. *Determinación de los antígenos H.* Se deposita en el porta una gota del antisuero H, correspondiente al serotipo más frecuente en el grupo O determinado (por ejemplo, si es O:4, el i; si es O:9, el d; etc., véase tabla 10.4) y se efectúa en él una suspensión de la cepa a estudiar, tomada de la periferia de la zona de crecimiento en la placa de agar blando (zona de máxima expresión flagelar). Al igual que en el caso anterior, se comenzará la aglutinación con antisueños polivalentes y después con los monovalentes del grupo detectado.
5. *Inversión de fases.* La mayoría de los serotipos de *Salmonella* poseen dos fases flagelares que no se expresan nunca a la vez (por ejemplo, Typhimurium primera fase: i; segunda fase: 1,2). Una vez identificada por aglutinación la primera fase (i, en el ejemplo), se siembra la cepa en el centro de una placa de agar blando a la que se ha incorporado una gota de suero contra la fase detectada (anti-i, en el ejemplo). Se incubará a 35-37 °C 18 horas. La fase flagelar detectada no se expresará por la presencia de anticuerpos en el agar. Si la salmonela tiene una segunda fase, se movilizará desde el centro de la placa de agar donde se ha sembrado hasta la periferia gracias a los flagelos con antígeno de segunda fase, pudiendo ponerse de manifiesto mediante aglutinación con antisueños específicos (anti-1,2, en el ejemplo). En ocasiones no es posible determinar el serotipo completo y debe remitirse la cepa a un centro de referencia.
6. *Antígeno capsular.* Algunos serotipos de *Salmonella*, como Typhi, presentan antígeno capsular Vi, que puede detectarse fácilmente por aglutinación con anti-Vi (antisuero monovalente) siguiendo la técnica para detectar el antígeno O. Cuando el Vi está presente, puede enmascarar el antígeno somático O, no observándose aglutinación con el anti O:9. Ante la presencia de un antígeno Vi, se ha de preparar una suspensión espesa de la cepa en suero fisiológico calentándola al baño María a 100 °C durante 10 minutos para posteriormente realizar la aglutinación del antígeno somático.

Protocolo técnico 10.2. ERIC-PCR de *E. coli*

Técnica de ERIC-PCR

Se detalla un protocolo estándar para la realización de la ERIC-PCR en *E. coli*. Este protocolo puede ser un punto de partida para, posteriormente, ajustar las condiciones a cada situación, que pueden variar en función del termociclador utilizado, los cebadores y la especie bacteriana objeto de estudio.

- *Extracción del DNA:* en un tubo Eppendorff se efectúa la suspensión de una o dos colonias de la cepa en 200 µl de agua destilada estéril y se hierve durante cinco minutos. A continuación, se centrifuga cinco minutos a 10.000 rpm y se toman de 2 a 4 µl del sobrenadante para la reacción de amplificación.
- *Preparación de la «master mix»:*
 - Se pueden utilizar reactivos comerciales preparados para la reacción.
 - Alternativamente, para preparar la «master mix» en el laboratorio, en la tabla se detalla la concentración estándar de la mayoría de los preparados comerciales, el volumen de cada uno de ellos, necesario para una reacción con un volumen final de 25 µl, y la concentración final que se obtiene. Todo ello puede modificarse y ajustarse en función de los cebadores y la Taq utilizados.

(Protocolo técnico 10.2. continuación)

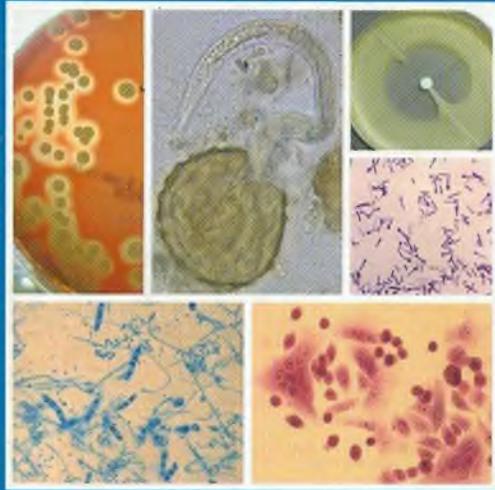
	Concentración <i>stock</i>	Volumen	Concentración de trabajo
Cebador ERIC 1	10 μmol	2,5 μl	1 μmol
Cebador ERIC 2	10 μmol	2,5 μl	1 μmol
DNTP	10 mmol	0,5 μl	0,2 mmol
Tampón	10 X	2,5 μl	1X
MgCl ₂	25 mmol	3 μl	3 mmol
Taq DNA polimerasa	5 U/ μl	0,25 μl	1,25U
DNA		2 μl	
H ₂ O bidestilada estéril		11,75 μl	
Volumen total		25 μl	

ERIC 1: 5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3'

ERIC 2: 5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'

- *Reacción de amplificación:* la amplificación se realizará en un termociclador convencional bajo las siguientes condiciones: cinco minutos de desnaturalización inicial y 35 ciclos de: un minuto a 95 °C, un minuto a 52 °C y tres minutos a 68 °C. Finalmente se realiza una extensión final de 10 minutos a 72 °C.
- *Visualización de la reacción:* se preparará un gel de agarosa al 2% conteniendo 0,2 mg/ml de bromuro de etidio y se visualizará bajo luz ultravioleta.
- La imagen obtenida se puede fotografiar y bien visualmente o bien con los diferentes programas de comparación de geles comercializados se realizará la interpretación de los resultados.

G. Prats



Microbiología Clínica

En el ámbito de la patología infecciosa se ha establecido una intensa relación entre la clínica y el laboratorio. Esta vinculación, tradicional en especialidades como medicina interna o pediatría, se ha extendido a otras en las que la infección es una patología emergente, como la medicina intensiva, la hematología, la cirugía y la epidemiología, de tal modo que hoy día imagina un buen clínico de especialidad médica o quirúrgica sin el apoyo de los recursos de que dispone para el diagnóstico así como las características de los recursos. De la misma manera, el microbiólogo necesita de los conocimientos clínicos que le permitan comprender el proceso infeccioso.

Desde esta perspectiva, «*Microbiología Clínica*» presenta un texto conciso, lo suficientemente riguroso y ordenado, para servir de marco de referencias conceptuales actualizado, en el que se describe la descripción de las modernas técnicas inmunológicas y la epidemiología molecular.

Dividido en tres partes (Concepto de Enfermedad Infecciosa, el laboratorio de microbiología clínica - Aplicación de esas técnicas) y de los principales síndromes y enfermedades infecciosas, su perfil, teórico y tecnológico, es un libro útil para facultades que trabajan en un laboratorio de microbiología clínica. La inclusión de una detallada de medidas de seguridad, recogida de muestras y de diversos protocolos técnicos, junto a numerosas tablas incluidas en el libro un texto útil para las prácticas de un curso de microbiología de las Facultades de Medicina, Farmacia y Ciencias, ha despertado su interés a los Centros de Formación Profesional que desean ofrecer un sólido fundamento teórico de su actividad.

ISBN: 84-7903-971-X



9 788479 039714

Prohibido maltratar el Código de barras (bajo sanción)



26304-71812-01

EDITORIAL MEDICA
panamericana