

Revista Mexicana de Patología Clínica

Volumen **49**
Volume

Número **3**
Number

Julio-Septiembre **2002**
July-September

Artículo:

Perspectivas en diagnóstico microbiológico

Derechos reservados, Copyright © 2002:
Federación Mexicana de Patología Clínica, AC

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 [Índice de este número](#)
- 👉 [Más revistas](#)
- 👉 [Búsqueda](#)

*Others sections in
this web site:*

- 👉 [Contents of this number](#)
- 👉 [More journals](#)
- 👉 [Search](#)

Perspectivas en diagnóstico microbiológico

Palabras clave: Microbiología, diagnóstico, cito centrifuga, citometría de flujo, taxonomía por pruebas rápidas, medios de cultivo, bioterio, inmunodiagnóstico, antibiogramas, genética y biología molecular, biotecnología, informática, robótica.

Key words: Microbiology, diagnosis, cyto centrifuge, flow cytometry, taxonomy by fast tests, culture media, bioterio, immunodiagnosis, antibiograms, genetic and molecular biology, biotechnology, information technology, robotics.

Recibido: 12/03/02
Aceptado: 28/03/02

Arturo M. Terrés-Speziale*

* Director de Asesoría en Investigación y Desarrollo.

Correspondencia:
Dr. Arturo M. Terrés Speziale
Blvd. Adolfo López Mateos 2109-501
Del. Alvaro Obregón CP 01710
México D.F.
E-mail: arturoterres@hotmail.com
aterres@aidmx.com

Resumen

Antecedentes: El laboratorio clínico es el espacio físico donde se efectúa gran diversidad de procedimientos médicos, científicos, técnicos, etc., que en conjunto representan un valioso recurso de la clínica al documentar el estado de salud (medicina preventiva) o de enfermedad (medicina curativa). La razón por la que el médico envía al paciente al laboratorio es sólo una: necesita información para tomar decisiones adecuadas. El clínico observa en el paciente una serie de manifestaciones clínicas, signos y síntomas que para poder cuantificar deben ser traducidos a datos concretos para la toma de decisiones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas. **Objetivo:** Revisar la historia de la microbiología clínica para valorar los recursos actuales y estimar su evolución presente y futura. **Método:** Se trata de un artículo de revisión de la literatura. **Resultados:** Los estudios de microbiología tienen la característica particular de ser eminentemente etiológicos, lo cual permite brindar el tratamiento específico, generando un impacto significativo en la humanidad. El laboratorio de microbiología clínica ha tenido una evolución de varios siglos, desde el surgimiento del microscopio hasta el advenimiento de la inmunología, ingeniería genética y biología molecular, la cual se ha ido ampliando gradualmente hasta abarcar bacterias, hongos, parásitos y virus. **Discusión:** El diagnóstico clínico es el punto crítico más importante en la atención médica, ya que

Summary

Background: Clinical Laboratory is the physical space where several medical, scientific and technological procedures are developed. It represents a valuable medical tool for health evaluation (preventive medicine) and disease management (healing medicine). Physicians request tests for a single reason. They need reliable information in order to take proper decisions. Clinicians observe several manifestations on patients, including signs and symptoms that must be translated and quantified in order to make diagnosis, prognosis and treatment. **Objective:** To review clinical microbiology history in order to evaluate present resources and to estimate future applications. **Methodology:** This document is a review of previously published medical literature. **Results:** Microbiological studies have the particular characteristic of etiological approach. In consequence they allow specific treatment with a significant impact on humanity. Microbiology labs have evolved for several centuries from the microscope invention to the immunology, genetic engineering, and molecular biology development, that has been expanding while covering bacteria, fungus, parasites, and virus. **Discussion:** Each day it is becoming more evident that clinical diagnosis is the cornerstone of medical attention, since prognosis and treatment depend heavily on it. Depending on recent scientific and technological developments better tests are developed constantly. Even when clinical laboratories

de él depende el pronóstico y el tratamiento. Aunque el laboratorio juega un papel central en el diagnóstico, debemos reconocer que se trata de un ejercicio multidisciplinario en el que la clínica sospecha, los gabinetes apoyan y los laboratorios confirman o descartan. Gracias al desarrollo científico y tecnológico de nuestra era, constantemente surgen más y mejores procedimientos diagnósticos. Al introducir nuevas pruebas, se eliminan las que se hacen obsoletas, por lo que es indispensable evaluar sus ventajas y sus limitaciones. La tarea de los profesionales del laboratorio clínico debe ser propiciar un mejor, y no sólo mayor, uso de las pruebas.

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 examinó todo tipo de objetos de manera indiscriminada y describió 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 llegó 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 gran cantidad de "animalitos" en el agua estancada. Analizó también las células del fermento y en el límite del poder amplificador de sus lentes describió los "gérmenes" que hoy conocemos como protozoarios y bacterias.

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 enferme-

play a central role on clinical diagnosis it should be understood that this is a multidisciplinary process where physicians suspect, departments support and laboratories reject or confirm. During the introduction of new tests, older ones become obsolete and should be discarded depending on benefits and limitations An important labor of clinical laboratory professionals is to promote a better and not only an expanded use of lab tests.

dad. Quince años después en 1875 Robert Koch estableció los postulados sobre los cuales se basa la bacteriología:

- 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.

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 Pasteur (1885) se logró 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 fracasó 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 y puso de manifiesto la participación de un elemento humoral del sistema inmune, del mismo modo Wasserman desarrolló 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 tratamientos contra la tripanosomiasis y la sífilis (1907-1908); más tarde, en 1928 Flemming se destacó por el descubrimiento de la penicilina seguido por Domagk quien descubrió las sulfamidas en 1939 y Waksman que inició 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	Microscopía óptica
1797	Jenner	Vacuna contra la viruela
1853	Robin	Aislamiento de <i>Candida albicans</i>
1860	Pasteur	Relación microbio enfermedad
1861	Simmelweiss	Etiología y profilaxis de la 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	Coccidioidomicosis
1892	Iwanosky	Virus de la hoja del tabaco

1894	Busse	Descripción de criptococosis
1896	Widal	Serología de la tifoidea
1901	Von Behring	Antitoxina diftérica
1906	Wasserman	Reacciones serológicas
1906	Darling	Descripción de la histoplasmosis
1907	Ehrlich	Tratamiento de tripanosomiasis
1908	Ehrlich	Tratamiento de sífilis con salvarsán
1912	Carrel	Cultivo de células <i>in vitro</i>
1920	Landsteiner	Antigenicidad con haptenos
1921	Calmette-Guérin	Vacuna BCG contra la tuberculosis
1928	Flemming	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 la polio
1967	Nakane/Pierce	Ensayos inmunoenzimáticos
1969	Kleppe/Khorana	Amplificación de DNA de levaduras
1971	Engvall	Pruebas ELISA
1975	Kohler/Milstein	Hibridomas y anticuerpos monoclonales
1983	Gallo/Montaigne	Descubrimiento virus HIV
1985	Mullis	PCR: Reacción de polimerasa en cadena

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:

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

El compromiso del laboratorio con el médico es 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:

1. Identificación del microorganismo:

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

2. Evaluación de la susceptibilidad a los antimicrobianos

- Pruebas de difusión en placa.

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.

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, recolección 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 la toma de muestras, esta etapa puede tener diversos grados de complejidad, requiere de conocimientos básicos y 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 específicamente qué es lo que se está buscando.
- 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 saprofitas.

- Contar con los elementos indispensables: guantes, cubrebocas, jeringas, hisopos, medios de transporte, laminillas, etc. y 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 se solicita en forma específica:

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 dependen en gran medida de la información preliminar y de los hallazgos. En general se puede completar un estudio en los siguientes lapsos:

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 comunicación clara, amable y oportuna.

Perspectivas

La segunda mitad del siglo XX pasó a la historia de la medicina como la era en la que se dieron los primeros pasos en biología molecular. Cinco son los descubrimientos cardinales:

1. Electroforesis de proteínas (1937).
2. Descripción del DNA (1953).
3. Surgimiento de los inmunoensayos (1967).
4. Síntesis de los anticuerpos monoclonales por hibridomas (1975).
5. Amplificación del DNA por medio de la reacción de polimerasa en cadena (1985).

La evolución del conocimiento y de la técnica redundó en 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. Microscopia
2. Citocentrífuga
3. Citometría de flujo
4. Taxonomía por pruebas rápidas
5. Medios de cultivo
6. Bioterio
7. Inmunodiagnóstico
8. Antibiogramas
9. Genética y biología molecular
10. Biotecnología
11. Informática
12. Robótica

157

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 de las 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 los treponemas, espiroquetas y 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 la 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 irremediamente limitado ya que con la iluminación habitual no pueden separarse netamente como entidades distintas dos objetos que se encuentren a menos de 0.2 micras uno del otro. El microscopio electrónico en cambio tiene un poder de resolución de una milésima de micra = 0.001 μ . 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 poder visualizar los virus.

Citocentrífuga

La citocentrifugación surgió en el laboratorio a mediados de la década de los sesenta. Este instrumento se utiliza para concentrar 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 microscopía de luz, microscopía electrónica, citocímica, 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.

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 negativas *a priori* con una confiabilidad de 99% determinada a través del valor predictivo negativo, sobre todo cuando la piuria se encuentra en niveles de > 50 leucocitos/mm³. Hay que reconocer que el uro-

cultivo 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 clitómetros de flujo permiten 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 posibilidad de incursionar en el laboratorio clínico en los años venideros.

Taxonomía por pruebas rápidas

Además de poder identificar microorganismos con bases morfológicas en microbiología se realiza 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 los géneros patógenos de los saprofitos, 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.

- Coagulasa: diferenciación de estafilococos.
- Catalasa: diferenciación de estreptococos.
- Oxidasa: diferenciación de fermentadoras de glucosa.
- Indol: identificación de *E. coli*.
- Sales biliares: identificación de neumococo.
- Filamentación suero: identificación *Candida albicans*.

Medios de cultivo

La posibilidad de cultivar microorganismos en medios artificiales (bioquímicos y celulares) representa un avance significativo en medicina. Los primeros cultivos fueron logrados por Pasteur en medios líquidos, mientras que Robert Koch fue 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 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 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.

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

Inoculación de animales

El bioterio del laboratorio clínico fue un elemento indispensable hasta hace relativamente poco tiempo. Con el advenimiento de 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.

160

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 hemoaglutinación y la fijación de complemento permitieron detectar hasta microgramos. El límite actual con las pruebas de radioinmunoensayo y las inmunoenzimáticas está en el orden de pico y 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., es

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, contraelectroforesis, 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.

Asintomático	IgM	IgG	Interpretación
	-	-	Susceptible
	+	-	Infección reciente
	+	+	Infección subyacente
	-	+	Inmune
Sintomático	-	-	Otro diagnóstico o anergia
	+	-	Enfermedad aguda
	+	+	Enfermedad activa
	-	+	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.

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 optimístamente 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 las 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 cali-

dad. 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. Por otra parte, los clínicos se confunden fácilmente al sustituir los ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 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 el futuro en vez de realizar las pruebas de Kirby Bauer y la determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) recurriremos al genoma para establecer la susceptibilidad de los microorganismos.

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 pirimidicas 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 alterará el curso de la historia de la medicina.

162

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: electroforesis de zona en acetato de celulosa, electroforesis de alta resolución en agarosa, contraimmunoelectroforesis, radioinmunoelectroforesis, electroinmunodifusión y más recientemente la electroinmunotransferencia de la que existen tres versiones: WesternBlott (DNA-anticuerpos), NorthernBlott (RNA-DNA) y SouthernBlott (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 radiactivo, quemiluminiscente o enzi-

mático. Hace cerca de 20 años que por primera vez se clonaron segmentos de DNA en los laboratorios de investigación básica para identificar microorganismos de importancia clínica. 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. En la actualidad las pruebas resultan laboriosas y caras cuando se comparan con las demás metodologías disponibles, de ahí que aún estemos en espera de un impacto real en los laboratorios clínicos.

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 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 hibridación de los ácidos nucleicos, las técnicas de electroforesis y la

preparación de los anticuerpos monoclonales son los avances más significativos de la biología molecular.

Informática

- Bases de datos:
 - Interpretación de pruebas bioquímicas.
 - 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.

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 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. La mayoría de estas técnicas pronto deben 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 es 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.

Bibliografía

1. Henry JB. *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 18th ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 1991:1454.
2. Umiker W. *The customer oriented laboratory*. Chicago ASCP Press. 1991:189.
3. Speicher CE, Smith JW. *Elección de pruebas de laboratorio*. México: El Manual Moderno. 1987:414.
4. Wallach J. *Interpretation of diagnostic tests*. 3a ed. Boston Little Brown and Co. 1978:639.
5. Shauna CA et al. *Clinical simulations in laboratory medicine*. Philadelphia: JB Lippincott Company. 1989:166.
6. Statland BE. *Clinical decision levels for lab tests*. NJ USA: Medical Economic Books. 1983:181.
7. Barnett RN. *Clinical laboratory statistics*. Little Brown and Co. 1971:
8. Lee LW. *Elementary principles of laboratory instruments*. 5th ed. Saint Louis: The CV Mosey Co. 1983.
9. Mourey L. *Manual de procedimientos del laboratorio clínico*. México. IMSS. 1978:158.
10. Mourey L. *Laboratorio clínico*. Cifras normales. México. IMSS. 1973:126.
11. Terrés SAM. *El laboratorio de patología clínica en medicina interna*. En: Uribe M. *Tratado de Medicina Interna*. México. Editorial Panamericana. 1988:2789-2800.
12. Terrés SAM. Utilidad de los estudios de laboratorio en el individuo supuestamente sano. *Rev Mex Patol Clin* 1987; 32: 2.
13. Goldberg J, Leal G, Terrés SAM. The incidence of positive stool samples in 100 healthy asymptomatic individuals. *Am J Gastroenterology* 1992; 87:9.
14. Watson JD. *La doble hélice*. Barcelona, España: Plaza y Janes Editores. 1968.
15. Kumate RJ. *La inmunología contemporánea*. Sobreiro de la Memoria de El Colegio Nacional. Tomo VIII Núm. 4, 1977.
16. Quintero RR (Compilador). *Prospectiva de la biotecnología en México*. México: Fundación Javier Barros Sierra. CONACYT. 1985:
17. Barriga AG, Castillo TN. Métodos actuales en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. *Rev Mex Patol Clin* 1986; 33: 174.

18. Fenoglio-Preiser CM, Wilman CHL. *Molecular diagnosis in pathology*. Baltimore USA: Williams and Wilkins. 1991:
19. Templeton NS. The polymerase chain reaction. History methods and applications. *Diagn Mol Path* 1992; 1: 58.
20. Terrés SAM. Septicemia, historia natural. *An Med Asoc Med Hosp ABC* 1982; 27: 24.
21. Terrés SAM. Informe epidemiológico del Comité de Infecciones. *An Med Asoc Med Hosp ABC* 1983; 28: 91.
22. Terrés SAM, Durazo QF et al. Manejo de las infecciones urinarias por antibiogramas de dos hospitales privados de la ciudad de México. *An Med Asoc Med Hosp ABC* 1986; 31:13.
23. Terrés SAM, Barreda GH. Valor predictivo de la tinción de Gram. *Rev Asoc Med Crit y Ter Int* 1988; II, 2.
24. Sánchez GF, Terrés SAM. Confiabilidad de la gota Gram en infecciones de vías urinarias. *An Med Asoc Med Hosp ABC* 1987; 32, 50.
25. Casimiro ME, Terrés SAM. Aplicación del valor predictivo total en infección de vías urinarias. *Rev Mex Patol Clin* 1987; 34: 4.
26. Terrés SAM, Moreno LLC. Infecciones intrahospitalarias por *Candida*. *An Med Asoc Med Hosp ABC* 1989; 34, 1.
27. Terrés SAM et al. El grupo piocianico y las infecciones intrahospitalarias. *Rev Mex Patol Clin* 1990; 37: 1.
28. Terrés SAM. Implications of informatics on health problems in Mexico. *Baylor Univ Med Center Proceedings* 1989; 2: 2.
29. Terrés SAM. Las especialidades médicas y la medicina general. *An Med Asoc Med Hosp ABC* 1992; 37:102.
30. Terrés SAM, Reyes FJ, Barreda H. Estudio de LCR en meningitis: Evaluación de confiabilidad. *Rev Mex Patol Clin* 1993; 40: 108-112.
31. Rojo GL, Terrés SAM. Optimización del Dx de IVU: Detección fotométrica de piuria y bacteriuria. *Rev Mex Patol Clin* 1994; 41: 94-99.
32. Zamora PA, Terrés SAM. Inmunodiagnóstico de neurocisticercosis en LCR. *Rev Mex Patol Clin* 1995; 42: 10-16.
33. Terrés SAM, López GJ. Impacto de la informática en la reingeniería de los laboratorios clínicos mexicanos. *Rev Mex Patol Clin* 1995; 42: 104-111.
34. Terrés SAM, Méndez MM, Hernández TA, Martínez ME. Contaminación atmosférica e infección respiratoria en la ciudad de México. *Rev Mex Patol Clin* 1996; 43: 104-112.
35. Zamora PA, Terrés SAM. Infección por VPH en mujeres y hombres mexicanos. Identificación por captura de híbridos. *Rev Mex Patol Clin* 1998; 45: 9-16.
36. Terrés SAM. Impacto de la patología clínica y de la biología molecular en el futuro de la medicina. *Rev Med IMSS* 1998; 36: 341-343.
37. Terrés SAM. Medicina del tercer milenio. *Rev Med IMSS* 1998; 36: 245-252.
38. NCCLS. *Expert Committee*. Laboratory automation: Communication with automated clinical laboratory systems standard auto3-P Vol 18 No 18. December 1998.