

Capítulo 6

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

***Antecedentes históricos**

***Panorama actual**

***Perspectivas**

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

En el siglo XVII el ser humano engrandeció sustancialmente su concepción del cosmos al aplicar los principios elementales de la óptica e inventar un par de instrumentos que amplificaron su visión. En el año de 1608 Galileo inicia sus observaciones astronómicas a través del telescopio mientras que en 1675 Anthony Van Leeuwenhoek, un mercader holandés aficionado al pulimento de lentes logra crear un microscopio capaz de incrementar hasta 200 veces el tamaño original. Con este instrumento Leeuwenhoek examinaba todo tipo de objetos de manera indiscriminada y describía cuanto veía en minucioso detalle en una serie de cartas dirigidas a la “Royal Society” de Londres. A través de sus lentes Leeuwenhoek descubrió los espermatozoides, los hematíes y hasta llega a ver fluir la sangre en los capilares de la cola de los renacuajos. En 1676 realiza un descubrimiento cardinal para la microbiología al observar la presencia de una gran cantidad de “animalitos” en el agua estancada. Analiza también las células del fermento y llegando al límite del poder amplificador de sus lentes describió los “gérmenes” que hoy conocemos como protozoarios y bacterias.



*Anthony Van
Leeuwenhoek.
El microscopio
Dibujo: Nora Souza*

Un siglo más tarde en el año de 1860, se pudo establecer el nacimiento de la microbiología gracias a los trabajos de Pasteur, los cuales desecharon las ideas del surgimiento de la vida por generación espontánea y establecieron la relación inequívoca entre los microorganismos y la enfermedad. Quince años después en 1875 Robert Koch estableció los postulados sobre los cuales se basa la bacteriología:



*Telescopio. Galileo
1564-1642*



***Louis Pasteur 1822-1895.
Microbiología
Dibujo: Nora Souza***

- El microorganismo se debe encontrar regularmente en las lesiones que produce la enfermedad.
- El agente causal debe aislarse en un medio de cultivo puro.
- La inoculación del agente causal en animales de experimentación debe ser capaz de reproducir las lesiones características de la enfermedad.
- El microorganismo se debe encontrar en las lesiones del animal inoculado.



***Roberto Koch 1843-1910.
Premio Nobel
de Medicina 1905
Dibujo: Nora Souza***

Los postulados de Koch hicieron hincapié, en dos aspectos fundamentales:

- El aislamiento e identificación del agente etiológico.
- La caracterización específica de las lesiones.

Gracias a los estudios de Jenner (1797), Metchnikoff (1881), Koch (1882) y de Pasteur (1885), se logra establecer que el paciente es capaz de responder a la agresión en forma inespecífica a través de la respuesta inflamatoria y de manera específica a través de la inmunidad. Esto permitió al propio Koch (1890) plantear la posibilidad de desarrollar una vacuna contra la tuberculosis y aunque se fracasa en el intento de proteger al susceptible, sus experimentos permitieron apoyar el diagnóstico por medio de la prueba de la tuberculina.

Al cabo de seis años, Widal (1896) describió las reacciones serológicas para el diagnóstico de la fiebre tifoidea poniendo de manifiesto la participación de un elemento humoral del sistema inmune; del mismo modo Wasserman desarrolla el serodiagnóstico de la sífilis en el año de 1906.

La primera mitad del siglo XX fue fructífera particularmente en lo relacionado a terapia antimicrobiana. Ehrlich fue el pionero al desarrollar el tratamiento de tripanosomiasis y de la sífilis



*A. Fleming 1881-1955.
Premio Nobel
de Medicina 1945.
Dibujo: Nora Souza*

(1907-1908); más tarde Fleming destacó por el descubrimiento de la penicilina en 1928 seguido por Domagk quien descubrió las sulfamidas en 1939 y Waksman quien inicia la era de los aminoglucósidos al descubrir la estreptomicina en 1944.

Por más de trescientos años el desarrollo de la ciencia y de la técnica ha sido fértil en infectología, bacteriología, micología, antisepsia, antibióticos, inmunología, virología y genética.

“Del microscopio óptico a la reacción de polimerasa en cadena”

1673	Leeuwenhoek	Microscopia óptica
1797	Jenner	Vacuna contra viruela
1853	Robin	Aislamiento de <i>Candida albicans</i>
1860	Pasteur	Relación microbio enfermedad
1861	Semmelweis	Profilaxis de fiebre puerperal
1866	Lister	Antisepsis con fenol
1875	Koch	Postulados microbiológicos
1881	Metchnikoff	Leucocitos y fagocitosis
1882	Koch	Descubrimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
1884	Gram	Tinción taxonómica
1885	Pasteur	Vacuna contra la rabia
1890	Koch	Diagnóstico con tuberculina
1892	Posadas	Coccidioidomycosis
1892	Iwanosky	Virus de la hoja del tabaco
1894	Busse	Descripción de cryptococosis
1896	Widal	Serología de tifoidea
1901	Von Behring	Antitoxina diftérica
1906	Wasserman	Reacciones serológicas
1906	Darling	Descripción de histoplasmosis
1907	Ehrlich	Tratamiento de tripanosomas
1908	Ehrlich	Trata sífilis con salvarsán
1912	Carrel	Cultivo de células <i>in vitro</i>
1920	Landsteiner	Antigenicidad con haptenos
1921	Calmette/Guerin	Vacuna BCG contra tuberculosis
1928	Fleming	Penicilina
1933	Knoll/Ruska	Microscopio electrónico
1937	Tiselius/Kabat	Electroforesis de proteínas
1939	Domagk	Sulfamidas
1944	Waksman	Estreptomicina
1950	Yalow/Benson	Radioinmunoanálisis
1953	Watson/Crick	Estructura del DNA
1955	Kornberg	DNA polimerasa
1957	Salk/Sabin	Vacunas contra polio
1967	Nakane/Pierce	Ensayos inmunoenzimáticos
1969	Kleppe/Khorana	Amplificación de DNA de levaduras
1971	Engvall	Pruebas ELISA
1975	Kohler/Milstein	Hibridomas y Ac monoclonales
1983	Gallo/Montaigne	Descubrimiento virus HIV
1985	Mullis	PCR: reacción de polimerasa en cadena



*Microscopia.
Leeuwenhoek 1632-1723.*

PANORAMA ACTUAL

El laboratorio de microbiología convencional tiene la responsabilidad de realizar los estudios relacionados a las enfermedades infecciosas. A diferencia de las otras secciones del laboratorio se trabaja con sistemas vivos, dinámicos y los resultados son más cualitativos que cuantitativos. Las preguntas que generalmente plantea el médico al laboratorio son:

- ¿Existe una infección en el paciente?
- ¿Cuál es el agente causal?
- ¿Bacteria, virus, parásito, hongo?
- ¿Cuál es su susceptibilidad a los antimicrobianos?

El compromiso del laboratorio con el médico es el de proporcionarle la información que requiere en forma gradual conforme se va generando en el proceso analítico a fin de que sea oportuna y trascendente. Hoy día, la mayoría de los laboratorios de microbiología realizan el diagnóstico con elementos básicos:



*Albert Schweitzer 1875-1965.
Doctor en Medicina, Teología, Filosofía y
Música.*

1. Identificación del microorganismo:

- Tinciones.
- Medios de cultivo.
- Pruebas bioquímicas.

2. Evaluación a la susceptibilidad a los antimicrobianos

- Pruebas de difusión en placa.
- Pruebas de microdilución en placa
- Pruebas de dilución en tubo

Para obtener el máximo provecho del laboratorio microbiológico es indispensable que el médico cumpla las siguientes premisas:

1. Aportar al laboratorio la información clínica indispensable.
2. Tener conocimientos básicos de microbiología clínica.
3. Conocer las indicaciones y las limitaciones de las pruebas.
4. Solicitar el estudio en forma precisa.
5. Comunicarse constantemente con el laboratorio
6. Alertar al laboratorio sobre patógenos raros.
7. Tomar las muestras correctamente.
8. Conocer los criterios de trabajo del laboratorio
9. Prestar atención a los resultados.



Las enfermedades infecciosas ocupan el primer lugar en morbilidad en el mundo.

RECUERDE

- Ninguna otra área del laboratorio clínico maneja una diversidad de especímenes tan grande ni de manera tan amplia.
- En microbiología el proceso de selección, colección y transporte de muestras es más complejo que en el resto de las secciones del laboratorio. La calidad de la muestra es directamente proporcional a la calidad del resultado que se puede obtener.
- En ninguna otra área resulta tan importante la buena comunicación entre el médico y el laboratorio.
- El aislamiento de un germen no es suficiente para establecer un diagnóstico. Se requiere del criterio clínico para establecer si se trata de una colonización, contaminación o infección, respuestas que no pueden ser dadas por el laboratorio en forma aislada.
- Una vez que el médico ha realizado el examen clínico del paciente, el siguiente paso es el de la toma de muestras; esta etapa puede tener diversos grados de complejidad, requiere de conocimientos básicos, procedimientos adecuados que consideren el motivo del estudio, el estadio clínico del padecimiento y la utilización previa de antibióticos.

ANTES DE LA TOMA DE MUESTRAS ES IMPORTANTE:

- Saber qué es lo que se está buscando específicamente
- Saber cómo se toma la muestra ideal
- Comunicarse con el laboratorio para dar y obtener información

AL TOMAR LA MUESTRA ES IMPORTANTE:

- Tener conocimientos básicos de asepsia y antisepsia
- Evitar contaminación con floras saprofíticas
- Contar con los elementos indispensables: guantes, cubrebocas, jeringas, hisopos, medio de transporte, laminillas, etc. Buena iluminación.
- Evitar el uso de hisopos secos en tubos supuestamente estériles.

CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE:

- La muestra se debe enviar al laboratorio de inmediato.
- Describir el estudio que solicita en forma específica:

Solicitud de estudio microbiológico

Espécimen:	Líquido orgánico, absceso, LCR, etc.
Cultivo:	Aerobios, anaerobios, micobacterias, hongos, etc.
Tinciones:	Gram, Giemsa, Ziehl Neelsen, etc.
Antibiograma:	Antibióticos de cuadro básico o especiales.

ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y REPORTE DE RESULTADOS

El tipo de procesamiento y el tiempo de incubación depende en gran medida de la información preliminar y de los hallazgos. En general se puede completar un estudio en los siguientes lapsos:

Tiempo requerido para estudios microbiológicos

Aerobios	2 a 3 días
Anaerobios	3 a 5 días
Hemocultivos	1 a 7 días
BAAR	1 a 8 semanas
Hongos	1 a 8 semanas

Técnicamente el proceso analítico termina con la entrega de los resultados, sin embargo desde el punto de vista clínico continúa con la interpretación del médico y con la toma de decisiones. Se debe evaluar la consistencia de la información y decidir si se trata de una colonización, contaminación o infección. Habrá que elegir entre iniciar o no la antibioticoterapia. El apoyo del laboratorio puede extenderse también a estas etapas siempre que exista una comunicación clara, amable y oportuna.

PERSPECTIVAS

La segunda mitad del siglo XX pasará a la historia de la medicina como la era en la que se dieron los primeros pasos en biología molecular.

Avances fundamentales del siglo XX:

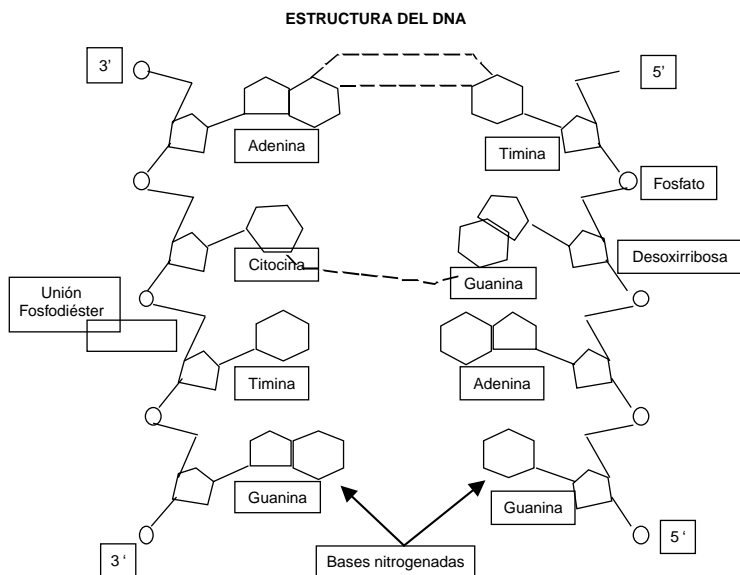
Electroforesis de proteínas (1937)

Descripción del DNA (1953)

Surgimiento de los inmunoensayos (1967)

Síntesis de los anticuerpos monoclonales por hibridomas (1975)

Amplificación del DNA por medio de la reacción de polimerasa en cadena (1985)



La evolución del conocimiento y de la técnica redunda en una mayor disponibilidad de elementos y recursos para el establecimiento del diagnóstico. A continuación se enumeran y discuten someramente los principales avances del laboratorio de microbiología.

1. Microscopio
2. Citocentrífuga
3. Citometría de flujo
4. Taxonomía por pruebas rápidas
5. Medios de cultivo
6. Bioterio
7. Inmunodiagnóstico
8. Antibiógramas
9. Genética y biología molecular
10. Biotecnología
11. Informática
12. Robótica

1. - MICROSCOPIA:

- | | |
|-------------------|--|
| A) De luz: | En fresco.
Campo oscuro.
Contraste de fases.
Tinciones. |
| B) Fluorescencia: | Directa: tinciones.
Indirecta: inmunofluorescencia. |
| C) Electrónica: | De transmisión
De barrido |

El microscopio ha sido durante mucho tiempo el principal instrumento del laboratorio microbiológico. La clasificación de los microorganismos ha dependido de las diferencias morfológicas y propiedades tintoriales. El microscopio de luz, el de campo oscuro y el de contraste de fases han sido de gran utilidad para el análisis en fresco del tamaño y de la forma, particularmente en el caso de treponemas, espiroquetas, protozoarios y para el estudio de las formas vegetativas en los microcultivos micológicos.

En la utilización de las tinciones y de los colorantes, destaca la tinción de Gram por ser la preferida para la clasificación de la



mayoría de las bacterias; del mismo modo la tinción de Ziehl Neelsen es la más adecuada para el estudio de las micobacterias por su cualidad de resistir la acidez. Existen tinciones fluorescentes tales como la de naranja de acridina y las de auramina fenol, las cuales pueden utilizarse en forma directa o acopladas a anticuerpos dando como resultado la inmunofluorescencia, la cual se caracteriza no sólo por su gran sensibilidad sino también por una alta especificidad. La tinción verde de malaquita es particularmente útil para observar esporas de *Clostridium sp.*

El poder de resolución del microscopio de luz es irrevocablemente limitado ya que con la iluminación habitual no pueden separarse netamente como entidades distintas a dos objetos que se encuentren separados por menos de 0.2 micras. El microscopio electrónico en cambio tiene un poder de resolución de una milésima de micra = 0.001μ . Con este instrumento es posible conocer en detalle la ultraestructura de los organelos intracelulares de los microorganismos más grandes (parásitos, hongos y bacterias) además de poderse visualizar los virus.

2. CITOCENTRÍFUGA:

La citocentrifugación surgió en el laboratorio a mediados de la década de los sesenta. Este instrumento se utiliza para concen-

trar especímenes, particularmente líquidos orgánicos y preparar laminillas para evaluación en el laboratorio. Después de procesar las muestras, se obtiene un sedimento de aproximadamente 6 mm de diámetro consistente en una monocapa de células y microorganismos bien preservados y desplegados.

Las aplicaciones de esta tecnología son múltiples, ya que se puede concentrar muestras de prácticamente cualquier líquido orgánico en cuestión de minutos para estudios citológicos y microbiológicos, los cuales pueden ser sometidos a microscopia de luz, microscopia electrónica, citoquímica, clonación, etc. La citocentrífuga además de ser extremadamente útil en el estudio de bacterias, hongos, parásitos y virus, se ha utilizado para el diagnóstico citológico de Papanicolaou, hematología, genética, análisis de cristales, etc.

En resumen, la citocentrífuga es una herramienta que sin duda está ganando una rápida aceptación en los laboratorios clínicos.

3. CITOMETRÍA DE FLUJO

Directa: Contadores de partículas.

Indirecta: Mediada por anticuerpos.

Los contadores de partículas se utilizan en el laboratorio clínico particularmente en el área de hematología donde sin duda han tenido un gran impacto en la realización de la biometría hemática, siendo capaces en la actualidad de hacer un análisis completo de la fórmula roja, cuenta total de leucocitos, análisis diferencial de la fórmula blanca, además de número y tamaño de plaquetas. Con un fundamento semejante, se han desarrollado instrumentos capaces de contar bacterias. Estos instrumentos encuentran su principal aplicación en la detección de piuria y bacteriuria, permitiendo hacer un escrutinio de qué orinas ameritan cultivo microbiológico y cuáles pueden ser como negativas a priori con una confiabilidad determinada a través del valor predictivo negativo de 99%, sobre todo cuando la piuria se encuentra en niveles de > 50 leucocitos/mm³. Hay que reconocer que el urocultivo es el procedimiento que con mayor frecuencia se solicita a los laboratorios de microbiología, de ahí que este instrumento sea extremadamente útil. De acuerdo a reportes de la

literatura, la utilización de esta tecnología puede llegar a reducir hasta 80% de los urocultivos. Los citómetros de flujo permiten una alta predicción de los cultivos que tendrán > de 100,000 UFC/mL, además de poder discriminar los casos en los que existe contaminación de la muestra. La utilización de estos instrumentos incrementa la confiabilidad y sobre todo la rapidez del diagnóstico.

En función de los resultados obtenidos con estos contadores de partículas, ya se han iniciado ensayos mediados por anticuerpos, análogos a los de la inmunofluorescencia indirecta con promesa de incursionar en el laboratorio clínico en los años venideros.

4. TAXONOMÍA POR PRUEBAS RÁPIDAS

Además de poder identificar a los microorganismos con bases morfológicas, en microbiología se realizan una serie de pruebas taxonómicas dependientes del metabolismo, capacidad de síntesis y cualidades de reproducción que por su rapidez, bajo costo y suficiente especificidad son ampliamente aceptadas. Estas pruebas permiten diferenciar a los géneros patógenos de los saprofíticos, los cuales aunque menos virulentos no deben ser subestimados, ya que está bien demostrado que se pueden comportar como oportunistas, particularmente en casos de pacientes inmunocomprometidos.

Taxonomía microbiológica por medio de pruebas rápidas

• Coagulasa:	Diferenciación de estafilococos
• Catalasa:	Diferenciación de estreptococos
• Indol:	Identificación de <i>E. coli</i>
• Sales biliares:	Identificación de neumococo
• Filamentación suero:	Identificación de <i>Candida albicans</i>

5. MEDIOS DE CULTIVO

La posibilidad de cultivar a los microorganismos en medios artificiales (bioquímicos y celulares) representa un avance significativo en medicina. Los primeros cultivos fueron logrados por Pasteur en medios líquidos, siendo Robert Koch el primero en

realizarlos en medios sólidos. Estos últimos tienen la gran ventaja de permitir el aislamiento del agente causal para someterlo a una serie de pruebas bioquímicas taxonómicas capaces de identificarlos, así como para evaluar la susceptibilidad a los antimicrobianos.

Alexis Carrel fue el pionero en cultivos celulares, los cuales han demostrado una gran utilidad, particularmente en virología.

Sobre la base del desarrollo tecnológico actual se dispone de instrumentos computarizados capaces de evaluar la curva de crecimiento bacteriano, identificar las bacterias, evaluar la susceptibilidad a los antimicrobianos con base en la concentración inhibitoria mínima (MIC) y generar un reporte completo para el médico tratante, la farmacia y el Comité de Infecciones y finalmente almacenar toda la información para fines epidemiológicos.

Cualidades de los medios de cultivo	
Medios de cultivo	Cualidad
1.- Transporte y enriquecimiento:	Nutrientes y anticoagulantes Inhibidores de antibióticos y de fagocitosis.
2. Inhibidores selectivos:	Resinas y antibióticos EH (anaerobios) Complementos (hemina/menadiona)
3. Bioquímicas diferenciales:	Fermentación carbohidratos, Sustratos proteicos.
4. Sistemas de detección:	pH, C ¹⁴ , turbidez , impedancia
5. Cultivos celulares (virus):	Efectos citopáticos y citolíticos

6. INOCULACIÓN DE ANIMALES

El bioterio del laboratorio clínico fue un elemento indispensable hasta hace relativamente poco tiempo. Con el advenimiento de las nuevas tecnologías este recurso se ha transformado en prescindible en la mayoría de los casos. Sin embargo, es indudable que en los laboratorios más especializados y en los centros de investigación seguirán desempeñando un papel fundamental. Hay que destacar que la única manera efectiva de cumplir con los postulados de Koch es contando con este valioso recurso; adicionalmente es posible obtener suero del animal inoculado en diversas etapas para realizar pruebas serológicas de "fase

aguda” y “fase convalescente” y de esta manera cuantificar la respuesta inmunológica.

- Demostración de agente causal.
- Histopatología de las lesiones.
- Demostración de la respuesta inmune.

7. INMUNODIAGNÓSTICO

- Detección del antígeno.
- Cuantificación de anticuerpos (IgG/IgM)
- Intradermorreacciones.

Inmunoensayos: La evolución de las pruebas inmunológicas se ha caracterizado por un incremento constante en sensibilidad y especificidad. Los primeros ensayos, dentro de los que destacan las pruebas de aglutinación y precipitación eran capaces de medir en miligramos; más tarde la inhibición de la hemaglutinación y la fijación de complemento permitieron detectar hasta un nivel de microgramos. El límite actual con radioinmunoensayo y las pruebas inmunoenzimáticas está en el orden del pico y de los femtogramos. Al igual que como ocurrió con el descubrimiento del microscopio electrónico, la capacidad de medición se expandió en un millón de veces.

Antígenos: La demostración de antígenos microbianos en líquidos orgánicos, sangre, tejidos, etc., son una alternativa útil a la observación microscópica y a los cultivos, sobre todo por las ventajas de su rapidez, el no requerir del microorganismo vivo, alta sensibilidad y especificidad. El número de métodos disponibles se ha incrementado significativamente; en la actualidad se dispone de pruebas de aglutinación, coaglutinación, contrainmunolectroforesis, radioinmunoanálisis, inmunofluorescencia y ELISA para detectar bacterias, hongos, parásitos y virus de la más diversa índole.

Anticuerpos: La demostración de anticuerpos IgG/IgM por medio de los inmunoensayos representa un avance significativo en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, ya que elimina al menos en la mayoría de los casos, la necesidad de contar

con muestras pareadas de fase aguda y de fase convalescente. La interpretación de los resultados depende en principio de la presencia de sintomatología en el paciente, además de las combinaciones resultantes de la realización de los dos estudios.

Interpretación de pruebas inmunológicas			
Asintomático	IgM	IgG	Interpretación
	Neg	Neg	Susceptible
	Pos	Neg	Infección reciente
	Pos	Pos	Infección subyacente
	Neg	Pos	Inmune
Sintomático	IgM	IgG	Interpretación
	Neg	Neg	Otro diagnóstico o anergia
	Pos	Neg	Enfermedad aguda
	Pos	Pos	Enfermedad activa
	Neg	Pos	Enfermedad crónica

Pruebas cutáneas: Las intradermorreacciones son útiles para establecer el antecedente de exposición a un antígeno, evaluar la respuesta inmune celular y en consecuencia apoyar el diagnóstico de una enfermedad infecciosa. Sobre la base de estas pruebas se puede establecer el diagnóstico de anergia cuando existe ausencia total de reactividad cutánea a una batería de antígenos comunes. En la actualidad se cuenta con una serie de pruebas que se pueden aplicar en forma aislada o simultánea dentro de las que destacan: tuberculina (PPD), histoplasmina, coccidioidina, candidina, tétanos, difteria, estreptococo, tricofiton, proteus, varidasa, etc. Una intradermorreacción positiva no es suficiente evidencia para establecer el diagnóstico definitivo de infección activa.

8. ANTIBIOGRAMAS

- Pruebas de difusión en placa: Kirby Bauer.
- Pruebas en medios líquidos: concentración inhibitoria mínima.
- Análisis sérico bactericida

Hace más de 50 años que se inició el uso de sulfonamidas y otros antimicrobianos en medicina . A partir de entonces más de 100 drogas han sido usadas y muchas más surgen cada año. Aunque los antibióticos representan uno de los más grandes logros de la ciencia, han sido incapaces de erradicar las infecciones de la faz de la tierra como algunos optimistamente pronosticaron. Esto se debe en gran medida a la habilidad de los microorganismos para desarrollar resistencia, fenómeno que por sí mismo ha sido tan importante como el surgimiento de los antibióticos.

El uso de medicamentos en microorganismos resistentes puede tener efectos desastrosos. Para contrarrestar este fenómeno los clínicos utilizan combinaciones de antibióticos dentro de los que incluyen un beta lactámico, un aminoglicósido y un macrólido, con resultados impredecibles.

Existen diversas maneras de valorar la susceptibilidad microbiana a los antibióticos . En 1972 la Food and Drug Administration y en 1975 el National Committee for Clinical Laboratory recomendaron el método de Kirby Bauer para todos los laboratorios de los Estados Unidos, siendo aún en la actualidad el método más ampliamente utilizado. Los problemas que se presentan al estudiar la susceptibilidad dependen de múltiples factores, entre los que destacan la gran demanda del estudio, el gran número de microorganismos por evaluar, el aumento de drogas disponibles, etc., de ahí que se deba tener un control adecuado de la calidad. El médico al recibir los resultados debe tener en mente que lo que el laboratorio hace es determinar la susceptibilidad de un microorganismo específico a una droga específica en una dosis específica. El estudio no permite determinar la tolerancia del paciente al medicamento ni su capacidad de penetración a los sitios de infección (v. gr. abscesos).

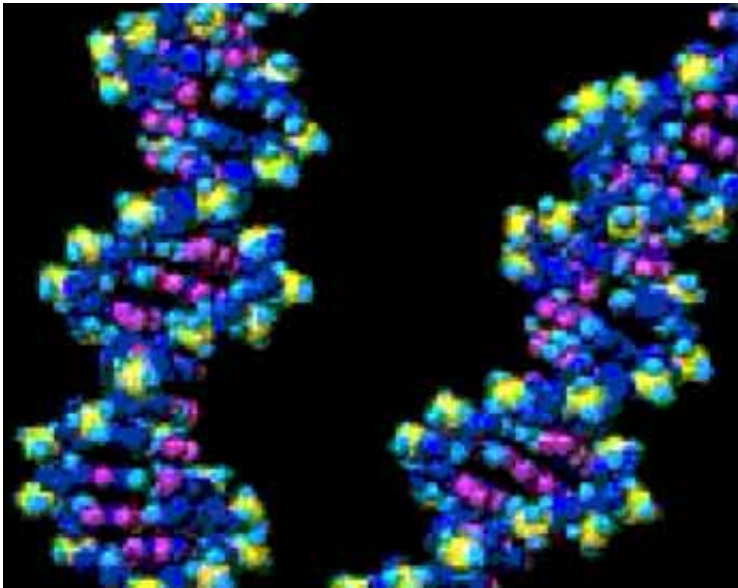
Con el surgimiento de la automatización está aumentando la disponibilidad de estudios de concentración mínima inhibitoria (MIC) sin embargo, aún son pocos los laboratorios que la realizan de rutina para todas las cepas aisladas y por otra parte los clínicos se confunden fácilmente al sustituir los ($\mu\text{g/mL}$) por el tradicional "Susceptible = S", "Resistente = R" o "Susceptibilidad Intermedia = SI".

Los estudios de laboratorio han demostrado la presencia de plásmidos de resistencia transferibles que hacen prever que en un futuro, en vez de realizar las pruebas de Kirby Bauer y la determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC), estaremos recurriendo al genoma para establecer la susceptibilidad de los microorganismos.

9. GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

- Reacción de polimerasa en cadena (PCR).
- Electroforesis.
- Hibridación.

En 1953, un físico inglés y un bioquímico norteamericano, Francis Crick y James Watson, respectivamente, reunieron toda la información disponible para elaborar un modelo revolucionario de las moléculas de ácidos nucleicos —un modelo que

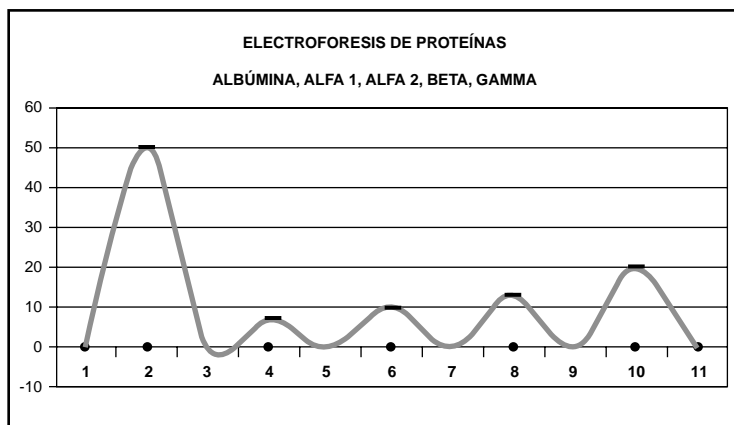


se representó como una doble hélice de bases púricas y pirimídicas enlazadas en cadenas paralelas por medio de azúcares y fosfatos dando como resultado los ácidos desoxirribonucleicos conocidos como DNA. El modelo de Watson y Crick permite explicar —entre muchas otras cosas— cómo puede un cromosoma duplicarse a sí mismo en el proceso de la división celular.

Reacción de polimerasa en cadena: La amplificación *in vitro* de un fragmento específico de DNA (sondas) por medios enzimáticos (DNA-Polimerasa) representa una poderosa herramienta de la tecnología molecular con múltiples aplicaciones en todas las áreas de la microbiología (virus, bacterias, hongos y parásitos). La amplificación del DNA permite incrementar la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico. Por medio de esta tecnología es posible reproducir un billón de copias de una molécula de DNA en cuestión de horas. El estudio de las secuencias de DNA permite, además de identificar al agente causal de la enfermedad, establecer su virulencia y susceptibilidad al tratamiento. Adicionalmente la PCR tiene gran importancia clínica en oncología, hematología, endocrinología, medicina legal, biología etc. En 1989 la revista Science consideró que se trata del descubrimiento de la década y predijo que la aplicación de esta herramienta alteraría el curso de la historia de la medicina.

Electroforesis: En 1937 Tiselius y Kabat perfeccionaron la separación de las proteínas en un campo eléctrico logrando así el análisis de la heterogeneidad de las moléculas. De esta técnica han derivado una gran cantidad de métodos dentro de los que destacan la electroforesis de zona en acetato de celulosa, electroforesis de alta resolución en agarosa, contrainmunolectroforesis, radioinmunolectroforesis, electroinmunodifusión y más recientemente la electroinmunotransferencia de la que existen tres versiones: Western Blott (DNA-Anticuerpos), Northern Blott (RNA-DNA) y Southern Blott (DNA-DNA) las cuales han sido de gran utilidad en microbiología al conjuntarse con las técnicas de hibridación.

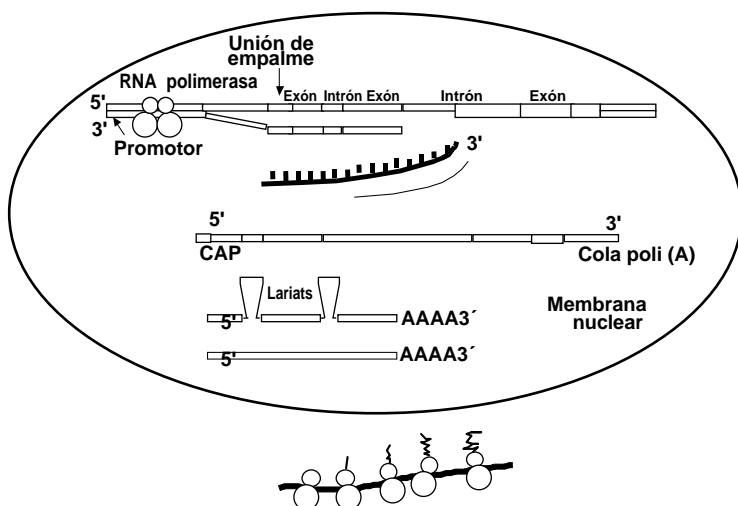
Hibridación: La hibridación de los ácidos nucleicos se refiere esencialmente al desarrollo de cualquier prueba capaz de detectar la presencia de un segmento específico de DNA o de



RNA utilizando una “sonda” complementaria a las bases púricas y pirimídicas y marcada ya sea por medio de material radioactivo, quemiluminiscente o enzimático. Hace cerca de 20 años que por primera vez se clonaron segmentos de DNA para identificar microorganismos de importancia clínica en los laboratorios de investigación básica. En un principio muchos predijeron una rápida expansión a los laboratorios clínicos, sin embargo la realidad es que el avance ha sido relativamente lento utilizándose principalmente en los centros médicos más desarrollados. Las pruebas resultan laboriosas y caras en la actualidad cuando se les compara con las demás metodologías actualmente disponibles, de ahí que aún estemos en espera de un impacto real el cual muy probablemente se desarrollará en los próximos años.

10. BIOTECNOLOGÍA

Se trata de la disciplina que se encarga de la producción de bienes y servicios a partir de sistemas biológicos o sus productos. Por procedimientos biotecnológicos se generan procesos para la producción industrial de aminoácidos, enzimas, proteínas, antibióticos, hormonas, anticuerpos, etc., empleando células microbianas, vegetales o de animales. Estas actividades son consideradas en los medios científicos, políticos y sociales, nacional e



Síntesis de proteínas en ribosoma.

internacionalmente como de máxima prioridad, pues la biotecnología ha abierto alternativas para el bienestar de la vida humana y posiblemente para su supervivencia.

Anticuerpos monoclonales: En 1975 Kohler y Milstein describieron la manera de producir anticuerpos monoclonales a partir de hibridomas de ratón mantenidos en cultivo celular. Los hibridomas se obtienen fusionando células de mieloma de ratón con linfocitos B procedentes del bazo de un ratón inmunizado. Desde su descubrimiento inicial los anticuerpos monoclonales han sido una herramienta importante en diagnóstico y actualmente desempeñan un importante papel en el desarrollo de mejores reactivos para el diagnóstico microbiológico.

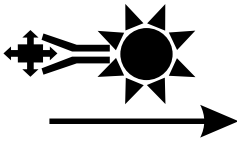
La amplificación del DNA, la hibridización de los ácidos nucleicos, las técnicas de electroforesis y la preparación de los anticuerpos monoclonales son los avances más significativos de la biología molecular.

11. INFORMÁTICA

- Bases de datos:
 - Interpretación de pruebas bioquímicas.

**ANTICUERPOS MONOCLONALES
CULTIVOS CELULARES
"HIBRIDOMA"**

Linfocitos sensibilizados



Anticuerpos monoclonales

- Utilización de antibióticos.
- Epidemiología intrahospitalaria.
- Sistemas expertos:
 - Apoyo en diagnóstico y en toma de decisiones.
 - Análisis de información en historia clínica.
 - Correlación de datos.
 - Teorema de Bayes y valor predictivo positivo.

12. ROBÓTICA

- Manejo de especímenes.
- Incremento en eficiencia y eficacia en la realización de pruebas.
- Eliminación de riesgos para el personal.
- Eliminación de contaminación de pruebas.

Hace más de 20 años que surgió la robótica y la informática en los laboratorios de química y hematología clínica, sin embargo no fue sino hasta finales de la década de los ochenta del siglo pasado cuando se hicieron los primeros prototipos para microbiología. El efecto esperado en esta área, además de incrementar la confiabilidad, la eficiencia, la rapidez y la productividad, será aumentar la seguridad del personal expuesto a

agentes patógenos y por ende de adquirir infecciones en el desempeño de sus labores, además de asesorar a los médicos en la toma de decisiones.

CONCLUSIÓN

Resulta evidente que la biología molecular representa una herramienta poderosa en el diagnóstico y monitoreo de los pacientes en la próxima década. La mayoría de estas técnicas pronto deberán ser realizadas rutinariamente en el laboratorio clínico. El progreso en la instrumentación, la informática y la robótica, facilitan el paso de estas metodologías desde el laboratorio de investigación básica hacia el laboratorio de patología clínica. La amplia aplicación de estas herramientas será el resultado de su gran sensibilidad, especificidad, velocidad y bajo costo. Aun cuando existe debate sobre los aspectos éticos de la utilización de las tecnologías recombinantes del DNA, estas pruebas están destinadas a jugar un papel central en el estudio de la enfermedad hasta transformarse en una herramienta indispensable en el ejercicio de la patología como especialidad médica.