

CAPÍTULO 10

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

María Teresa Ulloa F.

INTRODUCCIÓN

La estrecha colaboración entre el médico tratante y el laboratorio de microbiología es imprescindible para obtener el máximo beneficio para el paciente.

La tendencia actual en el laboratorio de microbiología esta destinada a obtener resultados **más objetivos, más rápidos**, que finalmente **incidan** en el manejo clínico.

La labor desempeñada en el laboratorio de microbiología esta dirigida fundamentalmente a realizar el diagnóstico etiológico de una determinada enfermedad infecciosa. Esto permitirá indicar una terapia específica y en algunos casos establecer la gravedad del cuadro infeccioso.

Por otro lado, permite asesorar la terapia antimicrobiana a través del estudio de susceptibilidad, apoyando la elección de la terapia más adecuada y un tratamiento dirigido hacia el patógeno.

Finalmente, el estudio microbiológico aporta información epidemiológica, con el fin de mantener una vigilancia de los agentes mas prevalentes y su comportamiento frente a los antimicrobianos y así escoger la terapia empírica local más adecuada.

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Actualmente, el diagnóstico microbiológico se sustenta en el análisis de aspectos tan diversos de los microorganismos, tales como, la fisiología, inmunología, biología molecular y reacciones parásito-hospedero involucradas en el proceso infeccioso.

Existen diversas estrategias que permiten abordar el diagnóstico de un agente infeccioso. Por un lado se investiga la presencia del agente o sus componentes en forma directa a través de métodos tradicionales, inmunológicos y moleculares. Por otro lado, en algunas situaciones el diagnóstico se realiza en forma indirecta a través de la detección de la respuesta inmune generada por la presencia de éste en el hospedero, (Figura 10-1).

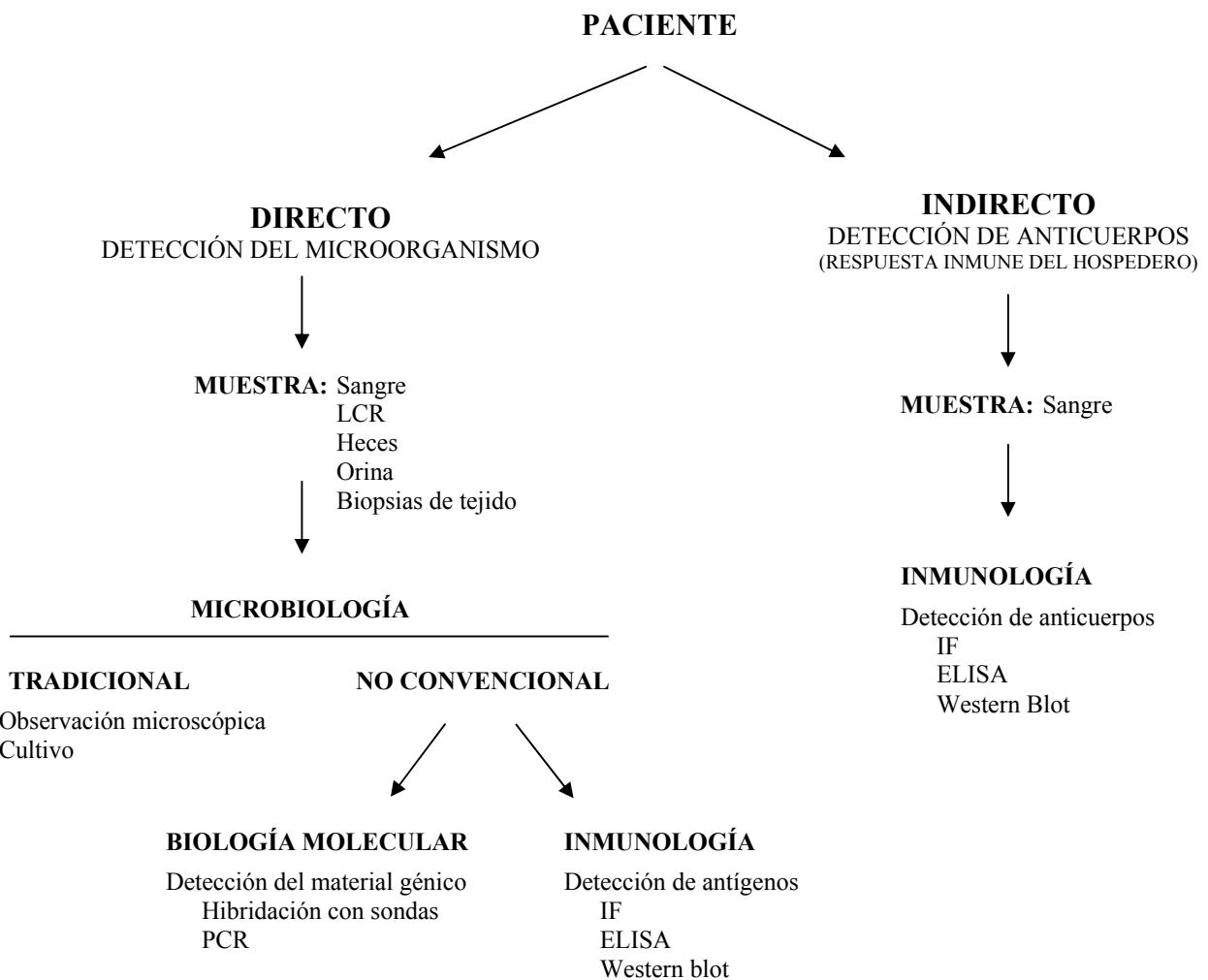


Figura 10-1: Métodos de diagnóstico microbiológico.

El diagnóstico microbiológico, independiente de la estrategia utilizada, incluye, como primera etapa, la obtención de la(s) muestra(s) pertinentes. El éxito de este estudio depende en gran medida de una muestra obtenida oportunamente y correctamente recolectada.

Recordemos que el manejo de las muestras siempre representa un riesgo biológico potencial, por lo tanto, es estrictamente necesario cumplir las normas de bioseguridad en su manipulación.

Toma de la muestra

Las siguientes son consideraciones fundamentales en la obtención de la muestra.

- 1.- La muestra debe ser representativa de la infección y obtenida correctamente a fin de evitar contaminación no deseada, especialmente cuando la muestra proviene de un sitio estéril.
- 2.- Debe ser obtenida en el momento óptimo, esto requiere conocimiento de la historia natural y la fisiopatología de la infección. El ejemplo más clásico corresponde a la fiebre tifoidea, en la cual el agente se encontrará en las primeras semanas en sangre y posteriormente en deposiciones.
- 3.- Se requiere una cantidad de muestra suficiente para llevar a cabo todos los análisis necesarios. En algunas situaciones es necesario obtener mas de una muestra para aumentar el rendimiento diagnóstico. Para esto se debe considerar el cuadro clínico y el momento de la obtención de muestras seriadas.
- 4.- Recoger la muestra en receptáculos adecuados según el tipo de muestra y estériles.
- 5.- En lo posible obtener la muestra previo al tratamiento con antimicrobianos.
- 6.- Las muestras deben ser identificadas con una etiqueta adherida al envase, y los datos anotados deben coincidir exactamente con los de la solicitud de examen.
- 7.- Deben incluirse aquellos datos del paciente que permitan al laboratorio elegir el mejor procedimiento para el aislamiento de patógenos, tales como edad, hipótesis diagnóstica, tratamientos concomitantes (especialmente antibióticos) enfermedades concomitantes, etcétera.

Transporte de la muestra

Las muestras deben ser enviadas al laboratorio a la brevedad y en general es deseable no alterar sus condiciones fisiológicas. Esto es fundamental en cuadros clínicos, en los que los exámenes implican recuento bacteriano, por ejemplo, infecciones urinarias e infecciones del tracto respiratorio inferior, entre otras.

DETECCIÓN DIRECTA DEL MICROORGANISMO

Microbiología tradicional

El estudio tradicional contempla varias etapas (Figura 10-2). En general, comienza con la observación microscópica, ya sea de material al fresco o teñido, para visualizar elementos

que nos permitan entregar un diagnóstico preliminar al médico clínico. La observación al fresco es de gran utilidad en la observación de protozoos como *Thichomonas*. La tinción mas utilizada en bacteriología es la tinción de Gram que nos permite obtener información sobre la morfología, reacción tintorial y agrupación de la mayoría de las bacterias. Un ejemplo de su utilidad, es el análisis de líquidos de cavidades estériles, especialmente de LCR, proporcionado valiosa información para el manejo de la meningitis bacteriana aguda.

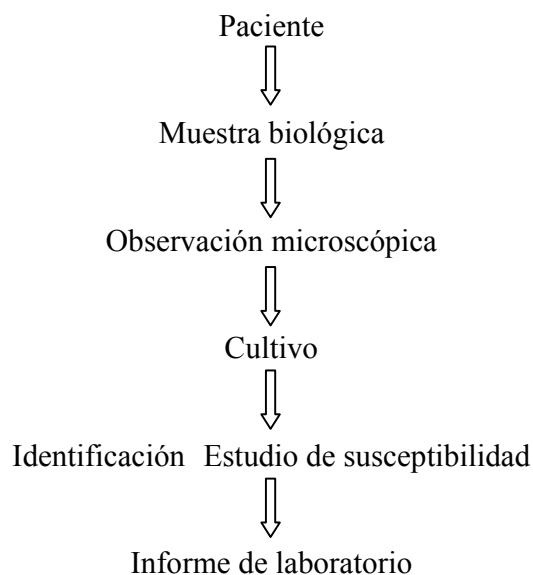


Figura 10-2: Etapas del diagnóstico tradicional.

Una segunda etapa corresponde al cultivo microbiano: Esta técnica sigue siendo el “*gold standard*” para la mayoría de los agentes bacterianos. Consiste en la inoculación de la muestra en medios de cultivos apropiados, seleccionados de acuerdo al conocimiento de la fisiología de las bacterias y al cuadro clínico. Este procedimiento permite obtener desarrollo bacteriano suficiente para proceder con la identificación de la bacteria, la cual se realiza generalmente a través de un conjunto de pruebas bioquímicas, utilizando métodos tradicionales o automatizados.

Detección de antígeno mediante inmunoensayos

Otra alternativa para realizar un diagnóstico directo, se relaciona con la capacidad de su detección completa o algunos de sus componentes, a través de reacciones antígeno-anticuerpo. Estas técnicas son utilizadas generalmente en el diagnóstico de *Chlamydia*, *Legionella*, *Borrelia*, entre otras. Entre las técnicas mas empleadas, esta la de

enzima-inmuno-enzayos (EIE), en la que generalmente, la detección de antígenos se obtiene mediante la reacción de éste con un anticuerpo específico, acoplado a enzimas, para revelar su presencia al adicionar el substrato apropiado. Otra técnica ampliamente utilizada es la inmunofluorescencia. En esta, la reacción antígeno-anticuerpo se visualiza mediante la adición de fluorocromos, substancias que emiten fluorescencia, (Figura 10-3).

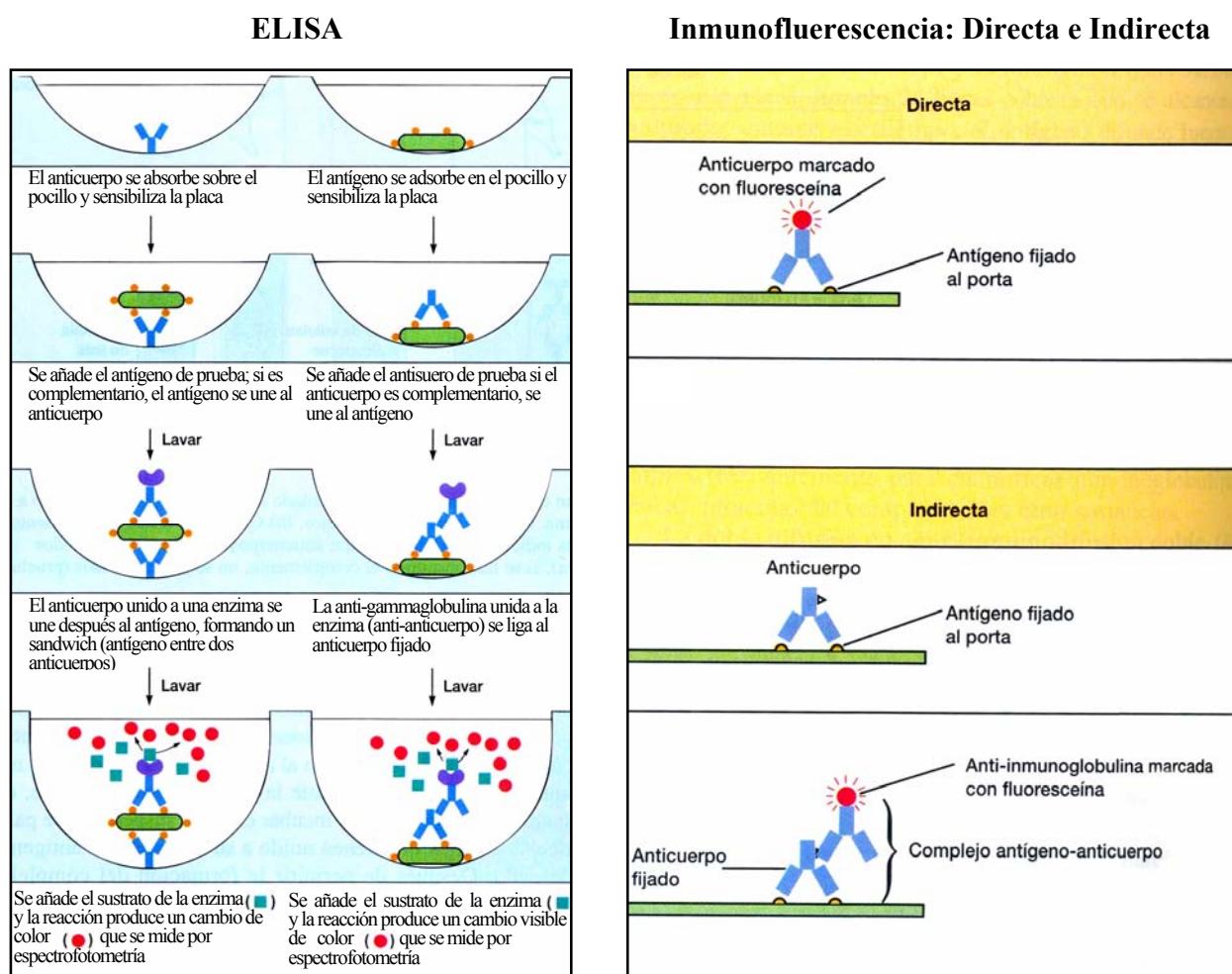


Figura 10-3: Detección de antígeno mediante inmunoensayos.

Detección de ácidos nucleicos

Actualmente, otra posibilidad de diagnóstico directo, la constituye la detección de ácidos nucleicos mediante técnicas de biología molecular. El principal aporte de esta tecnología,

en microbiología clínica, ha sido en el diagnóstico, pero además ha permitido el estudio de los mecanismos de resistencia bacteriana y el desarrollo de la epidemiología molecular, especialmente en el estudio de brotes intrahospitalarios. Dos de las técnicas más utilizadas corresponden a hibridación con sonda y PCR. La **hibridación con sonda**, se basa en la capacidad del ADN monocatenario de reconocer secuencias complementarias e hibridar, formando molécula híbrida de ADN de doble cadena. Por otro lado, la **PCR** es una técnica *in vitro*, que permite amplificar una secuencia específica, es decir, aumentar el número de moléculas de ese ADN. Para ello, se emplean ADN polimerasas termoestables, como la Taq polimerasa, y partidores de oligonucleótidos, complementarios a las secuencias de los extremos del ADN blanco a amplificar. A partir de los extremos 3'OH de cada partidor, se iniciará la síntesis de ADN, con la polimerización de nucleótidos.

Desde el punto de vista asistencial, su aporte se relaciona con el diagnóstico de microorganismos que no crecen *in vitro* o cuyos cultivos existen, pero son poco sensibles o en aquellos agentes infecciosos que requieren medios complejos o cultivos celulares (en general poco accesibles en los laboratorios asistenciales) o microorganismos que requieren un tiempo de incubación prolongada. Ej. *B. pertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia*, *Mycobacterium tuberculosis* (presencia extrapulmonar), entre otros.

DETECCIÓN INDIRECTA DEL MICROORGANISMO

Detección de Anticuerpos específicos (serología)

En algunas oportunidades, es impracticable la detección directa de agente y debemos recurrir a la detección de anticuerpos específicos, producidos por el hospedero como respuesta a la presencia del antígeno. Este análisis constituye el diagnóstico indirecto. Se utiliza fundamentalmente en el diagnóstico de bacterias no cultivables (*T. pallidum*), o en situaciones de riesgo biológico elevado (*Legionella*), o cuando no es posible implementar técnicas de diagnóstico de directo en el laboratorio de rutina (*Mycoplasmas*, *Chlamydia*). Sin embargo, se debe considerar que los resultados con estas técnicas, pueden ser alterados por varios factores, como por ejemplo, el estado del paciente, la técnica utilizada y el momento de obtención de muestra. Las técnicas más utilizadas son Inmuno-Ensayos, como ELISA, Inmunofluorescencia y “Western blot”.

Los exámenes serológicos se usan en la determinación del grado de inmunidad que posee un paciente.

Diagnóstico del estado inmune. A veces es importante conocer el estado inmune del sujeto. Un ejemplo, es determinar el grado de inmunidad frente a rubéola en una mujer en edad fértil.

Diagnóstico de infección aguda. El diagnóstico de infección aguda se establece comparando los títulos de dos sueros pareados, uno obtenido en la fase aguda obtenido tan pronto como sea posible en el transcurso de la enfermedad y otro suero en la fase convaleciente debe extraerse no antes de 10 días de comenzada la enfermedad, de preferencia 2-4 semanas después. La conversión de seronegativo a seropositivo o un

aumento de 4 veces o más del título de anticuerpos obtenido inicialmente es indicador de infección reciente.

Muestra única de suero (fase aguda). En algunas situaciones una muestra única de suero también puede ser útil para el diagnóstico. Los anticuerpos tipo IgM aparecen tempranamente durante la infección primaria y persisten por varias semanas. Por lo tanto la presencia de anticuerpos IgM es indicadora de infección reciente.

ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD

Las pruebas de sensibilidad *in vitro* se realizan en aquellos microorganismos cuya susceptibilidad no se puede predecir ej.: *Staphylococcus*, bacilos Gram (-) entéricos, BNF, entre otros. También se pueden indicar con fines epidemiológicos, como primera aproximación a la caracterización de cepas en el estudio de brotes intrahospitalarios.

Las pruebas de sensibilidad *in vitro* no están indicadas en aquellos microorganismos en los que no se ha descrito Resistencia al antimicrobiano de elección. Ej: *Corynebacterium diphtheriae*, frente a la penicilina. Tampoco están indicadas en microorganismos de la microbiota normal, que no juegan un rol patógeno.

El laboratorio proporciona información, a través de métodos estandarizados *in vitro*, de la actividad de los antimicrobianos frente al microorganismo patógeno aislado. Sin embargo, el clínico selecciona el antimicrobiano a usar considerando, esta información más otros factores que inciden en el comportamiento del fármaco *in vivo* (Ej: insuficiencia renal y alergias).

1.- Difusión en agar (Método de kirby-bauer)

A partir de un cultivo puro, se prepara un inóculo estandarizado a 0.5 unidades Mc Farland (1.5×10^8 ufc/ml). Se siembra en placa de agar para formar un tapiz homogéneo. Se enfrenta con diversos antimicrobianos en forma de sensidiscos según la cepa en estudio y el cuadro clínico. Los resultados se entregan como sensible, intermedio o resistente, según las tablas internacionales del National Committee for Control of Laboratory Standards (NCCLS).

2.- Métodos de sensibilidad en dilución (determinación de CIM)

Se usan para determinar la concentración mínima exacta del antimicrobiano (cuantitativo) que inhibe el crecimiento (CIM) para un determinado microorganismo. En este método, el microorganismo es incubado en diluciones seriadas del antimicrobiano.

La CIM se define como la mínima concentración del antimicrobiano en la cual no hay crecimiento microbiano aparente. Permite confirmar la susceptibilidad o resistencia de cepas que presentan sensibilidad intermedia por el método de difusión en agar, o cuyos resultados son variables por otros métodos. Esta técnica se puede realizar en caldo (tubo o microplaca) o en agar.

3.- E. test

Este método es relativamente nuevo, corresponde a una técnica cuantitativa (CIM), en él cual se combinan los principios básicos de los métodos de estudio de susceptibilidad por difusión y dilución en agar antes mencionados.

En el E. test, el inóculo estandarizado es diseminado en una placa de agar para formar un césped homogéneo. Sobre este inóculo se deposita una tira impregnada en una gradiente de concentración del antimicrobiano a estudiar. El agente antimicrobiano difunde sobre el agar y la CIM. corresponde al punto de intersección entre la inhibición del crecimiento bacteriano y la concentración del antimicrobiano.

INFORMACIÓN EPIDEMIOLÓGICA

Finalmente, el estudio microbiológico aporta información epidemiológica valiosa que nos permite mantener una vigilancia de los agentes más prevalentes a nivel local. Otro aspecto relevante, es contar con un registro de su comportamiento frente a los antimicrobianos y así escoger la terapia empírica local más adecuada. Además, de la caracterización fenotípica y de antibiotipo. Por otro lado la epidemiología molecular basada en el análisis de restricción del ADN bacteriano siendo la electroforesis de campo pulsado una de las más utilizadas, esta técnica consiste en cortar el ADN con ciertas Enzimas de Restriccion, hacer migrar el material mediante electroforesis y comparar los tamaños de los fragmentos, para establecer relaciones de clonalidad. Esta metodología permite complementar la epidemiología clásica en el análisis de brotes de infecciones intrahospitalarias. La caracterización más profunda de las cepas locales permite además complementar el diseño y el uso de vacunas en forma dirigida según los clones regionales circulantes.

BIBLIOGRAFÍA

Koneman W.E et al. 1999. Diagnóstico microbiológico texto y atlas color. Editorial Panamericana, Quinta edición.

Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F and Yolken R. 1995. Manual of clinical microbiology

Prescott M, Harley JP, Klein DA (eds). 1998. Zinsser Microbiología. Mc Graw-Hill Interamericana. 4^a Edición.

