

EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA: IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO EN ODONTOLOGÍA

Dra. María Alejandra Bojanich
Especialista en Microbiología



Contenido

PARTE I	3
INTRODUCCIÓN	4
A. DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO	5
1. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA	5
2. TRANSPORTE DE LA MUESTRA	6
3. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA: IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	8
❖ MÉTODOS FENOTÍPICOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	9
❖ MÉTODOS GENOTÍPICOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	21
❖ MÉTODOS PROTEÓMICOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	22
B. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO	23
1. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA	23
2. TRANSPORTE DE LA MUESTRA	24
3. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA: IDENTIFICACIÓN VIROLÓGICA	24
C. DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO	28
1-RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA	28
2-TRANSPORTE DE LA MUESTRA	29
3. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA: IDENTIFICACIÓN MICOLÓGICA	29
D. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO	33
1- RECOLECCIÓN y TRANSPORTE DE LA MUESTRA	33
2-PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA: IDENTIFICACIÓN PARASITOLÓGICA	33
PARTE II	35
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE.....	36
ESTREPTOCOCOS ORALES	36
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS	38
CANDIDIASIS OROFARÍNGEA	41
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE CÁNDIDA ORAL	41
DETECCIÓN ORAL DEL VIRUS HPV	43
BIBLIOGRAFÍA	45

PARTE I

EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA: DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

INTRODUCCIÓN

El **diagnóstico microbiológico** es un conjunto de procedimientos y técnicas complementarias empleadas para establecer la etiología del agente responsable de una enfermedad infecciosa.

En los últimos años se le ha dado especial atención al rol que cumple el Laboratorio de Microbiología en el diagnóstico de los microorganismos de la cavidad bucal. El objetivo del laboratorio de microbiología es proporcionar al profesional odontólogo información sobre la presencia o ausencia de microorganismos patógenos o potencialmente patógenos y conocer la etiología microbiana de un proceso patológico infeccioso para que, en caso de ser necesario, seleccionar el antimicrobiano adecuado y determinar la eficacia del tratamiento realizado.

El diagnóstico microbiológico es un trabajo en equipo entre el odontólogo, que establece su diagnóstico presuntivo diferencial sobre la base del cuadro clínico y radiográfico, y el especialista en microbiología, que dependiendo del diagnóstico presuntivo, debe indicar como tomar y transportar la muestra clínica, así como también, orientar la metodología específica en el diagnóstico a seguir.

El **laboratorio de microbiología** es un lugar físico habilitado para manejar y estudiar microorganismos. El trabajo debe realizarse de acuerdo con los estándares técnicos y de seguridad propios de un laboratorio de Microbiología Clínica.

Es importante recordar que la finalidad es determinar los microorganismos presentes en la muestra a estudiar. Es preciso extremar las precauciones para evitar contaminaciones que den lugar a resultados erróneos.

Todas las muestras deben ser manejadas con precaución por su potencial de patogenicidad.

Los pasos a seguir para llegar al diagnóstico de una enfermedad infecciosa son:

1. Recolección de la muestra
2. Transporte de la muestra
3. Procesamiento de la muestra

A. DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

El diagnóstico bacteriológico puede definirse como el conjunto de procedimientos y técnicas complementarias empleadas para establecer la etiología del agente responsable de una enfermedad infecciosa.

1. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

La muestra clínica representa una porción o cantidad de material biológico que es sometida a pruebas para determinar la presencia o ausencia de microorganismos específicos, patógenos o potencialmente patógenos en los diferentes sitios de la boca.

Este es un paso muy importante deben tenerse en cuenta los siguientes requisitos:

- Debe ser seleccionada del área afectada, con el fin de aislar e identificar los agentes etiológicos del proceso infeccioso.
- Se debe obtener una cantidad adecuada, para realizar las diferentes pruebas diagnósticas.
- Es importante evitar arrastrar flora microbiana que habita normalmente en piel y mucosas.
- Debe ser tomada antes de administrar antimicrobianos al paciente.
- Debe realizarse en condiciones de máxima asepsia, evitando contaminaciones ambientales, del profesional y del propio enfermo.
- No debe estar en contacto con sustancias desinfectantes.

La toma de muestra (Figura 1: A, B, C).se debe realizar utilizando instrumental estéril, que pueden ser

A-Hisopos estériles para la toma de muestra de la mucosa oral.

B- Puntas de papel absorbentes para la toma de muestra de lugares como el surco gingival o la bolsa periodontal.

C- Citobrush estéril para muestras de mucosa.

Las muestras de zonas purulentas se pueden obtener mediante punción con jeringa y aguja, intentando obtener la máxima cantidad de muestra posible.

También se pueden tomar muestras de saliva que son de importancia para determinaciones microbiológicas, bioquímicas o moleculares.

Después de realizar la toma de la muestra, esta debe ser rotulada con el nombre del paciente, número de historia clínica, fecha y origen de la misma. Esta información debe corresponder con los datos de la orden de solicitud del estudio microbiológico.

Una vez obtenida correctamente la muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio, pues existen factores que pueden modificar la composición inicial de la misma, tales como: temperatura, humedad y algunas sustancias que producen los microorganismos que pueden inhibir el crecimiento de otros.

Si se sospecha de la existencia de microorganismos aerobios o anaerobios en el proceso infeccioso, las muestras pueden ser transportadas al laboratorio a través de procedimientos especiales. Sobre este punto es importante recordar que la mayor parte

de los microorganismos asociados a las enfermedades de la cavidad bucal son anaerobios facultativos o anaerobios estrictos, esta premisa deberá tenerse en cuenta a la hora de efectuar el transporte de muestras al laboratorio, ya que deben tomarse en cuenta ciertas precauciones, como por ejemplo, el uso de medios de transporte especiales que permitan la viabilidad de los microorganismos hasta ser sembrados en los medios de cultivo selectivos.

Toda la información diagnóstica que el laboratorio de microbiología puede proporcionar, depende de la calidad de la muestra recibida. Por ello, una toma mal realizada, pobremente recogida o mal transportada determinará un posible fallo en la recuperación de los agentes patógenos, que puede inducir a errores diagnósticos, e incluso a un tratamiento inadecuado del enfermo.

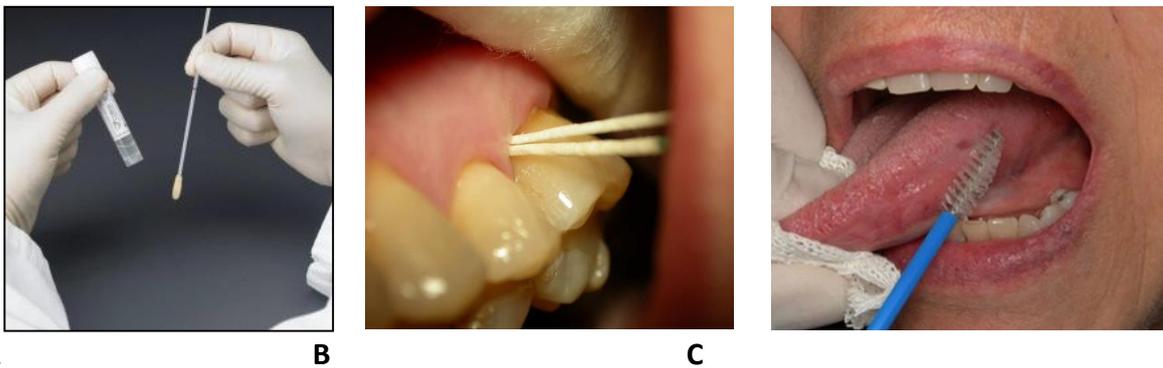


Figura 1: recolección de muestras microbiológicas de diferentes zonas de la boca. A.: con hisopo estéril; B: punta de papel estéril; C: citobrush.

2. TRANSPORTE DE LA MUESTRA

La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio, pues existen factores que pueden modificar la composición inicial de la misma, tales como: temperatura, humedad y algunas sustancias que producen los microorganismos que pueden inhibir el crecimiento de otros.

Para realizar esta acción se requiere de diferentes medios de transporte que deben ser utilizados desde el momento de la extracción de la muestra hasta su posterior estudio. Aseguran la viabilidad de las bacterias, sin multiplicación significativa de los microorganismos evitando también la posible la desecación de la muestra, lo que favorece la destrucción bacteriana. Se recomienda un límite de 2 horas desde la recolección de las muestras y su estudio en el laboratorio.

Existen medios de transporte que no son nutritivos, sino que preservan las bacterias existentes, sobre todo si son escasas, a la vez que impiden el crecimiento exagerado de otra flora bacteriana no deseada.

Los medios de transporte más frecuentemente utilizados son los de Stuart, Cary – Blair y Amies

- **Medio de STUART**

Permite la conservación y el transporte e un gran número de microorganismos patógenos, como *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus* spp., *Salmonella* sp., *Shigellas* sp., etc.

Se trata de un medio muy reducido debido a la presencia de tioglicolato que dificulta las reacciones enzimáticas de autólisis. A su vez, la ausencia de una fuente de nitrógeno evita la proliferación de la flora acompañante (Figura 2.A).

- **Medio Cary-Blair**

Es semisólido debido a la baja concentración de agar. Tiene un mínimo aporte de nutrientes que permite la recuperación de los microorganismos sin que haya replicación. El tioglicolato de sodio se incluye para proveer un bajo potencial redox; y el pH relativamente alto minimiza la destrucción bacteriana por acidificación (Figura 2.B).

- **Medio de AMIES**

Es una modificación del medio de Cary Blair. Básicamente, cambia el glicerofosfato por un fosfato inorgánico y el azul de metileno por carbón vegetal neutro farmacéutico. Además, añade iones calcio y magnesio, que ayudan a conservar la permeabilidad de la célula bacteriana.

Permite la supervivencia de organismos incluso hasta 48 horas. Es un medio apto para la conservación de una gran parte de patógenos como *Neisseria* sp., *Haemophilus* sp., *Corynebacterium* sp., *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, Enterobacterias, etc. (Figura 2, C).

Algunos microorganismos pueden resistir en el medio durante tres o más días, sin embargo, es conveniente que la muestra llegue al laboratorio antes de las 24 horas.



Figura 2: diferentes medios de transporte de muestras microbiológicas. **A:** Medio de STUART; **B:** Medio Cary-Blair; **C:** Medio de AMIES.

- **Medio de Transporte para Bacterias Anaeróbicas**

La mayoría de los aislamientos de muestras seleccionadas y recolectadas en el ambiente bucal corresponden a la categoría de anaerobios facultativos y obligados estrictos.

Los microorganismos anaerobios facultativos son más tolerantes a los efectos tóxicos de oxígeno que los anaerobios obligados estrictos.

Los factores limitantes fundamentales que pueden afectar el crecimiento de los anaerobios estrictos son: el efecto inhibitorio de oxígeno atmosférico y sus derivados tóxicos; y el potencial de óxido-reducción de los medios de cultivo. Los anaerobios obligados estrictos mueren cuando se exponen al oxígeno atmosférico durante 10 minutos o más. Las razones por la que los anaerobios varían su tolerancia al oxígeno depende de su producción de enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa y la

peroxidasa, que son protectoras contra los productos tóxicos de la reducción del oxígeno.

Las condiciones oxidantes que prevalecen en el tejido humano sano que está bien oxigenado y tiene un suministro de sangre continua son menores comparados con un medioambiente humano anaerobio como son los abscesos, o un tejido necrótico y el intestino grueso humano. Esto facilita el desarrollo de los anaerobios ya sean comensales o patógenos.

Lo anterior implica que para obtener un buen diagnóstico de una muestra en que se sospecha la presencia de anaerobios obligados, ya sean moderados o estrictos, las condiciones en que se transporta la muestra es de primordial importancia.

Los medios de transporte más utilizados para bacterias anaeróbicas o facultativas son: fluido de transporte reducido (FTR) que permite conservar la anaerobiosis de las muestras y el Anaerolin: compuesto por un frasco –ampolla con tapón de goma y sello de aluminio que contiene un medio líquido especial para recolección y desarrollo de anaerobios. Al cual se le han agregado sustancias reductoras como son el tioglicolato y la L –cistina que aseguran la reducción del medio (Figura 3).



Figura 3: medio Anaerolin con jeringa estéril para recolección de muestras microbiológicas anaeróbicas.

Una vez llegada la muestra al laboratorio, se procede a realizar la identificación del o los microorganismos.

3. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA: IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

Una de las tareas fundamentales del laboratorio de microbiología es la aplicación de una metodología precisa que permita la identificación de los microorganismos implicados en procesos clínicos asociados a infecciones o de aquellos que tienen relación con el ambiente bucal o el ser humano.

Con el objetivo de identificar el agente etiológico responsable del proceso infeccioso y para conocer las implicaciones patogénicas/patológicas, la evolución clínica y aplicar una terapia antimicrobiana eficaz, un pilar fundamental en la práctica de la microbiología clínica lo constituye la asignación de especie a un aislamiento microbiano.

Se presentan tres maneras diferentes de abordar la identificación bacteriana:

- a) métodos fenotípicos o tradicionales
- b) métodos genotípicos o moleculares
- c) métodos basados en la proteómica

Aunque no son los únicos, son los más importantes y los que mayor impacto tienen en el trabajo diario del microbiólogo.

Las técnicas **fenotípicas** son métodos que se realizan de manera rutinaria aunque muestran algunas limitaciones que se observan de manera específica y más evidente para algún tipo de microorganismos.

Los métodos **genotípicos** o moleculares permiten soslayar algunas de estas limitaciones, si bien su implementación no es universal en todos los laboratorios. Este hecho se debe al costo elevado y al grado de especialización del personal que se requiere para su aplicación.

La identificación molecular no es siempre accesible de forma inmediata y generalmente se utiliza conjuntamente con la identificación tradicional.

Los métodos basados en la **proteómica** han irrumpido, últimamente, de manera importante en el campo del diagnóstico microbiológico.

Dicha ciencia estudia al conjunto entero de proteínas expresadas en una célula.

❖ MÉTODOS FENOTÍPICOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

La identificación fenotípica bacteriana se basa en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas.

El cultivo, cuando es factible, continúa siendo el método diagnóstico de elección; permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y la aplicación de marcadores epidemiológicos.

En el cultivo es esencial la correcta elección del medio de crecimiento y las condiciones de incubación.

La elección de las diferentes pruebas bioquímicas está en función de la fiabilidad de las mismas, del género o de la especie bacteriana que se pretende identificar y del origen del aislado bacteriano.

En el proceso de identificación bacteriana tradicional se establecen tres niveles de procesamiento:

a) Pruebas primarias, como la de morfología a través de la tinción de Gram u otras tinciones, crecimiento en diferentes atmósferas de incubación, crecimiento en varios tipos de medios de cultivo. Utilizando estas pocas pruebas generalmente es posible situar a las bacterias, en uno de los principales **grupos** de importancia médica-odontológica.

b) El segundo nivel de identificación debe especificar el **género** al que pertenece el microorganismo. Tanto en este nivel como en el anterior, la hipótesis sobre la probable identidad de un microorganismo se apoya en las características del cultivo (por ejemplo atmósfera) y en pruebas primarias, con las cuales se puede determinar el género, grupo de géneros o en algún caso familia a la que pertenece un aislamiento.

Las pruebas primarias son: tinción de Gram, morfología, catalasa, oxidasa, oxidación-fermentación, fermentación de glucosa, producción de esporas, crecimiento en anaerobiosis y anaerobiosis y movilidad. Se debe tener en cuenta los datos clínicos que aporta el odontólogo.

c) Por último, la identificación a nivel de **especie**. El empleo de ciertas pruebas bioquímicas permite identificar con un alto grado de precisión la mayoría de las bacterias clínicamente significativas. Si la identificación no pudiera hacerse usando este

primer esquema, puede utilizarse una batería de pruebas más amplia como las que se encuentra en diferentes sistemas comerciales.

- **Microscopio**

El microscopio es el instrumento más necesario para un microbiólogo, ya que permite la observación de microorganismos que no pueden ser apreciados en detalle a simple vista. Su uso es indispensable para el estudio de la morfología y estructura de los microorganismos, así como, el comportamiento frente a diferentes colorantes.

Existe una gran variedad de microscopios que, según la fuente de iluminación utilizada, se agrupan en:

Microscopios ópticos: La fuente de iluminación es la luz.

- De campo claro. Permiten la observación de preparaciones, al natural o contrastadas mediante tinciones, resaltadas sobre un fondo más brillante (Figura 4. A).
- De campo oscuro. Permiten la observación de formas celulares que destacan brillantes sobre un fondo oscuro. Este efecto se consigue utilizando diafragmas especiales.
- De contraste de fases. Gracias a la utilización de diafragmas y objetivos especiales, que consiguen aumentar las diferencias en el índice de refracción de las células y el medio que las rodea, permiten la observación de células vivas, ya que no es necesario realizar ninguna tinción de las mismas.
- De interferencia. Permiten observar células vivas sin teñir, obteniéndose una imagen en relieve de las mismas.
- De fluorescencia. La luz ultravioleta que excita ciertas moléculas presentes en las células o añadidas a la preparación, y que emiten fluorescencia en el espectro visible.

Microscopios electrónicos: La fuente de iluminación es una fuente de electrones y las lentes son electroimanes.

- De transmisión. Permiten la observación de muestras teñidas con sustancias que son resistentes al paso de electrones y cortadas dando lugar a láminas finas, denominadas cortes finos. Los electrones no son visibles directamente por lo que éstos se envían a una pantalla que emite fluorescencia según el número de electrones que inciden en ella. Las estructuras celulares que se tiñan más intensamente impedirán el paso de electrones y por lo tanto no permitirán la emisión de fluorescencia, por lo que estas estructuras aparecerán oscuras en un fondo más brillante. Se consiguen entre 10.000 y 100.000 aumentos.
- De barrido. Permiten la observación de células enteras, sin necesidad de cortes finos, de modo que aparecen los relieves originales y las superficies externas. Alcanzan entre 1.000 y 10.000 aumentos (Figura 4. B).
- Confocal. Permite obtener imágenes bi y tridimensionales de alta resolución. Es un microscopio computarizado que acopla un láser. El análisis se realiza en forma digital por ordenador.

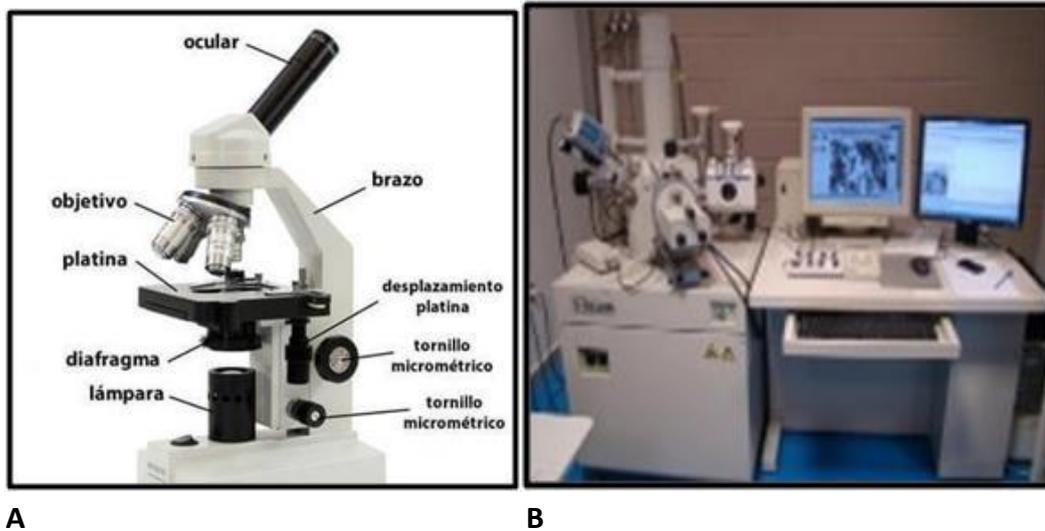


Figura 4: A: Microscopio óptico; B: Microscopio electrónico

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE LAS BACTERIAS

Como ya lo mencionamos, los organismos unicelulares son imperceptibles para el ojo humano y para observarlos es esencial el microscopio óptico.

El estudio microscópico en fresco y posterior tinción revela la forma y la manera de agruparse, la estructura de las células y su tamaño.

Los objetos a observar, deben poseer un cierto grado de contraste con su medio circundante para poder ser percibidos a través del microscopio. Por ello es que los microorganismos necesitan ser previamente teñidos para poder distinguirlos del medio (tinciones simples). Las tinciones son el primer paso, y ocasionalmente el único, para la identificación bacteriana.

* Tinciones y tipos de tinciones

La coloración o tinción es el proceso de teñir artificialmente los microorganismos con colorantes o reactivos para facilitar su estudio microscópico de forma, agrupación y estructuras.

Se pueden usar los colorantes de varias formas:

- Para teñir bacterias y hacerlas visibles al microscopio
- Para mostrar estructuras del organismo estudiado.
- Para la identificación de microorganismos en base a sus características de tinción, por ejemplo, si son o no alcohol-ácido resistentes, si son Gram positivas (Gram+) o Gram negativas (Gram -).
- En los medios de cultivo para inhibir el desarrollo de algunas bacterias y así poder estudiar selectivamente a los microorganismos que si crecen.

Existen diferentes tipos de tinciones:

-Tinción simple

Conocida con ese nombre ya que solo nos sirve para hacer más fácilmente visibles a las bacterias sin resaltar ninguna característica en especial. Por ejemplo: azul de metileno, para observación de microorganismos vivos.

También se utiliza el montaje directo húmedo o examen en fresco o sin colorante. En este caso las muestras se extienden directamente sobre la superficie de un portaobjetos para su observación y es fijado al calor.

-Tinción negativa.

Este método de tinción utiliza colorantes neutros o ácidos ya que tienen poca afinidad por la célula bacteriana, por lo tanto como no se absorben se colorea el fondo en el que están las bacterias pero la célula queda incolora y transparente, así pues las bacterias aparecen como pequeñas áreas iluminadas en un fondo oscuro. La tinción acídica con tinta china son las más usadas.

-Tinción diferencial.

Las bacterias se diferencian unas de otras tanto física como químicamente, por lo cual su reacción ante algunos colorantes también será diferente dando lugar así a grupos tintoreales característicos. Las más utilizadas e imprescindibles son la de Gram y la de Ziehl- Neelsen.

- **Tinción de Gram:** descubierta por Hans Christian Gram en 1884. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana, como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana: bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas (Figura 5).

Las bacterias Gram positivas, son aquellas que se tiñen de azul oscuro o violeta y las bacterias Gram negativas son aquellas que se tiñen de un color rosado tenue. Esta característica química está íntimamente ligada a la estructura de la pared celular de las bacterias, por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana.



Figura 5: tinción de Gram. Se utiliza para diferenciar y clasificar bacterias.

- **Tinción de Ziehl- Neelsen:** usada para la identificación de bacterias ácido-alcohol resistente (BAAR), como *Mycobacterium tuberculosis* o *M. marinum*, entre otros. Fue descrita por primera vez por dos médicos alemanes: Franz Ziehl, un

bacteriólogo, y Friedrich Neelsen (1882), un patólogo. Las paredes celulares de ciertas bacterias contienen ácidos grasos (ácidos micólicos) de cadena larga (50 a 90 átomos de carbono) que les confieren la propiedad de resistir la decoloración con alcohol-ácido, después de la tinción con colorantes básicos. Por esto se denominan ácido-alcohol resistente (Figura 6).



Figura 6: tinción de Ziehl-Neelsen para diferenciar bacterias ácido alcohol resistente.

-Tinción estructural.

Existen diferentes tipos de colorantes, que de acuerdo a su afinidad, se utilizan para teñir y detectar ciertas estructuras de la célula bacteriana como son las esporas, los flagelos y las cápsulas. Para visualizar formas específicas o distintas características morfológicas o estructurales se emplean tinciones diferenciales.

Se emplea la siguiente terminología en las preparaciones teñidas:

- forma: cocos, bacilos, cocobacilos, bacilos filamentosos, bacilos curvos, etc.
- cápsula: presente o ausente
- endosporas: ovales, esféricas, terminales, subterminales
- tamaño: cortos, largos, etc.
- bordes laterales: abultados, paralelos, cóncavos, irregulares
- extremos: redondeados, puntiagudos
- disposición: parejas, cadenas, tétradas, racimos, etc.
- variación en forma y tamaño: formas irregulares, ramificadas, fusiformes, etc.

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LAS BACTERIAS

*** Morfología**

La morfología de las colonias es fundamental en la identificación preliminar y para la diferenciación de los microorganismos. Para la observación morfológica es preferible examinar colonias de cultivos frescos crecidas en medios no selectivos o de cultivos puros compuestos por un solo tipo de microorganismo.

Las colonias de una única especie, cuando crecen en medios específicos se caracterizan por el tamaño, la forma, la consistencia, y a veces por su color.

El tamaño de las colonias bacterianas es generalmente uniforme entre una misma especie. Por ejemplo, las colonias de estreptococos tienen un tamaño más pequeño que las de los estafilococos y las enterobacterias.

La forma está determinada por los bordes y el grosor de la colonia. El borde puede ser liso o rugoso e irregular; la colonia, abultada o plana. La textura de la colonia es también importante. Puede variar desde seca a viscosa, con superficie lisa o granular.

Algunos microorganismos producen una colonia pigmentada, lo que puede ser de ayuda en el proceso de identificación, por ejemplo: *Pseudomona aeruginosa* (pigmento verde), *Serratia marcescens* (pigmento rojo); en una misma especie puede haber cepas no pigmentadas (Figura 7).

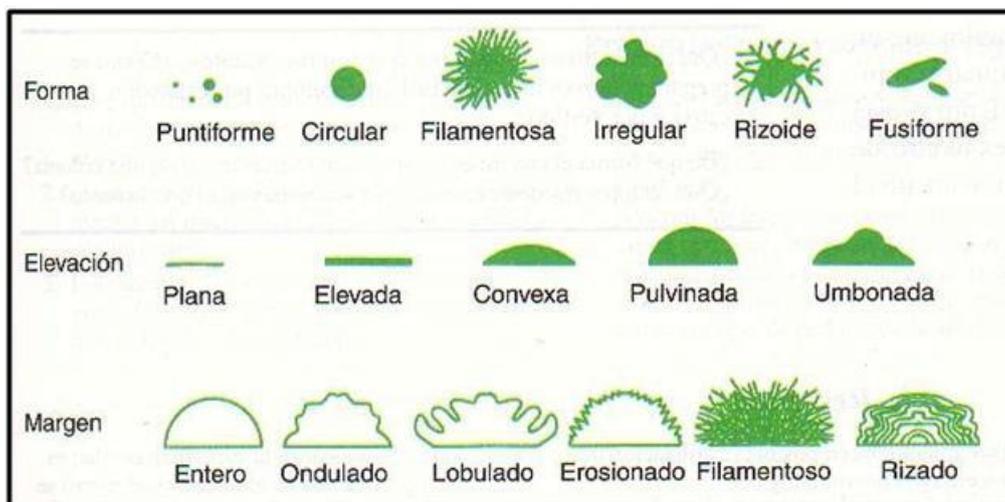


Figura 7: morfología y crecimiento de las colonias bacterianas

- **Medios de cultivos**

Se entiende por medio de cultivo al conjunto de nutrientes asimilables, balanceados en su concentración que, junto a factores ambientales adecuados, permiten el crecimiento y multiplicación de los microorganismos pretendiendo reproducir artificialmente las condiciones de su hábitat natural.

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad.

En los medios de cultivo las bacterias se multiplican y es necesario esperar al menos 18-24 horas para visualizarlas.

En términos generales todas las bacterias necesitan una fuente de energía, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, algunas sales, oligoelementos y agua.

Todos los medios de cultivo han de cumplir como mínimo con estos requisitos pero en muchas ocasiones se necesitan además otras sustancias adicionales como vitaminas, factores o aminoácidos esenciales.

Los medios de cultivo se utilizan para una amplia variedad de propósitos en el laboratorio, tales como:

- Aislamiento y propagación de bacterias

- Estudio de las propiedades fisiológicas, metabólicas, morfológicas, antigénicas y patogénicas de los microorganismos que sirven, entre otras cosas, para su identificación.
- Transporte y conservación de microorganismos.
- Estudio de la sensibilidad de los gérmenes a los antimicrobianos.
- Fabricación de antígenos para desarrollo de vacunas
- Selección de mutantes o variantes genéticas microbianas.

Con respecto a su **composición** los medios de cultivo pueden contener una gran variedad de sustancias; deben incluir los elementos indispensables para satisfacer todas las necesidades nutricionales de los microorganismos que se desea estudiar.

Los componentes más importantes son:

- Agua: constituye aproximadamente el 80-95% del medio de cultivo, permitiendo mantener en solución o suspensión a los demás constituyentes del medio.
- Peptonas: se obtienen por hidrólisis ácida o enzimática de proteínas. La gelatina, de carne, de soja o de albúmina constituyen una fuente fundamental de nitrógeno, pero también de carbono y azufre.
- Extractos de carne vacuna: son concentrados de productos hidrosolubles de la carne, aportan elementos muy ricos como xantina, glucógeno, vitaminas, oligoelementos, etc.
- Hidratos de carbono: los medios de cultivo pueden contener cualquier clase de mono, di y polisacáridos; se los usa como fuente de energía o para el estudio de su capacidad fermentativa.
- Minerales: se los usa en forma de sales inorgánicas. Los más utilizados son sodio, calcio, potasio, cloro, fósforo, azufre, hierro, cobre y magnesio.
- Factores de crecimiento: son otras sustancias que los microorganismos son incapaces de sintetizar por sí solos, como aminoácidos, vitaminas, bases púricas y pirimidínicas.
- Agentes selectivos: son sustancias químicas que, adicionadas al medio de cultivo, impiden el desarrollo de un grupo de bacterias sin inhibir otros.
Ejemplos: Colorantes cristal violeta que inhibe bacterias Gram positivas; verde brillante se usa en medios altamente selectivos para eliminar la flora acompañante Gram positivas y Gram negativas.
- Sustancias indicadoras: sirven para detectar algunas propiedades metabólicas de los gérmenes. Ejemplos: colorantes indicadores de pH como el azul de timol, rojo de fenol, azul de bromo timol.
- Sustancias de enriquecimiento: son sustancias que adicionadas al medio de cultivo permiten el desarrollo de microorganismos exigentes. Se emplea generalmente sangre total humana.

- Agentes solidificantes: se le incorporan para obtener medios de cultivo sólidos o semisólidos. El más utilizado es el agar, que es un polímero extraído de algas rojas.

El crecimiento de las bacterias, en un medio sólido, produce un gran número a partir de una única célula inicial de forma que, tras un periodo de tiempo de incubación y en las condiciones ambientales adecuadas, se produce una colonia de individuos iguales: **unidades formadoras de colonias (UFC), por mililitro o gramo de medio** (Figura 8).

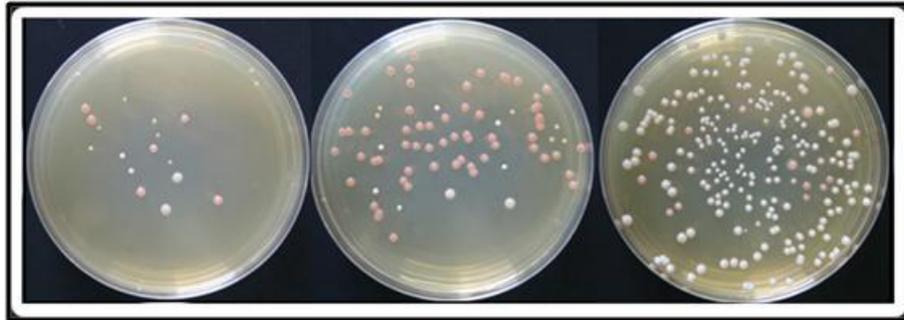


Figura 8: crecimiento de bacterias en un medio sólido. Dentro de un cultivo de células, una colonia debe presentar un crecimiento significativo para poder realizar el recuento de UFC de microorganismos.

Los medios de cultivo de pueden **clasificar** en:

- No selectivos: para cultivo de una amplia variedad de organismos. A menudo están enriquecidos con materiales como: sangre, suero, Hemoglobina, FX, FV, glutamina, u otros factores accesorios para el crecimiento de las bacterias (Agar Sangre, Agar Chocolate).
- Selectivos: se añaden sustancias que inhiban el crecimiento de ciertos grupos de bacterias, permitiendo a la vez el crecimiento de otras. (Mac Conkey, Kanamicina, Vancomicina).
- Para Enriquecimiento: suprimen el crecimiento de la flora competitiva normal potenciando el cultivo y crecimiento deseado (Selenito, medio con Vitamina K).
- Para Aislamiento: formulaciones nutritivas especiales que satisfacen requerimientos de grupos específicos de bacterias, ayudando a su identificación.
- Para Pruebas de Sensibilidad de Antibióticos: medios estandarizados en sus concentraciones iónicas para ser utilizados por la técnica de difusión con discos para determinar concentración inhibitoria mínima (CIM) de los antibióticos en las pruebas de sensibilidad.
- Para Preservación: medios diseñados para mantener viables por largos períodos de tiempo cepas microbianas en estado latente.
- Diferenciales: formulaciones especiales en las que se estudian las características bioquímicas y fisiológicas específicas de las bacterias: nutrición y respiración (Oxidación-Fermentación).

- Medios Cromogénicos: Formulas que se basan en las características enzimáticas de algunas bacterias que son capaces de desdoblar un sustrato cromogénico en un cromóforo que al quedar libre intracelular le otorga el color a la colonia . Esta es una reacción específica enzimática (Figura 9).

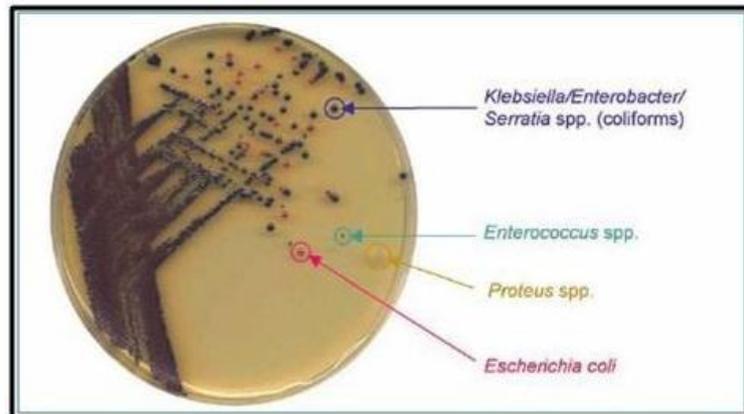


Figura 9: Características morfológicas de las colonias en un medio de cultivo sólido cromogénico

CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DE LAS BACTERIAS

El metabolismo bacteriano se define como el conjunto de procesos por los cuales un microorganismo obtiene la energía y los nutrientes que necesita para vivir y reproducirse.

Los microorganismos utilizan numerosos tipos de estrategias metabólicas distintas y las especies pueden a menudo distinguirse en base a estas estrategias.

En el laboratorio de microbiología se realizan diferentes pruebas metabólicas y bioquímicas de las bacterias para su identificación.

Se clasifican como: pruebas con lectura inmediata y pruebas con lectura lenta (18 a 48 horas).

***Pruebas con lectura inmediata**

- Catalasa: La catalasa es una enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan la catalasa hidrolizan el hidrogeno en agua y el oxígeno gaseoso que se libera produce burbujas.
- Oxidasa: Sirve para determinar la presencia se enzimas oxidantes. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciendo agua o peróxido de hidrogeno según la especie *Moraxella*, *Helicobacter* y *Brucella*.
- Indol: Mediante esta prueba se detecta la liberación de indol en un cultivo bacteriano. Dicha liberación se debe a la degradación del aminoácido triptófano mediante la enzima triptófanoasa.

* **Pruebas con lectura lenta a las 18 - 48 horas**

- Óxido-fermentación: mediante esta prueba se va a determinar si la utilización de los hidratos de Carbono por parte de un microorganismo se realiza vía oxidativa o por vía fermentativa.
- Reducción de nitratos: Sirve para determinar la capacidad de un organismo de reducir nitratos en nitritos. Se utiliza para asignar bacterias a la familia *Enterobacteriaceae*.
- Rojo de metilo: Es un indicador de pH. Actúa entre un pH 4,2 y 6,3 variando desde rojo hasta amarillo respectivamente. Mediante esta prueba se comprueba la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación ácido-mixta. Se utiliza como parte de la identificación a nivel especie de los bacilos entéricos Gram negativos.
- Voges-Proskauer: permite observar si el microorganismo fermenta la glucosa por la vía butanodiólica. Se usa en la identificación de bacilos entéricos Gram negativos.
- Agar de Hierro Kligler: mediante esta prueba se puede determinar la capacidad de un microorganismo de metabolizar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico; la producción o no producción de gases CO₂ e H₂ como productos finales del metabolismo de los hidratos de carbono. Y la producción de ácido sulfhídrico.
- Sistemas comerciales multipruebas: existen en el mercado numerosos sistemas o equipos multipruebas bioquímicas con el fin de conseguir una mayor rapidez en la identificación de algunas bacterias. Estos sistemas pueden ser manuales o estar automatizados.
- Sistemas comerciales manuales o galerías multipruebas: se trata de celdillas aisladas con un sustrato liofilizado que se inoculan individualmente y que permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas bioquímicas. Es un método bien establecido para la identificación manual de microorganismos a nivel de especie.
Algunos de los sistemas comerciales disponibles en el mercado son: API (bioMérieux), Enterotube (BBL), Oxi/FermTube (BD), RapIDsystems y MicroID(Remel), Biochemical ID systems (Microgen) (Figura 10).

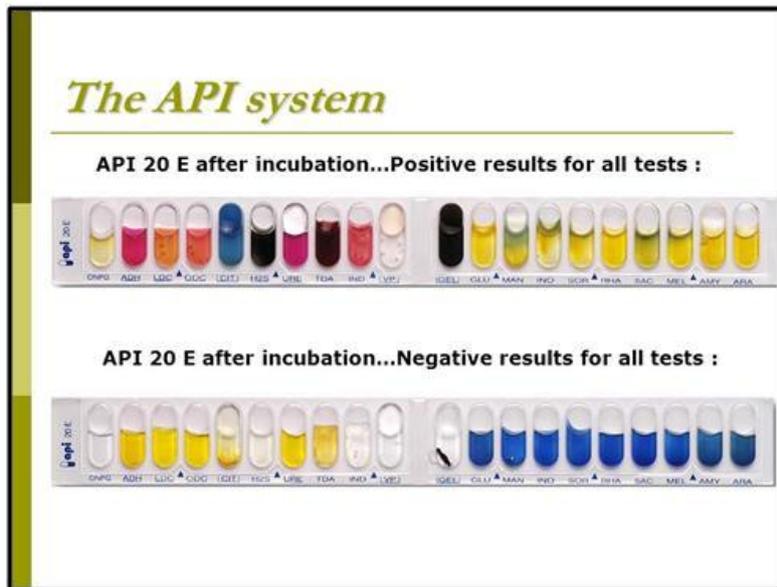


Figura 10: API: kits de prueba para la identificación de bacterias Gram positivas y Gram negativas

- Sistemas comerciales automatizados: existe en el mercado galerías multipuebas, como las descritas en el apartado anterior pero cuya inoculación, incubación y lectura se efectúan de modo automatizado.

También existe paneles en los que además de encontrarse los sustratos para el desarrollo de pruebas bioquímicas, se encuentran diversos antimicrobianos a distintas concentraciones, con lo que se realiza simultáneamente la identificación y antibiograma del microorganismo objeto de estudio. Existen distintos paneles para distintos grupos de microorganismos.

La inoculación y la lectura de estos paneles se suele hacer de forma automática, incorporándose los datos obtenidos en un ordenador, el cual proporciona con un índice alto de fiabilidad, la identificación del microorganismo. Algunos de los sistemas de paneles comerciales disponibles de uso más extendido son: MicroScan, Vitek, ATB, Pasco, Wider, Phoenix (Figura 11).



Figura 11: El sistema VITEK® para pruebas de laboratorio que permiten una identificación microbiana rápida y precisa.

- **Hemólisis:** algunas bacterias producen hemolisinas que causan la lisis de los hematíes en medios que contienen sangre. Esta hemólisis puede ser:
 - Alfa: halo de color verdoso alrededor de la colonia
 - Beta: zona clara alrededor de la colonia
 - Gama: sin presencia de hemólisis, los microorganismos que crecen sin modificar la apariencia del agar (Figura 12).

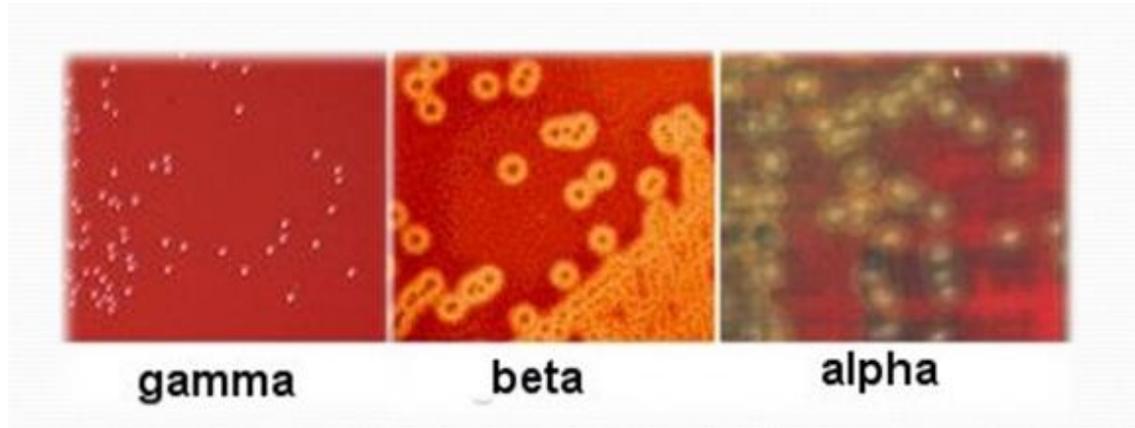


Figura 12: Tipos de hemólisis: Gama: sin presencia de hemólisis. Beta: zona clara alrededor de la colonia. Alfa: halo de color verdoso alrededor de la colonia.

CARACTERÍSTICAS ANTIGÉNICAS DE LAS BACTERIAS

Un **serotipo** o **serovar** es un tipo de microorganismo infeccioso clasificado según los antígenos que presentan en su superficie celular. Los serotipos permiten diferenciar organismos a nivel de subespecie, algo de gran importancia en epidemiología.

* **Pruebas serológicas**

- **ELISA:** La técnica ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color o algún otro tipo; en ocasiones. También existe un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado la enzima anteriormente mencionada. La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra
- **Western blot:** el Western blot, inmunoblot o electro transferencia, es una técnica analítica usada en biología celular y molecular para identificar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas, tal como la que se presenta en extractos celulares o de tejidos
- **Inmunofluorescencia Directa e Indirecta:** La inmunofluorescencia es una técnica de inmunomarcación que hace uso de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para demostrar la presencia de una determinada molécula.

- **Precipitado:** las reacciones de precipitación son las más simples de realizar y visualizar, al hacer reaccionar un antígeno soluble con un anticuerpo correspondiente. Al antígeno es multivalente, posee varias copias del mismo determinante antigénico y puede ser de naturaleza proteica, toxinas u otros productos de bacterias. El anticuerpo por lo general pertenece a las IgG
- **Neutralización:** la neutralización es una prueba que se utiliza para detectar anticuerpos que neutralizan la toxicidad de algunas moléculas o la inefectividad de las bacterias. Estos anticuerpos se fijan a la molécula tóxica e impiden que se produzca el daño.
- **Fijación del complemento:** la prueba de fijación del complemento se usa para demostrar la presencia o no de anticuerpos en el suero sanguíneo de un paciente.

❖ MÉTODOS GENOTÍPICOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

Dados los problemas inherentes que presentan los sistemas de identificación fenotípicos (no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas, una misma cepa puede generar diferentes patrones bioquímicos, entre otros), los métodos moleculares se han establecido como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos.

El estudio de los genes permite establecer relaciones filogenéticas entre las bacterias, como los genes que codifican para las subunidades ribosómicas 5S, 16S, 23S.

En la taxonomía bacteriana, el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada.

El ARNr 16S además de ser útil para la detección de bacterias, proporciona información rápida sobre su identificación y filogenia mediante la comparación con bases de datos. Debido a los avances tecnológicos en las técnicas de secuenciación, se han ido utilizando genes que permiten una mayor precisión en la identificación.

Inicialmente, la identificación bacteriana basada en el análisis de las secuencias se hallaba limitada a determinados centros o laboratorios, en la actualidad y como consecuencia de la automatización y simplificación del proceso, estas técnicas se han introducido en un mayor número de laboratorios.

* **Pruebas con técnicas moleculares**

Con el nombre de Diagnóstico Molecular se engloba una serie de técnicas basadas en el análisis del DNA o ácido desoxirribonucleico.

Dicho análisis puede tener dos objetivos:

- a- la detección de microorganismos de forma rápida y eficaz.
- b- el estudio de variaciones en los genes humanos que pueden condicionar la aparición de enfermedades.

Estas técnicas moleculares sirven, entre otros, para estudios epidemiológicos, determinación de algunas enterotoxinas, identificación de genes de resistencia, identificación de especies difíciles de cultivar o no cultivables, clonación de secuencias de genes. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es muy utilizada y posee una sensibilidad superior a la del método microbiológico.

Como ejemplos de su aplicación podemos mencionar:

- La detección de la presencia de *Streptococcus mutans* en saliva constituye una alternativa para su identificación rápida y segura.
- Diferenciación de los estreptococos del grupo mutans de otros estreptococos pertenecientes al Grupo viridans, enfocándose en los genes específicos asociados con la virulencia de *Streptococcus mutans*, tales como: glucosiltransferasas, fructosiltransferasas, dextranasas, proteína fijadora de glucanos, antígeno proteínico
- Identificación de genes del rRNA 16S del *Streptococcus mutans*.
- La prueba de PCR en tiempo real es una variante de la PCR tradicional, más rápida, y ha permitido la rápida detección y cuantificación de bacterias cariogénicas humanas incluyendo *S. mutans* y *Streptococcus sobrinus* de muestras orales.

❖ MÉTODOS PROTEÓMICOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

La proteómica es el estudio y caracterización del conjunto de proteínas (proteoma) expresadas por un genoma. Las técnicas de proteómica abordan el estudio de este conjunto de proteínas y las más usadas se basan en la electroforesis y en la espectrometría de masas.

Dependiendo del objetivo del estudio se pueden agrupar las técnicas de proteómica en los siguientes grupos:

- Técnicas empleadas para analizar globalmente el proteoma y separar sus proteínas.
- Técnicas usadas para analizar individualmente las proteínas.

B. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO

Los métodos para reconocer las infecciones por virus pueden utilizarse para demostrar la presencia del virus o de alguno de sus constituyentes (antígeno o genoma viral) o la respuesta inmune por parte del hospedador en el curso de la infección.

Los **métodos de diagnóstico virológico** pueden estar dirigidos a detectar:

1. El virus como agente infeccioso (aislamiento e identificación viral).
2. El virus como partícula viral (microscopía electrónica).
3. La presencia de ácidos nucleicos virales (PCR, Southern Blot, Northern Blot).
4. La presencia de antígenos virales (técnicas inmunológicas): inmunofluorescencia directa (IFD), ELISA, inmunohistoquímica (IHQ), inmunocitoquímica (ICQ).
5. La presencia de anticuerpos: seroneutralización, inmunodifusión en gel de agar (IDGA), inmunofluorescencia indirecta (IFI), ELISA.

1. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Las mejores muestras son las que se obtienen en un estadio temprano de la enfermedad (dentro de las primeras 72hs), cuando el virus se excreta en concentraciones relativamente elevadas y todavía no se ha unido con anticuerpos.

Después de transcurridos 7 días habitualmente no vale la pena realizar cultivos virales cuando se trata de huéspedes inmunocompetentes. No obstante en huéspedes inmunocomprometidos y en las infecciones virales persistentes o crónicas, el virus puede estar presente durante períodos prolongados.

Las muestras deben obtenerse de forma aséptica. El volumen de la muestra debe ser suficiente como para permitir la realización de los ensayos apropiados y la conservación, por ejemplo: en caso de tener que repetir el ensayo en pruebas adicionales, como PCR.

Las muestras pueden obtenerse a partir de:

- * Hisopados de:
 - Conjuntivales
 - Genital
 - Rectales
 - Mucosa oral
 - Lesiones cutáneas

- * Sangre
- * Aspirado nasofaríngeo
- * Lavado bronquio alveolar
- * Expectorcación
- * Orina
- * Líquido cefalorraquídeo
- * Materia fecal
- * Biopsia

2. TRANSPORTE DE LA MUESTRA

Dado la gran labilidad de los virus, estos deben ser transportados en un medio de transporte que les provea estabilidad. Esto se obtiene agregando proteínas como puede ser la albúmina bovina. El agregado de antibióticos y antifúngicos logra prevenir el sobre desarrollo de la flora bacteriana y fúngica residente del huésped.

Además, las muestras deben transportarse a 4°C (no congelarlas antes del envío), en recipientes estériles adecuados y con tapa hermética.

Para transportar virus de alta transmisibilidad como virus de la Hepatitis B o virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), debe colocarse el recipiente que contiene la muestra dentro de un contenedor de preferencia metálico con tapa a rosca y rotularse como peligro biológico. Estos contenedores se encuentran comercialmente disponibles.

3. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA: IDENTIFICACIÓN VIROLÓGICA

Los métodos que posibilitan la recuperación del virus viable a partir de una muestra problema son:

A) Cultivos y líneas celulares

- Cultivos celulares: los más usados en la rutina.

- Cultivos primarios: Se obtienen a partir de células, tejidos u órganos tomados directamente del organismo y pueden subcultivarse una o dos veces.

- Líneas celulares diploides: Son aquellas líneas celulares que pueden subcultivarse aproximadamente 50 veces y que conservan por lo menos en un 75% el cariotipo correspondiente a la especie de la cual provienen.

- Líneas celulares continuas: Permiten un número infinito de subcultivos

- Huevos embrionados: usualmente utilizados para cultivar virus propios de las aves como el Virus de la Influenza Aviar.

- Animales de laboratorio: ratón (encefalitis, herpes neonatal diseminado); conejo (enfermedad ocular).

Luego de inocular la muestra, el cultivo celular se incuba a 37° C y se observa diariamente para determinar la aparición de efecto citopático (ECP). Los ECP son los cambios morfológicos en las células inoculadas producidas por la acción del virus, entre los que podemos mencionar la lisis celular, la vacuolización, la formación de sincitios, entre otros.

Se usan cultivos celulares no inoculados como control y comparación con cualquier cambio morfológico observado en los cultivos inoculados.

Cuando los virus no producen ECP, se puede recurrir a técnicas que ponen en evidencia su presencia en el cultivo. La más usada es la inmunofluorescencia directa (IFD), aunque también puede utilizarse la hemadsorción, hemaglutinación.

- Hemadsorción: Algunos virus durante su replicación expresan en la membrana de la célula huésped elementos estructurales virales llamados hemaglutininas, glicoproteínas capaces de unirse a receptores específicos en la membrana de glóbulos rojos de diferentes especies animales. De modo que si se agregan glóbulos rojos a un cultivo inoculado, se puede poner en evidencia la infección de esas células a través de la unión de los glóbulos rojos a la superficie celular.

- Hemaglutinación: Las hemaglutininas pueden ponerse en evidencia en el sobrenadante de los cultivos utilizando el mismo fundamento que para la hemadsorción.

B) Microscopía Electrónica

Permite la visualización de las estructuras virales y la morfología y tamaño del virión, lo que ayuda a la identificación taxonómica viral.

C) Técnicas para la detección de ácidos nucleicos

- Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR):

Es una técnica que sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad se basa en que luego de la amplificación resulta mucho más fácil identificar el genoma viral.

Habitualmente, los resultados de una reacción de PCR se visualizan al usar electroforesis en gel de agarosa. La electroforesis en gel es una técnica en la que una corriente eléctrica impulsa fragmentos de ADN a través de una matriz de gel y los fragmentos de ADN se separan según su tamaño. Típicamente se incluye un estándar, o marcador de peso molecular, para que pueda determinarse el tamaño de los fragmentos en la muestra de PCR. Los fragmentos de ADN de la misma longitud forman una "banda" en el gel que se puede identificar a simple vista si el gel se tiñe con sustancias que se unan al ADN.

- Southern Blot, Northern Blot y Western Blot:

Las técnicas Southern blot y Northern blot se utilizan para separar y caracterizar ADN y ARN, respectivamente.

La técnica de Southern fue desarrollada por Edwin Southern para separar ADN y por analogía la separación de ARN se denominó Northern y la transferencia de proteínas que se denominó Western blot.

Estas técnicas comienzan con una electroforesis en gel con el objetivo de separar las moléculas por su tamaño, posteriormente la transferencia a una membrana para finalmente identificar un fragmento específico de ADN, una molécula de ARN particular o una proteína de interés mediante la unión específica de otra molécula de ácido nucleico (sonda) para ADN o ARN o anticuerpo para proteínas.

D) Técnicas inmunológicas para la detección de antígenos virales

- Inmunofluorescencia directa:

La muestra que presuntamente contiene antígenos virales es puesta en contacto con un anticuerpo conjugado con fluoresceína dirigido contra dicho antígeno. Si el antígeno esperado está presente se formará un complejo antígeno-anticuerpo.

Luego de los lavados, solo quedarán presentes estos complejos y la reacción positiva emitirá fluorescencia que puede verse con la ayuda de un microscopio de fluorescencia (Figura 13).

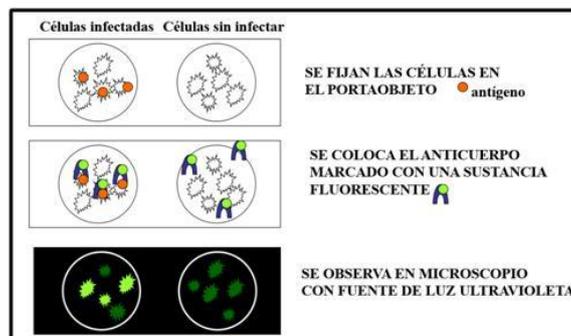


Figura 13: esquema para la detección de antígenos virales por inmunofluorescencia

-ELISA:

Se realiza en placas de 96 pocillos. En general, uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) se adsorbe sobre un soporte (inmoadsorbente) y se agregan antígenos o anticuerpos marcados con una enzima.

La reacción antígeno-anticuerpo quedará inmobilizada y, por lo tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico. Al actuar la enzima sobre el sustrato producirá un color, observable a simple vista (cualitativo) o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro, expresándose como densidad óptica (cuantitativo). En cada placa se colocan controles positivos y negativos de absorbancia conocida (Figura 14).

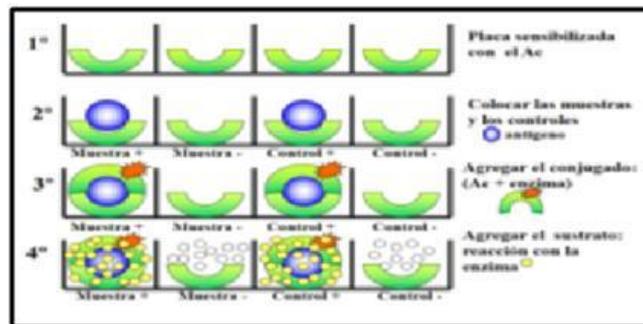


Figura 14: esquema de la técnica de ELISA para la detección de antígeno

-Inmunohistoquímica e inmunocitoquímica:

La inmunohistoquímica permite evidenciar la presencia de un Ag específico sobre un corte de tejido determinado y ubicar en qué estructuras del mismo se encuentra. Para la detección de antígenos, el único Ac a utilizar se encuentra conjugado con la enzima reconociéndose la unión del mismo con el antígeno tras el agregado del sustrato cromógeno.

La inmunocitoquímica permite evidenciar la presencia de un Ag específico sobre células mediante un procedimiento similar.

E) Técnicas inmunológicas para la detección de anticuerpos virales.

Las técnicas indirectas son las usadas para la detección de anticuerpos como la inmunofluorescencia indirecta e ELISA indirecto (Figura 15).

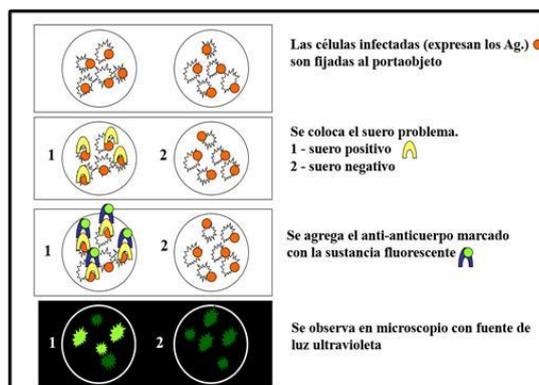


Figura 15: esquema de la detección de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta

Otras técnicas utilizadas de rutina son la seroneutralización y la inmunodifusión en gel de agar.

-Seroneutralización:

Se fundamenta en la detección de anticuerpos neutralizantes en el suero problema.

Se colocan los sueros, diluidos en medio de cultivo con el virus a neutralizar, en placas previamente sembradas con células. Luego se incuban las diluciones seriadas en una estufa a 37°C y se determina si hay o no presencia de ECP en un microscopio invertido.

Al realizar diluciones del suero es posible determinar la concentración o título de anticuerpos neutralizantes presentes en la muestra. El título de anticuerpos se determina como la dilución más alta que presenta inhibición completa del ECP después de 72 horas de incubación (Figura 16).

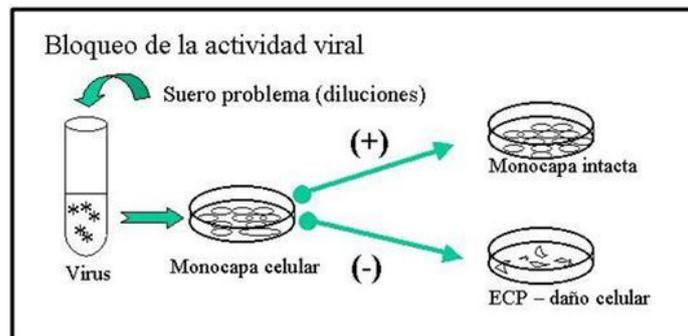


Figura 16: esquema de la seroneutralización viral

-Inmunodifusión en gel de agar (IDGA):

Empleando el medio adecuado (gel de agar), es posible hacer migrar por difusión tanto Ag como Ac, de modo que al encontrarse en proporciones óptimas, interaccionen, produciendo una banda de precipitado visible.

C. DIAGNÓSTICO MICOLÓGICO

Durante las últimas décadas, el aumento en la prevalencia de las infecciones fúngicas ha sido constante, relacionado fundamentalmente con el incremento de pacientes inmunocomprometidos, con el uso generalizado de antimicrobianos, con la utilización de inmunosupresores, con maniobras diagnósticas invasoras y la implantación de alimentación parenteral.

Para identificar a los hongos causantes de los diferentes tipos de micosis, el cultivo sigue siendo el “Gold standard” del diagnóstico microbiológico, ya que permite la identificación del agente etiológico y la realización del estudio de sensibilidad.

Las nuevas técnicas diagnósticas independientes del cultivo tienen como objetivo mejorar la sensibilidad y reducir el tiempo necesario para realizar el diagnóstico.

Las **principales técnicas** se clasifican en:

a) detección en sangre de antígenos y/o anticuerpos:

- antígeno capsular
- antígeno galactomanano
- antígeno manano
- anticuerpos anti-manano
- anticuerpos anti-micelio

b) detección de otros componentes fúngicos:(1→3)-β-D-glucano

1-RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Para alcanzar el éxito en el diagnóstico micológico partiendo de una sospecha clínica, es fundamental realizar adecuadamente la recolección de la muestra a partir de la lesión y evitar posibles contaminaciones en su transporte y procesamiento.

Ante un crecimiento fúngico hay que tener siempre presente la necesidad de diferenciar un “aislamiento significativo” de otros que no lo son, ya que no es lo mismo identificar una especie fúngica que diagnosticar una micosis.

Para optimizar la recolección de las muestras:

- Es necesario recoger las muestras asépticamente, utilizando contenedores estériles, remitirlas al laboratorio antes de 2 horas y sembrarlas lo antes posible.
- La muestra debe recogerse antes de instaurar el tratamiento antimicótico y siempre de la parte activa de la lesión
- Las muestras de lesiones cerradas y abscesos deben aspirarse con jeringa y transferirse a un contenedor estéril con solución salina.

El recipiente de recolección se identificará con los datos del enfermo (nombre y apellidos, número de historia clínica, sexo, etc.) y los datos clínicos (diagnóstico presuntivo, tratamiento antimicótico, etc.).

2-TRANSPORTE DE LA MUESTRA

Todas las muestras deben enviarse al laboratorio rápidamente, sin conservantes. Las muestras deben transportarse en un recipiente estéril ya prueba de vertidos.

En general, no deben introducirse en medios de transporte, a no ser que sea fácil retirar la muestra del medio.

Las muestras en que se sospeche la presencia de dermatofitos u hongos dimórficos se conservarán a temperatura ambiente, nunca refrigerados.

3. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA: IDENTIFICACIÓN MICOLÓGICA

Es importante que la muestra se recoja y se transporte en condiciones apropiadas y que no se demore su cultivo debido a la pérdida de viabilidad de algunos hongos por la desecación, la temperatura elevada (>37°C) o baja (<10°C), el sobre crecimiento bacteriano, la presencia de leucocitos, etc.

➤ **OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA**

Las muestras, antes de ser procesadas, tienen que observarse macroscópicamente, en busca de material caseoso, purulento, hemorrágico, necrótico o gránulos.

➤ **OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA**

Cuando los elementos fúngicos están presentes en número suficiente se puede establecer una orientación diagnóstica presuntiva y/o definitiva. Se informa al odontólogo clínico, para la instauración temprana de una terapia antifúngica. Esto es de importancia en los pacientes inmunocomprometidos.

Con frecuencia los hongos tardan en desarrollar las estructuras características (hifas, esporas sexuales, asexuales) para su identificación definitiva. Por lo tanto, es de gran utilidad que simultáneamente se inoculen los medios de cultivo y se realicen las técnicas microscópicas directas.

-Examen microscópico directo: proporciona un diagnóstico definitivo si se observan elementos fúngicos patognomónicos: cápsula, levaduras pequeñas, quistes, levaduras con brotes de base ancha, levaduras con gemación multipolar, etc. (Figura 17).



Figura 17: observación en fresco al microscopio óptico de *Candida albicans*

Los métodos usados para la visualización fúngica difieren en algunos aspectos de los de las bacterias; el mayor tamaño de los hongos hace, generalmente innecesarios la tinción de frotis secos; en su lugar son más utilizadas las preparaciones directas en fresco con o sin líquidos de montaje y clarificación.

Las **tinciones** más usadas para mejorar la sensibilidad son: tinta china, Giemsa, argénticas, agentes quimiofluorescentes, etc.

- **Levaduras**

La mayoría de los organismos levaduriformes crecen fácilmente en un gran número de medios de cultivos: agar sangre, agar glucosado Sabouraud (AGS), agar chocolate, agar CLED, etc. El AGS, con o sin antibióticos añadidos, es el medio de aislamiento por excelencia para la identificación de levaduras. En este medio las colonias de levaduras suelen ser completas, ligeramente abombadas o planas, de consistencia mantecosa, lisa o rugosa, con olor dulzón agradable, volviéndose más pastosas a medida que la colonia envejece.

- **IDENTIFICACIÓN MICOLÓGICA CONVENCIONAL**

Si se visualiza crecimiento que sugiera posibilidad de levaduras, se realiza una extensión en fresco. Si en la misma se observan levaduras, se procede a la identificación mediante subcultivo a un medio cromogénico, de los que hay varios comercializados. En el caso que no se trate de ninguna de las especies que este medio identifica, se procede a hacer la identificación mediante auxonograma de carbono o mediante alguno de los métodos comerciales basados en él.

- * **Medios de cultivos**

El objetivo fundamental de la utilización de los medios de cultivo es optimizar el crecimiento de los microorganismos. En los medios de cultivo micológicos, los antimicrobianos se utilizan tanto para inhibir el crecimiento bacteriano como el de otros hongos ambientales.

- * **Clasificación de los medios de cultivos**

-Generales: El más característico y clásico es el agar glucosado Sabouraud (AGS). Se utiliza como medio de cultivo general y fundamentalmente para la realización de la descripción de las características morfológicas de la mayoría de los hongos.

-Enriquecidos: Se utilizan especialmente en micosis sistémicas endémicas (histoplasmosis, blastomicosis), para la recuperación de la fase levaduriforme. Un ejemplo de estos medios es el agar cerebro-corazón con sangre (BHI).

-Selectivos: Son medios que favorecen el crecimiento de los microorganismos deseados impidiendo el de otros. Los componentes más utilizados como agentes selectivos son antibacterianos (cloranfenicol, gentamicina, penicilina, estreptomycin) y también inhibidores de hongos como la cicloheximida que es especialmente útil en las muestras cutáneas y respiratorias para el diagnóstico de micosis sistémicas endémicas.

-Diferenciales: Se utilizan para ayudar a la identificación del hongo basada en la apariencia de éste en dicho medio, merced a la adición de determinados componentes como por ejemplo sustancias cromógenas, o indicadores de pH como en el DTM ("Dermatophyte Test Medium", Indicador de pH rojo fenol, el medio cambia de amarillo

(ácido) a rojo (alcalino). Urea Agar es un medio diferencial, no selectivo, tiene como indicador de la producción de acidez o alcalinidad el Rojo Fenol.

-Especializados: Son aquellos medios que contienen algún componente (por ejemplo, ácidocafeico) destinado a aislar un agente concreto (*C. neoformans*), favorecer la identificación de ciertas especies (por ejemplo, el medio de Czapeck), u obtener estructuras de reproducción sexual (por ejemplo, agar acetato, agar patata zanahoria).

-Medios cromogénicos para levaduras: contienen diversos sustratos enzimáticos que están unidos a compuestos cromogénicos. Muy útil para el estudio de levaduras (Figura 18).

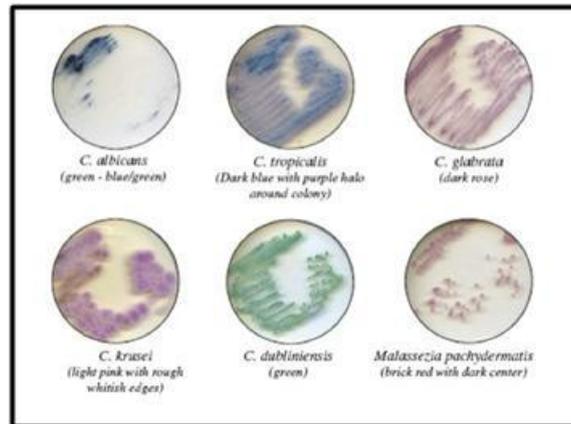


Figura 18: diferenciación de *Cándidas* spp por medio cromogénico

-Medios comerciales basados en la asimilación de nutrientes, en pruebas enzimáticas

- **AUXACOLOR:** en la galería Auxacolor (Bio-Rad) la asimilación se visualiza por el cambio de un indicador de pH. Posee la prueba de resistencia a la actidiona (inhibidor del crecimiento de ciertas levaduras y hongos) y otra para la detección de la actividad de la enzima fenol-oxidasa (Figura 19).

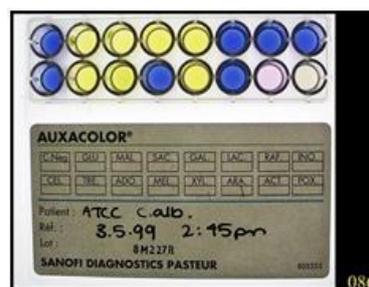


Figura 19: prueba comercial para la identificación de *Cándidas*

- **API 20 C AUX:** la galería API 20 C AUX (bioMérieux) se compone de 20 cúpulas con sustratos deshidratados que permiten realizar 19 pruebas de asimilación. Las cúpulas se inoculan con un medio mínimo semisólido y las levaduras sólo se reproducen si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente. Permite identificar un total de 34 especies diferentes. La lectura de estas reacciones se hace por comparación con un control de crecimiento y la identificación se obtiene, a partir de un código numérico, mediante un catálogo analítico o un programa informático (Figura 20).

D. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

El objetivo del estudio parasitológico de una muestra clínica es el de proporcionar información sobre la presencia o ausencia de patógenos, o de sus productos, que pudieran participar en la enfermedad de un paciente.

El proceso diagnóstico comienza por un problema clínico o epidemiológico que hace necesaria la demanda de una o varias pruebas, toma y transporte adecuado de las muestras a investigar, información de los datos demográficos y clínicos del paciente, recepción en el laboratorio, procesamiento, análisis e interpretación de los resultados y un informe final.

1- RECOLECCIÓN y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

Para las determinaciones es importante tener en cuenta el tipo de muestra a tomar, y qué precauciones deben tomarse para que sea satisfactoria en el momento de su análisis e investigación.

Las muestras de heces deben ser transportadas inmediatamente al laboratorio después de recogidas, pero si van a estar más de dos horas, se tienen que conservar en refrigeración a 4 °C y en caso de que se observen después de las 4 o 6 horas de recogida, sería conveniente el uso de preservantes como la formalina al 5 o al 10 %, los que se deben mezclar con las heces, en proporción de tres partes del líquido preservante por una de heces.

-Formol al 5%: para preservar quistes de protozoarios.

-Formol al 10%: para huevos y larvas de helmintos.

2-PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA: IDENTIFICACIÓN PARASITOLÓGICA

El diagnóstico de las infecciones parasitarias puede establecerse de dos maneras fundamentales:

A.- Métodos directos:

Permite determinar o precisar el agente causal por hallazgo del parásito o de sus elementos morfológicos.

Dentro de los métodos directos se encuentra:

- * El análisis parasitológico de heces: consta de un examen microscópico directo, con y sin coloraciones. La observación microscópica (microscopio óptico) permite observar las diferentes fases evolutivas del parásito (quistes, trofozoitos, huevos y larvas).
- * El examen macroscópico: que permite identificar el parásito en su estado adulto o fragmentos de ellos y comprende el examen a simple vista o con lupa
- * Los métodos de concentración en:
 - * -Solución salina fisiológica:

Para reconocer trofozoítos de protozoos y otros estadios de diagnóstico de protozoos y helmintos (larvas, huevos). Es el mejor método para detectar trofozoítos en una amebiasis invasora por *Entamoeba histolytica* en heces o en otros productos humanos. Sirve para ejecutar cuenta de huevos de algunos helmintos y así estimar la intensidad de la infección.

* -Solución de Lugol:

Para colorear en forma temporal trofozoítos y quistes de protozoos. Inmovilizar y colorear estructuras internas de larvas e identificar por morfología específica

B.- Métodos indirectos:

Dirigidos a hacer evidente la respuesta inmune del hospedador frente al parásito. Los métodos indirectos de diagnóstico tienen fundamental importancia para el diagnóstico de parasitosis en que es imposible, o muy difícil, la visualización directa del parásito o de alguno de sus elementos; también para controlar la evolución post-terapéutica de la infección.

Dentro de los métodos indirectos se encuentra:

- Citodiagnóstico: a través del hemograma
- Histodiagnóstico: que permite observar la reacción granulomatosa, metaplasia e inflamación
- Inmunodiagnóstico: determinación de inmunoglobulinas, fijación del complemento, hemaglutinación indirecta, ELISA, etc.

PARTE II

IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO EN ODONTOLOGÍA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE ESTREPTOCOCOS ORALES

* Recolección de Muestras

Las muestras se recolectan hisopando la mucosa de los carrillos, el dorso de la lengua, el piso de la boca y el paladar duro.

Generalmente y según la zona afectada por la enfermedad de caries, se toma muestra de la biopelícula bacteriana localizada en las diferentes superficies de los primeros molares superiores e inferiores.

* Medio de cultivo selectivo

Se utiliza el agar Mitis Salivarius (MS) suplementado con 0,2 U/ml de bacitracina y con 0,001% de Tellurite de potasio.

En el agar MS, muchos estreptococos orales muestran una morfología característica de las colonias. Pueden presentarse blanquecinas, de bordes definidos, colonias firmes muy adherentes al medio de cultivo, lo cual permite su diferenciación inicial. Usualmente, la placa de agar se cultiva en una atmósfera del 95% de nitrógeno y 5% de dióxido de carbono a 37°C por 1 o 2 días seguida de una incubación en aire por 1 o 2 días (Figura 21).

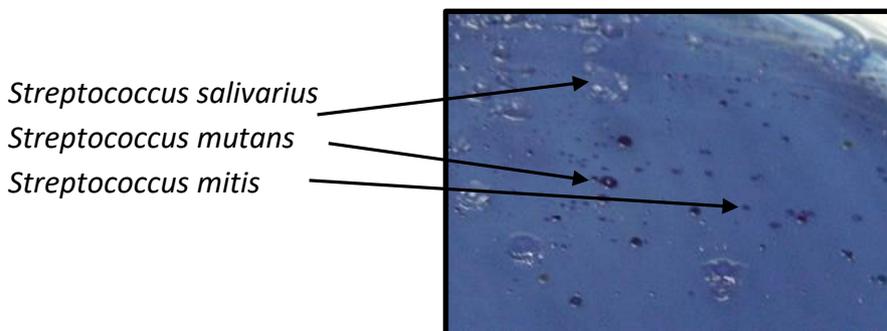


Figura 21: características morfológicas de las colonias estreptocócicas en AMS

Los azúcares en este medio son la sacarosa y la glucosa, así como los colorantes son el azul tripán y el cristal violeta. El azul tripán es absorbido por las bacterias, causando que se vuelvan azules. El cristal violeta, junto con el 1% de telurito agregado a este medio, inhibe las bacterias Gram negativas así como muchas otras bacterias Gram positivas.

-*Streptococcus salivarius* usa los azúcares para producir un levano, produce colonias pegajosas, mucoides y en forma de gota de goma.

-Las colonias de *Streptococcus mitis* son pequeñas, planas y de color azul claro.

-*Streptococcus mutans* produce colonias de forma irregular, con una apariencia granular de vidrio esmerilado y produce dextranos a partir de azúcar.

Con relación a los estreptococos orales, pueden diferenciarse por su habilidad para fermentar ciertos azúcares, por adherirse a superficies lisas en presencia de sacarosa, por el tipo de crecimiento aeróbico o anaeróbico, etc.

*** Morfología y características en cultivo de *Streptococcus mutans***

Es un coco Gram positivo, dispuesto en cadena, no móvil, catalasa negativo, productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH 7 a pH 4.2 en, aproximadamente, 24 horas.

Fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido. Normalmente no desamina la arginina para producir amoniaco. Usualmente no producen ni hemólisis ni decoloración en agar sangre, es principalmente alfa o gamma hemolítico en agar sangre de cordero, aunque se han reportado unas pocas cepas hemolíticas (Tabla 1).

S. mutans se ha subclasificado en varios tipos con base en las propiedades inmunológicas, biológicas y genéticas: los serotipos de *S. mutans* son c, e, f y k.

El hábitat natural de *S. mutans* es la boca humana. En cavidad oral, las colonias se adhieren muy cerca de la superficie del diente e igualmente se puede recuperar en lesiones cariosas. Puede aislarse frecuentemente de heces en humanos y ratas. Aunque *S. mutans* no se distribuye ampliamente en animales salvajes, se ha aislado en monos, murciélagos, ratas salvajes habitantes de campos de cultivo de caña de azúcar y de monos Rhesus. Igualmente, se ha aislado en ratas y hámsteres de experimentación.

Organismo	Fermentación					Hidrólisis			Polisacárido a partir de la sacarosa	Peróxido	Hemólisis en agar sangre de cordero
	Manitol	Sorbitol	Melibiosa	Rafinosa	Esculina	Inulina	Arginina	Esculina			
<i>S. mutans</i>											
a	+	+	+	+	+	+	-	+	Glucano» fructano	+	δ
b	+	+	+	+	+	+	+	+	Glucano» fructano	-	γ
dof	+	+	+	+	+	+	-	+	Glucano» fructano	-	γ
d'g	+	±	-	-	-	+	-	+	Glucano» fructano	+	δ
<i>S. sanguis</i>											
A	-	-	-	+	+	+	+		Glucano	+	α
B	-	-	-	-	-	-	-		Glucano	+	α
<i>S. mitis</i>	-	-	-	±	±	-	-		±	+	α
<i>S. salivarius</i>	-	-	-	+	+	±	-		Fructano» glucano	-	γ
<i>S. mitis</i>	-	-	-	-	+	-	+		-	-	α/γ

Tabla 1: características para la identificación de especies del Grupo Mutans. (Hamada.S. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiological reviews.1980)

* **Aplicaciones de las técnicas moleculares para la identificación de *Streptococcus mutans***

Los métodos microbiológicos y bioquímicos, disponibles actualmente, no permiten la rápida detección e identificación de esta bacteria. Se utiliza la metodología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar la presencia de *S. mutans* en saliva y biopelícula dental.

ASLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE BACTERIAS PERIODONTOPATÓGENAS

* **Recolección de Muestras de fluido crevicular gingival (FCG)**

Se selecciona la localización con la mayor profundidad y sangrado al sondaje.

Se eliminan cuidadosamente los depósitos de biopelícula supragingival, se aísla las zonas de interés mediante rollos de algodón y secado con aire.

Se introduce dos puntas de papel estériles, de tamaño medio (Figura 22) de forma consecutiva en la profundidad de la bolsa o del surco periodontal y se deja en esa posición durante 10 a 20 segundos. Las puntas de papel se introducen en un vial con 2 ml de fluido estéril de transporte reducido que permite conservar la anaerobiosis de las muestras (Figura 23).



Figura 22: toma de muestra de la bolsa o surco periodontal



Figura 23: muestras de puntas de papel estéril en vial con fluido estéril de transporte reducido

*** Procesamiento de las muestras de FCG**

Se siembran las muestras en placas de Petri con un medio de agar no selectivo (Oxoid no 2; Oxoid, Basingstoke, UK), suplementado con sangre al 5%, hemina (5mg/l) y menadiona (1mg/l) para la determinación del recuento total de anaerobios (UFC) y para la identificación de los patógenos bacterianos específicos (Figura 24).

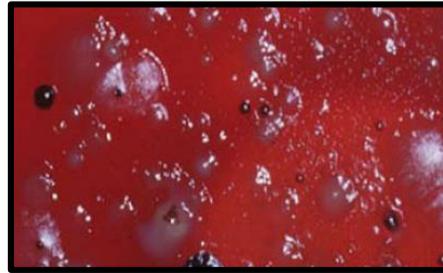


Figura 24: Placa de agar sangre con crecimiento de bacterias periodontopatógenas

Para el recuento de *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, las muestras se siembran en un medio Dentaïd-1.

Las placas de agar sangre se incuban en atmósfera anaeróbica (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂) a 37°C durante 7 y 14 días.

Las placas Dentaïd-1 se incuban en aire con 5% de CO₂ a 37°C durante 3 y 5 días

La presencia y la cantidad de los patógenos periodontales *P. gingivalis* (Figura 25. A), *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Parvimonas micra*, *Campylobacter rectus* y *Fusobacterium nucleatum*, se realiza en las placas de agar no-selectivo.

La determinación de especie bacteriana se realiza mediante test bioquímicos comerciales estándares (Rapid™ ANA II System; Remel, Lenexa, KS, EE.UU.) (Figura 25. B),

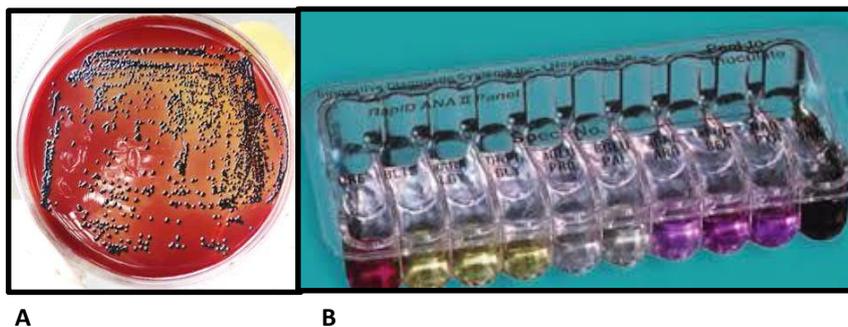


Figura 25: A: placa de agar sangre con *Porphyromonas gingivalis*; B: Kit comercial Rapid™ ANA II System

*** Aplicaciones de las técnicas moleculares para la identificación de bacterias periodontopatógenas**

Los métodos que utilizan fragmentos de ADN para la detección de periodontopatógenos son pruebas rápidas, sensibles y específicas, en comparación con los que utilizan medios de cultivo. Sin embargo, se encuentran disponibles sólo para unos cuantos patógenos y no permiten conocer la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos.

- **PCR:** se utiliza un termociclador para la amplificación en cadena de la polimerasa. Con alta sensibilidad y especificidad. El producto final de esta reacción exponencial es un ácido nucleico de doble cadena que puede ser analizado en tamaño, secuencia y cantidad o servir para otras técnicas moleculares. Se utiliza para la búsqueda de material genético de un agente infeccioso en una muestra clínica y para la identificación de aislamientos (Figura 26).



Figura 26: Termociclador para realizar PCR

- **PCR tiempo real:** es una variante de la PCR convencional que se emplea para la cuantificación de ácidos nucleicos, tanto de ADN como de ARN mensajero en una muestra. Permite cuantificar proporciones de *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *A. actinomycetemcomitans*, y debido a su gran rapidez y sensibilidad son de gran utilidad en los estudios epidemiológicos. La presencia o ausencia de la bacteria puede ser insuficiente para evaluar los efectos terapéuticos de algún tratamiento, por lo que la cuantificación de los niveles o proporciones de las especies en el biopelícula proporciona un mejor resultado.
- **Southern Blot:** Transferencia de fragmentos de ADN originados por endonucleasas de restricción y posterior hibridación con una sonda marcada. Permite la comparación de patrones genéticos
- **Sondas:** las muestras subgingivales son sometidas a la digestión enzimática del ADN bacteriano, estos fragmentos desconocidos son expuestos a sondas marcadas complementarias y bajo determinadas condiciones de temperatura e ionización, se permite su hibridación en un sustrato de nitrocelulosa. El ADN puede ser detectado por radiomarcado o reacción calorimétrica. Las sondas de ADN permiten identificar secuencias de nucleótidos específicos para especies bacterianas concretas. Permiten detectar bacterias específicas de la biopelícula subgingival.
- **Análisis proteómico:** Esta técnica ofrece el perfil de proteínas totales de una célula o un microorganismo. Como método de estudio de la proteómica se usa la electroforesis en gel bidireccional para separar las proteínas, identificándose las mismas mediante espectrometría de masas.

La aplicación de métodos de laboratorio para la identificación de patógenos periodontales, siempre en estrecha relación con otros métodos empleados para el diagnóstico de la enfermedad periodontal, posibilita un mejor manejo y seguimiento de los pacientes. Los continuos progresos en el campo de la microbiología periodontal y

métodos de diagnóstico por laboratorio, permiten un mejor entendimiento de la compleja ecología microbiana que existe a nivel subgingival y ayuda a definir las interacciones existentes entre las bacterias y el huésped con enfermedad periodontal activa.

El diagnóstico microbiológico de la enfermedad periodontales una valiosa herramienta en el tratamiento de la periodontitis, la composición de la flora subgingival y los niveles de especies patógenas difieren entre individuos así como de un sitio a otro. Ningún tratamiento único será eficaz para todos los individuos, y las directrices para un tratamiento adecuado deberían optimizar los aspectos relacionados con el pronóstico y la eficacia terapéutica para cada individuo.

El objetivo de las pruebas microbiológicas debe ir encaminado a desarrollar el tratamiento más adecuado para el perfil microbiano específico del paciente. Las reducciones en el complejo patógeno del individuo serán de esta forma mayores y más fáciles de mantener, lo que llevará a una estabilidad clínica prolongada.

CANDIDIASIS OROFARÍNGEA

ASLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE CÁNDIDA ORAL

* **Recolección de Muestras**

La toma de muestras se lleva a cabo de diferentes maneras: frotis directo con torunda estéril, enjuague bucal con solución salina (para cuantificación), biopsia (en candidiasis hiperplásica y esofagitis).

* **Tinción y Medio de Cultivo**

El examen directo con solución salina y azul de lactofenol puede ser útil para el diagnóstico rápido de la candidiasis oral pseudomembranosa.

Las técnicas de cultivo suelen ser más sensibles, ya que la microscopía directa precisa de la existencia de un número significativo de levaduras. La tinción de Gram mejora mucho la observación en fresco, pues pueden distinguirse más fácilmente las células levaduriformes. También se realiza la tinción con fluorocromos (rojo Congo, blanco de calcoflúor).

La presencia de pseudohifas o hifas y células inflamatorias en un frotis se valora más que la de blastosporas en relación con una posible infección. La presencia de hifas o pseudohifas sugiere infección por *Candida albicans*.

El examen histológico es esencial para el diagnóstico de candidiasis hiperplásica, y muy útil en la esofagitis. Debido a la proliferación de levaduras en los tejidos, las muestras de biopsias deben procesarse rápidamente.

Para la detección de levaduras en estas muestras, la tinción con hematoxilina-eosina no es muy sensible, por lo que debe utilizarse otra técnica como la del ácido peryódico de Schiff (PAS), que pone de manifiesto la presencia de hifas y blastosporas.

El cultivo es imprescindible para establecer la etiología y efectuar pruebas de sensibilidad a los antifúngicos, así como para llevar a cabo estudios de tipificación molecular.

Un cultivo positivo sólo demuestra la presencia de levaduras, pero no de infección, sobre todo en ausencia de clínica sugestiva.

El agar glucosado de Sabouraud con antibióticos es un buen medio para el cultivo primario de muestras orofaríngeas, pero dada la similar morfología colonial que exhiben las distintas especies de levaduras es deseable el empleo de un medio capaz de diferenciar las especies más frecuentes y detectar cultivos mixtos, como es el CHROMagar Candida, donde se identifican muy bien *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. krusei*

Las colonias de morfología macroscópica compatible con levaduras y confirmadas mediante tinción de Gram se deben identificar hasta el nivel de especie, mediante el estudio de sus características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y nutricionales.

La producción de tubos germinativos y de clamidosporas, son pruebas para identificar a *C. albicans*. La producción de tubos germinativos es además una prueba sencilla y rápida (2-4 horas) que puede obviar otras más lentas y complicadas.

La producción de clamidosporas en medio de agar harina de maíz, agar de Wolin-Bevis, agar arroz o agar patata-zanahoria, es más sensible para la confirmación de *C. albicans*

IDENTIFICACIÓN SEROLÓGICA DE CÁNDIDA ORAL

Actualmente, existen técnicas de aglutinación que ofrecen una buena alternativa diagnóstica por su rapidez (5 minutos), sensibilidad y especificidad.

El test Bichro-Latex Albicans utiliza partículas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales que reaccionan con antígenos de *C. albicans*, y el llamado test Krusei color va dirigido a la identificación de *C. krusei*; el test Candida Check posibilita identificar las especies más frecuentes en clínica y detectar los serotipos A y B de *C. albicans*.

*** Detección de antígeno**

A pesar del gran número de antígenos estudiados, la detección de antígeno en pacientes con candidiasis invasora no ha permitido solucionar el problema diagnóstico que presenta esta micosis y no existe una prueba aceptada universalmente.

La detección de manano por ELISA es más sensible y específica que por aglutinación de partículas de látex.

Debido que la antigenemia en los pacientes con candidiasis invasora es transitoria, es posible que se necesite la combinación de técnicas que detecten diferentes antígenos o epitopes para aumentar la sensibilidad diagnóstica.

*** Detección de anticuerpos**

La utilidad de la detección de anticuerpos anti-Cándida en pacientes con candidiasis invasora puede presentar dos limitaciones importantes:

a) La detección de títulos altos de anticuerpos en pacientes que están solamente colonizados por Cándida.

b) La respuesta de anticuerpos puede estar retrasada, reducida o no existir en pacientes inmunodeprimidos.

Sin embargo, las pruebas comercializadas actualmente detectan anticuerpos contra el manano y la enolasa y los antígenos del micelio de *C. albicans*. Estas pruebas se utilizan para estudiar muestras seriadas del paciente, lo que permite analizar la evolución de los títulos de anticuerpo y su correlación con los datos clínicos y microbiológicos.

La detección simultánea de manano y anticuerpos anti-manano mejora ostensiblemente la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de candidiasis invasora.

-**BICHRO-LATEX ALBICANS** (Fumouze): es un método para la identificación rápida de aislados de *C. albicans* por aglutinación de partículas de látex utilizando un anticuerpo monoclonal específico de *C. albicans*. La prueba se realiza con dos reactivos distintos:

- a) Bolas de látex recubiertas con anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con el antígeno de *C. albicans* localizado en su pared celular
- b) Agente disociante que permite la exposición al antígeno (Figura 27).

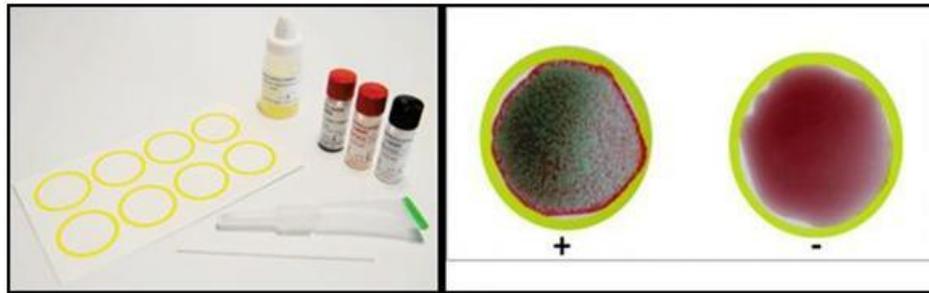


Figura27: prueba comercial para la identificación de *Cándida albicans*

MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Los métodos de biología molecular se han aplicado al análisis de diferentes poblaciones de *C. albicans* para el estudio de las candidiasis orofaríngeas. La determinación del cariotipo mediante electroforesis de campo pulsátil (PFGE), la hibridación con sondas, la detección del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP), la amplificación del ADN (PCR, LCR) y posterior hibridación por Southern, son los más empleados

DETECCIÓN ORAL DEL VIRUS HPV

El diagnóstico de HPV asociado a carcinomas de células escamosas se debe considerar en cánceres de cavidad oral y de orofaringe, especialmente los localizados en zonas palatina y lingual.

- Un ensayo clínico tradicional para el diagnóstico de la infección por VPH es la técnica de tinción Papanicolaou (PAP). Esta técnica es una herramienta muy útil, por su bajo costo, fácil realización y amplia difusión, no obstante tiene poca reproducibilidad y una sensibilidad y especificidad variable dependiente de la experiencia del personal que la realiza. Como consecuencia, se estima que aproximadamente el 50 % de las infecciones VPH positivas pasan desapercibidas por PAP (Figura 28).
- En la actualidad, dos ensayos moleculares son utilizados para el diagnóstico y la tipificación de VPH: el test de captura de híbridos (*Hybrid Capture, Digene Diagnostics, INC. Silver Spring, Maryland, EE.UU.*). La prueba del HPV por Captura Híbrida es una prueba de laboratorio que se utiliza para detectar la presencia

ó ausencia del Papiloma Virus Humano mediante la detección del ADN del virus en las células alcanzando niveles notables de detección y la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

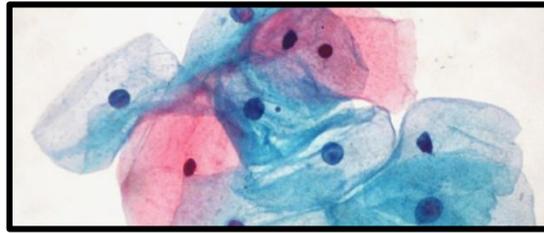


Figura 28: citología exfoliativa con tinción de Papanicolau (PAP)

BIBLIOGRAFÍA

1. Baron E., Miller M., Weinstein M., et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013.
2. Brock, D. Clínica y Diagnóstico Microbiológico. Biología de Microorganismos.
3. Cantón R. Role of the microbiology laboratory in infectious disease surveillance, alert and response. *ClinMicrobiol Infect.* 2005; 11: 3-8.
4. Carballal, G.; Oubiña, J. Diagnóstico Viroológico. *Virología Médica.* El Ateneo, 1994. Bs As, Argentina. 6: 73-100.
5. Chans, G. Aplicaciones de las Nuevas Técnicas de Biología Molecular al estudio de Bacterias y Virus. *Etiopatogenia Microbiológica.* Vol. 2. Librería Medica Editorial. 19:289-301.
6. Chevaliez S1, Rodriguez C, Pawlotsky JM. New virologic tools for management of chronic hepatitis B and C. *Gastroenterology.* 2012 May; 142(6):1303-1313.e1.
7. Easterbrook PJ1, Roberts T, Sands A, Peeling R. Diagnosis of viral hepatitis. *Curr Opin HIV AIDS.* 2017 May; 12(3):302-314.
8. Emonet S., Shah H., Cherkaoui1 A., and Schrenzel J. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *ClinMicrobiol Infect* 2010; 16: 1604-1613.
9. Frías López MC, Uria Ovando V, Carasol Campillo M. "Métodos de diagnóstico microbiológico en la enfermedad periodontal". *Cient Dent* 2009; 6:93-101.
10. Garcia G, Lopez W, Alger J, Matute ML, Kaminsky R. Diagnóstico parasitológico de laboratorios públicos y privados de Tegucigalpa, Honduras: ¿Capacidad de respuesta? *Rev Med Hondur,* 2014 82(4):148-154.
11. Isenberg H., Specimen, Collection, Transport and Acceptability. Isenberg H., *Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2th Edition, United States, ASM Press* 2004:2.1.1-2.1.25.
12. Kalenin S., Budimir A. The role of the microbiology laboratory in healthcare associated infection prevention. *Int J Infect Control.* 2009; 5:1-6.
13. Koivunen M. and Krogsrud R. Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. *LabMedicine.* 2006; 37 (8): 490-497.
14. Koneman's Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology, 6th Edition, United States, Lippincott Williams & Wilkins, 2006: 946-996.
15. Levinson W. Review of Medical Microbiology and Immunology, 20th Edition, United States, McGraw Hill, 2012: 86-94.
16. Levinson W., Laboratory Diagnosis, Levinson W., Review of Medical Microbiology and Immunology, 20th Edition, United States, McGraw Hill, 2012: 61-68.
17. Loomer P. "Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases". *Periodontol* 2000 2004; 34: 49-56.
18. Millar B., Xu J., and Moore J. Molecular Diagnostics of Medically Important Bacterial Infections. *Curr Issues Mol Biol.* 2007; 9(1):21-39.

19. Montiel F. y Guzmán A. Laboratorio de Microbiología Clínica. Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas. Boletín Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. 1997; 26:140-145.
20. Murray P., and Tenenbaum F. The Clinician and the Microbiology Laboratory. - Mandell D., Bennett J., Dolin R., 7th Edition, United States, Elsevier, 2010: 233-276.
21. Newton D. and Weekley S. Enhancing the Function of Clinical Microbiology Laboratories: Can We Navigate the Road Less Traveled? J Clin Microbiol 2011; 49 (9): S72-S76.
22. Pondé RAA. The serological markers of acute infection with hepatitis A, B, C, D, E and G viruses revisited. Arch Virol. 2017; 162(12):3587-3602.
23. Prentice Hall, 1988. New Jersey. 13: 488-489.
24. Raoult D., Fournier P, Drancourt M. What does the future hold for clinical microbiology? Nat Rev Microbiol. 2004; 2(2):151-159.
25. Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). Clin Infect Dis. 2013; 57(4):e22-e121.
26. Scansen K., Bonsu B., Stoner E., et al. Comparison of Polyurethane Foam to Nylon Flocked Swabs for Collection of Secretions from the Anterior Nares in Performance of a Rapid Influenza Virus Antigen Test in a Pediatric Emergency Department. J Clin Microbiol. 2010; 48 (3): 852-856.
27. Van Leeuwen W. Molecular Diagnostics in Clinical Microbiology. Iran.J.Microbiol. 2009; 1 (2):5-20.
28. Walker A. Rapid plasma reagin (RPR) card test a screening method for treponemal disease. Br J Vener Dis. 1971 August; 47 (4): 259-262.
29. Washington C., Allen S., Janda W., et al., Laboratory Diagnosis by Immunologic Methods, Washington C., Allen S., Janda W., et al., Koneman's Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology, 6th Edition, United States, Lippincott Williams & Wilkins, 2006: 112-125.
30. York M., Aerobic Bacteriology, Isenberg H., Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2th Edition, United States, ASM Press 2004:3.1.1-3.6.5.