

TEMA 9.
TOMA DE MUESTRAS.
Marcelina Moreno Gómez.

1. NORMAS BÁSICAS PARA LA RECOGIDA Y TRANSPORTE DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS.

1. Las muestras deben obtenerse en el momento álgido de la enfermedad y antes de administrar tratamiento antimicrobiano.
2. En caso de existir antibioterapia, se suprimirá durante las 48-72 horas anteriores a la recogida.
3. Si es posible suprimir el tratamiento, se señalará en la petición analítica el fármaco administrado, la hora de la última medicación y la dosis. En estos casos, la muestra debe tomarse momentos antes de administrar la siguiente dosis.
4. Cada muestra tiene unas características especiales, por lo que se recogerá de la forma más conveniente: por emisión directa, mediante escobillonaje, punción, sondaje, etc.
5. La cantidad de muestra debe ser suficiente para realizar el análisis que se solicita.
6. Las muestras se dispondrán en recipientes estériles, utilizando el más recomendable para cada tipo de muestra.
7. Se evitará el contacto de las muestras con antisépticos o desinfectantes.
8. Aquellas muestras que por sus características especiales lo precisen deberán preservarse convenientemente en un medio de transporte (Stuart-Amies, Cary-Blair, tioglicolato), en especial cuando se quieran investigar anaerobios.
9. El envase que contenga la muestra debe rotularse con el nombre del enfermo y la identificación de la muestra.
10. Una vez recogidas, las muestras deberán enviarse rápidamente al laboratorio o conservarse en condiciones apropiadas: refrigeradas o en estufa, nunca a temperatura ambiente.

El laboratorio rechazará las muestras sin identificar o que acusen defectos en su recogida: con material infeccioso fuera del recipiente, con signos de deterioro, mal conservadas, esputos con gran contenido de saliva, escobillones no impregnados suficientemente, etc., ya que su análisis constituye una labor inútil y su manipulación puede suponer un riesgo de contagio.

2. ENVASES PARA LA RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS.

1. *Tubo estéril con tapón de rosca*: se utiliza para la recogida de líquidos biológicos y puntas de catéteres, principalmente. No es conveniente el uso de tubos de cristal, por el peligro de rotura, ni de tapones de presión, por la posibilidad de que se desprendan.

2. *Escobillón estéril*: utilizado para cultivos comunes que van a procesarse con rapidez: exudados, secreciones, heces, etc. Los hay de punta gruesa y fina, empleados estos últimos para muestras especiales (exudado ótico y uretral). Los escobillones son de alginato de calcio y dacrón, principalmente. Tienen el inconveniente de que la cantidad de muestra que toman es escasa.

3. *Escobillón estéril con medio de conservación*: su uso está indicado cuando el cultivo va a demorarse y, específicamente, para exudado uretral, vaginal y muestras que contienen microorganismos lábiles. Los medios de conservación más habituales son los de Stuart y Amies.

4. *Frasco estéril de boca ancha*: se emplea para casi todo tipo de muestras: orina, heces, esputo, puntas de catéteres, fragmentos de tejidos, etc. Deben ser irrompibles, de cierre hermético y, preferiblemente, transparentes.

5. *Jeringa estéril*: se utiliza para punción de cavidades cerradas, sondas y drenajes, en particular cuando se quieren investigar anaerobios.

6. *Frascos con medio de cultivo*: son apropiados para la realización del hemocultivo y, desde hace unos años, se utilizan a menudo para el cultivo directo de líquidos biológicos.

7. *Placa de Petri estéril*: no debe emplearse nunca, a no ser en el mismo laboratorio para la recogida de pelos, escamas y uñas. Deben precintarse tras la recogida de la muestra.

La finalidad de la toma de muestras es la determinación hematológica, bioquímica, microbiológica o inmunológica de los líquidos o fluidos corporales.

El proceso analítico consta de tres etapas:

- *Preanalítica*: en esta etapa se prepara al paciente y se realiza la recogida de muestras y su posterior almacenamiento y transporte.
- *Analítica*: es la realización de las mediciones a cargo del analista y los profesionales de laboratorio, hasta que se emite el informe.

- *Postanalítica*: el informe llega a manos del médico que prescribió la prueba, el cual lo evalúa para planificar el tratamiento.

La obtención, conservación y transporte de las muestras es tan importante como la realización del análisis. En primer lugar, y para evitar errores de identificación, la persona encargada de recoger la muestra (la enfermera) debe preguntar los datos personales al paciente y consignarlos en el recipiente y en la hoja de solicitud.

La obtención de las muestras se puede llevar a cabo en la propia habitación del paciente, en su domicilio o en el laboratorio.

Análisis de sangre.

El objetivo es el estudio de la sangre para el diagnóstico de enfermedades, bien sean de la misma sangre (anemias, leucemias) o de otros órganos (hepatopatías, diabetes).

En la realización de un análisis de sangre interviene un amplio grupo de profesionales: médicos analistas, personal de enfermería, técnicos especialistas de laboratorio y auxiliares.

— Recogida de muestras:

La recogida de sangre puede hacerse a partir de sangre arterial, venosa y capilar

Recursos materiales:

- Algodón y gasas.
- Alcohol o povidona yodada.
- Lanceta.
- Jeringas y agujas desechables (calibre 25x9), o agujas con doble terminación con tubos de vacío, que pueden tener distintos anticoagulantes.
- Tubos de recogida de sangre, con anticoagulante si se precisa.
- Capilares heparinizados.
- Portaobjetos de cristal.
- Esparadrapo.
- Guantes estériles.
- Contenedores de desecho de agujas.

— Protocolo de actuación:

Sangre capilar o periférica: se frota la zona con un algodón humedecido con alcohol. A continuación se efectuará la punción de una forma rápida: se desecha la primera gota de sangre y se recoge la segunda. Si queremos que la sangre fluya mejor, se puede calentar la zona con un masaje durante unos minutos.

Esta técnica es válida para la determinación de los tiempos de hemorragia y coagulación, las extensiones sanguíneas, y el cálculo de la hemoglobina y la fórmula leucocitaria.

Sangre venosa: lo primero que hay que hacer es acomodar al paciente tumbado en una camilla o sentado con el brazo apoyado y descubierto y sin peligro de que se caiga si se marea. Esta sangre se utiliza para la mayor parte de las pruebas analíticas sanguíneas.

Se emplean con preferencia las venas de la flexura del codo, aunque puede utilizarse cualquier otras de los brazos, manos y piernas.

Para realizar la punción se coloca un torniquete de goma por encima de la zona elegida, con el fin de aumentar la presión en la vena y facilitar su localización. Éste debe retirarse antes de sacar la aguja. La sangre se deposita en los tubos preparados y debidamente identificados.

Una vez extraída la aguja, se debe presionar la zona con un algodón, durante unos minutos, para evitar la formación de un hematoma.

Al terminar la extracción se recoge el equipo, se acomoda al paciente, se lavan las manos y se procede al envío de las muestras al laboratorio.

Hay multitud de análisis que pueden realizarse en la sangre. El básico es el hemograma o recuento de células sanguíneas. Otros estudios analíticos son las pruebas de coagulación y las pruebas bioquímicas (este grupo abarca la determinación de glucosa, las pruebas hepáticas, GOT, GTP, etc.) inmunológicas, genéticas y hormonales.

Hemocultivo: se realiza cuando el paciente tiene un pico febril. En esta prueba hay que tener en cuenta que el paciente no debe estar en tratamiento con antibióticos, ya que pueden alterar los resultados.

Análisis de orina.

Aporta una información clínica significativa en una gran variedad de procesos patológicos.

Aunque igual que en el resto de las pruebas, el equipo humano está integrado por diferentes profesionales.

El objetivo del análisis de orina es la detección de posibles enfermedades de carácter funcional o morfológico.

El análisis de orina básico que se realiza en una muestra de una micción generalmente la primera de la mañana, recoge los siguientes datos:

- Características generales: apariencia, densidad, pH.
- Determinaciones químicas: glucosuria, proteinuria, etc.
- Examen microscópico del sedimento centrifugado: células, cilindros, etc.

Otros tipos de análisis de orina son:

- Urinocultivo: para el estudio bacteriológico.
- Análisis cuantitativos, en los que se precisa la orina de 24 horas: para determinaciones bioquímicas.

— Recogida de muestras

La recogida de muestras se puede hacer en el domicilio, en el laboratorio, en el hospital y en la propia habitación del paciente.

- Recipientes secos y limpios, de boca ancha y etiquetados.
- Recipientes estériles, etiquetados.
- Gasas estériles.
- Cuña o botella para pacientes encamados.
- Bolsas de polietileno con márgenes adhesivos para la recogida en niños.
- Botella o frasco de recogida para 24 horas, etiquetado.
- Equipo de limpieza o pequeño aseo.
- Guantes desechables y estériles.
- Equipo para la recogida con un sondaje: antiséptico, gasas, jeringa y aguja, pinza de plástico y recipiente etiquetado.

— Protocolo de actuación:

- Recogida de orina al azar de una sola micción, para examen de rutina se recoge en un bote seco y limpio, a poder ser la primera orina de la mañana, ya que es la más concentrada. Si el estudio del sedimento es necesario, se le pedirá al paciente que antes de recoger la orina se lave la zona evitando para ello jabones bactericidas, para que la orina no se contamine por secreciones vaginales y perineales.
- Recogida de orina estéril para urocultivo: el paciente debe lavarse toda la zona próxima al meato uretral. La mujer separará los labios con una mano y con la otra se lavará con una gasa y jabón antiséptico haciendo sólo movimientos de arriba abajo (con cada gasa) hasta completar la limpieza. El varón retraerá el prepucio y con un jabón antiséptico limpiará el glande, desde el extremo distal al proximal, y luego se secará.

A continuación se recoge la muestra a mitad de la micción. Para ello se debe desechar el primero y el último chorro de orina. El recipiente donde se va a recoger debe estar estéril, así como un tapón y debe cerrarse inmediatamente después de su recogida y llevarse a continuación a laboratorio. Si se va a tardar cierto tiempo en hacerlo, debe guardarse en el frigorífico, procurando llevarlo lo antes posible y siempre antes de 12 horas.

En pacientes sondados la recogida se hace pinchando en la sonda, en la zona apropiada para ello, después de haberla desinfectado, y aspirando con una jeringa.

- Recogida de orina de 24 horas: hay análisis de orina cuantitativos en los que se precisa recoger la orina de 24 horas para la determinación de sustancias como la creatinina, las proteínas y las hormonas. Para ello es muy importante que el paciente siga las instrucciones precisas. Se le indicará que recoja la primera micción de la mañana, antes del desayuno, la deseche y a partir de ella recoja todas las micciones hasta la primera de la mañana del día siguiente incluida. Hay que medir la cantidad de orina total que se obtiene mezclando todas las micciones. Este dato y una muestra de la orina total, que se obtiene mezclando todas las micciones y recogiendo la muestra, se llevarán al laboratorio para su análisis. Todas las muestras deben guardarse en el frigorífico hasta completarlas. Se indicará al paciente que beba la menor cantidad de líquidos posible y que no ingiera alcohol ni fármacos durante las 24 horas.
- Recogida de orina en niños: se suele utilizar una bolsa desechable de polietileno con superficie adhesiva. Antes de aplicar la bolsa se limpiará y secará meticulosamente la zona próxima al meato uretral. Después se fija la parte adhesiva y se espera a que el niño orine para retirarla y enviarla al laboratorio en un frasco etiquetado.

Análisis de esputo.

Se realiza a partir de la recogida de esputos que procedan de las vías respiratorias bajas y no de la faringe o la saliva.

Su objetivo es analizar sus características macroscópicas (color, volumen, consistencia y olor) y microscópicas (estudio citológico y cultivo).

La muestra de esputo debe ser de la secreción traqueobronquial. Es aconsejable tomar la muestra a primera hora de la mañana, porque hay más secreciones, acumuladas durante la noche.

— Recursos materiales:

- Volante de laboratorio, frasco con tapón de rosca estéril, tira adhesiva para poder rotular, pañuelos desechables y guantes.
- Sistemas de aspiración y equipo de recogida para este sistema, para pacientes que no colaboren.

— Protocolo de actuación:

- Lavarse las manos y ponerse los guantes.
- Explicar al paciente lo que se va a hacer, resaltando la importancia de su colaboración.

- Lavarse la boca el paciente para evitar la contaminación de la muestra por los microorganismos de las vías altas.
- Colocar el frasco estéril abierto, directamente pegado a la boca del paciente. Pedirle que respire profundamente 2 ó 3 veces consecutivas y que en la última respiración tosa para liberar el esputo (teniendo en cuenta que no debe liberar saliva o secreciones nasales).
- Cerrar el frasco (para evitar posibles contaminaciones), rotular con la fecha y los datos del paciente.
- Acomodar al paciente y lavarle las manos para evitar contaminaciones.
- Recoger todo el equipo y ordenar la habitación.
- Lavarse las manos.
- Trasladar la muestra al laboratorio junto con el volante de petición. Si esto no se hace inmediatamente, se debe refrigerar la muestra.
- Registrar la técnica utilizada.
- En un paciente que no colabore, o que esté inconsciente se realizará la aspiración del esputo insertándolo en el sistema adecuado de recogida.

Análisis de heces.

Se puede llevar a cabo para determinar la presencia de parásitos y sangre, o para realizar un coprocultivo.

— Recursos materiales:

- Guantes.
- Equipo de aseo y limpieza.
- Cuña.
- Recipiente para recoger la muestra, con etiquetas autoadhesivas.
- Espátula de madera o depresor lingual (si el recipiente no tiene cucharilla incorporada).
- Hoja de solicitud para el laboratorio.

— Protocolo de actuación:

- Lavarse las manos y ponerse los guantes.
- Explicar al paciente lo que se va a hacer pidiendo su colaboración.
- Rellenar todos los datos del paciente en la tira adhesiva, que irá pegado sobre el recipiente de la muestra.
- Colocar la cuña para que defeque en ella (no debe orinar en el mismo recipiente).

- Cuando haya terminado, recoger la muestra de la cuña con el depresor (una o dos cucharadas), depositándola en el frasco rotulado o directamente con la cucharilla del frasco de muestra.
- Si la muestra es para hacer un cultivo, la toma debe hacerse en condiciones de máxima esterilidad, recogiénola con un escobillón y depositándola en un tubo de ensayo totalmente estéril, que se envía directamente al laboratorio para su análisis.
- Limpiar al paciente, dejándolo instalado cómodamente y retirar el material utilizado.
- Lavarse las manos.
- Registrar la técnica en la historia de enfermería.

Análisis del líquido seminal.

Se utiliza principalmente en el diagnóstico de infecundidad aunque también se hace en otros casos, como ante la sospecha de violación, o para comprobar la eficacia de la vasectomía.

Se determina la movilidad, la morfología, el volumen de eyaculado y el recuento de espermatozoides.

Para recoger la muestra para su estudio se recomienda que se haga después de 2 ó 3 días de abstinencia sexual.

El paciente puede recoger la muestra en su domicilio (por masturbación o coito interrumpido) o en el laboratorio (por masturbación). Se recomienda esto último, pues se evita el transporte hasta el laboratorio y que la muestra pueda sufrir cambios bruscos de temperatura que podrían alterarla.

El semen se recoge en un frasco de vidrio de boca ancha limpio. Los preservativos no resultan adecuados para la recogida pues pueden contener sustancias químicas que alteren la actividad de los espermatozoides.

Otros.

Además de lo expuesto, pueden analizarse también en el laboratorio para evaluar sus características bioquímicas y microbiológicas, otros productos como:

- Jugo gástrico.
- Vómitos.
- Exudados de oído, ojo, fosas nasales, faringe, vagina, uretra, heridas. En este caso se utiliza un hisopo con que el que se recoge la muestra.

Existen otros estudios específicos, como:

- Estudios inmunológicos *in vivo*, como la prueba del parche y las pruebas de hipersensibilidad inmediata o retardada.

- Estudios inmunológicos in vitro, como el radioinmunoanálisis (RIA), la inmunoabsorción (ELISA) y la inmunofluorescencia.
- Citología: es el estudio de las células para determinar la existencia de patología como tumores, cambios hormonales. Se pueden realizar a partir de secreciones vaginales (muy frecuente), esputo, secreciones prostáticas, etc.

3. DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

Algunas enfermedades infecciosas están causadas por microorganismos difíciles de cultivar o no pueden ser diagnosticadas mediante cultivo por dificultades técnicas o porque se han administrado previamente antibióticos.

Los métodos de diagnóstico o serología de enfermedades infecciosas se basan en el hecho de que, cuando una persona es infectada por un microorganismo, se producirá una respuesta inmune específica (habitualmente, producción de anticuerpos específicos). Las técnicas serológicas están diseñadas para detectar o cuantificar esta respuesta inmune específica y así detectar e identificar el microorganismo infectante.

Las técnicas de diagnóstico serológico son aquellas que pretenden diagnosticar una enfermedad utilizando la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo. Lo más frecuente es que utilicemos un antígeno conocido para comprobar si el enfermo ha desarrollado una respuesta de anticuerpos específicos. Son las técnicas diagnósticas que se conocen, en su conjunto, como serología.

Las reacciones serológicas están siempre basadas en la detección de la formación de complejos antígeno-anticuerpo. El suero de un enfermo se hace reaccionar con antígenos conocidos (procedentes de los distintos microorganismos sospechosos de ser los causantes de la infección) y cualquier complejo antígeno-anticuerpo que se forme nos indicará que el enfermo ha estado en contacto previamente con ese agente infeccioso.

Existen múltiples técnicas para medir la presencia y cuantificar la producción de anticuerpos frente a un antígeno: son las llamadas técnicas serológicas. Entre las diversas técnicas serológicas (técnicas para detectar la presencia de complejos antígeno-anticuerpo), las más utilizadas son, probablemente: **aglutinación, inmunofluorescencia, enzoinmunoensayo (ELISA) y fijación del complemento (RFC)**. Los anticuerpos que pueden ponerse de manifiesto con las distintas pruebas serológicas reciben, a menudo, denominaciones específicas, según la reacción que producen.

La cantidad de anticuerpo existente en el suero suele expresarse por el título: es la más alta dilución del suero que da reacción positiva (p. ej., 1/16, 1/20, etc.).

La muestra más frecuentemente utilizada para la determinación de anticuerpos es la sangre (en ocasiones, se emplea líquido cefalorraquídeo u otros líquidos, como

líquido pleural o saliva). Habitualmente la sangre se deja coagular y se separa el suero.

Muchas veces se toman dos muestras de sangre separadas por varios días de intervalo (una durante la fase aguda de la infección y otra durante la fase de convalecencia) y se efectúa la determinación de anticuerpos en ambas muestras (sueros pareados). Si existe un incremento en el título de anticuerpos entre ambos sueros (seroconversión), es probable que el microorganismo frente al que se ha detectado seroconversión sea la causa de la infección. Habitualmente, para que se considere que se ha producido seroconversión se necesita que el título de anticuerpos aumente 4 ó más veces, desde 1/8 a 1/32.

Existen algunas desventajas en la utilización de las técnicas serológicas que miden anticuerpos totales (sobre todo IgG):

- a) Los anticuerpos pueden haber alcanzado su título máximo antes de la obtención de la muestra de suero, por lo que no se observará seroconversión.
- b) La IgG persiste durante largos períodos (muchos años) y su título puede fluctuar independientemente de que haya infección activa.
- c) La IgG atraviesa la placenta, pasa de la madre al feto y persiste en el recién nacido varios meses, por ello no es útil para diagnosticar infecciones en niños pequeños.

La IgM producida durante una infección primaria o durante una reactivación aumenta bruscamente, aparece de forma más precoz que la IgG y su persistencia en el suero está limitada a algunos meses. Por ello, la detección de IgM específica en el suero se considera casi siempre evidencia de infección activa.

Otra aplicación importante de la serología es la detección de anticuerpos cuando queremos comprobar el estado inmunitario de la persona frente a una posible infección. Así, podemos saber si existe riesgo para esa persona de contraer la infección: se estudia, por ejemplo, el estado inmunitario de las mujeres frente al virus de la rubéola para comprobar si han pasado la infección o serán susceptibles de padecerla durante un embarazo, con el consiguiente peligro para el feto.

Reacciones cruzadas.

Un problema que surge en las pruebas serológicas es que muchos microorganismos poseen antígenos idénticos (antígenos comunes) o de parecida estructura, sobre todo microorganismos de especies relacionadas. En muchas ocasiones, un agente infeccioso no sólo provoca la aparición de anticuerpos frente a él mismo, sino también frente a otros microorganismos con antígenos parecidos, y aparecen reacciones cruzadas. Estas reacciones cruzadas pueden dar lugar a diagnósticos erróneos: por ejemplo, un incremento del título de anticuerpos frente a fiebre tifoidea (*Salmonella typhi*) puede ser debido, simplemente, a contacto o infección con otra especie de *Salmonella*.

En otras ocasiones, se hace uso de las reacciones cruzadas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas de cuyo agente causal es difícil preparar antígenos adecuados para usarlos como reactivos: por ejemplo, diagnóstico de la rickettsiosis por aglutinación frente a determinadas cepas de *Proteus*, diagnóstico de la mononucleosis infecciosa por demostración de aglutininas frente a hemáties de carnero (anticuerpos heterófilos), pruebas no treponémicas en la sífilis, etc.

Esta comunidad de antígenos se producen a veces, entre microorganismos y determinadas proteínas del organismo, y puede dar lugar a fenómenos de autoinmunidad.

Técnicas de detección de antígeno.

En otras ocasiones, la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo se utiliza para detectar la presencia de antígeno de un determinado microorganismo.

El fundamento es inverso a la detección de anticuerpos específicos utilizada en serología. Para detectar antígeno, utilizamos como reactivo un suero (antisuero) en el que existe un anticuerpo conocido y estudiamos si se produce reacción con una muestra del enfermo (esputo, LCR, leucocitos, orina, etc.) en la que queremos estudiar si existe el microorganismo.

Estas técnicas de detección de antígeno pueden utilizar cualquier tipo de sistema de detección de la reacción antígeno-anticuerpo, como aglutinación (detección de antígeno de *Cryptococcus* en LCR), inmunofluorescencia (detección de *Legionella* y *Pneumocistis* en esputo) ELISA (detección de antígeno de hepatitis B o VIH en suero), etc.

Las técnicas de detección de antígeno se utilizan también para llegar a la identificación definitiva de microorganismos. Para ello se utilizan varios reactivos que contienen antisueros específicos para el microorganismo que queremos identificar y otros microorganismos parecidos (batería de antisueros), y comprobamos si reaccionan con el cultivo: en la identificación de *Salmonella*, por ejemplo, se usa una suspensión en solución salina del cultivo que hay que identificar; ésta se pone en contacto con los antisueros correspondientes y observamos si se produce aglutinación. Si el antisuero que se emplea como reactivo no es puro y además de los anticuerpos contra el antígeno que hay que determinar, contiene otros anticuerpos, estos anticuerpos pueden reaccionar con otros antígenos presentes en la muestra y se producen reacciones falsamente positivas (reacciones cruzadas).

Las técnicas de diagnóstico de antígeno pueden hacerse muy específicas (lo que evita reacciones falsamente positivas) si se utiliza como reactivo en antisuero muy puro, como son los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales tienen una especificidad muy alta y sólo reaccionan y detectan una clase de antígeno; cuando se usan como reactivos no se producen reacciones inespecíficas. El principal in-

conveniente de la utilización de los anticuerpos monoclonales como reactivo es su elevado precio.

3. Genética molecular en el diagnóstico de las infecciones. Técnicas de amplificación. PCR.

La aplicación de la biología molecular al diagnóstico de enfermedades infecciosas se fundamenta en la detección de secuencias de ácidos nucleicos (ADN o ARN) característicos de cada microorganismo. Ello se realiza detectando la presencia, en las muestras clínicas, de un fragmento o trozo al que llamaremos diana de ADN del microorganismo que hay que investigar (secuencia de nucleótidos). Este trozo debe ser exclusivo del germen que hay que investigar; de lo contrario darían también positivo otros microorganismos.

La detección se realiza mediante hibridación (unión) entre un trozo del ácido nucleico del microorganismo que hay que detectar (diana) y un oligonucleótido (cadena de ADN de sólo varios nucleótidos) sintético, con secuencia de bases complementaria a la diana. A este oligonucleótido complementario de la diana lo denominamos sonda. Para saber si existe un determinado microorganismo en una muestra, pondremos la muestra en contacto con la sonda (secuencia de bases complementaria a la diana característica del microorganismo que hay que detectar). En condiciones adecuadas y si encuentra secuencias de nucleótidos de microorganismo buscado, se producirá la hibridación entre la sonda y la diana.

La sonda se fabrica con síntesis química y se marca con alguna molécula que termina su detección una vez producida la hibridación.

Otras técnicas de diagnóstico molecular incluyen, antes de la fase de hibridación, una amplificación del ácido nucleico diana. Existen varias técnicas de amplificación, pero la más utilizada es la denominada PCR (Polimerase Chain Reaction, reacción en cadena de la polimerasa).

El fundamento de la PCR lo podemos resumir como sigue: el material de partida para la PCR es un segmento de una doble cadena de ADN que contiene la secuencia específica que hay que detectar (diana).

La reacción utiliza 2 cebadores o primers (oligonucleótidos sintéticos) una ADN-polimerasa termostable y una mezcla de nucleótidos. Los dos primeros se preparan en el laboratorio y se escogen de tal forma que flanqueen y limiten la secuencia del ADN diana que va a ser amplificada. Se utiliza una ADN-polimerasa termostable para que no se destruya con los calentamientos necesarios para separar las hebras de ADN.

La ADN-polimerasa sintetiza cadenas de ADN complementario de la secuencia diana a partir de los cebadores. Esta síntesis se realiza uniendo al extremo 5' del cebador (grupo fosfato) sucesivos nucleótidos por el carbono 3' de la desoxirribosa, en el orden establecido por la secuencia diana.

Cada primer debe hibridar un trozo de cada una de las dos cadenas de ADN y, como las dos cadenas de ADN tienen orientaciones contrarias (una 3'—5' y la otra 5'—3'), la síntesis a partir de cada primer se realiza en sentido contrario a la del otro, por lo que se encierra el trozo de ADN que hay que amplificar. El proceso de la PCR comienza (como en todas las técnicas de diagnóstico por detección de ADN específico) extrayendo el ADN presente en la muestra que hay que estudiar.

La amplificación consta de una serie de ciclos repetitivos, cada uno de los cuales consiste en:

1. Separación de las 2 hebras de ADN diana por calentamiento.
2. Hibridación de los primers a las hebras de ADN diana separadas. Los primers se fijan en los extremos de la zona diana que hay que amplificar.
3. Elongación (alargamiento) de la fibra de ADN de los cebadores por la ADN-polimerasa, reproduciendo la secuencia diana de ADN. La elongación de la nueva hebra de ADN se realiza siempre en el sentido 5'—3', que es la forma de actuación de la ADN-polimerasa.
4. Separación por nuevo calentamiento de las nuevas dobles cadenas de ADN constituidas entre las cadenas de ADN formadas a partir de los cebadores y las cadenas diana.

Repetición sucesiva del ciclo de amplificación descrito.

El resultado es la amplificación exponencial del fragmento de ADN específico que hay que amplificar (diana), que es el fragmento de ADN limitado y definido en cada extremo por los primers.

La técnica de la PCR es tan potente que permite, en pocas horas, la síntesis de miles de millones de copias de la diana (secuencia amplificada).

El producto amplificado (ADN de la diana) puede detectarse de distintas maneras.

La técnica de la PCR, cuando se aplica a diagnóstico de enfermedades infecciosas, es tan sensible que puede detectar el ADN de un solo microorganismo (incluso no viable) presente en una muestra.

Las técnicas de biología molecular no sólo permiten la identificación del agente etiológico de un proceso infeccioso, sino que también pueden emplearse para detectar si el microorganismo en cuestión es portador de genes de resistencia a agentes quimioterápicos, genes que codifican las toxinas, etc.

Fiabilidad de las pruebas diagnósticas.

Para el diagnóstico de las distintas enfermedades (y desde luego, de las infecciones) se utilizan pruebas de laboratorio. La mayoría de estas pruebas son imperfectas,

puesto que algunos individuos sanos pueden ser clasificados como enfermos (dan la prueba positiva) e individuos que realmente padecen la enfermedad pueden no ser detectados (dan la prueba negativa).

Supongamos que cada individuo en una población grande puede clasificarse como verdadero positivo o como verdadero negativo para un diagnóstico concreto (basándonos en una prueba absolutamente cierta, en la evolución posterior o en el diagnóstico en la necropsia).

En cada individuo de los grupos con y sin la enfermedad, la prueba puede dar positivo o negativo y el conjunto de la población puede clasificarse como: **verdaderos positivos, falsos positivos, verdaderos negativos y falsos negativos**.

Se llama **sensibilidad** de una prueba para diagnóstico a la proporción (probabilidad) de individuos realmente enfermos que dan la prueba positiva. Es decir, es el tanto por ciento de veces que la prueba acierta (es positiva) en un individuo enfermo:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Total enfermos}}$$

Especificidad es la proporción (probabilidad) de individuos que dan la prueba negativa. Es decir, es el tanto por ciento de veces que la prueba acierta (es negativa) en un individuo sano:

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Total sanos}}$$

Las pruebas más sensibles son aquellas que detectan la gran mayoría de individuos enfermos de la población. Las pruebas más específicas son las que casi nunca dan positivas en un individuo sano. La prueba ideal será aquella con muy alta sensibilidad y muy alta especificidad. En general, la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas están contrapuestas, es decir las pruebas más sensibles son poco específicas y las pruebas más específicas suelen tener baja sensibilidad.

Valor predictivo de un resultado positivo es la proporción de individuos enfermos que dan la prueba positiva (verdaderos positivos) con relación a la cantidad total de los que dan la prueba positiva. Es decir, es el porcentaje de individuos enfermos del total de los que dan la prueba positiva:

$$\text{Valor predictivo positivo} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Total de positivos}}$$

Valor predictivo de un resultado negativo es la proporción de individuos sanos que dan la prueba negativo (verdaderos negativos) con relación al total de los que dan

la prueba negativa. Es decir, es el porcentaje de individuos sanos del total de los que dan la prueba negativa:

$$\text{Valor predictivo negativo} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Total de negativos}}$$

Los valores predictivos dependen mucho de la prevalencia de la enfermedad en la población (cociente entre enfermos y total de la población). No ocurre lo mismo con la sensibilidad y la especificidad, que son independientes de la prevalencia.

Cuando existen diversas pruebas para el diagnóstico de una enfermedad, la elección se basará en los datos de sensibilidad y especificidad, y en los valores predictivos. Así, en las pruebas llamadas **descreening (detección o cribado)** se utilizan, en general, pruebas de alta sensibilidad para no perder positivos y luego se confirman con otra técnica más específica. En las pruebas de confirmación de enfermedades cuyo diagnóstico implique un tratamiento complejo o con riesgos, se utilizan, en general, pruebas de alta especificidad.

Distribución de una población respecto a una prueba de diagnóstico

POBLACIÓN

| | ENFERMOS | SANOS | |
|---------|----------------------|----------------------|-------------------|
| PRUEBA+ | Verdaderos positivos | Falsos positivos | Total con prueba+ |
| PRUEBA- | Falsos negativos | Verdaderos negativos | Total con prueba- |
| | Total enfermos | Total sanos | |

A. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS ENFERMEDADES BACTERIANAS.

A.1. Sangre.

El cultivo de sangre es uno de los procedimientos más importantes realizados en el laboratorio de microbiología clínica. El éxito de esta prueba guarda relación directa con los métodos empleados para recoger las muestras de sangre. La bacteriemia y la fungemia se definen como presencia de bacterias u hongos respectivamente en el torrente sanguíneo, y estas infecciones se conocen en conjunto como septicemias. Los estudios clínicos han demostrado que la septicemia puede ser continua o intermitente.

La *septicemia continua* se observa fundamentalmente en infecciones intravasculares, como por ejemplo endocarditis, tromboflebitis séptica, infecciones de catéter intravascular, o en la sepsis sobreaguda en el shock séptico.

La *septicemia intermitente* se produce en la mayoría de las demás infecciones con foco en un lugar distante como por ejemplo en pulmones, tracto urinario, infecciones de tejidos blandos...

La cronología de la recogida de sangre no tiene importancia en los pacientes con septicemia continua, mientras que resulta crítica en los enfermos con septicemia intermitente. Además puesto que los signos clínicos de sepsis como la fiebre, escalofríos, hipotensión, constituyen una respuesta a la liberación de endotoxinas o exotoxinas por los microorganismos, esos signos pueden aparecer hasta una hora después de que los gérmenes hayan desaparecido del torrente sanguíneo. Así pues, la recogida de muestras de sangre durante un episodio febril puede representar el peor momento para el aislamiento del microorganismo. Se deben recoger dos o tres muestras de sangre a intervalos aleatorios durante un período de 24 horas. Por las razones indicadas previamente, el número de muestras recogidas tiene más importancia cuando se sospecha una septicemia intermitente. La toma de más de tres muestras en 24 horas se ha mostrado innecesaria, incluso entre los pacientes que reciben antibióticos.

Se debe recoger un volumen grande de sangre, puesto que más de la mitad de todos los pacientes con septicemia presentan menos de un microorganismo por mililitro de sangre. Se recogerán aproximadamente 20 ml. de sangre en los adultos para cada hemocultivo, y volúmenes proporcionalmente menores en los niños y los recién nacidos. El volumen de sangre cultivada tiene gran importancia puesto que se obtiene un aumento del 40% de positividad significativas cuando el volumen de sangre sube desde 10 ml. hasta 20 ml. Dado que muchos pacientes del hospital son susceptibles a infecciones por gérmenes que colonizan la piel, tiene importancia la desinfección cutánea cuidadosa con alcohol seguido por yodo al 2%.

La mayoría de las muestras de sangre se inoculan en viales con caldos nutrientes enriquecidos. Ésto se debe hacer en el momento de recoger la muestra. Para asegurar la máxima recuperación de organismos importantes se inoculan dos viales por cada muestra. Una vez que los viales de caldo inoculados se reciben en el laboratorio, se incubarán a 37 grados centígrados e inspeccionarán a intervalos regulares para buscar crecimiento microbiano. Cuando se detecta crecimiento, los caldos son sometidos a subcultivo para aislar el germen, con el fin de proceder a su identificación y a las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. La mayor parte de los gérmenes con significado clínico se detectarán durante los dos primeros días de incubación; sin embargo, todos los cultivos se deben incubar durante un mínimo de 5 a 7 días.

A.2. Líquido cefalorraquídeo.

La meningitis bacteriana es una enfermedad seria con morbilidad y mortalidad altas si se retrasa el diagnóstico etiológico. Puesto que algunos patógenos comunes son lábiles (por ejemplo, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*), el líquido cefalorraquídeo (LCR) se debe procesar inmediatamente. El LCR se recoge de manera aséptica tras desinfectar la piel con alcohol y yodo. La muestra se inocula en tubos estériles con tapón de rosca, que deben ser transportados inmediatamente al laboratorio. En ningún caso se someterá la muestra a refrigeración o calentamiento.

Al recibirla en el laboratorio, la muestra es concentrada mediante centrifugación y el concentrado se emplea para inocular medios bacteriológicos, preparar una tinción de Gram (y otras tinciones si se sospechan infecciones por hongos o micobacterias) y realizar pruebas encaminadas a la detección directa de antígenos bacterianos (p. ej. para *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus* grupo B).

Las pruebas de antígenos tienen un valor muy limitado, aunque pueden ser útiles en pacientes con infecciones parcialmente tratadas. El laboratorio se pondrá en contacto con el médico inmediatamente si alguna prueba (tinción, antígenos, cultivo) es positiva.

A.3. Otros líquidos normalmente estériles.

Es posible recoger una variedad de líquidos normalmente estériles para cultivo bacteriológico, entre los que se incluyen líquido abdominal o peritoneal, torácico o pleural, sinovial y pericárdico. Si es posible recoger un volumen grande de líquido mediante aspiración percutánea se debe inocular en viales de hemocultivo con medios nutrientes. Una porción pequeña se enviará también al laboratorio en un tubo estéril para preparar extensiones apropiadas (gram, KOH, acidorresistente). Si la cantidad de líquido es menor, la muestra se puede inocular directamente en medios de agar o en un tubo estéril y transportarlo al laboratorio.

Se desaconseja el transporte de las muestras en jeringuillas. Puesto que quizás existan relativamente pocos organismos en la muestra, debido a dilución o a eliminación de los microorganismos por la respuesta inmune del huésped, tiene importancia cultivar el mayor volumen de producto posible.

Quizás existan anaerobios en la muestra, sobre todo en casos de infección intra-abdominal o pulmonar; por tanto, se evitará la exposición de la muestra al oxígeno.

A.4. Muestras de vías respiratorias altas.

Los estreptococos grupo A son las bacterias más importantes responsables de faringitis bacteriana. En la orofaringe pueden existir otras bacterias potencialmente

patógenas, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Enterobacterias* y *Pseudomonas*, pero rara vez son responsables de enfermedad significativa del tracto respiratorio alto.

La muestra se recogerá con una torunda de Dacron o alginato cálcico. Se debe tomar de las áreas amigdalares, la faringe posterior y cualquier exudado o úlcera. Se evitará la contaminación de la muestra con saliva, puesto que ésta puede favorecer o inhibir el crecimiento de patógenos importantes. Si existe una pseudomembrana, se desprenderá una parte y se enviará para cultivo. Los estreptococos grupo A y C, *Diphtheriae* son muy resistentes a la desecación, por lo que su transporte al laboratorio no requiere precauciones especiales. Sin embargo, las muestras recogidas para aislamiento de *B. pertusis* y *N. gonorrhoeae* se deben inocular en medios de cultivo inmediatamente después de la recogida y antes de enviarlos al laboratorio. El transporte de muestras para aislamiento de Chlamidia y *M. pneumoniae* requiere el uso de medios de transporte especiales.

Los estreptococos grupo A se pueden detectar directamente de la muestra del paciente mediante inmunoanálisis específico para el antígeno grupo específico. Aunque esas pruebas son muy específicas, por ahora resultan poco sensibles y no excluyen de forma fiable el diagnóstico de faringitis por estreptococos grupo A.

Otras infecciones del tracto respiratorio alto pueden afectar a la epiglotis y los senos. El intento de tomar muestras para cultivo de la epiglotis, puede conducir a la obstrucción completa de la vía aérea en pacientes infectados (sobre todo en niños). Por esa razón, se evitarán tales cultivos.

El diagnóstico específico de una infección sinusal requiere aspiración directa del seno, transporte anaerobio apropiado hasta el laboratorio y procesamiento rápido.

A.5. Muestras de las vías respiratorias inferiores.

Se pueden usar diversas técnicas para recoger muestras de las vías respiratorias inferiores, entre las que se encuentran la expectoración espontánea o inducida con solución salina, la broncoscopia y el lavado broncoalveolar, la aspiración transtraqueal y aspiración directa a través de la pared torácica.

La expectoración espontánea o inducida, así como la mayor parte de los tipos de muestras de broncoscopia, pueden estar contaminadas por bacterias de las vías aéreas altas. Por esto se debe estudiar microscópicamente para valorar el grado de contaminación oral y el posible valor de la muestra.

La contaminación de la muestra en la vía aérea alta se puede evitar si se usa un broncoscopio protegido, la aspiración transtraqueal o la aspiración pulmonar directa. El empleo de esas técnicas invasivas para recoger una muestra es necesario en caso de infección broncopulmonar por anaerobios.

A.6. Ojo y oído.

Llamamos timpanocentesis a la aspiración de líquido del oído medio, con el objeto de establecer el diagnóstico específico de otitis media, aunque resulta innecesaria para la mayoría de las infecciones, puesto que los patógenos más comunes se pueden tratar prácticamente. El cultivo de muestras nasofaríngeas o faríngeas no es útil y no se debe realizar.

La recogida de muestras en casos de infección ocular es difícil, puesto que la muestra obtenida resulta en general muy pequeña y pueden existir relativamente pocos microorganismos. Las muestras se deben recoger mediante torunda antes de usar anestésicos tópicos, y mediante raspado corneal si se considera necesario.

Los medios de cultivo se inocularán en el momento de recoger las muestras, para enviarlas a continuación al laboratorio. Todos los medios se deben incubar durante un mínimo de cinco días.

Se deben realizar cultivos especiales si se sospecha infección ocular por *C. trachomatis*.

A.7. Heridas, abscesos y tejidos.

Las heridas abiertas con drenaje son colonizadas muchas veces por organismo potencialmente patógenos, no relacionados con el proceso infeccioso específico. Por ésto tiene importancia recoger muestras de la profundidad de la herida después de limpiar la superficie.

Se evitará el uso de torundas puesto que es difícil obtener una muestra representativa no contaminada por los microorganismos que colonizan la superficie.

No emplear solución salina que contenga algún conservador bactericida. Los aspirados de abscesos cerrados se deben recoger tanto del centro como de la pared del absceso. El drenaje de infecciones de tejidos blandos puede recogerse mediante aspiración.

Los tejidos se deben obtener de lugares representativos, y siempre que sea posible se recogerán múltiples muestras. La muestra tisular se transportará en un recipiente estéril con tapón de rosca y se añadirá solución salina estéril para prevenir la desecación si se trata de una muestra pequeña.

A.8. Orina.

La orina constituye una de las muestras enviadas con más frecuencia para el cultivo.

Dado que los patógenos pueden crecer en la orina, se evitará el retraso en el transporte hasta el laboratorio, si no es posible cultivar inmediatamente la muestra, se debe refrigerar o colocar en un conservador bacteriostático.

Una vez recibida la muestra en el laboratorio, se inocula una cantidad de orina en cada medio de cultivo, generalmente un medio de agar no selectivo y otro selectivo. De esa forma se puede cuantificar el número de microorganismos en presencia de piuria.

El proceso es útil para evaluar el significado de un aislado, aunque un pequeño número de microorganismo en presencia de piuria puede tener significado clínico.

Se han introducido varios procedimientos para la selección de la orina que se usan mucho; todos esos métodos en casos de bacteriuria poco intensa que, sin embargo, puede tener significado clínico.

A.9. Genitales.

A pesar de la variedad de bacterias asociadas con enfermedades de transmisión sexual, la mayoría de los laboratorios se centran en el aislamiento de *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*. Ambos organismos son lábiles, por lo que requieren manipulación adecuada de la muestra.

El exudado uretral o endocervical debe ser inoculado de forma inmediata en medios selectivos apropiados para la recuperación de *N. gonorrhoeae*. Estos medios contienen antibióticos para suprimir el crecimiento de otros microorganismos que pudieran estar presentes en la muestra.

Sin embargo se debe inocular también un medio no selectivo, puesto que algunas cepas de *N. gonorrhoeae* son inhibidas por los antibióticos.

Parte del exudado se extenderá también sobre un porta de cristal, se realizará una tinción con Gram y se examinará al microscopio. En el caso de muchos varones con infección, sólo es necesario ese procedimiento para establecer el diagnóstico.

A.10. Heces.

Un gran número de bacterias pueden causar infecciones gastrointestinales. Su recuperación en cultivo requiere recogida de una muestra de heces adecuada, transporte al laboratorio de una forma que asegure la viabilidad de los microorganismos, e inoculación en medios selectivos apropiados.

Las muestras se transportan lo antes posible al laboratorio para evitar los cambios ácidos en las heces debidos a metabolismo bacteriano, que son tóxicos para gérmenes como *Shigella*.

Puesto que en las muestras de heces existen numerosos organismos como bacterias patógenas y no patógenas, el aislamiento y la identificación de los patógenos entéricos requiere con frecuencia tres o más días. Por esto los cultivos de heces se usan con frecuencia para confirmar el diagnóstico clínico y la terapia, si está indicada, y no esperar a los resultados del cultivo. De hecho no se suelen hacer pruebas de susceptibilidad a los antibióticos con la mayoría de los patógenos entéricos.

B. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS ENFERMEDADES MICÓTICAS.

El diagnóstico de las infecciones micóticas causadas por patógenos primarios (p. Ej. *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* y otros), se puede establecer mediante estudio microscópico, al visualizar la fase parasitaria del germen en las muestras clínicas, o mediante cultivo del microorganismo en las muestras de tejido tomados de la lesión.

La situación se complica en el caso de infecciones micóticas causadas por agentes oportunistas ampliamente difundidos como *Aspergillus*, *Candida*, *Mucor* y otros, puesto que esos hongos son comunes en el medio ambiente y se encuentran con frecuencia como contaminantes de los cultivos.

En ese caso adquiere importancia fundamental el aislamiento repetido del mismo organismo en muestras tomadas en momentos distintos.

Los métodos empleados para recoger las muestras clínicas tienen importancia considerable en el aislamiento y la identificación de los hongos. Además el procedimiento utilizado para tomar las muestras dependerá del área y el tipo de tejido afectado. Aunque se dispone de medios selectivos para aislar y cultivar la mayoría de hongos patógenos, es importante utilizar técnicas estériles siempre que resulte posible. Esto se aplica en especial a las superficies cutáneas, las uñas y los pelos, que pueden estar contaminados por hongos saprófitos, bacterias, suciedad y detritos epiteliales.

La superficie de la piel se limpiará con etanol al 70% y se dejará secar al aire antes de tomar la muestra, lo que se hace mediante raspado simple de la superficie para eliminar las escamas cutáneas o el pelo con hongos.

Puesto que los hongos contienen quitina y varios polisacáridos complejos en la pared celular, se muestran resistentes a los álcalis. De hecho, varios procedimientos histológicos que tiñen específicamente los hongos en los cortes tisulares, como las tinciones con metenamina plata de Gomori o con ácidoperiódico de Schiff, se basan en la presencia de quitina y polisacáridos en la pared celular.

En general, las técnicas usadas para la identificación de levaduras en el laboratorio son similares a las empleadas para las bacterias. Aunque se basan en las propiedades bioquímicas y fisiológicas de los microorganismos, la tinción de Gram no tiene papel en la identificación de los hongos, puesto que todos ellos son gram-positivos.

Las levaduras son unicelulares, crecen con rapidez y pueden ser suspendidas de modo uniforme en caldo. En cambio, los mohos son filamentosos, producen conidias especializadas y crecen con lentitud. Se identifican al microscopio de acuerdo al tamaño y la forma de las conidias y el modo como se desarrollan. Las características morfológicas de ciertas estructuras especializadas, como las clamidosporas y las hifas, también ayudan a la identificación de los mohos.

La identificación de los hongos requiere un conocimiento básico de sus distintas características morfológicas.

C. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS ENFERMEDADES PARASITARIAS.

La gran mayoría de las identificaciones y los exámenes parasitológicos se basan por completo en el reconocimiento de la morfología característica de los organismos, cualquier condición que pueda oscurecer o distorsionar el aspecto morfológico del parásito conducirá a errores en la identificación y el diagnóstico.

C.1. Infecciones parasitarias intestinales y urogenitales.

Los protozoos y helmintos más comunes que pueden colonizar o infectar los tractos gastrointestinales y urogenital de los humanos son las amebas, los flagelados y los nematodos. Sin embargo, también es posible encontrar infecciones por trematodos, cestodos, ciliados, coccidios y microsporidios.

La preparación húmeda simple o la extensión teñida resulta inadecuado para la infecciones intestinales y urogenitales. Muchas veces se requieren técnicas de concentración de las muestras mediante sedimentación o flotación para detectar las cantidades pequeñas de huevos (gusanos) y/o quistes (protozoos) presentes en las muestras de heces.

La detección óptima de ciertos patógenos del intestino delgado, como *Giardia lamblia* o *Satrongyloides stercoralis*, puede exigir aspiración del contenido intestinal o incluso biopsia intestinal. De modo similar, la detección de parásitos colónicos, como *Entamoeba histolytica* y *Schistosoma mansoni*, puede necesitar examen proctoscópico o sigmoidoscópico con aspiración o biopsia de las lesiones mucosas. La toma de muestras en la piel perianal tiene utilidad para recuperar huevos de *Enterovirus vermicularis* o tenias.

Técnicas para el examen de heces.

Las muestras deben ser examinadas de forma sistemática en busca de huevos y larvas de helmintos y de protozoos intestinales. Para optimizar la detección se requieren varias técnicas:

- *Examen microscópico:* la muestra fecal debe ser examinada en cuanto a consistencia y presencia de sangre, moco, gusanos y proglótides.
- *Preparación húmeda directa:* las heces frescas serán examinadas al microscopio utilizando las técnicas de preparación con solución salina y yodo para detectar posibles trofozoítos o larvas móviles.

Ambas técnicas se emplean también para detectar la presencia de huevos de helmintos, quistes de protozoos y células del paciente como leucocitos y hematíes. El método tiene utilidad además para el examen de muestras de esputos, orina, exudado vaginal, aspirado duodenal, abscesos y biopsias tisulares.

- *Concentración:* todas las muestras fecales deben ser colocadas en formalina al 10% para conservar la morfología de los parásitos, y concentradas mediante procedimientos como la sedimentación con formalina-acetato de etilo y la flotación con sulfato de cinc. El objetivo de esos métodos es separar los quistes de protozoos y los huevos de helmintos, de la masa de materia fecal, con lo que aumenta la probabilidad de detectar un número pequeño de microorganismos, que probablemente se pasarían por alto si se utilizase sólo la extensión directa. Después de la concentración, el material se tiñe con yodo y se examina al microscopio.
- *Placas con tinción permanente:* la detección y la identificación correcta de los protozoos intestinales se basa muchas veces en el examen de extensiones con tinción permanente. El detalle citológico ofrecido por algunos métodos de tinción permanente es esencial para la identificación segura, y la mayoría de las identificaciones se deben considerar provisionales hasta que se confirmen en las placas teñidas permanentemente. Las placas se preparan con extensiones del material fecal fresco colocadas en solución fijadora de Schadinn, o mediante fijación de una pequeña cantidad de heces con el fijador APV.

Colección de examen de muestras distintas a las de heces.

Muchas veces es necesario recoger y examinar muestras distintas a las de heces, para diagnosticar las infecciones causadas por patógenos intestinales. Se encuentran entre ellas:

- *Muestras perianales:* suele ser necesaria para detectar oxiuros y a veces tenias. El método incluye preparación de una placa con cinta de celulosa transparente o una torunda anal. La placa con cinta de celulosa constituye el método de elección para descubrir huevos de oxiuros. En cualquiera de los dos casos, las muestras se deben recoger por la mañana, antes de que el paciente se bañe o vaya al WC.
- *Material de sigmoidoscopia:* pueden resultar útiles en el diagnóstico de la infección por *Entamoeba histolytica*, no detectada mediante el examen de heces habitual. Las muestras consisten en el material obtenido mediante raspado o aspiración de la superficie mucosa. Se deben tomar muestras lo menos de seis áreas.
- *Aspirado duodenal:* la toma de muestras y el examen del contenido duodenal son formas que permiten descubrir las larvas de Strongyloides, huevos de Clonorchis y otros parásitos intestinales de tamaño pequeño, como Giardia,

Isospora y *Cryptosporidium*. Las muestras se pueden obtener mediante endoscopia, con la cápsula entérica o con la prueba de cordón. Las muestras se deben recoger en solución salina y ser transportadas al laboratorio.

- *Aspirado de abscesos hepáticos*: la muestra se debe recoger al margen del absceso hepático, y no del centro necrótico. La primera porción extraída suele tener un aspecto amarillo-blanco y rara vez contiene amebas. Las otras porciones, de color rojizo, son las que suelen mostrar organismos. Como mínimo se deben extraer dos porciones separadas del exudado. Muchas veces, después de la aspiración, el colapso del absceso determina la entrada de sangre lo cual permite la liberación de amebas de los tejidos. La probabilidad de observar organismos aumenta en aspiraciones repetidas. El material aspirado se transportará enseguida al laboratorio.
- *Espujo*: el examen microscópico debe incluir la preparación húmeda con solución salina y las preparaciones con tinción permanente.
- *Orina*: los huevos presentes en la orina, se pueden detectar mediante examen directo o tras concentración con la técnica de sedimentación por centrifugación. Es posible que los huevos estén atrapados en moco o pus, y resulta más probable observarlos en las últimas gotas de la muestra que en la primera porción.
- *Muestra urogenitales*: la identificación tiene como base el examen de la preparación húmeda del exudado vaginal y uretral, las secreciones prostáticas o el sedimento urinario.

C.2. Infecciones parasitarias sanguíneas y tisulares.

Los parásitos localizados dentro de la sangre y/o los tejidos son más difíciles de detectar que los intestinales y urogenitales. El examen microscópico de las extensiones sanguíneas proporciona un método directo y útil para detectar organismos palúdicos, tripanosomas y microfilarias.

No obstante, la concentración de gérmenes suele fluctuar y por tanto, es necesario recoger múltiples muestras a lo largo de varios días.

Las preparaciones húmedas (microfilarias y tripanosomas) y las extensiones sanguíneas gruesas y finas teñidas permanentemente constituyen la clave del diagnóstico. El examen del esputo puede revelar huevos de helmintos o larvas después de aplicar técnicas de concentración adecuadas. El diagnóstico de ciertas infecciones por nematodos puede requerir biopsia cutánea o muscular.

Extensiones sanguíneas.

El diagnóstico clínico de enfermedades parasitarias como paludismo, leishmaniasis, tripanosomiasis y filariasis se basa especialmente en la recogida de muestras

de sangre en momentos apropiados, con examen microscópico experto de las extensiones sanguíneas finas y gruesas preparadas y teñidas de forma adecuada. Puesto que el paludismo es una de las pocas infecciones parasitarias que pueden poner en peligro la vida del paciente, resulta necesario recoger y examinar muestras de sangre de una forma exhaustiva.

Puesto que los niveles de parasitemia pueden ser bajos o fluctuantes, se recomienda obtener y examinar extensiones sanguíneas a las 6, 12 y 24 horas después de la toma inicial.

Para el diagnóstico de infecciones parasitarias sanguíneas se preparan dos tipos de extensiones: finas y gruesas. Aunque las preparaciones húmedas de las extensiones de sangre pueden revelar la presencia de parásitos móviles, la mayoría de los laboratorios proceden directamente a la preparación de extensiones finas y gruesas para tinción.

En la extensión fina, la sangre es extendida sobre la placa formando una capa fina y los hematíes permanecen intactos después de la tinción.

En la extensión gruesa los hematíes son lisados antes de la tinción y sólo se ven leucocitos, plaquetas y parásitos si existen. Permiten estas extensiones examinar mayor cantidad de sangre, lo que aumenta la posibilidad de detectar infecciones ligeras. No obstante, la mayor distorsión de los parásitos hace especialmente difícil la identificación de las especies cuando se emplean extensiones gruesas.

Una vez preparadas, las extensiones sanguíneas se deben teñir. La tinción más fiable para los parásitos sanguíneos se obtiene con el colorante de Giemsa tamponado a pH entre 7.0 y 7.2.

El colorante de Giemsa es particularmente útil para la tinción de protozoos, sin embargo, la vaina de las microfilarias no siempre se tiñe con el Giemsa.

C.3. Alternativas a la microscopia para el diagnóstico de infecciones parasitarias.

En la mayoría de los casos, el diagnóstico de laboratorio se establece mediante detección microscópica e identificación del parásito en muestras clínicas. A veces es imposible detectar el parásito aunque se busque con el mayor cuidado, debido a que su número es muy pequeño o nulo en el material clínico disponible.

Es estos casos, se puede recurrir a métodos alternativos para establecer un diagnóstico basado en la detección de material procedente del parásito (antígenos o ácidos nucleicos) o en la respuesta del huésped frente a la invasión parasitaria (anticuerpos).

Entre los demás métodos se incluyen cultivo, inoculación en animales y xenodiagnóstico.

D. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA ENFERMEDAD VÍRICA.

La confirmación en el laboratorio del diagnóstico de infección vírica se puede establecer mediante observación de efectos histopatológicos (ECP) en las células, visualización de partículas víricas con el microscopio electrónico, aislamiento y cultivo del virus, detección de componentes víricos como proteínas, enzimas y ácidos nucleicos o evaluación de la respuesta inmune del paciente al virus, a lo que denominamos serología. El virus, los antígenos víricos o los ECP se pueden detectar mediante examen citológico de muestras clínicas o con células mantenidas en cultivo de tejido e infectadas en el laboratorio.

Procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de las infecciones víricas:

- Citología.
- Microscopia electrónica.
- Aislamiento y cultivo del virus.
- Detección de proteínas víricas como antígenos y enzimas.
- Detección de material genético vírico.
- Serología.

D.1. Citología.

El examen citológico de muestras puede proporcionar un diagnóstico inicial rápido para aquellos virus que producen un efecto histopatológico característico. Entre los tipos de ECP nos encontramos los cambios de la morfología celular, lisis, vacuolación, formación de sincitios y presencia de cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión son cambios histológicos de las células causados por la presencia de componentes víricos, o modificaciones de las estructuras celulares inducidas por el virus.

La infección por citomegalovirus puede causar cuerpos de inclusión tipo ojo de búho nucleares en las células de tejidos o en el sedimento urinario. La rabia se puede detectar por el hallazgo de cuerpos de Negri.

D.2. Microscopia electrónica.

La microscopia electrónica no es una técnica de laboratorio clínico estándar, pero se puede usar para la detección e identificación de algunos virus.

D.3. Aislamiento y cultivo de virus.

Lo esencial para probar la etiología vírica de un síndrome es la recuperación y cultivo del agente causal.

En ocasiones la selección de la muestra apropiada para el cultivo de virus resulta complicada debido a que varios virus pueden causar la misma enfermedad clínica.

Por ejemplo, la meningitis aséptica puede estar causada por muchos agentes, y quizá sean necesarios varios tipos de muestras para identificar el virus causal.

Las muestras como hemos apuntado en numerosas ocasiones, se deben recoger de forma precoz en la fase aguda de la infección, antes de que cese la diseminación del virus.

Cuanto más corto es el intervalo entre la recogida de la muestra y su entrega al laboratorio, mayor la posibilidad de aislar virus. Muchos patógenos víricos son lábiles, y las muestras están expuestas a proliferación de bacterias y hongos.

— *Cultivo vírico.*

Los virus se pueden cultivar en cultivo de tejidos, huevos embrionados o animales de experimentación.

— *Cultivo celular.*

Existen varios tipos de cultivos de células diferentes en cultivo de tejidos. Los cultivos celulares primarios se obtienen mediante tratamiento de órganos animales específicos con tripsina o colagenasa.

Las células primarias pueden ser tratadas con tripsina y sometidas a pases o transferencias para obtener cultivos celulares secundarios. Las cepas de células diploides son cultivos de un solo tipo celular capaz de soportar un número grande, pero finito, de pases antes de experimentar envejecimiento.

Las células tumorales y las inmortalizadas por virus o sustancias químicas se pueden cultivar como líneas celulares, consistentes en un solo tipo celular que puede ser sometido a pases continuos sin experimentar senescencia.

— *Detección de virus.*

La detección y la identificación inicial del virus se pueden conseguir mediante observación de ECP en la monocapa celular. Un solo virus puede causar un foco de citopatología: placa.

Algunos virus crecen lentamente, no crecen o no causan con facilidad ECP en las líneas de células usadas típicamente por los laboratorios de virología clínica.

Se pueden también utilizar propiedades víricas características para la identificación de virus que no causan ECP clásicos. El virus de la rubéola quizá no cause ECP pero evita la replicación de picornavirus en un proceso conocido como interferencia heteróloga. Las células infectadas por virus influenza, virus parainfluenza, virus de la parotiditis y togavirus expresan una glucoproteína vírica que une los hematíes de determinadas especies animales a la superficie de las células infectadas (hemabsorción). Los virus liberados en el medio de cultivo celular se pueden detectar por aglutinación de eritrocitos, un proceso denominado hemaglutinación.

— *Interpretación de los resultados de los cultivos.*

En general, la detección de cualquier virus en tejidos, líquido cefalorraquídeo, sangre o líquido vesicular se puede considerar altamente significativa. Sin embargo, la diseminación del virus puede ser inducida por alguna circunstancia subyacente y no guardar relación con los síntomas de la enfermedad.

Ciertos virus pueden experimentar diseminación intermitente sin síntomas durante períodos variables de semanas, meses o años. La falta de aislamiento de un virus en presencia de infección vírica se suele deber a problemas relacionados con la muestra clínica.

D.4. Detección de proteínas víricas.

La replicación vírica produce enzimas y otras proteínas que pueden ser detectadas mediante técnicas bioquímicas, inmunológicas y de biología molecular. Las proteínas víricas se pueden separar mediante electroforesis. Este método se emplea para identificar a diferentes virus y para diferenciarlos entre ellos.

La detección y el análisis de enzimas características permiten identificar y cuantificar determinados virus. Por ejemplo, la presencia de transcriptasa inversa en suero o cultivo celular indica la presencia de retrovirus.

Se puede utilizar la inmunohistoquímica que consiste en usar los anticuerpos como un instrumento sensible y específico para detectar, identificar y cuantificar la presencia de virus y antígenos víricos en muestras clínicas o cultivos celulares. El antígeno se detecta con anticuerpos antivíricos, marcados covalentemente con sustancias fluorescentes, enzimáticas o radiactivas. Los anticuerpos antivíricos se pueden obtener de individuos convalecientes o prepararse en animales.

Los antígenos víricos presentes en la superficie celular o dentro de la célula se pueden detectar mediante:

- Inmunofluorescencia: la I. Directa se emplea un anticuerpo antivírico primario fluorescente, mientras que para la indirecta se utiliza un anticuerpo secundario fluorescente para reconocer el anticuerpo antivírico primario y localizar el antígeno.
- Los virus o los antígenos liberados por células infectadas se pueden detectar mediante análisis de inmunosorción ligado a enzimas o ELISA, radioinmunoanálisis o RIA y aglutinación del látex o AL.

La detección de citomegalovirus se puede potenciar si se combinan métodos de cultivo celular e inmunológicos.

D. 5. Detección de material genético vírico.

La estructura y la secuencia genética del genoma representan una característica distintiva fundamental de la familia, el tipo y la cepa de virus. La separación elec-

troforética de segmentos de ARN genómicos o productos digeridos con endonucleasa de restricción de virus ADN genómico, distingue entre diferentes tipos y cepas de virus. Los patrones de ARN o ADN son similares a las huellas digitales genéticas de esos virus. De esta forma se puede distinguir también entre diferentes cepas de virus del herpes simple tipos 1 y 2.

Se pueden usar sondas ADN con secuencias complementarias para regiones específicas de un genoma vírico para detectar, localizar y cuantificar ácidos nucleicos víricos en muestras clínicas.

Las sondas ADN se pueden usar de modo similar a los anticuerpos, como un instrumento sensible y específico para detectar la presencia de virus, pero las sondas ADN permiten detectar el virus incluso en ausencia de replicación vírica. El análisis con sondas ADN tiene utilidad especial en las infecciones por virus de replicación lenta o no productivas, como los citomegalovirus y los papilomavirus humanos.

La reacción en cadena de la polimerasa permite conocer copias únicas de ADN vírico, y es una de las técnicas de análisis genético más nuevas.

D.6. Serología vírica.

El diagnóstico serológico se utiliza para virus difíciles de aislar y cultivar en cultivo de células, y para los que producen enfermedad con un curso más lento.

La respuesta inmune humoral proporciona una historia de las infecciones de un paciente. La serología puede ser usada para:

- Identificar el virus y su cepa o serotipo.
- Evaluar el curso de una infección o determinar si se trata de una infección primaria o una reinfección, o de una infección aguda o crónica.

La concentración relativa de anticuerpos se conoce con el nombre de título. Se define como la inversa de la mayor dilución del suero del paciente que conserva actividad, por ejemplo, se une al antígeno vírico, inhibe una actividad vírica específica, o compite y bloquea la unión y detección de un anticuerpo radiactivo o marcado de otra forma.

La producción de anticuerpos en respuesta a la infección primaria conduce a seroconversión. La detección de anticuerpos IgM específicos para el virus indica en general infección primaria reciente, y esos anticuerpos se encuentran durante las dos o tres primeras semanas de la infección primaria. La seroconversión está indicada por el aumento de cuatro veces o mayor en el título de anticuerpos, entre los sueros tomados durante la fase aguda de la enfermedad y al menos dos o tres semanas después, durante la fase de convalecencia.

El curso de una infección crónica se puede determinar también por un perfil serológico. La presencia y los títulos de anticuerpos contra varios antígenos víricos

claves pueden describir la fase de la enfermedad por determinados virus. Esto tiene utilidad especial para virus que producen infecciones de curso más lento.

Se puede utilizar una batería o panel serológico, compuesto por pruebas para varios virus, en el diagnóstico de ciertos síndromes.

— *Infecciones víricas mediante serología:*

- Virus de Epstein-Barr,
- Virus de la rubéola,
- Hepatitis A, B, C, D, E,
- Virus de la inmunodeficiencia humana,
- Arbovirus (virus de encefalitis),

Pruebas serológicas.

- *Fijación del complemento:* es una prueba serológica y técnicamente difícil. Consiste en hacer reaccionar con antígeno y complemento que procede del laboratorio.
- *Inhibición de la hemaglutinación:* esta técnica junto con la anterior son las mejores para detectar anticuerpos y su unión al virus. Los anticuerpos que tapizan el virus bloquean su unión a células indicadoras.
- *Neutralización:* los anticuerpos inhiben la infección y la citopatología de las células en cultivos celulares. La respuesta de anticuerpos neutralizantes es específica de virus, aparece muchas veces al comenzar los síntomas y persiste durante largos periodos.
- *Inmunofluorescencia:* indirecta cuando se puede utilizar para la detección de anticuerpos específicos como el virus presentes en el suero del paciente, mediante el uso de células infectadas por el virus. El título de anticuerpos es el recíproco de la dilución más alta que todavía exhibe tinción fluorescente.
- *Aglutinación del látex:* es un método rápido y sencillo de realizar para determinar la presencia de anticuerpos o antígenos solubles. El anticuerpo específico contra el virus causa aglutinación de partículas de látex recubiertas con antígenos víricos. La hemaglutinación pasiva emplea como indicadores hematíes modificados por el antígeno, en vez de partículas de látex.
- *Enzimoimmunoanálisis in situ.*
- *Análisis de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA):* este método usa antígeno inmovilizado en una superficie de plástico, perla o filtro, para capturar y separar el anticuerpo específico contra el virus, de otros anticuerpos presentes en el suero del paciente. El anticuerpo del paciente fijado se detecta des-

pués mediante un anticuerpo antihumano unido de forma covalente a una enzima. Se cuantifica espectrofotométricamente por la intensidad del color de un sustrato apropiado, causado por la acción enzimática. Las muchas variaciones de la técnica ELISA difieren en los medios para capturar y detectar el anticuerpo o el antígeno. Encontramos un ejemplo de prueba ELISA usada frecuentemente, en el test rápido para embarazo basado en la detección de la hormona coriagonadotrofina humana.

- *Radioinmunoanálisis*: se utiliza anticuerpo o antígeno radiomarcado, con el fin de cuantificar los complejos antígeno-anticuerpo. Como método de captura se puede emplear el RIA, según lo descrito previamente, o un método de competencia. En la técnica de competencia, el anticuerpo presente en el suero del paciente es cuantificado por su capacidad para competir con un anticuerpo radiomarcado preparado en el laboratorio y sustituirlo en los complejos antígeno-anticuerpo.

La prueba de anticuerpos fluorescentes indirectos y el inmunoanálisis en fase sólida, como la aglutinación del látex, el análisis de inmunoabsorción ligada a enzima y el radioinmunoanálisis, se emplean para detectar y cuantificar inmunocomplejos formados por anticuerpos específicos y antígenos víricos.

Limitaciones de la serología.

Existen limitaciones para el uso y la interpretación de las pruebas serológicas. La presencia de anticuerpos antivíricos indica infección previa, pero no es suficiente para indicar cuándo se produjo la infección. Pueden existir anticuerpos causantes de interferencia, y las reacciones cruzadas serológicas entre virus diferentes pueden confundir la identidad del agente infeccioso. A la inversa, el anticuerpo utilizado en la prueba puede ser demasiado específico y quizá no reconozca otros virus de la misma familia, por lo que produce un falso negativo.

BIBLIOGRAFÍA.

- Murriay, Patrick; Kobayashi, George; Pfaller, Michael y Rosenthal, Ken. 1997 Microbiología médica. Madrid. Ed Harcourt Brace de España. Páginas: 160-280, 400-404, 440-448, 526-542.
- De la Rosa, Manuel. 1997 Microbiología. Enfermería-ciencias de la salud. Ed. Harcourt Brace de España. Páginas: 25-40.
- García, P.; Fernández, M. y Paredes, F 1997 Microbiología clínica aplicada. Ed. Díaz de Santos. Páginas 60-88.

