PROJECT MILESTONE

MILESTONE #3: DETECTION OF OPPORTUNISTIC INFECTIONS PROCEDURES MANUAL DEVELOPED AND ENDORSED

CONTENTS

1. Official Endorsement by the Head of the National Laboratory
2. Detection of Opportunistic Infections Procedures Manual Developed and Endorsed

SEPTEMBER 30, 2014

This publication was produced for review by the United States Agency for International Development. It was prepared by AIDSTAR Plus under USAID/Honduras AID-522-TO-13-00001; IQC No. AID-GHH-I-00-07-00059.

SECRETARIA DE SALUD
DEPARTAMENTO LABORATORIO NACIONAL DE VIGILANCIA
Tel. 2232-5840 Fax 2239-7580

OF.N°. 340-JDLNV-2014 **Tegucigalpa, M. D. C. 25 de Septiembre 2014**

DR. ROLANDO PINEL
Director de País
John Snow Inc. (JSI)
AIDSTAR Comprehensive HIV/AIDS Project

Estimado Doctor Pinel:

Por este medio le informo que como resultado de las actividades realizadas por el equipo de trabajo del Departamento de Laboratorio Nacional de Vigilancia con la asistencia técnica del equipo de AIDSTAR Plus, se ha logrado concluir y se ha aprobado por esta Jefatura el siguiente documento:

1. **Manual de Procedimientos Operativos de Laboratorio para el Diagnostico de Infecciones Oportunistas más Frecuentes en Personas con VIH.**

Agradecemos profundamente su gestión en el logro de tan importante documento normativo.

Con muestras de consideración y respeto,

Atentamente,

DRA. MARIA LUISA MATUTE
Jefe Departamento Laboratorio Nacional

CC: Dr. Bredy Lara, Director de la Unidad de Vigilancia de la Salud
Dra. Rita Meza, Jefe Laboratorio VIH/DLNV
Archivo

GOBIERNO DE LA
REPÚBLICA DE HONDURAS

SECRETARÍA DE SALUD

Manual de Procedimientos Operativos de Laboratorio para el Diagnóstico de Infecciones Oportunistas Más Frecuentes en Personas con VIH

Septiembre, 2014

Tegucigalpa, M.D.C. Honduras, C.A.

USAID
DEL PUEBLO DE LOS ESTADOS
UNIDOS DE AMÉRICA

PEPFAR

AIDSTAR Plus

Esta publicación fue realizada gracias al generoso apoyo del pueblo de los Estados Unidos de América a través de la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo International (USAID) y el Plan de Emergencia del Presidente para el Alivio del SIDA (PEPFAR). Los contenidos son la responsabilidad de John Snow, Inc. (JSI) y no reflejan necesariamente la perspectiva de la USAID, PEPFAR o el gobierno de los Estados Unidos.

Autoridades de la Secretaría de Salud

Dra. Edna Yolani Batres
Secretaria de Estado en el Despacho de Salud

Dra. Sandra Maribel Pinel
Subsecretaria de Redes Integradas de Servicios de Salud

Dr. Francis Rafael Contreras
Subsecretario de Regulación

Dra. Silvia Yolanda Nazar
Directora General de Normalización

Dra. Glady Paz Díaz
Directora General de Vigilancia del Marco Normativo

Dra. María del Carmen Sevilla
Directora General de Desarrollo del Recurso Humano

Dr. Billy Rolando González
Director General de Redes Integradas de Servicios de Salud

Dr. Bredy Dilman Lara
Jefe de la Unidad de Vigilancia de la Salud

Dra. María Luisa Matute
Jefa Departamento de Laboratorio Nacional de Vigilancia

Coordinación técnica

Dra. María Luisa Matute
Jefe del Departamento Nacional de Vigilancia

Dra. Rita Isabel Meza
Jefa de Laboratorio de VIH
Departamento de Laboratorio Nacional de Vigilancia

Equipo técnico AIDSTAR-Plus

Validación técnica

Dra. Adilia Andara	Instituto Cardiopulmonar
Dra. Marta Flores	Hospital Santa Teresa, Comayagua
Dra. Carmen Ramos	Hospital Regional de Occidente, Sta. Rosa de Copán
Dra. María del Carmen Morales	DLNV/Laboratorio de Bacteriología
Dra. Celeste Galindo	IHSS/Tegucigalpa
Dr. Wilfredo Castejón	IHSS/Tegucigalpa
Dra. Carol Webster	Hospital Medical Center
Dra. Lilia Acevedo	UNAH/Depto. de Micología
Dra. Carmen Galo	UNAH/Depto. de Microbiología
Dra. Mirla Rosa	DLNV/Unida Gestión de la Calidad
Dra. Nora Sánchez	Instituto Cardiopulmonar

Contenido

Introducción 1
Propósito 2
Objetivos 2
Campo de aplicación 2

Capítulo I: Infecciones producidas por hongos 3
Introducción 4
Definiciones 5
Candida spp. 6
Criptococcus neoformans 13
Histoplasma capsulatum 17
Pneumocystis jirovecii 23
Aspergillus 27
Obtención de muestras 31
Obtención de muestra de orina para cultivo 32
Obtención muestra de biopsia 34
Obtención de muestras de esputo y secreciones bronquiales 35
Lavado Broncoalveolar 36
Obtención de muestras de Líquido Cefalorraquídeo 37
Procedimientos de Laboratorio 38
Examen microscópico directo 39
Tinción de tinta china (Cryptococcus neoformans) 40
Frotis de tinta china (Cryptococcus neoformans) 41
Examen en fresco con azul de metileno 42
Blanco de Calcoflúor 43
Coloración de Gram 44
Procedimiento de Cultivo 45
Tinción de Coloración de May Grünwald-Giemsa (Histología) 47
Tinción rápida de Giemsa 48
Tinción Azul de toluidina (Pneumocystis jirovecii) 49
Tinción Argéntica rápida (Gomori-Grocott modificado) 51
Tinción de Gomori-Grocott Para la tinción de hongos (Candida, Aspergillu) 53
Técnica de Buffy Coat 55
Inmunofluorescencia 56
Bibliografía 57

Capítulo II: Infecciones producidas por Virus 59
Introducción 60
Definiciones 61
Virus Herpes Simplex 62
Varicela Zoster 67
Citomegalovirus 71
Hepatitis viral tipo B 75
Obtención de la muestra 78
Obtención Toma de Muestra de Líquido de Vesícula (Para diagnóstico de Herpes simplex y Varicela zoster a través de cultivo viral) 79

Obtención Muestra de Sangre Venosa 80
Obtención de muestra de Raspado de base de la lesión (Para diagnóstico de Herpes simplex y Varicela zoster) 82
Obtención muestra de biopsia 83
Obtención de muestras del Líquido Cefalorraquídeo 84
Procedimientos de Laboratorio 85
Prueba de Tzanck (Para identificación presuntiva de Varicela zoster y Herpes simplex) 86
Coloración de Giemsa (Citodiagnóstico) 88
Técnica ELISA 90
Prueba de Látex 92
Bibliografía 93

Capítulo III: Infecciones transmitidas por Protozoos 95
Introducción 96
Definiciones 97
Toxoplasma gondii 99
Isospora belli. 108
Cyclospora cayetanensis 113
Trypanosoma cruzi 116
Microsporidios 121
Obtención de muestras 124
Obtención de muestras de Líquido Cefalorraquídeo 125
Obtención muestra de Sangre venosa 126
Obtención muestra de biopsia 128
Obtención de muestra de Heces 129
Obtención de muestras de esputo y secreciones bronquiales 130
Obtención de muestra de sangre para hemocultivo 131
Procedimientos de Laboratorio 133
Examen Microscópico Directo de heces (Cyclospora) 134
Técnica de concentración/flotación. Técnicas de Sheather (Para diagnóstico de coccidios: Cryptosporidium spp, Cyclospora spp, Isospora spp.) 135
Ziehl –Neelsen en “frio”: Coloración de Kinyoun (Para diagnóstico de coccidios: Cryptosporidium spp, Cyclospora spp, Isospora spp.) 137
Método de Flotación con Sulfato de Zinc (Para Isospora) 139
Técnica de TELEMA (Microsporidium) 141
Examen en Fresco (para diagnóstico de parásitos sanguíneos) 142
Frotis sanguíneo 143
Gota gruesa (Identificación morfológica del agente en muestras de sangre), Chagas 145
Coloración de Giemsa 146
Método de Strout (diagnóstico de Chagas) 147
Técnica (ELISA) 148
Técnica de Capsula de Beal (Para diagnóstico de coccidios biliares como, Isospora spp.) 150
Técnica de Esporulación 152
Bibliografía 153

Capítulo IV: Infecciones producidas por Bacterias 156
Introducción 157
Definiciones 158
Bartonella spp. 159

Bacterias que producen infecciones entéricas 163
Bacterias que producen neumonías 171
Técnicas de hemocultivo 185
Treponema pallidum 187
Obtención de muestras 191
Obtención muestra de biopsia 192
Obtención de muestra de sangre para hemocultivo 193
Obtención muestra de Sangre venosa 195
Obtención de muestra de Raspado de base de la lesión 197
Toma de muestra de Heces 198
Obtención muestra de Sangre venosa 199
Procedimientos de Laboratorio 201
Procedimiento para aislamiento bacteriano 202
Coloración de Gram 204
Prueba de Catalasa 206
Prueba de Oxidasa 207
Prueba de Coagulasa 208
Prueba de Optoquina 209
Prueba de Solubilidad en bilis 210
Prueba de determinación de factores 211
Pruebas de identificación bacteriana utilizando sistemas comerciales 212
Prueba de ß lactamasa (Método Cromogénica) 213
Método de Difusión en Disco/Kirby Bauer 214
Prueba de VDRL en suero 217
Prueba de VDRL en Líquido Cefalorraquídeo 220
Pruebas no treponémicas macroscópicas RPR 222
Bibliografía 225

Capítulo V: Infecciones causadas por Mycobacterias 227
Introducción 228
Definiciones 229
Mycobacterium tuberculosis 230
Procedimientos de Laboratorio 237
Coloración de Ziehl-Neelsen 238
Método de Petroff –Modificado (Para cultivo de Mycobacterium tuberculosis) 240
Bibliografía 242

1. Introducción

Las infecciones oportunistas (IO) han sido la principal causa de morbilidad y mortalidad de las personas infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Sin embargo, con la aplicación de métodos diagnósticos adecuados y el uso de pautas terapéuticas eficaces se mejoró el manejo clínico lo que ha impactado positivamente en la calidad de vida de las personas con VIH.

En vista que el diagnóstico precoz y el tratamiento oportuno sigue siendo un tema de actualidad en la atención integral de las personas con VIH, exige que los métodos de diagnóstico sean cada día de mayor rapidez y eficiencia, pues representa una herramienta esencial en la toma de decisión terapéutica para el personal clínico responsable de brindar servicios a esta población.

Por lo anterior, el Laboratorio de VIH del Departamento de Laboratorio Nacional de Vigilancia ha elaborado el presente "*Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de infecciones oportunistas más frecuentes en personas con VIH".* Consta de V capítulos que detallan las definiciones, abreviaturas, patologías y las principales técnicas/procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de las IO.

Este manual está dirigido a profesionales del ámbito sanitario, que brindan atención integral a las personas con VIH y al personal de laboratorio. Esperamos que dicho documento sea utilizado en la práctica profesional, contribuyendo de esta manera a mejorar la calidad de los servicios y por ende la calidad de vida de las personas con VIH.

2. Propósito

Este manual tiene como propósito actualizar los conocimientos clínicos y técnicos, en los procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de infecciones oportunistas más frecuentes en personas con VIH, con la finalidad de realizar el diagnóstico oportuno y confiable y de esta forma disminuir la morbilidad y mortalidad asociadas a dichas infecciones.

3. Objetivos

1.1 General

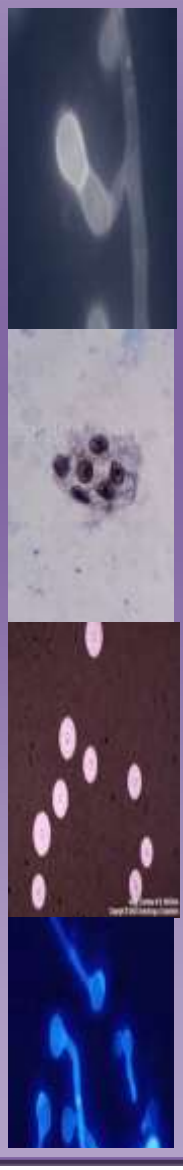
Promover y fortalecer el diagnóstico oportuno y confiable de las infecciones oportunistas más frecuentes en personas con VIH, mediante el uso estandarizado de procedimientos de laboratorio.

1.2 Específicos

- Describir las principales infecciones oportunistas y sus manifestaciones clínicas
- Detallar los procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de las infecciones oportunistas más frecuentes

4. Campo de aplicación

El presente manual es aplicable a todo el personal clínico y de laboratorio de las entidades públicas y no públicas que conforman el Sector Salud.



Capítulo I

INFECCIONES PRODUCIDAS POR

Hongos

Introducción

En la medida que la pandemia del sida fue creciendo se convirtió en el principal factor predisponente para el padecimiento de varias micosis tanto superficiales como profundas.

Todas ellas presentan un cuadro clínico diferente del que originan en personas no infectadas por el VIH; En general son más diseminadas, su curso es más agudo y la evolución más grave.

Algunas infecciones fúngicas son una causa frecuente de muerte en las personas con sida, como es el caso de la criptococosis y la neumocistosis, o tienen importancia por la frecuencia de su aparición y evolución recidivante como las candidiasis bucofaríngeas y esofágicas que empeoran el estado general de los personas precipitándolos, a veces, a la caquexia. La aparición de antirretrovirales sumada a la de nuevos antifúngicos ha disminuido la incidencia de micosis asociada al VIH, sin embargo, ciertas infecciones como la neumonía por Pneumocystis jiroveci y las patologías asociadas a la Cándida spp siguen siendo infecciones oportunistas frecuentes.

En una persona infectada por el VIH, el desarrollo de una infección por hongos sugiere progresión de la enfermedad y la disfunción inmune y se debe considerar la terapia antirretroviral.

Definiciones

- **Auxonograma:** Pruebas bioquímicas manejadas en la identificación de las especies de *Cándida spp*, se basan en la utilización de carbohidratos, se realiza en medios sólido con base peptonada.
- **Blastoconidea:** Unidad de reproducción asexual, producida por gemación, puede observarse en levaduras como: *Cándida* y *Cryptococcus spp.*
- **Candidiasis diseminada**: infección producida por el género Cándida que se expande o afecta diversos órganos.
- **Cápsula**: envoltura hialina y gelatinosa que rodea a una célula, formada generalmente de polisacáridos.
- **Clamidospora:** (clamidoconidios) conidios grandes, de pared gruesa y por lo común esféricos, producidos por las hifas terminales o intercalares.
- **Conidio:** estructuras reproductivas asexuales (mitospora) producidas por la transformación de una levadura vegetativa o una hifa, o por una célula conidiógena especializada, que puede ser sencilla o compleja y elaborada. Los conidios pueden formarse en hifas especializadas llamadas conidióforos. Los microconidios son pequeños y los macroconidios son grandes y multicelulares.
- **Gemación:** Es un tipo de reproducción asexual (división desigual), consiste en la formación de prominencias sobre la levadura y que al crecer y desarrollarse forma nuevos entes que pueden separarse del organismo parental o quedar unidos a él.
- **Hemocultivo:** Es un cultivo microbiológico de la sangre, empleado para detectar infecciones por bacterias u hongos en la sangre.
- **Hifas**: Elemento estructural fundamentalmente de los hongos, puede ser unicelular como las levaduras o pluricelular adoptando la forma de filamento septado o aseptado. El conjunto de hifas forma el micelio.
- **Hifas cenocíticas:** hifas no septadas o no tabicadas
- **Hongo:** Designa a un grupo de organismos eucariotas entre los que se encuentran los mohos, las levaduras y las setas. Se clasifican en un reino distinto al de las plantas, animales y protistas.
- **Levadura:** hongo ascomiceto, de tamaño microscópico, redondeado u ovoide unicelulares, que se dividen por gemación y que producen fermentaciones.
- **Peptidoglicano** o **muraina:** es un copolìmero formado por una secuencia alternante de N- acetil-glucosamida y el Àcido N-acetilmuràmico unido mediante enlaces β-1,4. El peptidoglicano es muy resistente y protege a las bacterias de una ruptura osmòtica y da a los tipos diferentes de bacteria su forma. Constituye la estructura básica de la pared celular de las bacterias.
- **Reproducción asexual:** multiplicación celular por mitosis y que en los hongos da por resultado la producción de conidios.
- **Zimograma:** Pruebas bioquímicas manejadas en la identificación de las especies de *Cándida spp*, se basan en la fermentación de carbohidratos, debe realizarse en un medio de cultivo liquido con una proporción de carbohidratos (Alexandro Bonifaz,2012)

Cándida spp.

Cándida spp., son levaduras mitospóricas alargadas o ligeramente redondas de 2 - 6 x 3 - 9 µm que se reproducen por gemación (blastoconidios). A excepción de *C. glabrata*, el resto de las especies asociadas a candidiasis pueden formar pseudomicelios; *C. albicans* y *C. dubliniensis* además son formadoras de hifas. (Castañon Olivares, 2013)

Muchas especies se han aislado de vegetales, suelo, agua, aire, alimentos y algunas de ellas forman parte de la biota normal de la piel y membranas mucosas (boca, vagina, vías respiratorias altas, tracto gastrointestinal) de mamíferos.

Aunque se han reportado más de 17 especies patógenas, el 90% de las infecciones se atribuyen a: *C. albicans, C. krusei, C. glabrata, C. parasilopsis, C. tropicalis.*

Más del 70 % de las infecciones son producidas por *C. albicans*. (Vázquez y Sobel. 2011). El cuadro 1., describe las especes de *Cándida* patógenas.

Cuadro 1. Especies de *Cándida* patógenas

Especie	Frecuencia
C. albicans	50%
C. tropicalis	15-30%
C. parapsilosis	15-30%
C. glabrata	15-30%
C. krusei	~1%
C. guilliermondii	~1%
C. lusitaniae	~1%
C. dubliniensis	~1%

1. Descripción de la enfermedad

La candidosis o candidiasis es una micosis causada por diversas especies de levaduras del género Cándida. Cualquier tejido puede ser afectado por lo que se presentan diversos cuadros clínicos, cada uno de ellos asociado directamente al estado inmunológico del paciente. Las candidiasis de mucosas y piel son las más frecuentes, mientras que las sistémicas son de evolución aguda o crónica y generalmente severas. (Castañón Olivare, 2013).

2. Manifestaciones Clínicas

2.1 Candidiosis Bucal

A. Seudomembranosa

La forma aguda es la más frecuente y predomina en los recién nacidos y ancianos; localizada en lengua, carrillos y paladar se caracteriza por una capa blanca, adherente y membranosa, de bordes difusos y dispuesta sobre una base eritematosa, cuyo síntoma es el dolor. Los pacientes refieren pérdida de la sensación gustativa, ardor, disfagia alta y sialorrea.

B. Atrófica eritematosa o estomatitis hipertrófica

Es común en personas que usan dentadura postiza, el epitelio es delgado, brillante y eritematoso, se presenta macroglosia, lengua escrotal (fisurada), gingivitis, hemorragias frecuentes de las encías y queilitis angular.

C. Hiperplasia o leucoplaquia

Localizada en el dorso de la lengua, caracterizada por una capa blanca persistente, firme, rugosa, de margen irregular y eritematoso. Asociada a estomatitis, queilitis angular (localizada en las comisuras labiales, pudiéndose extender a los pliegues de la cara).

2.2 Vulvovaginitis

La mucosa vaginal y la vulva presentan eritema intenso que puede extenderse a pliegues inguinales y periné. Generalmente se presenta dispareunia y leucorrea, además de prurito, sensación urente y disuria. Existe un riesgo mayor de recaídas en las pacientes HIV positivas.

2.3 Balanitis

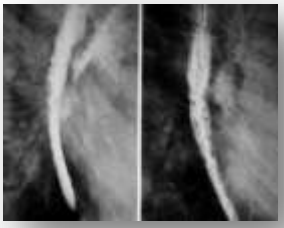
En los casos leves, se caracteriza por la presencia de pápulas o pústulas localizadas al glande con discreto eritema y dolor. En los casos severos o crónicos los cambios inflamatorios son persistentes sobre el glande y el prepucio.

2.4 Onicomicosis y perionixis

La infección de las uñas por Cándida se puede manifestar principalmente por onicolisis asociada a paroniquia o perionixis. En algunas ocasiones Cándida puede penetrar la cara dorsal de la lámina ungueal y manifestarse por leuconiquia. Es frecuente que se asocie a una reacción de perionixis con inflamación, edema, dolor y exudado

2.5 Esofagitis

La candidiasis esofágica es la causa más común de esofagitis en los pacientes infectados por el HIV. Clínicamente se presenta con disfagia, odinofagia, náuseas, vómito, hematemesis y dolor retroesternal, en ocasiones hay casos sin síntomas y el diagnostico se basa en la endoscopía, en la cual se pueden observan placas blanquecinas difusas o focales asociadas a una mucosa hiperémica y friable, así como exulceraciones bien circunscritas.



La radiografía contrastada de esófago presenta defectos de relleno, ocasionados por las múltiples ulceraciones superficiales de la mucosa. Su aspecto es muy característico, llamado esófago en empedrado, aunque no es patognomónico. Los hongos del género *Cándida* pueden complicar las lesiones esofágicas previas de otro origen como las lesiones herpéticas y las producidas por el *Citomegalovirus*.

3. Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de candidiasis se basa en el conjunto de signos y síntomas clínicos junto a un cultivo positivo o la visualización de las levaduras mediante tinción de Gram, KOH o blanco de calcoflúor.

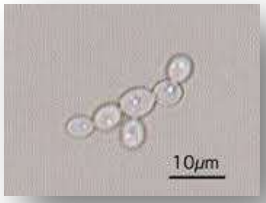
3.1 Muestras clínicas/biológicas para el diagnostico

- ✓ Raspado de superficies de lesiones en mucosa
- ✓ Material de biopsia
- ✓ Muestras broncoscópicas
- ✓ Orina
- ✓ Sangre (hemocultivo)

3.2 Métodos de diagnóstico

A. Examen Directo

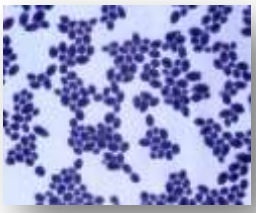
A.1 Examen en fresco



En solución salina al 0.85%, o examen en KOH al 10%.

Se observan células redondas u ovaladas de 3 a 7 micras de diámetro, que se reproducen por blastoconidias y forman pseudomicelio en la mayoría de las especies.

A.2 Coloración de Gram



De acuerdo al resultado de la coloración las microrganismos pueden ser Gram positivas o Gram. Las levaduras retienen los colorantes violetas por lo que se colorean como Gram positivas.

A.3 Cultivo

El cultivo es imprescindible para identificar especies de *Cándida*, efectuar estudios de sensibilidad in vivo o para estudios epidemiológicos.

En la mayor parte de los medios: Sabouraud, papa dextrosa agar, agar sangre, extracto de levadura, infusión cerebro corazón; incubados por 2- 3 días a 28 o 37°C; crecen colonias blanquecinas, lisas (en ocasiones rugosas), húmedas, limitadas, opacas y en algún momento se observan pseudomicelios dentro del agar. (Alexandro Bonifaz, 2012)

La identificación de especies de *Cándida* se puede realizar por diferentes métodos.

A.3.1 Prueba de tubo germinal

Se observa la formación de tubo germinal de aproximadamente 5 a 15 µm de largo que salen de la levadura. Efecto producido por *C. albicans* (Alexandro Bonifaz 2012)

A.3.2 Chrom agar

Se basa en la diferenciación cromogénica de las diferentes especies de *Cándida*.

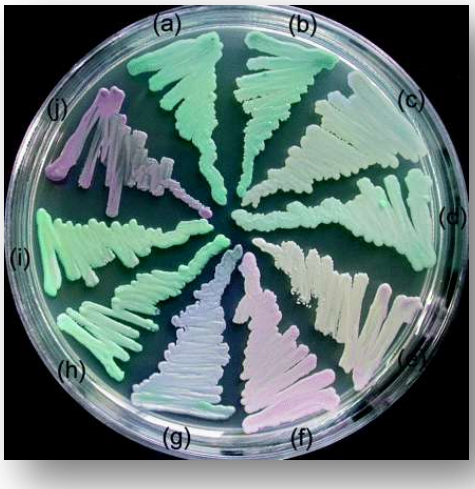
Cándida albicans crece como colonias lisas brillantes, color verde esmeralda.

A continuación se presenta un cuadro con las diferentes especies de Cándida y el color producido en el Chrom agar (Cuadro 2).

Cuadro 2. Color y aspecto de especies de *Cándida* en Chrom agar

Características de las colonias de las especies levaduriformes en CHROM-agar Cándida

Especie	Color	Aspecto
Cándida		
C. albicans	Verde esmeralda	Lisas, brillante
C. glabrata	Rosa oscuro	Lisas, brillantes
C. guillermondii	Rosa, rosa pálido	Planas, brillantes, borde liso
C. krusei	Rosa	Secas, opacas, rugosas
C. parapsolopsis	Rosa pálido	Lisas, brillantes
C. troipicalis	Azul	Lisas con borde micelial
Geotrichum		
G. candidum	Blanca	Aterciopelada
Rhodotorula		
R. glutinis	Rojo coral	Lisas, húmedas, mucosas
Saccharomyces		
S. cerevisiae	Púrpura, rosa púrpura	Lisas, planas, húmedas
Trichosporon		
T. beigelii	Azul intenso	Secas, rugosas[8]



Colonies grown on CHROMagar Candida for 48 h at 30°C: (a) *C. pseudorugosa* XH 1026, (b) *C. pseudorugosa* XH 1164, (c) *C. rugosa* CBS 613, (d) *C. rugosa* AS 2.1498, (e) *C. parapsilosis* ATCC 22019, (f) *C. krusei* AS 2.3194, (g) *C. tropicalis* AS 2.3195, (h) *C. dublinensis* CBS 7988, (i) *C. albicans* ATCC 90028, and (j) *C. glabrata* ATCC 90030.

A.3.3 Identificación bioquímica

Se basa en la fermentación (zimograma) y utilización (auxograma) de carbohidratos.

En la actualidad se han desarrollado diversos métodos comerciales de pruebas bioquímicas; los más utilizados son: API-yeas (20 o 36 carbohidratos), Auxocolor, Microscan, Vytec. Todos permiten realizar una identificación sencilla de las levaduras (Alexandro Bonifaz, 2012) Cuadro 3

Identificación de *Cándida albicans* por métodos bioquímicos

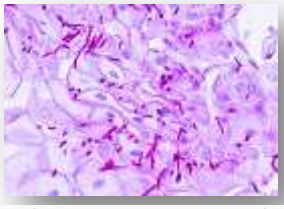
Cuadro 3. Perfil bioquímico para la identificación, especies de Cándida

Especies	Morfología			Auxonograma										Zimograma						Otras características			
				Indispensable						Electivo													
	Micelio o seudomicelio	Clamidospora	Filamento en suero a 37°C, 4h	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Galactosa	Lactosa	Rafinosa	Inositol	Celobiosa	Xilosa	Trehalosa	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Galactosa	Lactosa	Rafinosa	Ureasa	Reducción de tetrazolio	Resistencia A Cicloheximidina (Actidione) (crecimiento)	Utilización de KNO^3
C. albicans	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	±	+	-	-	-	B	+	-
C. stellatoidea	+	±	±	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	R	+	-
C. tropicalis	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	V	+	+	+	+	+	+	-	-	-	Vi	-	-
C. parapsilosis	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	R	-	-
C. krusei	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	B	-	-
C. pseudotropicalis	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	V	-	+	-	+	+	+	+	-	R	+	-
C. guillermondii	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	R	+	-
C. zeylanoides	+	-	-	+	+	+	V	-	-	-	-	-	+	V	-	-	-	-	-	-	R	-	-

+, Positivo; - , negativo; ±, casi siempre es positivo; B, blanco; R, rosado; V, variable; Vi, violeta.[15]

A.4 Tinciones en Biopsias

Utilizadas para observar efectos patológicos y morfológicos causados por el microorganismo a las células (tejidos), entre ellas podemos mencionar; Plata-metenamina de Gomori, Giemsa, PAS (Ácido peryódico de Schiff)



Micrografía de la candidiasis esofágica. Muestra de biopsia; ácido peryodico de Schiff.

A.5 Biología molecular

Se ha creado un PCR tiempo real para detectar la taxonomía de la base filogenética; Identifica la región variable de la subunidad 18S del DNA ribosomal, (diferenciación de especies) C. albicans, C. glabrata, C. krusei, C. tropicalis y C. parapsilosis en suero.

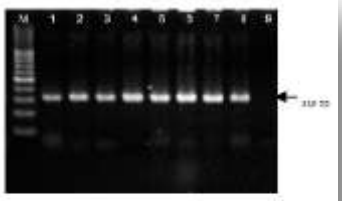


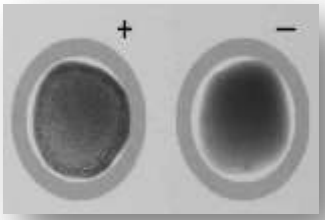
Figure 1. PCR products of *Candida albicans* identification. Agarose gel (2%), stained with ethidium-bromide. M: molecular weight marker; lanes 1-8: clinical samples, lane 9: negative control.

B. Examen Indirecto

Las pruebas serológicas no son sistemáticas; son tipos de inmunodiagnóstico que permiten detección de anticuerpos en suero.

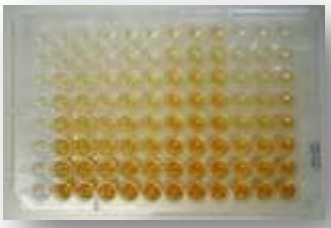
B.1 Aglutinación en látex

Puede resultar positiva con formas superficiales de candidiasis; (Formación de grumos se interpreta como positivo).



B.2 ELISA (Ensayo Inmunoenzimatico),

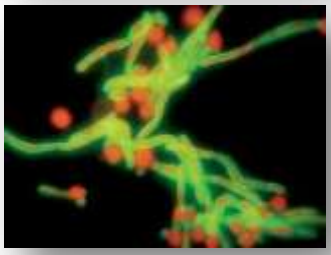
Investiga anticuerpos anticitoplasmáticos; con altos porcentajes de sensibilidad y especificidad



B.3 Anticuerpos fluorescentes:

Investiga formas de candidiasis septicémicas y viscerales.

En esta prueba lo más recomendable es combinar contrainmunoelectroforesis e inmunofluorescencia indirecta. (Roberto Arenas 2011)



Criptococcus neoformans

Cryptococcus neoformans y *C. gattii* son levaduras de basidiomicetos con grandes cápsulas de polisacáridos (Jawetz Melnick y Adelberg, 2011)

Uno de los hábitats más importantes o frecuentes de esta levadura es el guano de algunas aves como palomas, pichones, gallinas etc., donde se ha llegado a obtener hasta un 69%; por lo tanto, es habitual el aislamiento en los gallineros, palomeras, atrios de iglesia y edificios viejos o abandonados.

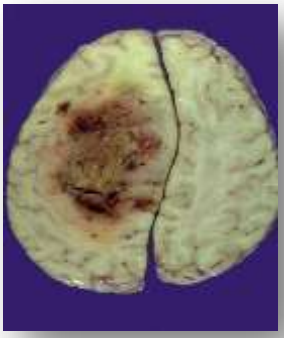
Las aves se convierten en reservorios o vectores indirectos que mantiene el microorganismo, pero no adquieren la enfermedad. (Martín Lasso B, 2011).

La capsula de las especies de *Cryptococcus*, es uno de los factores de virulencia más importantes, formada por polímeros (ß-(1,2)-glucorónico), que pueden diferir ligeramente en su composición generando cinco serotipo conocidos como son: A, B, C, D y AD (hibrido), mismo que sirve para clasificar las especies y variedades. (Alexandro Bonifaz, 2012)

1. Descripción de la enfermedad

La criptococosis es una micosis sistémica aguda, subaguda o crónica causada principalmente por *Cryptococcus neoformans* (vars. *neoformans* y *grubii*) y *Cryptococcus gattii* y se caracteriza por afectar inicialmente los pulmones, y después diseminarse a piel y vísceras, con una clara predilección hacia el sistema nervioso central (SNC), (Alexander Bonifaz, 2012). Con mayor riesgo de padecerla, las personas infectadas por VIH con menos de 100 linfocitos CD4/ml y aunque el hongo tiene una amplia distribución mundial y se encuentra de manera abundante en la naturaleza, solamente causa enfermedad grave en personas con resistencia inmunológica muy baja. La exposición a *C. neoformans* es frecuente y la vía de entrada es la respiratoria, la forma pulmonar es generalmente transitoria, leve y no reconocida (Jesus Santos, 2012); Sin embargo hay reportes de casos cutáneos primarios que se inician por la inoculación a través de una soluciones contaminadas. El *C. neoformans* también pueden ingresar por vía oral (frutos, leche), pero la lisozima salival y el pH ácido del estómago lo inactiva la mayoría de las veces.

2. Manifestaciones Clínicas



La criptococosis cerebral es la forma más frecuente, se manifiesta principalmente como un cuadro de meningitis o meningo-encefalitis y se caracteriza por fiebre, cefalea y compromiso del estado general y mental.

Los signos clásicos de rigidez de nuca y fotofobia son menos habituales (25-30%) que en la meningitis bacteriana aguda.

El compromiso de las funciones mentales superiores y del nivel de conciencia es poco frecuente y se ven más bien en etapas tardías de la enfermedad.

El LCR puede ser normal o mostrar alteraciones discretas: proteínas elevadas, glucosa baja o normal e incremento del número de células a expensas de linfocitos. La presión de apertura es elevada en 75% de los pacientes y rebasa los 20 cm de H2O. (Jesus Santos, 2012).

3. Diagnóstico de laboratorio

El diagnostico se basa en la detección del hongo en las muestras orgánicas, mediante tinción, cultivo o

La capsula no se tiñe con colorantes habituales, por lo que se requiere de técnicas de contraste negativo como la tinta china. (Martín Lasso B, 2011). La cual es positiva en el 75% de los pacientes determinación de antígenos capsulares. El líquido cefalorraquídeo es el espécimen en donde con mayor frecuencia se hace el diagnóstico de criptococosis. (Castañon Olivares, 2013).

3.1 Muestras clínicas/biológicas para el diagnostico

Depende del tipo de criptococosis, por lo que se puede manejar:

- ✓ LCR
- ✓ Sangre
- ✓ Esputo
- ✓ Pus
- ✓ Lavado Bronquial
- ✓ Exudados
- ✓ Orina
- ✓ Biopsias

3.2 Métodos de diagnóstico

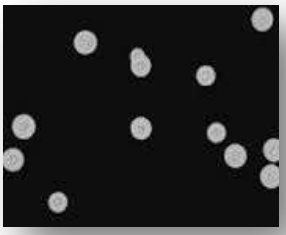
A. Examen Directo

Examen directo y tinciones

El examen directo es de poca utilidad porque mediante esta técnica la cápsula no es visible debido a que es altamente hidrofílica y tiene similar índice de refracción, por lo que no se observa con exámenes en fresco y tinciones habituales. Las levaduras de Cryptococcus spp., Cándida spp. u otros hongos levaduriformes, llegan a confundirse fácilmente.

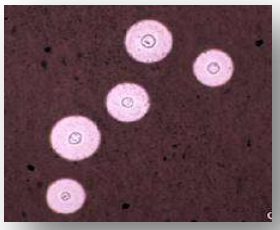
A.1 Examen directo con tinta china

Es la forma más sencilla y rápida de hacer diagnóstico en LCR, orina y suero, previamente centrifugados. El sedimento de las muestra se mezcla con una gota de tinta china; el objetivo es resaltar la cápsula, así como el cuerpo de la levadura. Es importante buscar levaduras gemantes. (Alexander Bonifaz, 2011)



A.2 Frotis con tinta china

A partir de la muestra (LCR, suero, orina), se realiza un frotis y se fija al calor, luego se agrega al extendiendo una gota de tinta china (tinta india) o nigrosina; por refringencia con el microscopio se puede observar de manera sencilla el cuerpo de la levadura y el halo de la cápsula. (Alexandro Bonifaz, 2012)



A.3 Cultivo

Procedimiento por el cual se logra aislar el hongo para realizar identificación de especie a través de pruebas bioquímicas, determinar perfiles de sensibilidad y realizar estudios epidemiológicos.

Crecimiento en agar Níger a 25°C. Se observa producción de pigmento melánico que da un color marrón obscuro a las colonias de *C. gattii y C. neoformans*.
Imagen: E. Bazán-Mora, UNAM.

Los medios de cultivo más útiles son: Sabouraud, extracto de levadura y BHI agar, nunca debe sembrarse en Sabouraud sin Cicloheximidina (actidione) ya que inhibe a C.*neoformans* y *C. gattii.*

Después de 2-3 días a temperatura ambiente o 37°C, las colonias son limitadas, mucoides, convexas, de color blanco amarillento y dan un aspecto de leche condensada, rara veces puede

A.3.1 Examen microscópico de cultivo

Al microscopio se observan levaduras de aproximados 5 a 10µm de diámetro con blastoconidios de la mitad de su tamaño; ambas, con todo y cápsula, llegan a medir hasta 20 µm de diámetro. (Martín Lasso B.,2011)

Cryptococcus neoformans. Levaduras encapsuladas.
Imaagen: CDC/ Leanor Haley

Uno de los métodos para identificar especies de *Cryptococcus* es por su perfil bioquímico Cuadro 4.

El perfil bioquímico para *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*, es asimilación de glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa, galactosa y Rafinosa. (Alexandro Bonifaz, 2012)

Cuadro 4. Perfil bioquímico para la identificación de *Cryptococcus*

Propiedades	*C. neoformans*	*C. gattii*	*C. uniguttulatus*	*C. albidus*	*C. laurenti*	*C. gastricus*
Producción de ureasa	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 37°C	+	+	±	+	+	-
Crecimiento a 40°C	+	+	-	-	-	-
Utilización de Nitratos $(KNO)_3$	-	-	-	-	-	-
Medio Canavanina-glicina-azul de bromotimol	-	+	-	-	-	-
Inhibición de Urea (tratada con EDTA)	-	+	-	-	-	-
Virulencia al ratón	+	+	-	-	-	-
Pigmento en medio alpiste	+	+	-	-	-	-
Formación de cápsula	+	+	-	+ delgada	+ delgada	+

B. Examen Indirecto

B.1 Detección de Antígeno (Cr Ag- Lateral Flow)

Preuba inmunocromatográfica, cualitativa y semicuantitativa, utilizada para la detección de antígenos polisacáridos de la especie Crypotococcus (Crypotococcus neoformans y Crypotococcus gattii) en suero y LCR.

Histoplasma capsulatum

Hongo dimórfico denominado *Histoplama capsulatum* variedad *capsulatum,* clasificado dentro de la división *Ascomycetes*, se le conoce una fase telemórfica que se le denomina *Ajellomyces capsulatus.*

H. capsulatum puede habitar en el suelo y detritus vegetal, pero en especial se ha aislado del guano proveniente de murciélagos, aves domésticas como gallinas, pavos, gansos, o bien de aves migratorias, en especial de estorninos (*Sturnus vulgaris*), por lo que es posible encontrar el hongo en granjas y bosques.

La temperatura óptima para su desarrollo es de 20 a 30°C, a una humedad relativa entre 70 y 90%, con una preferencia sobre suelos calizos, con alto contenido de nitrógeno y fosforo, prefiere poca luz para su reproducción y un ambiente húmedo; también se ha aislado de excretas de aves (pollinaza y gallinaza) que son utilizados como alimentos para el ganado.

H. capsulatum entra a través del aparato respiratorio, por la aspiración de esporas o conidios; en contadas ocasiones penetran por vía cutánea (0.5% de veces), dando un complejo cutáneo chancroide similar al de esporotricosis o coccidioidomicosis, pero tiende a la involución espontánea y sólo se mantiene en pacientes muy inmunosuprimidos; esto demuestra la poca afinidad de *H. capsulatum* hacia el tegumento.

Periodo de Incubación, puede ser de 1 a 3 días, hasta 1 a 5 meses, teniendo como promedio 7 a 10 días.

La micosis pulmonar se considera la más frecuente en el mundo; es un padecimiento patógeno primario y en pacientes inmunosuprimidos el hongo puede actuar como oportunista. (Martín Lasso B., 2011).

1. Descripción de la enfermedad

La histoplasmosis capsulati o americana, es una micosis sistémica causada *Histoplasma capsulatum.*

Los organismos causantes son intracelulares, ubicándose en el interior de una vacuola fagocítica en el citoplasma de los macrófagos del huésped que infectan. Se mencionan cinco formas clínicas: asintomática, respiratoria aguda benigna, aguda diseminada, diseminada crónica y pulmonar crónica. La diseminación ocurre principalmente a nódulos linfáticos y bazo y algunas formas pueden ser fatales. (Berrueta T. U., Criptosporidium, 2013)

La histoplasmosis es una infección casi cosmopolita; los trabajos de *Ajello* indica que en más de 60 países se ha reportado la enfermedad *H. capsulatum* y se desarrolla sobre todo en

climas tropicales, por ejemplo Centro y Sudamérica, sobresaliendo Panamá, Nicaragua, Honduras, Venezuela, Colombia, Brasil, Las Antillas y Argentina. (Martín Lasso B., 2011)

La asociación con la infección del VIH es importante y se puede presentar en áreas endémicas en porcentajes mayores a 10%

Esta enfermedad se considera ocupacional; los grupos de más alto riesgo son mineros, espeleólogos, ingenieros topógrafos, guaneros, agricultores, avicultores, arqueólogos y viajeros de ecoturismo.

2. Manifestaciones Clínicas

Esta infección oportunista se caracteriza por presentar los síntomas que corresponden a las formas diseminadas agudas o subagudas, en las cuales las manifestaciones generales de un cuadro infeccioso grave son las más prominentes.

La respuesta a las drogas antifúngicas es buena, pero las recaídas son frecuentes, obligando a indicar un tratamiento supresivo durante largos periodos.

Las manifestaciones clínicas observadas en más del 40% de los pacientes son: fiebre prolongada, astenia, anorexia, pérdida de peso, anemia, lesiones cutáneas pápulo-ulceradas, hepatomegalia, esplenomegalia, tos, disnea, expectoración mucopurulenta y adenomegalias.

Con una incidencia menor, pero también importante, se presentan diarreas, úlceras bucofaríngeas o laríngeas, leucopenia, plaquetopenia y compromiso del sistema nervioso central que usualmente se manifiesta con cefalea, alteraciones de la conciencia, vómitos, parálisis de algunos nervios craneanos, especialmente el motor ocular externo, convulsiones y rigidez de nuca, son comunes en la histoplasmosis diseminada.

Es aconsejable realizar siempre radiografías de tórax para detectar los infiltrados habitualmente difusos de los pulmones, ecografía o tomografía abdominal que permita el reconocimiento de la hepatoesplenomegalia así como la observación de adenomegalias retroperitoneales o mesentéricas.

Entre el 5% y 10% de los pacientes con histoplasmosis presentan un estado de agudo de shock séptico, síndrome similar al que incluye la hipotensión y la evidencia de coagulopatía diseminada (Powderly, 2011)

Debe tenerse en cuenta que un 5 a un 10% de los pacientes con histoplasmosis diseminada y sida presentan también criptococosis. Por este motivo, el estudio del LCR debe ser siempre muy minucioso y es necesario que incluya el examen microscópico del sedimento con tinta china, los cultivos para hongos y resto de estudios para *C. neoformans*.

Las manifestaciones de piel son variadas, las más habituales tienen un aspecto moluscoide o variceliforme o pápulo-necrótico. Con menor frecuencia pueden simular un pioderma gangrenoso. Las lesiones mucosas son menos comunes que las cutáneas, pero proporcionan una posibilidad diagnóstica importante. La escarificación de las úlceras o erosiones tegumentarias son útiles para llevar a cabo un citodiagnóstico de Tzanck, empleando el colorante de Giemsa y cultivos en medios con antibióticos que permiten el diagnóstico de aproximadamente el 70% de los casos. . (Negroni, 2010)

La vía de entrada el hongo es a través del aparato respiratorio, por la aspiración de esporas o conidios; en contadas ocasiones penetran por vía cutánea (0.5% de veces), dando un complejo cutáneo chancroide similar al de esporotricosis o coccidioidomicosis, pero tiende a la involución espontánea y sólo se mantiene en pacientes muy inmunosuprimidos; esto demuestra la poca afinidad de *H. capsulatum* hacia el tegumento, el periodo de incubación de la enfermedad puede ser de 1 a 3 días, hasta 1 a 5 meses,

3. Diagnóstico de laboratorio

Ante la presencia de lesiones se indicarán biopsias de tejido con tinción de hematoxilina-eosina.

La IgG suele ser positiva, prácticamente en la totalidad de los pacientes infectados por VIH, de manera que un incremento en los títulos de esta inmunoglobulina respecto a un examen basal previo puede ser de utilidad. (Martín Lasso B., 2011).

Debemos destacar que los hemocultivos por el método de lisis-centrifugación con saponina al 5% presentan resultados positivos en más del 70% de las personas con histoplasmosis asociadas al sida y alrededor del 20% constituye el único elemento de diagnóstico.

Los mielocultivos y la biopsia de medula ósea son frecuentemente positivas pero su realización no se practica sistemáticamente, sin embargo debe ser considerada en personas que presentan pancitopenia o hematocritos inferiores al 30% (Negroni, 2010).

3.1 Muestras clínicas/biológicas para el diagnóstico

- ✓ Esputo,
- ✓ Exudado de lesiones cutáneas
- ✓ Líquido cefalorraquídeo
- ✓ Orina
- ✓ Fragmentos de biopsia
- ✓ Material de aspirado bronquial

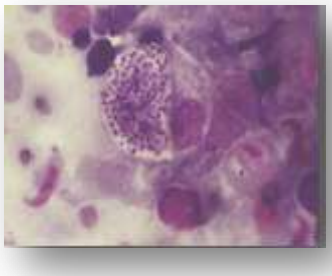
3.2 Técnicas de diagnóstico

A. Examen Directo

A.1 Examen directo

Es poco útil debido a que las levaduras de *H. capsulatum*, var *capsulatum* son muy pequeñas e intracelulares y por lo general pasan inadvertidas.

A.2 Biopsias



Las muestras se dividen en dos partes para su observación y cultivo. Se realizan improntas o frotis, que se fijan al calor o con sustancia como PVP (polivinil pirrolidina) que se tiñen de preferencia con hematoxilina-eosina. PAS, Giemsa, Grocott o Gomori (Martín Lasso B., 2011).

Al microscopio se observan *levaduras intracelulares,* en general dentro de polimorfonucleares y macrófagos; en ocasiones pueden estar libres; miden entre 1 y 2µm de diámetro; en muy contados casos se puede presentar al doble o triple de tamaño (4-6 µm). Por lo regular las levaduras tienen un halo refringente que simula una cápsula, pero corresponde al límite del citoplasma celular, de ahí su nombre. Cabe mencionar que esta imagen se puede confundir con los amastigotes de *Leishmania* o bien con levaduras intracelulares de *Penicillium marneffei*.(Alexandro Bonifaz, 2012).

A.3 Cultivos

El material recolectado, como esputo, aspirado bronquial, exudados, etc., se siembran en medios como Sabouraud, agar sangre, extracto de levadura o infusión cerebro-corazón (BHI). *H. capsulatum* es un hongo dimórfico por lo que incubado por 1 a 2 semanas a 25°C crecerá en forma filamentosa y en forma de levadura a 37°C. (Castañón Olivares, 2014)

Cultivo de *Histoplasma capsulatum* en agar dextrosa Sabouraud con cicloheximida a 25oC. Colonias blancas de apariencia algodonosa. Imagen: Bazán-Mora E, Facultad de Medicina, UNAM.

A.3.1 Examen Microscópico de cultivo

Las colonias muestran hifas hialinas y septadas; a partir de una hifa parental, se desarrollan hifas (conidióforos) en ángulo recto, que generan grandes conidios unicelulares, hialinos, redondos, de paredes gruesas, tuberculados con proyecciones digitiformes en la superficie, denominados macroconidios, tuberculoclamidosporas o macroaleurioconidios. De las hifas, pueden emerger también pequeños conidios unicelulares laterales, hialinos, redondos y con paredes lisas o arrugadas, llamados microconidios o microaleurioconidios.(Castañón Olivares 2014).

Examen directo con azul de algodón, a partir de una colonia de *Histoplasma capsulatum*. Hifas septadas, hialinas, abundantes macroconidios de pared gruesa, redondos, con tubérculos. Imagen: Bazán-Mora E, Facultad de Medicina, UNAM.

A.4 Biología molecular

En la actualidad se han incorporados prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR); las dos más empleadas son RAPD-PCR y la PCR-anidada; son muy específicas y útiles para la identificación tanto de muestras biológicas como para cepas.

(Alexander Bonifaz, 2012).

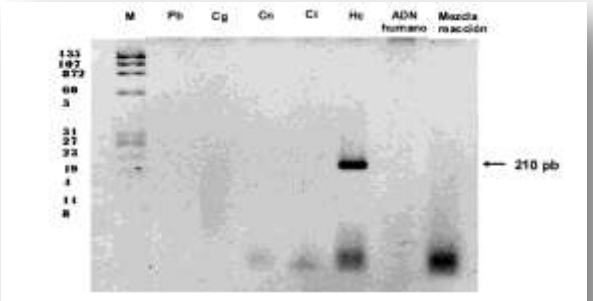


Figura 3. Especificidad del ensayo de PCR para la detección de ADN de *H. capsulatum*. Se aisló el ADN de diferentes hongos y se realizó la prueba de PCR empleando las secuencias cebadoras para *H. capsulatum*. Los hongos analizados corresponden a *P. brasiliensis* (Pb), *C. glabrata* (Cg), *C. neoformans* (Cn), *C. immitis* & *C. posadasii* (Ci), e *H. capsulatum* (Hc). M: marcador de peso molecular en pares de bases. La flecha indica el producto de PCR específico para *H. capsulatum* de 210pb.

B. Examen Indirecto

B.1 Pruebas inmunológicas

Los métodos inmunológicos son empleados para la detección de anticuerpos específicos o para la detección de antígenos circulantes, a partir de diferentes fluidos corporales.

Las técnicas más utilizadas para la búsqueda de anticuerpos son las de inmunoprecipitación. Otras pruebas inmunológicas que se utilizan son: aglutinación de látex y ELISA. La detección de antígenos circulantes por alguna de estas técnicas adquiere relevancia en los pacientes inmunodeprimidos.

Las pruebas más empleadas con fines diagnósticas se describen en el cuadro 5 (Alexander Bonifaz, 2012)

Cuadro 5. Pruebas empleadas en el diagnóstico de Histoplasma

Prueba	Utilidad
IDR a la histoplasmina	Solo tiene valor de primo contacto y nos demuestra hipersensibilidad retardada, se aplica intradérmicamente.
Serología	Se puede practicar cualquiera de las técnicas para valoración de recipitinas y aglutininas, su positividad es de acuerdo al padecimiento. Las dos técnicas más empleadas son la difusión en gel y fijación del complemento. Se emplean también la Inmunofluorescencia directa e indirecta, con excelentes resultados, pero con un alto costo.
Antígeno circulante	Las que mejores resultados dan, son: inmunoenzimáticas y radioinmunoenzimáticas, estas últimas tienen una mayor sensibilidad en orina (95%) que en suero (86%)

Pneumocystis jirovecii

El *Pneumocystis jirovecii* (antes *P. carinii*) es un hongo previamente clasificado como protozoario. Es un microorganismo “de transición” o considerado fúngico-atípico, que mantiene propiedades tanto de parasito como de hongo.

Aunque *P. jirovecii* se encuentra en el medio rural o urbano, su hábitat aún no está claro, se ha aislado de agua, aire, así como de diversos sitios hospitalarios, incluso al principio se pensó que era una infección netamente hospitalaria.

La mayoría de los autores propone la vía pulmonar como entrada, sin embargo, por los reportes de su aislamiento en agua, la vía oral también puede ser factible. Con los nuevos estudios se plantea que ésta es una enfermedad endógena y que el microorganismo sea parte de la flora alveolar.

El periodo de incubación, no está definido.

Muchos personas presentan anticuerpos desde edades muy tempranas (Alexandro Bonifaz, 2012).

1. Descripción de la enfermedad

La neumocistocis o neumonía PcP, es una infección causada por un microorganismo oportunista denominado *Pneumocystis jirovecii* (antes *P. carinii*), el cual afecta de manera primordial pulmones, en forma de neumonía aguda o crónica, conocido también como: neumonía intersticial de células plasmáticas o neumocistosis infantil epidémica.

La mayoría de los casos de neumosistis están relacionados con personas infectadas por el VIH; Hay reportes que en los pacientes que no reciben profilaxis primaria la infección puede estar presente hasta en un 80% de los casos. Con el advenimiento de la terapia TARV (*Terapia antirretroviral*), el número de casos de neumocistocis ha disminuido considerablemente (Alexandro Bonifaz, 2012).

2. Manifestaciones Clínicas

Esta Infección Oportunista se caracteriza por falla respiratoria subaguda, fiebre, tos no productiva y molestias torácicas inespecíficas, de días a semanas de evolución, aunque puede presentarse únicamente con fiebre.

En el examen físico pulmonar en ocasiones no hay ningún signo. En los casos graves existe hipoxemia (PO2 < 70 mmHg) que se traduce inicialmente por un descenso en la saturación de oxígeno ante el ejercicio leve. El neumotórax es una complicación asociada frecuente de los cuadros graves.

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en sangre puede estar elevada más de tres veces sobre el valor normal, lo cual es altamente sensible pero poco específico. La proteína C reactiva (PCR) suele ser baja cuando no existe co-infección por otros agentes infecciosos.

La radiografía de tórax muestra infiltrados intersticiales bilaterales “en alas de mariposa”, pero puede tener patrones variables con presencia de nódulos, bulas o cualquier tipo de patrón radiológico.

La TAC de pulmón demuestra, clásicamente, imágenes en vidrio esmerilado o de “árbol en brote”.

Entre 13 y 18% de los pacientes con neumonía por *P. jirovecii* tienen una co-infección ya sea con una neumonía bacteriana, tuberculosis (TBC) o sarcoma de Kaposi (Jesus Santos, 2012).

3. Diagnóstico de Laboratorio

El método clásico de diagnóstico es por medio de la expectoración inducida o lavado bronco-alveolar, útil para observar los quistes y trofozoitos de *Pneumocystis* a través de tinciones como: Giemsa o Wright, Gomori Grocott metamina de plata que (tiñe la pared del quiste). El *Pneumocystis jiroveci* es un hongo no cultivable. (Martín Lasso B., 2011)

3.1 Muestras clínicas/biológicas para el diagnóstico

- ✓ Lavados broncoalveolares (LBA),
- ✓ Esputo espontáneo o inducido y
- ✓ Biopsia pulmonar y transbronquial

Recientemente se han comenzado a estudiar otras muestras biológicas como:

- ✓ Lavados orofaríngeos,
- ✓ Exudados nasales o
- ✓ Aspirados nasofaríngeos que evitarían realizar técnicas invasivas (LBA/ biopsia), sin embargo aún no se utilizan en forma rutinaria en la clinica.(Martín Lasso B.,2011)

3.2 Técnicas de Diagnóstico

A. Examen Directo

El Lavado Broncoalveolar (LBA) es la mejor muestra, las tinciones más utilizadas son:

A.1 Wright-Giemsa

Útil para quistes y trofozoitos, pero no tiñen la pared.

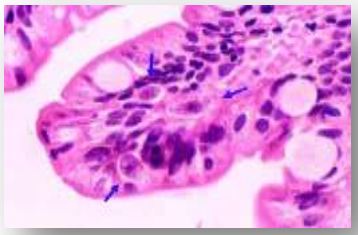
Pneumocystis jirivecii, coloración de Giemas

A.2 Tinción de Gomori Grocott metenamina de plata (tiñen la pared del quiste).

Considerada la "estándar de oro" (Alexander Bonifaz, 2012), pero, para la búsqueda de *P. jirovecii* en estas tinciones es necesario tener experiencia, para descartar la presencia o ausencia del agente. (Armas Rodríguez, 2013).

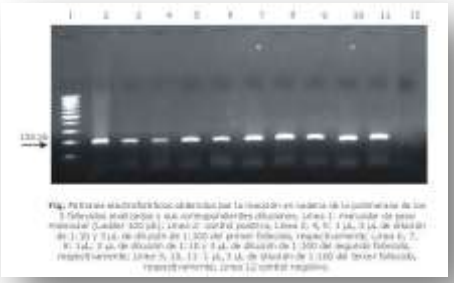
A.3 La prueba de Papanicolaou

Es una técnica muy empleada por los citohistopatólogos, que puede generar información importante para detectar *Pneumocystis*. (Martín Lasso B., 2011).



A.4 Biología molecular

La prueba de PCR es muy útil, para la identificación; las muestras pueden provenir de LBA, esputo por expectoración inducida así como de biopsias; esta técnica también es útil para la investigación de los diferentes tipos de hábitats. (Alexander *Bonifaz*, 2012)

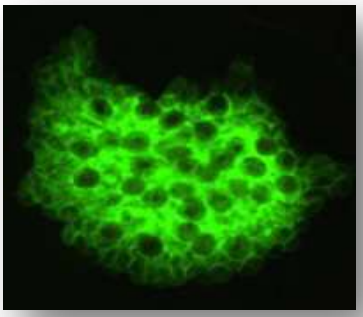


B. Examen Indirecto

B.1 Inmunológicas

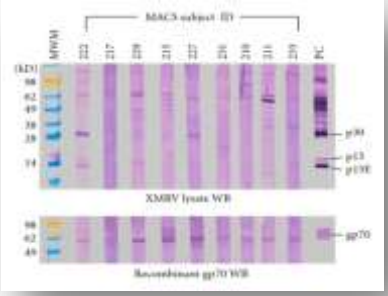
B.1.1 Inmunofluorescencia

Se han empleado técnicas directas e indirectas con excelentes resultados y sensibilidad superior al 90%, la cual depende de la sensibilidad del anticuerpo monoclonal utilizado; algunas son específicas a los quistes (ascas) u otras formas (trofozoitos y esporozoítos).



B.1.2 Otras técnicas

Otras técnicas que se han empleado para la detección de anticuerpos específicos son: ELISA y Western Blot, con resultados variables. (Alexandro Bonifaz 2012).



Aspergillus

Aspergillus, son saprófitos de distribución amplísima en la naturaleza y por ellos la enfermedad aparece a nivel mundial. Para los humanos el patógeno más frecuente es *A. fumigatus*, pero también pueden causar enfermedad *A. flavus, A. niger, A. terreus,* y *A. lentulus.* El moho en cuestión produce abundantes conidios pequeños que pueden ser dispersados fácilmente en el aire (por aerosol). Después de inhalarlos los sujetos atópicos suelen presentar grandes reacciones alérgicas a los antígenos de esas estructuras. En pacientes inmunodeprimidos y en particular los que tienen leucemia, quienes han recibido blastos en trasplante y personas sometidas a corticoterapia, los conidios pueden germinar y producir hifas que invaden los pulmones y otros tejidos. (JAWETZ, 2011).

Las diversas especies oportunistas de *Aspergillus*, son ubicuas, ocupan el primer o segundo lugar dentro de los hongos contaminantes del ambiente; se aíslan con frecuencia de aire, tierra, plantas, materia orgánica en descomposición y en especial contaminan alimentos, sobre todo los que contienen carbohidratos y fibras (pan, dulces, alimentos de aves, granos, etc.)

Algunas especies son parte de la flora habitual de diversas zonas del cuerpo como orofaringe, fosas nasales, piel, saco lagrimal, oído y tubo gastrointestinal, por lo que su aislamiento debe tener correlación clínica.

La principal vía de ingreso al organismo es la respiratoria; sin embargo puede penetrar por traumatismo cutáneo. (Alexandro Bonifaz, 2012).

1. Descripción de la enfermedad

El término “aspergilosis” involucra una serie de enfermedades, la mayoría de ellos causada por especies patógenas y oportunistas del género *Aspergillus.* Los tipos de aspergilosis más frecuentes son: pulmonar, diseminada, cutánea, ótica, oftálmica y estado de hipersensibilidad inmunológicas (alergias).

La mayoría de las veces la aspergilosis está ligada a diversos factores entre los que sobresalen desnutrición, tuberculosis, absceso hepático amebiano, alcoholismo crónico, carcinomas pulmonares, etc.; o se presenta en pacientes inmunodeprimidos por linfomas, leucemias, trasplante de órganos, VIH/SIDA y corticoterapia. A pesar de los incrementos de los casos de VIH/SIDA, pocos se asocian con cuadros de aspergilosis, y cuando se presentan lo hacen en forma diseminada. La escasa cantidad de casos se ha explicado porque la aspergilosis se presenta en pacientes con neutropenia y no con linfógena, la cual normalmente presentan los enfermos con SIDA. (Alexandro Bonifaz, 2012).

2. Manifestaciones Clínicas

Dos síndromes principales predominan en los pacientes con aspergilosis: enfermedad del tracto respiratorio e infecciones del sistema nervioso central. Ambos están asociados con la invasión significativa de los vasos sanguíneos, y los síntomas suelen estar relacionados con la destrucción del tejido localizado.

La afectación pulmonar a menudo se presentan con tos, dificultad para respirar, fiebre, dolor torácico y hemoptisis.

En los estudios radiológicos se pueden observar infiltrados nodulares, que pueden ser localizados o difusos y con frecuencia cavitación. (Jesús Santos, 2012)

El Aspergiloma es el término con que se define a la formación de una masa fúngica en los pulmones de personas que tienen cavidades formadas previamente sin la participación de *Aspergillus*. Esto puede tratarse de pacientes que tiempo atrás presentaron una tuberculosis cavitaria de la que incluso pueden haber sanado, sin embargo, si por accidente conidios de *Aspergillus* se depositan en la cavidad, entonces el hongo formará una masa fúngica que ocupara todo el espacio existente y posteriormente ocasionar inflamación y erosión de las paredes de la cavidad que se manifestaría clínicamente como hemoptisis. En las radiografías o tomografías se observará una masa redonda u ovoide en campos pulmonares que no presenta niveles hidro-aéreos. (Tovar, 1013)

3. Diagnóstico de Laboratorio

Se basa en la sospecha clínica de la enfermedad y la confirmación del microorganismo a través del aislamiento en medios de cultivo, el cual puede estar acompañado de otro tipo de pruebas diagnósticas como; observación directa del hongo que nos permitirán observar (hifas, conidios y cabezas aspergilar), tinciones y biopsias.

Muestras clínicas/biológicas para el diagnóstico

- ✓ Lavado broncoalveolar
- ✓ Esputo
- ✓ Exudados
- ✓ Fragmentos de biopsia

Es importante mencionar que en los casos alérgicos de aspergilosis (rinitis, alveolitis y asma), los hongos por lo general no se observan invadiendo ni saprofitando tejidos; por lo tanto; los exámenes en fresco, cultivo y biopsia son de poca utilidad.

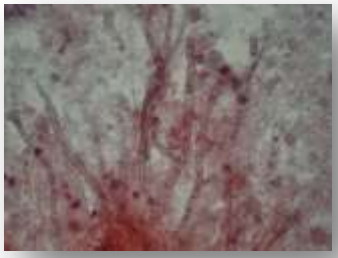
A. Examen Directo

A.1 Examen en fresco:

Solución salina al 0.85%, KOH al 10%

Dependiendo del tipo de aspergilosis, al microscopio se observa lo siguiente:

- ✓ Aspergilosis pulmonar (aspergilomas), se ven hifas, conidios y las clásicas cabezas aspergilares (como en los medios de cultivo); esta misma imagen se presenta también en otomicosis y en las saprofitaciones de pacientes quemados.
- ✓ Invasión pulmonar, en raras ocasiones se presentan cabezas aspergilares (casos mixtos); en general se ven hifas gruesas tabicadas y ramificadas en ángulos de 45°; esta imagen también es propia de aspergilosis diseminada.



- ✓ En la onicomicosis y las ulceras necróticas se observan hifas delgadas, tabicadas y hialinas. En las uñas en ocasiones se aprecian cabezas aspergilares.
- ✓ En rinosinisitis, a partir de lavados nasales es posible ver hifas tabicadas y ramificadas en 40% de los casos. (Alexandro Bonifaz, 2012).

A.2 Cultivo

Se realiza en los medios como Sabouraud agar, papa dextrosa agar (PDA), y Czapek agar, los cuales incubados por 1 a 3 días a 25-28°C, las colonias se desarrollan con rapidez, cada especie con una morfología característica.

Debido a que estos hongos son contaminantes del ambiente, e incluso de las vías respiratorias, piel y conducto auditivo externo es importante hacer cultivos a intervalos separados (de días).

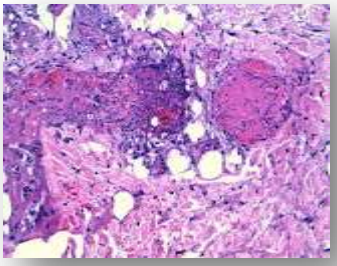
A.2.1 Examen microscópico del cultivo

Al microscopio se observan las clásicas cabezas aspergilares. (Alexandro Bonifaz, 2012).

A.3 Biopsia

Son útiles para los casos de aspergilomas en los que, los exámenes directos no sean positivos,

Las biopsias son indispensables para las úlceras cutáneas y micetomas; en el primero se observan zonas de necrosis y el agente etiológico aparece en forma de hifas tabicadas, en cambio en el segundo se presentan gránulos eumicéticos. En la rinosinusitis, se observan las bolas fúngicas.



B. Indirecto

B.1 Pruebas inmunológicas

B.1.1 Serología

Son útiles para los casos de aspergilosis pulmonar invasiva, saprofítica y diseminada. Las pruebas por sí solo no indican valor alguno, las más empleadas son inmunodifusión en gel, fijación de complemento y recientemente RIA y ELISA (Alexandro Bonifaz, 2012).

B.2 Radiografía y tomografía

Indispensables para las formas pulmonares; en el caso de los aspergilomas se observa en tomografía y radiografía computarizadas el signo de Monod o media luna, y en la aspergilosis invasiva el signo del halo; ambos son altamente sugestivos de los padecimientos. Estos casos son también útiles en casos cerebrales y micetomas.

Obtención de muestras

Obtención de muestra de orina para cultivo

Materiales e insumos

- ✓ Frasco boca ancha, estéril y cierre hermético.

Procedimiento

- ✓ Se recomienda colectar en un recipiente de boca ancha, tapón de rosca y estéril un volumen no menor a 10 ml hasta 20 a 25 ml para un adecuado estudio micológico.
- ✓ El paciente debe retener la orina por lo menos tres horas. La primera parte de la micción se elimina, por contener flora de arrastre de la porción distal de la uretra, de la misma forma desechar la parte final, por su escaso contenido microbiano.

Se recoge la parte media de la micción matinal, la más representativa del estado de las vías urinarias y la más idónea para el cultivo.

Este tipo de procedimiento lo realiza el paciente, quien previamente debe realizar la limpieza de sus genitales con agua y jabón.

- ✓ En el caso de los varones deben de retraer el prepucio y las mujeres separar los labios para evitar contaminación exógena.
- ✓ En el caso de que la obtención de muestra se realice a través de la instalación de un catéter o sonda vesical, realizarlo previa higiene del meato uretral y genitales externos. Este método de obtención es el adecuado cuando se sospecha de candidiasis urinaria. Sin embargo, se debe de considerar que ello implica cierto peligro de sobreinfección de vías altas y producción de microtraumas especialmente en el varón.

Se emplea la sonda vesical cuando no se obtienen resultados por los anteriores métodos o cuando se desea corroborar un diagnóstico.

En pacientes con sonda permanente, la muestra se obtiene por punción aséptica de la sonda, nunca de la bolsa recogida.

- ✓ Para obtener la muestra de lactantes se debe usar una bolsa recolectora estéril la cual se coloca en los genitales manteniéndola hasta la micción. No olvidar realizar la higiene de la zona incluyendo la región anal.

- ✓ Si no se produce la micción dentro de los 30 minutos posteriores a la colocación de la bolsa, ésta debe de ser sustituida: La micción puede ser facilitada con la ingesta de líquidos. Este tipo de muestra no es adecuada para el diagnóstico de candiduria.

- ✓ La obtención de la muestra a través de punción o aspiración suprapúbica se indica en lactantes cuando no es posible conseguirla a través de otro método, pero está contraindicada en pacientes con problemas de hemostasia.
- ✓ Después del aseo, antisepsia y anestesia local, se punciona directamente la vejiga. Cualquier hallazgo microbiológico tiene valor.

Transporte y almacenamiento

Las muestras genitourinarias se transportan al laboratorio a temperatura ambiente y deben de procesarse inmediatamente después de obtenidas ya que el rápido desarrollo de las levaduras a temperatura ambiente puede dar una falsa concentración de la muestra. Si no se puede proceder con el análisis, refrigerar (4- 8°C) la muestra por un máximo de 12 horas.

Obtención muestra de biopsia

Materiales e insumos

- ✓ Frasco estéril, boca ancha y cierre hermético
- ✓ Solución salina isotónica estéril
- ✓ Formol al 10%

Procedimiento

- ✓ Se debe realizar en el quirófano o consultorio bajo las más rigurosas reglas de asepsia.
- ✓ Obtenida la muestra, ésta se divide en dos porciones (1mm cada una), una es colocada en un recipiente estéril con tapa de rosca conteniendo solución salina isotónica estéril. Para el examen micológico y la otra en formol al 10% en solución salina buferada para histopatología.

Transporte y almacenamiento

La muestra para el estudio debe ser remitida de inmediato al laboratorio a temperatura ambiente. Sin embargo, de no ser procesada al momento, conservar a 4-8°C por dos a cuatro horas.

Obtención de muestras de esputo y secreciones bronquiales

Materiales e insumos

- ✓ Frasco de boca ancha, estéril y cierre hermético
- ✓ Solución salina al 0,85%, estéril

Procedimiento

Debido a que las muestras de esputo pueden contener *Mycobacterium tuberculosis*, se deben adoptar precauciones al momento de su emisión para minimizar el riesgo de contagio:

- ✓ Por seguridad las muestras de esputo, deben tomarse fuera del laboratorio, para evitar los aerosoles.

Debe preferirse la expectoración espontánea (esputo) como muestra de estudio para el diagnóstico de laboratorio de micosis broncopulmonares. Este es un espécimen representativo y puede repetirse sin inconvenientes. Sin embargo, tiene la desventaja de arrastrar microorganismos colonizantes de la boca y faringe.

Para pacientes que no pueden expectorar fácilmente se puede utilizar la nebulización con solución salina hipertónica o con ayuda de fisioterapia para inducir la salida de esputo.

La utilidad diagnóstica del esputo se medirá de acuerdo con su calidad valorada en función del número de leucocitos polimorfonucleares-PMN (más de 25 PMN) y células epiteliales (menos de diez células por campo) presentes en la muestra.

- ✓ Indicar al paciente que se realice la higiene bucal y hacer enjuagues con agua y bicarbonato de sodio (una cucharada sopera de bicarbonato de sodio en un litro de agua hervida que luego se entibia).
- ✓ Emitir la muestra en frasco estéril y boca ancha.

Transporte

Las muestras deben de transportarse al laboratorio en un plazo de *no mayor de dos* horas desde su obtención a temperatura ambiente.
Una vez recibido el espécimen en el laboratorio se deberá procesar de inmediato o en su defecto conservar en refrigeración a 4-8°C por cuatro a seis horas.

Lavado Broncoalveolar

Lavado Broncoalveolar (BAL) se obtiene por fibrobroncoscopía, reduciendo la presencia de contaminantes de boca y vías respiratorias superiores: El BAL se considera significativo cuando el recuento de células epiteliales planas es inferior al 1% y se observa predominio de macrófagos alveolares o células inflamatorias.

Una vez recibido el espécimen en el laboratorio se deberá procesar de inmediato o en su defecto conservar en refrigeración a 4-8°C por cuatro a seis horas.

El aspirado bronquial se obtiene mediante un fibrobroncoscopio, se aspiran secreciones del árbol bronquial, previa colocación de 5 a 10 ml de suero fisiológico.

El aspirado está indicado cuando el volumen del líquido recuperado en el lavado Broncoalveolar es insuficiente y existe sospecha de infección fúngica pulmonar.

El cepillado bronquial se obtiene a través de un fibrobroncoscopio, induciendo a través de él un cepillo con el que se frotan las paredes, permitiendo obtener muestras con una elevada proporción de células descamadas de las paredes del árbol bronquial.

Hay que considerar que la muestra no se encuentra protegida por lo que puede contaminarse al pasar por el canal del broncoscopio: Se emplea para el diagnóstico citológico. No es una muestra recomendada para el estudio de infecciones fúngicas.(Castañón Olvares, 2013)

Transporte y almacenamiento

Una vez recibido el espécimen en el laboratorio se deberá procesar de inmediato o en su defecto conservar en refrigeración a 4-8°C por cuatro a seis horas.

Obtención de muestras de Líquido Cefalorraquídeo

Materiales e insumos

- ✓ Tubos de ensayo estériles con tapón de rosca
- ✓ Estilete para punción lumbar
- ✓ Torundas de algodón con desinfectante (alcohol al 70%, yodopovidona, etc.)
- ✓ Guantes estériles
- ✓ Gabacha
- ✓ Mascarilla

Procedimiento

- ✓ Desinfectar la zona por punzar con yodopovidona al 2%
- ✓ El médico debe realizar la punción en los espacios intervertebrales L3-L4, L4-L5 o L5-S1.
- ✓ Al llegar al espacio subaracnoideo, retirar el estilete y dejar fluir libremente la muestra.
- ✓ Recoger un volumen mínimo del espécimen de 5mL en un tubo estéril con tapa de rosca.

Transporte y almacenamiento

Transportar al laboratorio a temperatura ambiente. De no procesar de inmediato conservar a temperatura ambiente, protegido de la luz, por un máximo de 12 horas, No transportar ni almacenar en refrigeración, debido a que las bajas temperaturas afectan a los microorganismos que se investigan en esta muestra. (Castañón Olivares, 2013)

Procedimientos de Laboratorio

Examen microscópico directo

Es uno de los métodos más sencillo y útiles para orientar la identificación del agente etiológico; puede realizarse tanto en muestras clínicas o aislamientos de medios de cultivo. Para la observación se puede utilizar:

- ✓ Solución salina al 0.85%,
- ✓ KOH al 10%

Materiales e insumos

- ✓ Muestra/aislamiento sospechoso
- ✓ Solución salina 0.85% o solución de KOH al 10%
- ✓ Lámina portaobjeto
- ✓ Cubreobjetos
- ✓ Protopipetas
- ✓ Aplicador de madera o asa bacteriológica
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha
- ✓ Recipiente para descarte

Equipo

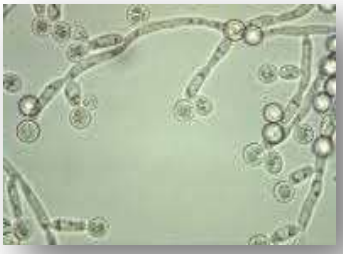
- ✓ Microscopio con objetivo de 10 y 40X

Procedimientos

1. Hacer una suspensión en la lámina portaobjetos de la muestra o aislamiento problema con una gota de solución salina al 0.85% o KOH al 10%
2. Colocar cuidadosamente el cubreobjetos sobre la suspensión.
3. Observar la preparación al microscopio con objetivo 10x y 40x.

Resultado Esperado

Observar las levaduras con pseudohifas o hifas verdaderas.



Tinción de tinta china (Cryptococcus neoformans)

La tinción negativa o tinta china, colorea toda la preparación excepto la cápsula y permite hacer un diagnóstico presuntivo de criptococosis

Materiales e insumos

- ✓ Fluido corporal centrifugado (LCR, orina y suero)
- ✓ Solución tinta china
- ✓ Lámina portaobjetos
- ✓ Lámina cubreobjetos
- ✓ Protopipetas
- ✓ Aplicador de madera o asa bacteriológica
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha
- ✓ Recipiente para descarte

Equipo

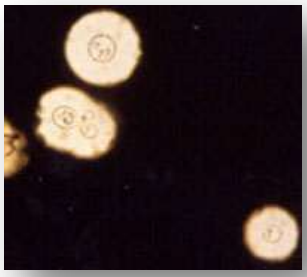
- ✓ Microscopio con objetivo de 10 y 40X

Procedimientos

1. Hacer una suspensión en la lámina portaobjetos del fluido (previamente centrifugado) con una gota de tinta china.
2. Colocar cuidadosamente el cubreobjetos sobre la suspensión.
3. Observar la preparación al microscopio con objetivo 10x y 40x.

Resultado Esperado

Es importante diferenciar bien la célula de doble capa pared refringente, con su cápsula y buscar células en fase de gemación, se recomienda confirmar esta técnica presuntiva con el cultivo.



(Procedimientos técnicos de microbiología, 2011)

Frotis de tinta china (Cryptococcus neoformans)

A partir de las muestras de (LCR, esputo, orina), se pueden observar con facilidad los cuerpos de la levadura y el halo de la cápsula. Si a esta preparación se añade previamente una gota de fucsina básica (de Ziehl-Neelsen), el cuerpo de la levadura se ve de color rojo-rosa. Rodeado de un halo blanco

Materiales e insumos

- ✓ Fluido corporal (LCR, orina y esputo)
- ✓ Solución tinta china
- ✓ Fucsina básica
- ✓ Lámina portaobjetos
- ✓ Lámina cubreobjetos
- ✓ Mechero
- ✓ Protopipetas
- ✓ Aplicador de madera o asa bacteriológica
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha
- ✓ Recipiente para descarte

Equipo

- ✓ Microscopio con objetivo de 10 y 40X

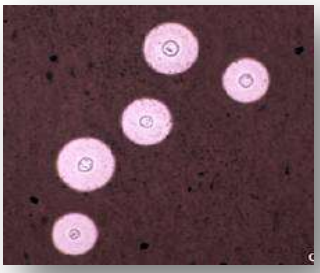
Procedimientos

1. En la lámina portaobjetos realizar un frotis del fluido corporal
2. Fijar al calor
3. Agregar al extendido una gota de tinta china (tinta india) nigrosina
4. Secar la lámina a temperatura ambiente o estufa
5. Agregar una gota de fucsina básica por un minuto
6. Lavar con agua corriente
7. Dejar secar la lámina
8. Observar al microscopio

Resultado Esperado

El cuerpo de la levadura obtiene un color rojo-rosa, rodeado por un halo blanco de la cápsula.

(Alexander Bonifaz, 2012).



Examen en fresco con azul de metileno

Se utiliza para la visualización de estructuras micóticas, las cuales toman un color azul claro.

Materiales e insumos

- ✓ Muestra/aislamiento sospechoso
- ✓ Solución de azul de metileno al 1%
- ✓ Lámina portaobjetos
- ✓ Cubreobjetos
- ✓ Protopipetas
- ✓ Aplicador de madera o asa bacteriológica
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha
- ✓ Recipiente para descarte

Equipo

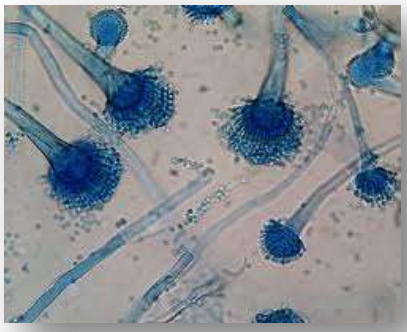
- ✓ Microscopio con objetivo de 10 y 40X

Procedimiento

1. Hacer una suspensión en la lámina portaobjetos de la muestra o aislamiento problema con una gota de solución de azul de metileno al 1%
2. Colocar cuidadosamente el cubreobjetos sobre la suspensión.
3. Observar la preparación al microscopio con objetivo 10x y 40x.

Resultado Esperado

Estructuras micóticas visualizadas de color azul celeste



Blanco de Calcoflúor

Es un blanqueador de la industria textil y del papel; está disponible en el comercio (Blankofor, Bayer; Calcoflúor White, Polysciences; Fluorescent brightener, Sigma), permite observar la característica refringentes de algunas estructuras micóticas.

Materiales e insumos

- ✓ Muestra biológica
- ✓ Agua destilada
- ✓ Calcoflúor blanco (Polysciences. Warrington PA)
- ✓ Lámina portaobjeto
- ✓ Cubreobjetos
- ✓ Protopipetas
- ✓ Probeta
- ✓ Solución de KOH
- ✓ Mechero
- ✓ Pinzas
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha
- ✓ Azul de Evans al 0,05%
- ✓ Recipiente para descartar

Equipo

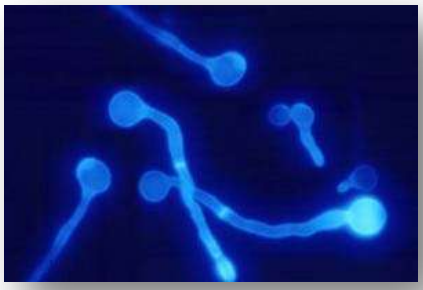
- ✓ Balanza
- ✓ Microscopio de inmunofluorescencia

Procedimiento

1. La solución se prepara con 1 gramo de polvo de Calcoflúor blanco (Polysciences. Warrington PA) en 100 ml de agua destilada (solución madre al 0,1%) y se calienta suavemente.
2. Se coloca en una lámina portaobjetos la muestra con una gota de la preparación y se coloca un cubreobjetos, se calienta ligeramente y se examina al microscopio de fluorescencia.
3. Se puede diluir también 1:10 en solución acuosa de azul de Evans al 0.05% como colación de fondo.

Resultado Esperado

Con el microscopio de inmunofluorescencia se observa la estructura micótica refringiendo



Coloración de Gram

Este procedimiento permite distinguir entre microorganismos Gram positivos y Gram negativos; de acuerdo a la presencia de peptidoglicano presente en la pared celular del microorganismo. (Microorganismos Gram positivos tienen gran cantidad de peptidoglicano).

Materiales e insumos

- ✓ Muestra biológica
- ✓ Lámina portaobjeto
- ✓ Solución salina al 0.85%estéril
- ✓ Mechero
- ✓ Solución salina
- ✓ Pinzas
- ✓ Aceite de inmersión
- ✓ Set de coloración de Gram (Cristal violeta, lugol, alcohol acetona, safranina)
- ✓ Protopipetas
- ✓ Papel lente
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha

Equipo

- ✓ Microscopio 100X

Procedimiento

1. En la lámina portaobjetos hacer una pequeña suspensión de solución salina y muestra biológica, dejar que se seque.
2. Fijar con calor (pasando tres veces por el mechero)
3. Se cubre la lámina con cristal violeta (o violeta de genciana) durante 1 min. y después se lava ligeramente con agua corriente
4. Cubrir con solución de yodo durante 1 min.
5. Lavas con agua corriente
6. Decolorar con alcohol acetona (1:1)
7. Se lava ligeramente con agua corriente
8. Se cubre con safranina durante 30 seg.
9. Se lava con agua corriente
10. Se deja secar
11. Se observa al microscopio en objetivo 100X con aceite de inmersión

Resultado esperado

Todos los hongos son Gram positivos, excepto *Criptococcus* que, por la presencia de la cápsula, casi no toman la coloración. (Roberto Arenas, 2011)

Procedimiento de Cultivo

El cultivo en la microbiología se considera el diagnostico estándar ya que es a través de él que podemos confirmar el agente causal de la patología. Nos permite poder identificar y confirmar a través de pruebas bioquímicas género y especie del microorganismo, realizar estudios de sensibilidad, pruebas de serotipificación y nos brinda una información epidemiológica sumamente valiosa, para la toma de medidas preventivas y de control de las enfermedades.

Materiales e insumos

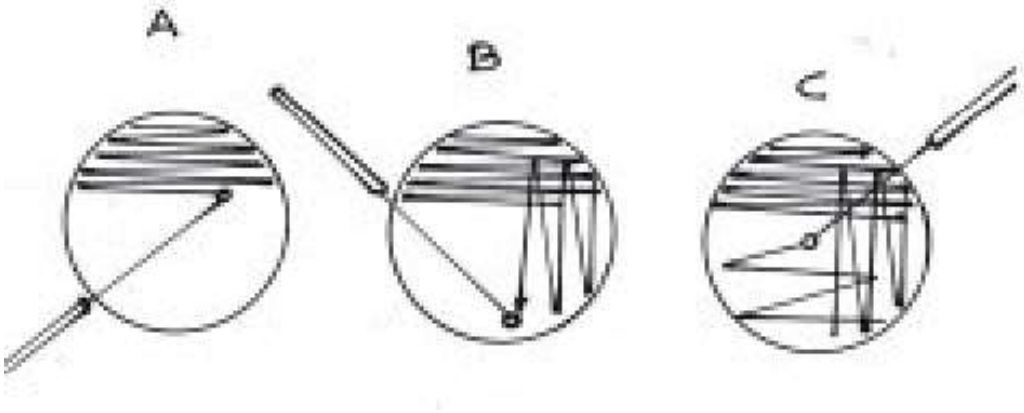
- ✓ Muestra clínica
- ✓ Medios de cultivo los cuales se seleccionan de acuerdo microorganismo que se va a cultivar, orientado por aspectos clínicos y pruebas presuntivas (Examen microbiológico directo, Gram, pruebas látex, etc.)
- ✓ Mechero
- ✓ Asa bacteriológica/micológicas
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha
- ✓ Recipiente para descarte

Equipo

- ✓ Incubadora (la temperatura y las condiciones atmosféricas se programa de acuerdo a los requerimientos del microorganismo que se va a cultivar)

Procedimiento

1. Tener los medios de cultivo a temperatura ambiente etc.).
2. Antes de sembrar la muestra, verificar que los medios estén en las condiciones óptimas (no contaminados, no estén secos, etc.)
3. Rotular las placas o tubos con la información necesaria (Número de registro, nombre del paciente, fecha, etc.)
4. Tomar parte (asada) de la muestra con una asa bacteriológica/micológico y sembrar por método de estría en superficie, cuando el medio este en placa; debiendo esterilizar el aza cada cambio de dirección. Si el medio esta en tubo sembrar en la parte superior del tubo (pico de flauta) por estría y cuando el medio requiera sembrar con el asa en punta hasta el fondo por picadura.
5. Incubar las placas o tubos con medios de cultivo a temperatura y condiciones atmosféricas de acuerdo al microorganismo que estamos investigando.



Resultado esperado

Observar crecimiento bacteriano en medios de cultivo, después de tiempo y condiciones de incubación requeridas por el microorganismo.

Tinción de Coloración de May Grünwald-Giemsa (Histología)

Se utiliza para distinguir levaduras intracelulares que se encuentran dentro de macrófagos o monocitos, el componente extracelular se colorea de color rojo y las estructuras nucleares de color violeta. Es muy importante tomar en cuenta el pH del colorante, ya que de acuerdo a este se fija en la estructura celular.

Materiales e insumos

- ✓ Muestra biológica (cortes)
- ✓ Agua neutra
- ✓ Agua destilada
- ✓ Lámina portaobjeto
- ✓ Cubreobjetos
- ✓ Protopipetas
- ✓ Alcohol acetona
- ✓ Solución de tolueno
- ✓ Ácido acético
- ✓ Resina
- ✓ KOH
- ✓ Mechero
- ✓ Pinzas
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha
- ✓ Azul de Evans al 0,05%

Equipo

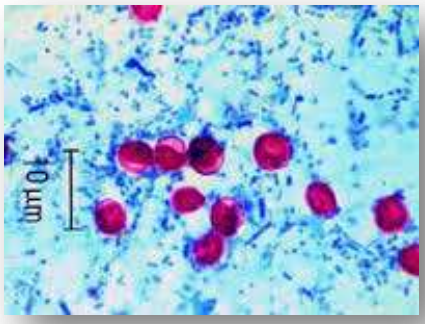
- ✓ Microscopio

Procedimiento

1. Se lavan los cortes con agua neutra
2. Se cubre con colorante de May Grünwald-Giemsa (1 ml en 4 ml de agua destilada neutra) durante 15 minutos a 37°C
3. Sin lavar se colorea con Giemsa (3 gotas en 2 ml de agua destilada neutra), 40 minutos a 37°
4. Se lava con agua destilada
5. Se diferencia con ácido acético débil
6. Se lava nuevamente
7. Se deshidrata con alcohol acetona 1:1
8. Se pasa por tolueno
9. Se monta en resina

Resultado esperado

El componente citoplasmático se coloreara de un color rosa a rojo (quistes)



Tinción rápida de Giemsa

Materiales e insumos

- ✓ Muestra biológica (cortes)
- ✓ Agua neutra
- ✓ Agua destilada
- ✓ Lámina portaobjeto
- ✓ Cubreobjetos
- ✓ Diff-Quik o Giemsa Plus
- ✓ Protopipetas
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha

Equipo

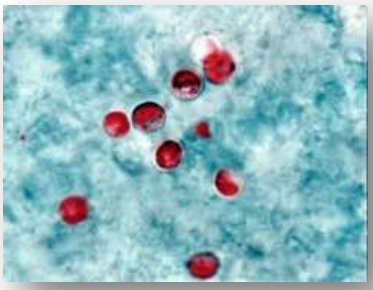
- ✓ Microscopio

Procedimiento

1. Se pueden utilizar técnicas comerciales como Diff-Quik o Giemsa Plus:
2. Se añaden 1 o 2 gotas de la solución roja (solución 1) sobre la muestra, se deja actuar durante 10 segundos y se escurre.
3. Se añade 1 o 2 gotas de solución azul (solución 2), se deja durante 10 segundos, se escurre y se lava muy ligeramente con agua desionizada.
4. Se deja secar y se procede a la observación de la muestra.

Resultado esperado

La Giemsa permite identificar tanto los quistes como los trofozoitos, colorea los núcleos de ambas formas de color rosado y contrasta con el azul que adquiere el citoplasma. (Enrique Calderón, 2011)



Tinción Azul de toluidina (Pneumocystis jirovecii)

Utilizado para identificar quistes o trofozoitos de *Pneumocystis jirovecii* en muestras de lavado Broncoalveolar, con el objetivo de ayudar en el diagnóstico diferencial de neumopatías en pacientes inmunosuprimidos. (Cifarelli, 2014)

Materiales e insumos

- ✓ Tubo cónico con tapón de rosca
- ✓ Lámina portaobjetos
- ✓ Lamina cubreobjetos
- ✓ Aplicadores
- ✓ Coplins
- ✓ Protopipetas o pipetas Pasteur
- ✓ Aceite de inmersión
- ✓ Mascarilla
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha
- ✓ alcohol isopropilíco
- ✓ Recipiente para descartar

Azul de toluidina 1%

- ✓ Azul de toluidina, 1g
- ✓ Ácido acético, 10ml
- ✓ Alcohol absoluto, 4.19ml
- ✓ Agua destilada, 86 ml

Reactivo de Sulfatación

- ✓ Ácido Acético Glacial
- ✓ Alcohol Etílico al 100%

Equipos

- ✓ Microscopio de luz con objetivo 40X y 100X
- ✓ Centrifuga
- ✓ Vórtex

Procesamiento de la muestra

Tipo de muestra: Lavado Broncoalveolar.

1. Primero se debe verificar que los datos del paciente en la muestra coincidan con los datos de la solicitud de examen.
2. Centrifugar la muestra a 2000 rpm por 5 minutos
3. Con una protopipeta eliminar el sobrenadante
4. Realizar cuatro frotis del sedimento, extendiendo la muestra en forma circular en el extremo del portaobjeto, previamente identificado.
5. Dejar secar a temperatura ambiente (no en estufa)
6. De los cuatro frotis realizados, dos se tiñen y dos se dejan de respaldo.
7. Una vez secado teñir

Tipo de muestra: Expectoración

La expectoración primero debe ser fluidificada

Reactivos para fluidificar:

- ✓ Ditiotreitol 1gr/lt, se debe mantener refrigerado a 4°C
- ✓ Buffer fosfato pH 7,2

Técnica de fluidificación

1. La muestra de expectoración debe tomarse en recipiente estéril
2. Colocar de 2 a 3 ml de expectoración en un tubo estéril
3. Agregar igual cantidad de Ditiotreitol preparado
4. Agitar vigorosamente en un vórtex, hasta disolver la expectoración
5. Incubar a 5 o 10 minutos a 37°C o 15v minutos a temperatura ambiente
6. Agregar Buffer fosfato pH 7,2 al tubo
7. Centrifugar a 4000 rpm por 5 minutos
8. Extraer el sobrenadante y dejar un pellet de 0,5 ml
    - ✓ Tomar una gota del sedimento y extender en forma circular en el portaobjetos
    - ✓ Se deben realizar cuatro frotis, de los cuales se tiñen dos y dos se guardan como respaldo
    - ✓ Dejar secar a temperatura ambiente
    - ✓ Teñir según técnica

Procedimiento de tinción

1. Colocar las láminas a teñir en un coplín que contiene el reactivo de sulfatación por 10 minutos
2. Lavar bien con agua corriente, suavemente
3. Dejar escurrir
4. Colocar las láminas con solución de Azul de Toluidina por 10 minutos
5. Lavar bien con agua corriente, suavemente
6. Colocar en alcohol isopropilíco por 1 minuto y dejar secar
7. Montar en el microscopio
8. Leer las preparaciones con objetivo de 100X en forma sistemática (CIFARELLI, 2014).

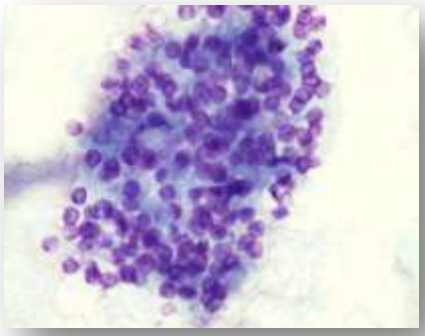
Resultado esperado

Si el resultado es negativo, se informa: No se observan Quistes de *Pneumocystis jirovecii*

Tinción: Azul de Toluidina O

Si el resultado es positivo, se informa: Se observaron quistes de *Pneumocystis jirovecii*

Tinción: Azul de Toluidina O (Enrique Calderón, 2011).



Tinción Argéntica rápida (Gomori-Grocott modificado)

Esta tinción está indicada en los esputos inducidos, aspirados bronquiales, lavados broncoalveolares o biopsias pulmonares con sospecha de Pneumocystis jirovecii, aunque también pueden detectase otros hongos.

Preparación de la muestra

El adecuado procesamiento de las muestras es un paso crítico en el diagnóstico microscópico de la neumosistis. Las muestras de las vías respiratorias bajas se toman en frascos estériles de boca ancha y tampón a rosca.

Esputo

- ✓ Añadir de 2-3ml del esputo el mismo volumen de Ditiotreitol al 0.3% (1,5 g en 500 ml de agua destilada)
- ✓ Agitar e incubar 5 min. a 37°C
- ✓ Añadir un volumen igual de PBS y agitar hasta conseguir una buena mezcla
- ✓ Centrifugar a 1,500rpm durante 10 min.
- ✓ Retirar el sobrenadante y resuspender el sedimento con 500µl de PBS.
- ✓ Si no se ha eliminado todo el moco de la muestra, se repiten paso 1 y 2

Aspirado bronquial y LBA

- ✓ Centrifugar la muestra a 1,500 rpm, durante 10 min.
- ✓ Retirar el sobrenadante
- ✓ Resuspender el sedimento en un pequeño volumen de PBS hasta que la densidad del material no sea excesiva

Tras la preparación y concentración, se puede depositar directamente una gota del sedimento en el centro de un portaobjetos o utilizar 200 µl para la citocentrifugación. Secar al y fijar con metanol.

Procedimiento

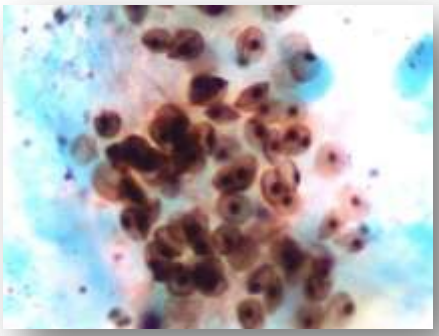
1. Cubrir la lámina portaobjetos con la muestra fijada con una solución de ácido crómico al 10%, dejando actuar durante 10 min. (Se puede utilizar microondas durante 40 segundos).
2. Lavar la lámina portaobjetos con agua destilada
3. Cubrir con una solución de metabisulfito sódico al 1% durante 1 min.
4. Lavar con agua destilada e introducir el portaobjetos en un recipiente donde se ha preparado previamente, justo en el momento de realizar la tinción, la solución de trabajo de Metanamina-nitrato de plata.

5. Tapar el recipiente e introducir en un microondas, al 50% de su potencia, durante aproximadamente 60 segundos (si el microondas no tuviese plato giratorio, debe pararse a los 30 seg., girar el recipiente 90° y volver a calentar otros 30 segundos). Posteriormente, mantener la solución caliente durante 2 min. (deberá tomar un color marrón oscuro). En caso de que no se disponga de microondas, se puede utilizar un baño de agua María a 80°C, donde se coloca un recipiente con la solución de teñido 6 min. antes de colocar en el mismo el portaobjetos. Se mantiene en esas condiciones durante otros 5 min, debiendo cambiar en color de la solución, como en el caso anterior, de marrón a negro.
6. Transcurrido el tiempo correspondiente, sacar el portaobjetos y lavar con agua destilada
7. Sumergir el portaobjetos en una solución de cloruro de oro al 1% de 2 a 5 segundos; seguidamente lavar con agua destilada.
8. Cubrir el portaobjetos con una solución de tiosulfato sódico al 5% durante 1 min. Lavar nuevamente con agua destilada.
9. Cubrir con una solución de 0,2% de verde brillante en ácido acético glacial durante 1 min. Lavar con agua destilada, escurrir el portaobjetos y dejar secar.
10. Montar la preparación con cubreobjetos y Entellán
11. Examinar la preparación a bajo aumento (20X y 40X) y confirmar a 100X.

Interpretación de resultados:

La pared de los quistes de *P. jirovecii* se tiñen irregularmente, con aspecto de uva pasa; formas redondeadas de color gris o marrón oscuro con la pared engrosada en forma de doble coma.

El interior de los quistes no se tiñen con esta tinción (López García, 2012).



Tinción de Gomori-Grocott

Para la tinción de hongos (Cándida, Aspergillu)

Materiales e insumos

- ✓ Muestra biológica (cortes)
- ✓ Metano absoluto
- ✓ Agua destilada
- ✓ Ácido crómico
- ✓ Agua corriente
- ✓ Bisulfito de sodio
- ✓ Metamina - nitrato de plata
- ✓ Cloruro de oro
- ✓ Tiosulfato de sodio
- ✓ Recipiente para descartar
- ✓ Xilol
- ✓ Verde brillante
- ✓ Lámina portaobjeto
- ✓ Cubreobjetos
- ✓ Protopipetas
- ✓ Pinzas parafinadas
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha

Equipo

- ✓ Microscopio

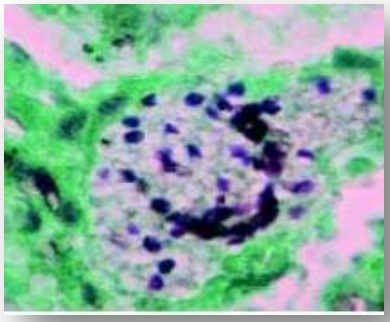
Procedimiento

1. Se fija la preparación con metano absoluto o calor
2. Se humedece ligeramente con agua destilada
3. Se coloca en un baño de ácido crómico durante 10 min
4. Se cubre con agua corriente durante 5 seg
5. Se coloca en un baño de bisulfito de sodio durante 1 min
6. Se coloca agua destilada durante 1 min
7. Se coloca en un baño de solución de metamina - nitrato de plata por 5 a 10 min., hasta lograr un tono marrón claro
8. Los cortes se tiñen de color café (marrón) amarillentos; se observan al microscopio; utilizando pinzas parafinadas (para evitar contacto metálico). Si la coloración es pálida antes de lavar se repite el paso anterior durante otros 60 seg
9. Se lava brevemente con agua caliente, luego con agua tibia y después con agua fría
10. Se lava enseguida con agua destilada
11. Se coloca en un baño de cloruro de oro durante 10 seg
12. Se lava con agua destilada
13. Se coloca en un baño de tiosulfato de sodio durante 3 min.
14. Se cubre con agua corriente durante 30 seg.
15. Posteriormente se cubre con verde brillante 30 seg.

16. Se lava con etanol 70%, 95% y absoluto, dos veces con cada uno y posteriormente se lava con xilol
17. Se cubre con bálsamo de Canadá o resina y se coloca un cubreobjetos.

Resultado esperado

La pared celular de los hongos debido a la oxidación adquiere un color marrón-café oscuro.



Técnica de Buffy Coat

Esta técnica es utilizada para diagnosticar las levaduras de *Histoplasma capsulatum* en sangre periférica en pacientes con sospecha de histoplasmosis diseminada.

Materiales e insumos

- ✓ Sangre con anticoagulante EDTA
- ✓ Tubos wintrobe para VES
- ✓ Dispensadores
- ✓ Láminas portaobjetos
- ✓ Colorante Wright
- ✓ Aceite de inmersión

Procedimiento

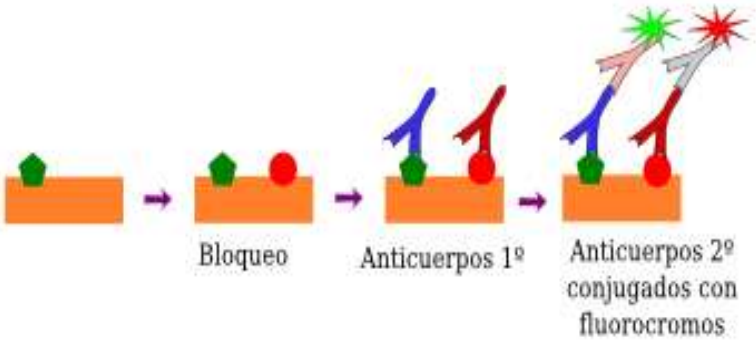
1. Colocar en el dispensador la sangre a examinar en un tubo wintrobe (se carga igual que una VES)
2. Centrifugar el tubo wintrobe a 3000 rpm por 15 minutos
3. Retirar el tubo de la centrifuga
4. Extraer el plasma sobrenadante con el dispensador.
5. Extenderlo como un frotis sanguíneo
6. Colorear con Wright según tiempos estandarizados por las láminas con objetivo de 100X buscando estructuras levaduriformes de 1-5µ de diámetro intra y extracelular.

Inmunofluorescencia

Colorea formas tróficas y los quistes. Esta técnica demuestra su mayor utilidad cuando no se dispone de una muestra idónea (Ej. Esputo inducido) o cuando el número de organismos es bajo, como en la neumocistosis extrapulmonar. Aun siendo las más sensibles, no son las más específicas, por lo que se recomienda otra técnica confirmatoria.

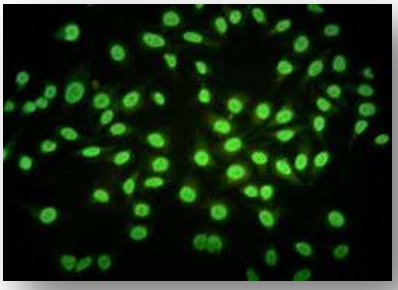
El fluorocromo más utilizado en los laboratorios de microbiología es el Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) por su estabilidad en soluciones acuosas, intensidad y ausencia de interferencia con la reacción inmunológica. Tiene un pico de excitación o absorción a 490 nm y un pico de fluorescencia o emisión en 525 nm, muy cercanos al de otros fluorocromo de uso habitual en los laboratorios de microbiología.

La Inmunofluorescencia Directa (IFD) y la Indirecta (IFI) son los procedimientos más ampliamente utilizados. En la IFD el antígeno se expone directamente al anticuerpo fluorescente durante un tiempo adecuado, luego se lava y se observa al microscopio de fluorescencia. En el IFI la presencia de un antígeno se revela primero por su exposición a anticuerpos no marcados, luego se lavan y se marcan estos con anticuerpos conjugados, se lava de nuevo y se examina al microscopio de fluorescencia.



Resultado esperado

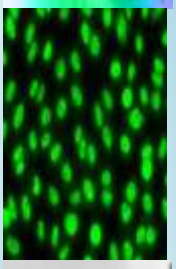
La refringencia del microorganismo que se está investigando. Esta técnica tiene más del 96% de especificidad y sensibilidad.



Bibliografía

1. CANDIDIASIS O CANDIDOSIS
   Dra. Laura Rosio Castañon Olvares
   Departamento de Microbiología y parasitología, Facultad de Medicina, UNAM
   www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/file.php/.../CANDIDIASIS_2013-1.pdf
   2013
2. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas.
   Ministerio de Salud del Perú, Instituto Nacional de Salud
   Medicina y Laboratorio, volumen 16, Número 7-8, 2010
3. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongo oportunistas causantes de micosis humanas.
   Ministerio de Salud del Perú, Instituto Nacional de Salud
   Medicina y Laboratorio, volumen 16, Número 7-8, 2010
4. 2007 Revista Iberoamericana de Micología-ISBN:978-84-611-8776-8 (capitulo 11)
5. Revista Chilena de Infectología 2011; 28 (5): 440-460
   Martín Lasso B.
   www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext...1018**2011**000600010
6. Revista Cubana de Medicina Tropical. 2013; 65(3): 403-406
   Yaxsier de Armas Rodríguez, Virginia Capó de Paz, Enrique Calderón Sandubete
   scielo.sld.cu/pdf/mtr/v65n3/mtr15313.pdf
7. *Pneumocystis jirovecii*: cien años de historia
   Enrique Calderón Sandubete,[I] Yaxsier de Armas Rodríguez,[II] Virginia Capó de Paz[III]
   Revista Cubana de Medicina Tropical
   Versión On-line ISSN 1561-3054
   Rev Cubana Med Trop v.63 n.2 Ciudad de la Habana mayo.-ago. 2011
8. Diagnóstico de Infecciones oportunistas en pacientes VIH+ (II)
   BY M. CIFARELLI.
   26 enero 2014
9. Manual de procedimientos técnicos de microbiología
   Hospital Padre Hurtado
   Fecha de actualización Noviembre 2011
   Chile
10. Eficacia del azul de toluidina y lugol en el diagnóstico precoz del cáncer bucal
    Revista Archivo Médico de Camagüey
    Versión ISSN 1025-0255
    AMC v. 14 n.4 Camagüey Jul - ago. 2010
11. Diagnóstico y tratamiento de infecciones oportunistas en el paciente adulto con infección por VIH/SIDA
    Martín Lasso *B. en representación del Comité Consultivi de SIDA. Sociedad Chilena de Infectología*
    Rev. Chil Infect 2011; 28(5); 44D-460

12. Métodos microbiológicos para el diagnóstico, manejo y estudio de la infección fúngica invasora 2012
Emilia Cantón Lacasa, Julio García Rodríguez, Jesús Vicente Guinea Ortega, Estrella Martín Mazuelos, Javier Pemán García
13. CANDIDIASIS O CANDIDOSIS
www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/file.php/.../CANDIDIASIS_2013-1.pd
14. **Micología** Médica Básica
Alexandro Bonifaz
Cuarta edición
Mc Graw Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V
México, 2012
15. Micología médica ilustrada
Roberto Arenas
Cuarta Edición
Mc Graw Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V
México, 2011.
16. **Histoplasmosis** - Facultad de Medicina - UNAM
Dra. Laura Rosario Catañón Olivares
www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/.../histoplsmosis.html
Última revisión 7 de enero 2014
17. Técnicas de tinción histológica
www.uam.es/departamentos/medicina/patologia/Tecnicas.htm
Tinción para reticulina · Perls · **P.A.S.** · Rojo congo · Elástica de Van Gieson · Plata metenamina o Hexamina
Azul Alcian · Sudan III · Grocott · Violeta de Cresilo.
18. Microbiología médica
JAWETZ, MELNICK Y ADELBERG
25ª edición
Mc Graw Hill Educación
2011
México D.F.
19. Manual de laboratorio de microbiología para el diagnóstico de infecciones respiratorias
Mª José López García, Marta Cárdenas Povedano, Aurora Urbano Felices.
1ª edición 2012 OmniaScience.



Capítulo II

INFECCIONES PRODUCIDAS POR

Virus

Introducción

El estudio científico de estas macromoléculas parasitarias e intracelulares es reciente. Apenas en el siglo XIX, mediante estudios clínicos y patológicos, se les reconoció como agentes etiológicos de enfermedades específicas.

Entre las consecuencias de la invasión viral a nivel celular podemos observar: Cambios en las células los que han sido denominados efectos citopáticos, y los, debido a alteraciones en la síntesis de ácidos nucléicos y proteínas propios, en la estructura del citoesqueleto y en la membrana. (Uribarren, 2013)

Antes del uso generalizado de la terapia antirretroviral, las infecciones oportunistas (IO), se han definido como las infecciones más frecuentes y graves de personas inmunosuprimidas infectadas por el VIH y han sido la principal causa de movilidad y mortalidad en esta población. (AIDS*info,* 2013). Muchas IO pueden ser prevenidas y/o tratadas. En realidad, muchas de las investigaciones en sida, sobre las que habrás escuchado, han sido realizadas para encontrar tratamientos o curas para determinadas IO y no para buscar medicamentos para detener el VIH.

Entre las infecciones oportunistas virales podemos mencionar: Citomegalovirus (CMV), Hepatitis C, Virus Herpes Simple (herpes oral y genital), Virus Herpes Zoster (culebrilla), Virus Papiloma Humano (VPH, verrugas genitales, displasia/cáncer anal o cervical, entre otros. (AIDSmeds, 2010)

Definiciones

- **Ataques recidivantes**: Recidivante o recidiva; enfermedad que reincide en un paciente o que vuelve a aparecer o recaer, después de un periodo de tiempo, permaneciendo en estado de latencia en agente causal de la enfermedad.
- **Cuerpos de inclusión**: Muchos tipos de virus inciden en la aparición de estructuras membranosas en el citoplasma, en algunos casos en forma de grandes vacuolas citoplasmáticas (Ej. VHI) y en otros como pequeñas vesículas. En varios virus se comprobado que estas regiones corresponden a zonas muy ricas en proteínas virales, siendo centros de replicación viral.
- **Dermatoma**: Es el área de la piel inervada por una raíz o nervio dorsal de la médula espinal. Los nervios cutáneos son los que llegan a la piel, recogiendo la sensibilidad de ésta. Cada nervio cutáneo se distribuye en una cierta zona de piel, llamada dermatoma.
- **Exantema**: Es una erupción cutánea que aparece de forma aguda, aparece frecuentemente con enfermedades generales infecciosas como sarampión, rubéola, varicela, escarlatina, dengue o tifus. Las causas que provocan su aparición en un niño pueden ser varias; agentes infecciosos: virus, toxinas bacterianas; por medicamentos, enfermedades inflamatorias; efecto esperado de algunas vacunas virales.
- **HBsAg:** Significa antígeno de superficie de la Hepatitis B, también conocido como *antígeno Australia*. Consta de una glucoproteína que se inserta en la superficie del virus de la Hepatitis B y cuando se detecta en el torrente sanguíneo indica infección actual.
- **HBeAg:** Significa antígeno de la Hepatitis B. Este antígeno es una proteína del virus de la Hepatitis B, que circula en la sangre infectada cuando el virus se está replicando activamente. La presencia de este antígeno indica que la persona es contagiosa y es capaz de transmitir el virus a otra persona.
- **Hipoglucorraquía**: Disminución de la cantidad de glucosa contenida en el Líquido Cefalorraquídeo causada por agentes bacterianos
- **Viremia**: Es una condición médica sonde virus entran al torrente sanguíneo y logran tener acceso al resto del cuerpo.

Virus Herpes Simplex

Los virus herpes simplex pertenecen a la familia *Herpesviridae*, son virus ADN, icosaédricos y envueltos, de aproximadamente 150nm de diámetro. Al igual que los demás miembros de esta familia, tienen la capacidad de persistir de manera latente y de reactivarse. Serológicamente se diferencia en dos tipos, Virus Herpes Simplex -1 (VHS-1) y el Virus Herpes Simplex -2 (VHS-2), los cuales comparten cerca del 50% de homología genética.

Si bien ambos pueden infectar la mucosa genital. El VHS-2 es el principal agente de úlcera genital en el mundo. Generalmente, se considera una infección de diagnóstico clínico; sin embargo; en ocasiones se requiere la certificación del laboratorio, especialmente en pacientes inmunoinmunosuprimidos, mujeres embarazadas y recién nacidos. (José Martínez, 2010)

Una de las técnicas más antiguas y simples de realizar, en la cual se tiñe un frotis de la lesión ulcerada, con solución de Giemsa y se observa al microscopio de luz, la formación de células gigantes mononucleadas, tiene el inconveniente de no distinguir entre serotipos de Virus de Herpes simplex (VHS), ni del virus varicela zoster

1. Descripción de la Enfermedad

La propiedad destacada de los herpes virus es su capacidad de establecer infecciones persistentes de por vida en sus hospedadores y experimentar reactivación periódica. Su activación frecuente en los pacientes inmunodeprimidos produce complicaciones graves. Desde el punto de vista clínico la infección, la infección reactivada puede ser muy diferente a la causada por la infección primaria.

Diversas enfermedades se relacionan con la infección por los herpes virus. La infección primaria y la enfermedad reactivada por un determinado virus pueden implicar diferentes tipos de células o presentar diferentes cuadros clínicos.

VHS-1 y VHS-2 infecta a las células epiteliales y establecen infecciones latentes en las neuronas. El VHS-1 por lo general se relaciona con las lesiones bucofaríngeas y producen ataques recidivantes de “herpes febril”. El VHS-2 infecta principalmente la mucosa genital y es la causa principal de herpes genital. Los dos virus también producen enfermedad neurológica. VHS-1 es la principal causa de encefalitis esporádica.

Tanto el tipo 1 como el tipo 2 pueden causar infecciones neonatales que a menudo son graves. (JAWETZ, 2010).

Las lesiones genitales se asocian a dolor, linfadenopatía y pueden tener descarga uretral ocasionalmente. Lesiones ulceradas grandes y confluentes, tanto en boca como genitales,

pueden verse en pacientes con recuentos de linfocitos T-CD4< 100 cél/ml. (Martín Lasso B., 2010)

2. Manifestaciones Clínicas

A grandes rasgos se considera que el HSV-1 infecta de la cintura para arriba y el VHS-2 de la cintura para abajo, sin embargo esta diferenciación no es estricta.

La infección por VHS-1 es frecuente en sitios hacinados y con condiciones precarias de higiene se tienen porcentajes de 90% de la población tienen anticuerpos antivirales. La infección por VHS-2 depende de la actividad sexual

Las infecciones herpéticas son habituales en la cavidad oral (VHS-1) y región genital (VHS-2), estas son úlceras superficiales y confluentes, dolorosas, pueden contener fibrina, lo que les otorga una apariencia blanquecina amarillenta sucia y plana.

Las lesiones herpéticas suelen reaparecer en el mismo sitio y ocasionalmente comprometen el área roja externa de los labios, situación que no ocurre con las aftas. Las lesiones genitales se asocian a dolor, linfadenopatía y pueden tener descarga uretral ocasionalmente.

Lesiones ulceradas grandes y confluentes, tanto en boca como genitales, pueden verse en pacientes con recuento de linfocitos T-CD4 < 100 cel. /mL1.

La posibilidad de que VHS-1 y VHS-2 establezcan infecciones latentes con recidivas asintomáticas favorece su transmisión, ya que un individuo infectado puede ser transmisor durante toda su vida. Los virus infectantes se encuentran en el líquido de las vesículas (Berrueta, 2013)

Los dos virus también producen enfermedad neurológica. HSV-1 es la principal causa de encefalitis el diagnostico de encefalitis herpética incluye compromiso agudo o subagudo del nivel de conciencia, alteración de funciones mentales superiores, fiebre, cefalea y convulsiones. En la tomografía computarizada de cerebro suelen encontrarse precozmente áreas isquémicas bilaterales, temporo-parietales, pero puede comprometerse cualquier zona cortical. (Lasso B, 2010). Tanto el tipo 1 como el tipo 2 pueden causar infecciones neonatales que a menudo son graves. (JAWETZ; MELNICK Y ADELBERG, 2010).

3. Diagnóstico de Laboratorio

El diagnóstico de laboratorio es económico y rápido se realiza mediante la prueba de Tzank que consiste en hacer una impronta de las células y teñirlas con el colorante de Wright o Giemsa, y observar células fusionadas con varios núcleos, sincitios, así como inclusiones nucleares de Cowdry. Se puede detectar anticuerpos o antígenos virales por otras técnicas. La detección de anticuerpos solo es de utilidad para detección de la primo infección y estudios epidemiológicos. (Gómez García, 2013).

3.1 Muestras clínicas/Biológicas para diagnóstico

- ✓ Líquido de vesículas
- ✓ Raspado de base de vesículas
- ✓ Tejido de lesiones
- ✓ LCR
- ✓ Sangre
- ✓ Biopsia

3.2 Métodos de Diagnóstico

A. Examen Directo

A.1 Citipatología

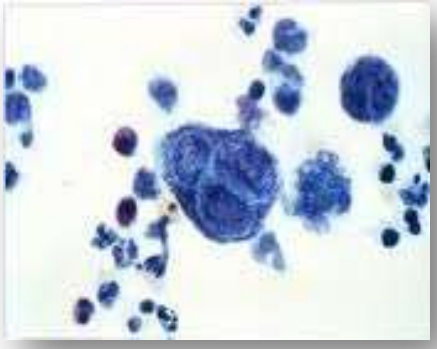
A.1.1 Prueba de Tzanck

Una de las técnicas más antiguas y simples de realizar, en la cual se tiñe un frotis de la lesión ulcerada, con solución de Giemsa y se observa al microscopio de luz.

Tiene el inconveniente de nos distinguir entre serotipos de VHS, ni del virus varicela- zoster (Mario Bianchi, 2012)

Resultado esperado

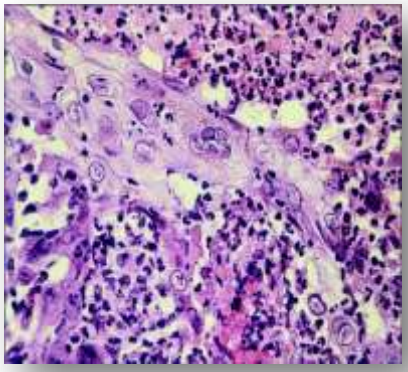
Se busca presencia de células gigantes con inclusiones intranucleares (queratinocitos multinucleados). (Mario Bianchi, 2012)



Prueba de Tzanck positiva- Virus de Herpes Simplex

A.2 Cultivo

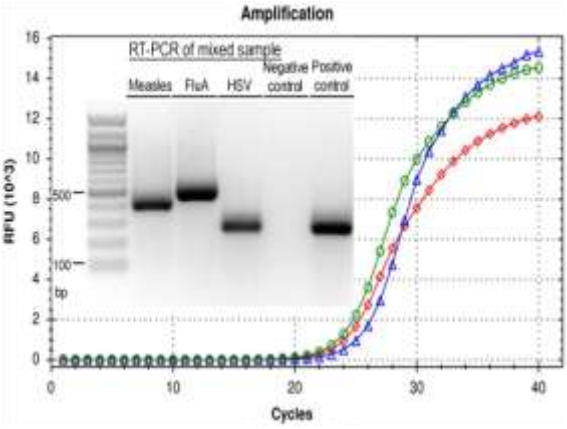
Es una técnica que entrega la certeza de identificar el virus replicante de la muestra clínica. Continúa siendo la técnica de referencia en el diagnóstico de enfermedades virales (M. José Martínez, 2010). Las muestras son tomadas en medio de transporte viral y en condiciones de refrigeración, se debe enviar en forma inmediata al laboratorio donde serán procesadas o almacenadas a -70°C



Se observó a las 48 hrs. Un efecto citopático compatible con infección por virus de herpes simplex

A.3 Biología molecular

Esta técnica muestra una sensibilidad y especificidad cercanas al 100%, también permite tipificar el Virus del Herpes Simples (VHS-1 y VSH-2).



B. Examen Indirecto

B.1 Serología

La incidencia más alta de la infección por HSV-1 ocurre en los niños de 6 meses a tres años de edad, hacia la edad adulta, 70 a 90% de las personas tienen anticuerpos para el tipo 1.

B.1.1 ELISA

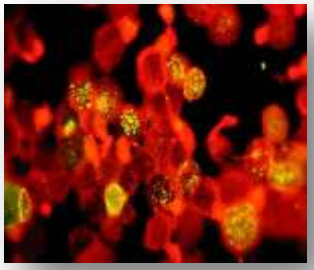
Aparecen anticuerpos en un lapso de cuatro a siete días después de la infección y alcanzan un máximo en dos a cuatro semanas. Persisten con fluctuaciones leves durante toda la vida del hospedador.

La utilidad diagnóstica de los análisis serológicos está limitada por los múltiples antígenos compartidos por HSV-1 y HSV-2. También puede haber algunas respuestas anamnésicas, heterotípicas al virus de varicela-zoster en las personas infectadas con HSV y viceversa.

El empleo de anticuerpos específicos para HSV, disponibles en algunos laboratorios de investigación, permite pruebas serológicas más significativas. (JAWETZ, 2010).

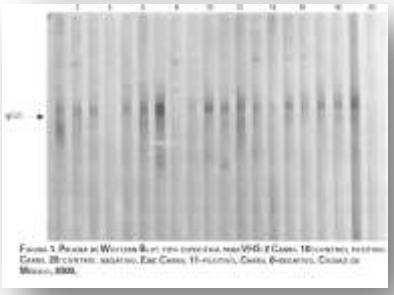
B.1.2 Inmunofluorescencia directa

Se utiliza para detección de antígeno viral, realizada de frotis de lesiones causadas por el virus del Herpes. (M. José Martínez, 2010) (Fundara Hernández, 2012).



B.1.3 Western Blot

El Western Blot es capaz de distinguir entre anticuerpos del tipo HSV-1 y del tipo HSV-2 del herpes simplex con una precisión extremadamente alta, se aproxima al 99%.



B.1.4 Pruebas rápidas

Se visualiza la reacción antígeno-anticuerpo, el antígeno está fijado a partículas de látex y al enfrentarse con los anticuerpos presentes en muestra, se produce una reacción de aglutinación en el caso que la muestra este positiva.

Varicela Zoster

El virus de varicela zoster corresponde al alfa-herpesvirus 3, y es morfológicamente idéntico al virus del herpes simple; no tiene reservorio animal, de manera que para su supervivencia se propaga de hombre a hombre.

En cultivo de tejido embrionario humano, producen cuerpos de inclusión intranucleares característicos; los cambio citopático son más focales y se diseminan en forma mucho más lenta que los producidos por los virus del herpes simples. Los virus infecciosos mantienen una asociación muy estrecha con las células, y la propagación serial se lleva a cabo con más facilidad por el paso de células infectadas a partir del líquido de cultivos de tejidos.

El mismo virus ocasiona varicela y herpes zoster. Los virus aislados de lesiones de varicela y zoster no muestran variación genética importante; La inoculación de líquidos de vesículas de zoster en niños produce varicela y estos niños, al recuperarse de la infección inducida por el virus, precedentes de herpes zoster, son resistentes a nuevos cuadros de varicela. (Lourdes Alonso 2011).

1. Descripción de la enfermedad

El virus de varicela zoster es causa de dos patologías diferentes; en el primer contacto del huésped con el virus (primoinfección) se manifiesta como varicela, una enfermedad contagiosa y generalmente benigna que afecta en forma epidémica a niños susceptibles.

La vía de entrada es la mucosa de las vías respiratorias superiores o la conjuntiva y una vez que el virus ha ingresado al organismo se produce la replicación inicial en los ganglios linfáticos regionales, lo que da lugar a la viremia primaria que disemina al virus con replicación en el hígado y el bazo. La viremia secundaria, en la que intervienen células monoclonales infectadas, que transportan los virus a los ganglios de las raíces dorsales; en este sitio se replican y establecen la latencia y posteriormente se diseminan a la piel, donde aparece el exantema característico.

El edema de las células epiteliales, la degeneración por inflamación y la acumulación de líquido tisular resultan en la formación de vesículas.

Cuando la infección primaria de varicela se alivia, los segmentos residuales del provirus viajan hacia arriba desde las terminaciones nerviosas sensoriales hasta la raíz de los ganglios craneales o raquídeos; estos fragmentos virales permanecen en el núcleo de las células neuronales, donde son protegidos de altas concentraciones de anticuerpos que persisten en la circulación, en respuesta a la infección primaria. La migración y colonización del virus a los largo de la ruta natural puede explicarse, en parte, porque el herpes zoster afecta

predominantemente el ganglio sensorial, y la erupción se distribuye localmente a los largo de un dermatoma sensorial. (Lourdes Alonso 2011).

2. Manifestaciones Clínicas

La reactivación de la infección por el herpes zoster puede ser la primera manifestación clínica de la infección por el VIH, hasta el punto de que su presencia en un individuo joven y sano debe obligar a descartarla.

La infección se caracteriza por una infección neurológica y dermatológica, posterior a un episodio de varicela con reactivación del virus en los ganglios sensitivos espinales y craneales.

Una vez reactivado, el virus se mueve a lo largo de las fibras sensitivas hasta él área de piel que inervan.

Herpes zoster se presenta como una erupción con vesículas de topografía unilateral, que usualmente afectan de 1 - 3 dermatomas.

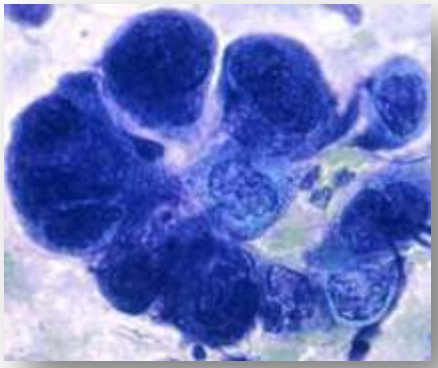
El dolor asociado es permanente durante la fase aguda. Una vez que se han resuelto las vesículas, un gran número de pacientes mantienen dolor persistente, durante meses o años. Esta neuralgia postherpética implica la pérdida de autonomía y una calidad de vida pobre y es una de las principales complicaciones. (García, 2013)

El cuadro clínico es similar al de los pacientes inmunocompetentes, aunque es más intenso, pudiendo desarrollar queratitis epitelial crónica.

Aunque el cuadro de necrosis retiniana externa progresiva y necrosis retiniana aguda son infrecuentes como extensión del proceso externo, se debe incluir examen retiniano periódico. (Xavier Camino, Julio S Arrizabalaga, David Avellanat, 2010)

3. Diagnóstico del Virus Varicela Zoster

El diagnóstico se basa en la prueba de Tzank, el virus se puede aislar de las de las vesículas y recientemente se utiliza tecnología de biología molecular para su identificación. (Gómez García, 2013).



3.1 Muestras para el diagnóstico

- ✓ Raspado de lesiones mucocutáneas (base de lesiones)
- ✓ Líquido de vesículas
- ✓ Sangre
- ✓ LCR
- ✓ Biopsias

3.2 Metodos de Diagnóstico

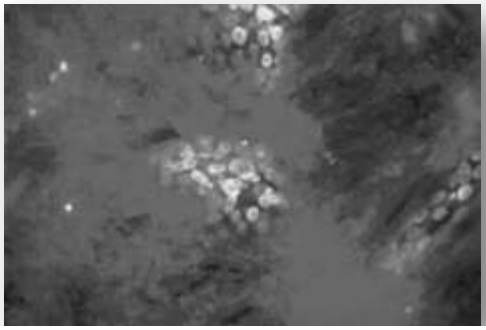
A. Directas

A.1 Técnica de Tzanck

Identificar células gigantes mononucleadas. Tiene sensibilidad de 85%, sin embargo, sí se aplica tinción de inmunohistoquimica al frotis de Tzanck la sensibilidad y especificidad aumentan al 99.5%, pero no permite diferenciar el virus de varicela zoster del virus herpes simplex**.**

A.2 Cultivo

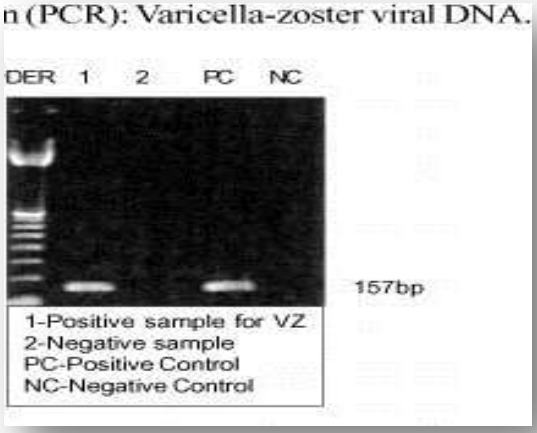
Se considera el patrón de referencia; sin embargo, ofrece especial dificultad para recuperar partículas virales a partir de las muestras, que deben tomarse de vesículas recientes, se negativiza con el tratamiento antiviral e implica mucho tiempo.



Cultivo de Shell-vial de infección por *Varicela zoster*

A.3 Biología molecular

Los estudios virológicos detectan virus infecciosos, ADN viral o proteínas virales en muestras clínicas.



B. Indirectas

B.1 Inmunofluorescencia

Se realiza con anticuerpos monoclonales

Resultado esperado

Observar células gigantes

B.2 Serología

B.2.1 ELISA

Permiten la detección de anticuerpos de la clase IgG e IgM (en herpes zoster puede detectarse concentraciones altas de anticuerpos en las fases iniciales). La serología tiene sus inconvenientes como ser:

a. Producir reacciones cruzadas
b. En la infección primaria se retrasa la producción de anticuerpos
c. La respuesta serológica puede verse alterada en los pacientes inmunodeprimidos

B.2.2 Prueba de látex

Detectan anticuerpos del virus de varicela zoster, tiene gran sensibilidad incluso pueden ser mayor que la de algunas pruebas de ELISA.

Es una prueba sencilla y flexible, pero suele presentar fenómeno de pro-zona lo que obliga a realizar diluciones lo que multiplica su costo.

Citomegalovirus

Es un virus DNA de doble cadena, pertenece a la familia herpes virus. La infección en humanos es un balance que se mantiene entre el sistema inmune y la replicación viral en la que permanece el virus latente en leucocitos y otras células epiteliales y otras células epiteliales del huésped. (Guía práctica clínica GPS, México, 2012).

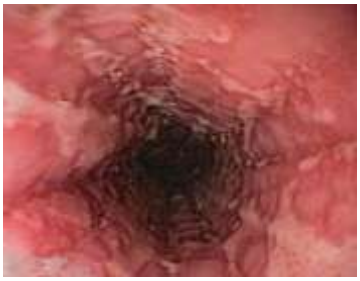
1. Descripción de la enfermedad

El citomegalovirus (CMV) compromete a pacientes portadores de VIH inmunodeprimido (linfocitos T-CD4 < 100 cel. /ml). La retinitis es su más importante manifestación clínica, es unilateral en 2/3 de los pacientes y, de no mediar terapia, afecta ambas retinas en todos los pacientes. La progresión de la enfermedad, una vez diagnosticada, es muy rápida y puede llevar a la pérdida visual total en periodos tan cortos como 10 a 21 días. Las lesiones retínales evaluadas por un oftalmólogo experimentado, junto con un contexto clínicos claro, tiene una valor predictivo positivo en 95%. Si existen dudas se debe realizar PCR para CMV en humor vítreo.

Además de lo anterior el CMV provoca colitis que es la causa más habitual de perforación intestinal en el paciente con infección de VIH. (Martín Lasso B., 2011)

2. Manifestaciones Clínica

Como se mencionó anteriormente, la retinitis es la más importante manifestación clínica la cual es unilateral en 2/3 de los pacientes y de no mediar terapia, afecta ambas retinas en todos los pacientes. La progresión de la enfermedad, una vez diagnosticada, es muy rápida y puede llevar a la pérdida visual total en períodos tan cortos como 10 a 21 días.



La colitis ocurre en 5 a 10% de los pacientes, se caracteriza por fiebre, pérdida de peso, dolor abdominal y diarrea. El estudio por colonoscopia demuestra extensas áreas ulceradas necróticas y es la causa más habitual de perforación intestinal en el paciente con infección por VIH.

Puede presentarse también con esofagitis en el 5 a 10% de las personas; las lesiones clásicamente son únicas, extensas, superficiales y del extremo distal del esófago. Hay fiebre, odinofagia y dolor retro-esternal.

La meningo-encefalitis puede ser rápidamente letal y se caracteriza por un LCR con pleocitosis linfocitoria, glucorraquia levemente baja e incremento de proteínas. El cuadro clínico imita a la demencia por VIH. La poliradiculopatía se caracteriza por un inicio con dolor lumbar y fiebre,

evolucionando a la pérdida del control de esfínteres y paraparesia o paraplejia en la mayoría de pacientes; todo esto, en el lapso medio de cuatro semanas. (Lasso B, 2010)

3. Diagnóstico de Laboratorio

El CMV puede afectar cualquier órgano pero se observa con más frecuencia en hígado, riñón, pulmón, páncreas, cerebro, tracto digestivo, médula ósea y glándulas salivares donde se espera observar, células gigantes con inclusiones intracelulares /citoplasmáticas, meden de 3-4 veces más que las células normales y poseen un gran núcleo habitualmente excéntrico. Las inclusiones intracelulares son eosinófilas y están separadas de la membrana nuclear por un halo claro, lo que da un aspecto de ojo de lechuza.

3.1 Muestras clínicas/biológicas para diagnóstico

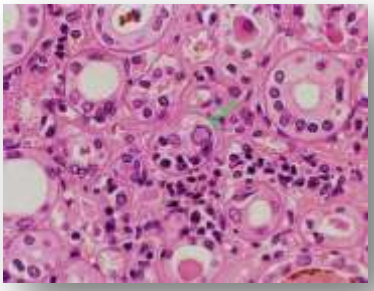
- ✓ LCR
- ✓ Biopsia
- ✓ Suero

3.2 Técnicas de diagnóstico

A. Directas

A.1 Diagnóstico histológico

Permite observar células gigantes con inclusiones intracelulares /citoplasmáticas, meden de 3-4 veces más que las células normales y poseen un gran núcleo habitualmente excéntrico.



A.2 Cultivo

Es una técnica altamente específica y permite realizar estudios de sensibilidad, no obstante la obtención de resultados es tardía.

A.3 Biología molecular

Son absolutamente específicas y muy sensibles. El PCR permite detectar cantidades muy pequeñas del agente viral. Las muestras deben procesarse de forma inmediata sino se deben conservar a 4°C. Las líneas celulares más utilizadas son MRC-5 y WI 38. La reacción positiva se determina por el efecto citopático del CMG sobre la línea celular. (3-5 días).

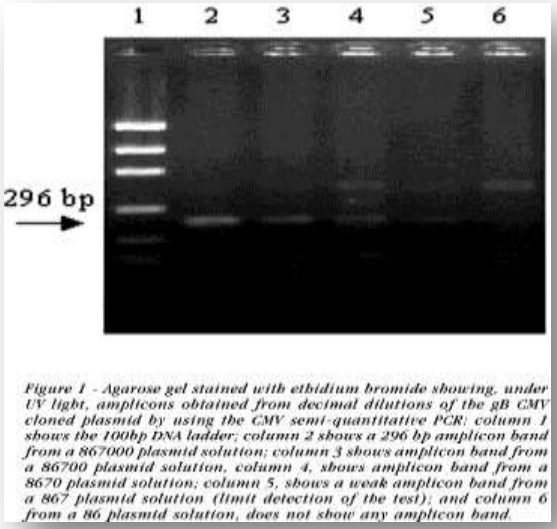


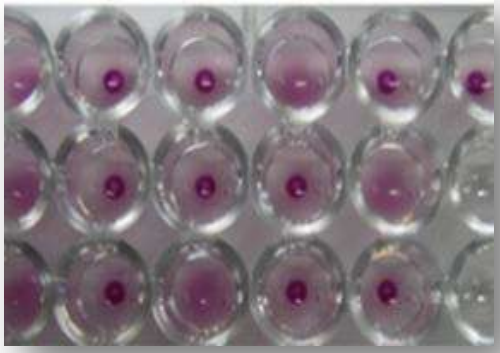
Figure 1 - Agarose gel stained with ethidium bromide showing, under UV light, amplicons obtained from decimal dilutions of the gB CMV cloned plasmid by using the CMV semi-quantitative PCR: column 1 shows the 100bp DNA ladder; column 2 shows a 296 bp amplicon band from a 867000 plasmid solution; column 3 shows amplicon band from a 86700 plasmid solution, column 4, shows amplicon band from a 8670 plasmid solution; column 5, shows a weak amplicon band from a 867 plasmid solution (limit detection of the test); and column 6 from a 86 plasmid solution, does not show any amplicon band.

B. Indirectas

B.1 Fijación de Complemento

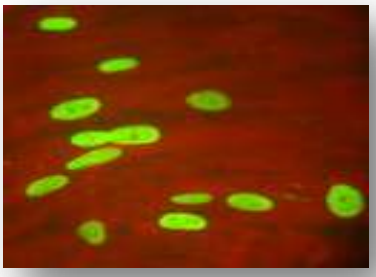
Se basa en la unión del Complemento al complejo Ag-Ac, consumiéndose el complemento en proporción a la cantidad de Ac., presente en la muestra.

Esta técnica es capaz solamente de detectar cantidades importantes de Ac y no tiene elevada sensibilidad por lo que no suele utilizarse de forma rutinaria. (Fernando Casafont).



B.2 Inmunofluorescencia

El complejo Ag-Ac se detecta con un Ac humano conjugado con fluoresceína y permite detectar Ac tanto IgG como IgM (tiene especificidad en torno al 35%)



B.3 ELISA

Es cuantitativa, rápidas, automatizables, lectura objetiva y son las que tienen mayor sensibilidad.

B.4 Pruebas de Látex:

Permiten detectar Ac frente al CMG de una forma rápida (5-10 min) tiene elevada sensibilidad y especificidad (95%).

Hepatitis viral tipo B

Es un virus RNA de tira positivo, clasificado bajo la familia Flaviviridae, género Hepadnavirus. Con análisis de la secuencia de la RNA se puede diferenciar por lo menos seis genotipos principales y más de 100 subtipos (JAWETZ, 2011)

1. Descripción de la enfermedad

La Hepatitis viral es considerada una de las principales causas de muerte entre las personas VIH positivas debido a que pueden ocasionar problemas crónicos en el hígado, falla de insuficiencia del hígado y cáncer de hígado. En consecuencia, muchas personas VIH positivos deben combatir dos infecciones al mismo tiempo. Son tres las hepatitis virales que son una amenaza para la salud: hepatitis A (VHA), hepatitis B (VHB) y el de la hepatitis C (VHC).

El VHB, no causa daño directo a los hepatocitos. Lo que ocurre es que el sistema inmunológico reacciona atacando el virus, y esto provoca inflamación y daño del hígado. Sin embargo, el virus puede causar daño al material genético dentro de las células del hígado, lo que puede causar cáncer de hígado que al igual que la hepatitis, también puede ser mortal.

El VHB se parece al VIH en cuanto a las formas de transmisión: por contacto sanguíneo y contacto sexual. Sin embargo los niveles en sangre del VHB son mucho mayores que los del VIH o de Hepatitis C, lo que hacer que la transmisión de ciertas situaciones sean mucho más probables (por ejemplo de madre a hijo durante el parto).

El VHB se encuentra en la sangre, el semen y las secreciones vaginales y se transmite principalmente por contacto sexual. Otras vías de transmisión es el uso de jeringas contaminadas para inyectarse droga, de madre portadora de VHB a hijo durante el parto transfusiones sanguíneas. (AIDSMEDS, 2011)

El VHB se parece al HIV en cuanto a las formas de transmisión por contacto sanguíneo con fluidos corporales y contacto sexual. Sin embargo los niveles en sangre de VHB son mucho mayor que los de VIH o de Hepatitis C, lo que hace que la transmisión en ciertas situaciones sean mucho más probables (por ejemplo de madre a hijo durante el parto).

2. Manifestaciones Clínicas

La mayoría de las personas que adquieren el VHB se recupera sin consecuencias en un período menor a 6 meses. Aproximadamente el 5% de los pacientes que adquiere la infección siendo adultos desarrolla la forma crónica. La probabilidad de desarrollar una hepatitis B crónica depende de la edad al momento de adquirir la infección y del estado inmunitario de la persona.

Los síntomas de hepatitis B aguda se presentan después de 1 a 4 meses de adquirido el virus. Los niños e inmunosuprimidos generalmente son asintomáticos.

Un 30-50% de las personas mayores de 5 años presentan síntomas como cansancio, disminución del apetito, náuseas, ictericia, dolor abdominal, artralgia o artritis. Los signos clínicos son ictericia, hepatomegalia y en ocasiones esplenomegalia. Los síntomas habitualmente desaparecen en un lapso de 2-4 meses. Una proporción muy baja de pacientes con hepatitis B aguda (0.1 a 0.5%) desarrollan una forma de la enfermedad caracterizada por una falla grave hepática (hepatitis fulminante), que tiene una elevada mortalidad. Esta forma es algo más frecuente en mayores de 60 años.

La infección primaria puede ser limitada con eliminación espontánea del virus o progresar a una infección crónica con viremia persistente. En casos de inmunosupresión se ha demostrado reactivación viral con síntomas de infección aguda y detección del ADN viral sin marcadores serológicos de infección crónica. . (Guía Clínica de manejo y tratamiento de la infección por la Hepatitis B, 2010)

3. Diagnóstico de laboratorio

Las manifestaciones clínicas no permiten diferenciar la hepatitis B de la hepatitis causada por otros agentes virales y por consiguiente, es esencial la confirmación del diagnóstico en laboratorio.

Se dispone de algunas pruebas de sangre para diagnosticar la hepatitis B y hacer el seguimiento de las personas infectadas. Mediante esas pruebas se pueden distinguir las infecciones agudas y las crónicas (Jawetz, 2011).

3.1 Muestras clínicas/biológicas para diagnóstico

- ✓ Sangre
- ✓ Biopsia

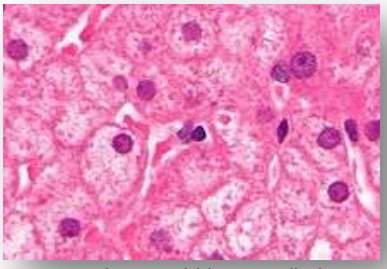
3.2 Métodos de diagnóstico

A. Directos

A.1 Específicos

A.1.1 Biopsia

La biopsia hepática permite establecer un diagnóstico histológico de la hepatitis (Jawetz, 2011). Continúa siendo una valiosa herramienta para caracterizar la actividad y severidad de la hepatitis B crónica y puede proporcionar importante

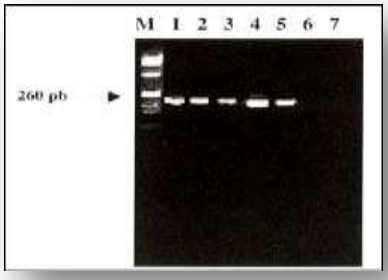


Hepatocitos en vidrio esmerilado, tal como se ven en una biopsia hepática por hepatitis crónica B

información en el progreso de la enfermedad para guiar el tratamiento (AIDS info, 2013).

A.1.2 Biología molecular

Diagnóstico a través del DNA viral.



En esta figura de muestra la presencia de DNA del virus de la Hepatitis B (HVB) en suero.

A.2 No específicos

A.2.1 Las pruebas de función hepáticas anormales, como:

- ✓ Alanina aminotransferasa Transamisa glutámica pirúvica, niveles persistentes bajos, puede ser asociado con enfermedades del hígado.
- ✓ La bilirrubina sérica. Complementan los datos clínicos (JAWETZ, 2011)

B. Indirectos

B.1. ELISA

El diagnóstico de laboratorio de la hepatitis B se centra en la detección de antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg). La OMS recomienda que se analice la presencia de este marcador en todas las donaciones de sangre, a fin de evitar la transmisión del virus a los receptores.

- La infección aguda se caracteriza por la presencia del HBsAg y de inmunoglobulina M (IgM) en el antígeno del núcleo HBcAg. En la fase inicial de la infección los pacientes también son seropositivos para el HBeAg.
- La infección crónica se caracteriza por la persistencia (más de seis meses) del HBsAg (con o sin concurrencia de HBeAg). La persistencia de HBsAg es el principal marcador del riesgo de ulterior desarrollo de hepatopatía crónica y carcinoma hepatocelular.
- La presencia del HBeAg indica que la sangre y los líquidos corporales de la persona infectada son muy contagiosos. (Hepatitis B; OMS, 2014).

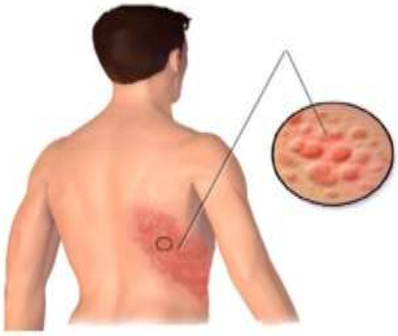
Obtención de la muestra

Obtención Toma de Muestra de Líquido de Vesícula

(Para diagnóstico de Herpes simplex y Varicela zoster a través de cultivo viral)

Materiales e insumos

- ✓ Lanceta estéril
- ✓ Hisopo estéril
- ✓ Torundas de algodón con desinfectante (alcohol al 70%, yodopovidona, etc.)
- ✓ Medio de transporte viral (MTV)
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha
- ✓ Recipiente para descarte



Procedimiento

1. Limpiar con algodón y alcohol la vesícula.
2. Con la lanceta pinchar la vesícula llena de líquido.
3. Tomar el líquido con el hisopo estéril y colocarlo en el Medio de transporte viral (MTV).
4. Enviarlo al laboratorio para cultivo.

Transporte y almacenamiento de muestra

Las muestras en el MTV se deben mantener y transportar al laboratorio donde se realizara el cultivo en condiciones de refrigeración (4 a 8°C).

Obtención Muestra de Sangre Venosa

Materiales

- ✓ Guantes desechables
- ✓ Tubos con sistemas al vacío o tubos con tapón rojo
- ✓ Camisa para extracción al vacío
- ✓ Jeringa de 5 o 10 ml
- ✓ Torundas de algodón con desinfectante (Alcohol al 70% / yodopovidona/ Clorhexidina acuosa 2%, etc.)
- ✓ Etiquetas de identificación
- ✓ Gradilla
- ✓ Recipiente para descarte
- ✓ Centrifuga
- ✓ Protopipetas
- ✓ Tubos de ensayo 13 X 100 mm
- ✓ Aplicador de madera sin algodón

Procedimiento

1. Colocarse los guantes desechables
2. Colocar cómodamente e inmovilizar al paciente
3. Rotular el tubo con nombre, edad, número de expediente, fecha y hora. (de acuerdo a solicitud de examen/boleta)
4. Preparar la jeringa (ajustar correctamente la aguja, aflojar el embolo, etc.)
5. Seleccionar la vena mediante tacto, (así determinaremos la profundidad, calibre, elasticidad, etc., de la vena).
6. Desinfectar el punto de punción con torundas impregnadas de alcohol al 70%, dejar que se seque el desinfectante utilizado.

7. Colocar el torniquete o compresor en la parte superior del brazo, para producir exaltación de la vena
8. Pinchar la piel, formando con la jeringa con un ángulo entre 15° y 30°, con el bisel de la aguja hacia arriba.
9. Extraer sangre, lentamente sin mover la aguja de la jeringa, para evitar perforar la vena.
10. Soltar el torniquete cuando la sangre fluya
11. Sacar la aguja y aplicar presión suave hasta lograr hemostasia, con la torunda de algodón.

12. Dispensar suavemente la sangre extraída en el tubo sin anticoagulante (tubo tapón color rojo)
13. En ayunas, generalmente la muestras es más homogénea y ofrece valores más precisos (María Isabel Bellón, 2014)

Separación de componentes sanguíneos

- ✓ Dejar la sangre a temperatura ambiente de 10 a 20 minutos para que el coagulo se retraiga
- ✓ Con un aplicador de madera, remover el coagulo formado
- ✓ Centrifugar a 5,000rpm durante 10 minutos
- ✓ Con una protopipeta tomar el suero y trasvasarlo a un tubo limpio o vial, previamente rotulado con los mismos datos del paciente (nombre, edad, número de expediente fecha y hora de toma de muestra).

Transporte y almacenamiento

- ✓ Si la muestra no se trabajara de inmediato, almacenarla en refrigeración (4-8 °C) o congelación (-20°C) si no se procesara en mismo día.

Obtención de muestra de Raspado de base de la lesión (Para diagnóstico de Herpes simplex y Varicela zoster)

Materiales e insumos

- ✓ Bisturí estéril
- ✓ Torunda de algodón
- ✓ Torundas de algodón con desinfectante (alcohol al 70%, yodopovidona, etc.)
- ✓ Placa petri o lámina portaobjetos
- ✓ Solución salina al 0.85% estéril
- ✓ Guantes estériles
- ✓ Gabacha
- ✓ Recipiente para descarte

Procedimiento

- Limpiar debidamente con algodón y desinfectante la lesión de donde se tomara la muestra
- Con el bisturí hacer un raspado de la base de la lesión (con sumo cuidado)
- Fijar la muestra a la lámina portaobjetos (pasándola por la llama de un mechero, si requiere humedad, utilizar una gota de solución salina estéril).
- Realizar procedimiento de coloración (Giemsa).

Transporte y almacenamiento

La muestra se debe fijar se manera inmediata y luego guardar la lámina a temperatura ambiente, protegida del polvo, insectos y humedad que pueda dañar el frotis.

Obtención muestra de biopsia

Materiales e insumos

- ✓ Frasco estéril, boca ancha y cierre hermético
- ✓ Solución salina isotónica estéril
- ✓ Formol al 10%

Procedimiento

1. Se debe realizar en el quirófano o consultorio bajo las más rigurosas reglas de asepsia.
2. Obtenida la muestra, ésta se divide en dos porciones (1mm cada una), una es colocada en un recipiente estéril con tapa de rosca conteniendo solución salina isotónica estéril. Para el examen micológico y la otra en formol al 10% en solución salina buferada para histopatología.

Transporte y almacenamiento

La muestra para el estudio debe ser remitida de inmediato al laboratorio a temperatura ambiente. Sin embargo, de no ser procesada al momento, conservar a 4-8°C por dos a cuatro horas.

Obtención de muestras del Líquido Cefalorraquídeo

Materiales e insumos

- ✓ Tubos de ensayo estériles con tapón de rosca
- ✓ Estilete para punción lumbar
- ✓ Torundas de algodón con desinfectante (alcohol al 70%, yodopovidona, etc.)
- ✓ Guantes estériles
- ✓ Gabacha
- ✓ Mascarilla

Procedimiento

1. Desinfectar la zona por punzar con yodopovidona al 2%
2. El médico debe realizar la punción en los espacios intervertebrales L3-L4, L4-L5 o L5-S1.
3. Al llegar al espacio subaracnoideo, retirar el estilete y dejar fluir libremente la muestra.
4. Recoger un volumen mínimo del espécimen de 5mL en un tubo estéril con tapa de rosca.

Transporte y almacenamiento

Transportar al laboratorio a temperatura ambiente. De no procesar de inmediato conservar a temperatura ambiente, protegido de la luz, por un máximo de 12 horas, No transportar ni almacenar en refrigeración, debido a que las bajas temperaturas afectan a los microorganismos que se investigan en esta muestra. (Castañón Olivares, 2013)

Procedimientos de Laboratorio

Prueba de Tzanck

(Para identificación presuntiva de Varicela zoster y Herpes simplex)

Es un procedimiento económico, rápido y eficaz para diferentes enfermedades cutáneas y mucosas que se presentan como pápulas ulceradas, vesículas, ampollas o úlceras. Es un procedimiento de orientación que requiere confirmación por otros métodos (Mario Bianchi, 2012).

Tipo de muestra

- ✓ pápulas ulceradas
- ✓ vesículas
- ✓ pústulas
- ✓ ampollas o úlceras de la piel

Insumos

- ✓ hisopos estériles
- ✓ torundas de algodón con desinfectante (alcohol etílico al 70%, Yodopovidona, etc.)
- ✓ bisturí estéril
- ✓ lámina portaobjetos
- ✓ Solución de cloro al 0.05%
- ✓ Aceite de inmersión
- ✓ Colorante de Giemsa
- ✓ cubreobjetos
- ✓ guantes
- ✓ gabacha
- ✓ Recipiente para descarte

Equipo

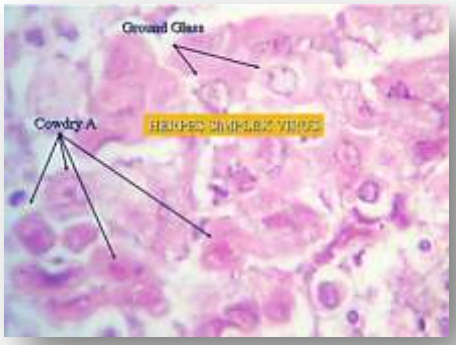
- ✓ Microscopio

Procedimiento

1. Limpiar con alcohol etílico al 70% (u otro desinfectante) la zona donde se tomara la muestra.
2. Si la lesión es una pápula con líquido hacer un pequeña incisión para examinar el líquido
3. Hacer raspado de la lesión, si esta tiene costra, quitarla para tomar muestra de la base de la lesión.
4. Colorear por método de Giemsa
5. Observar al microscopio

Resultado esperado

Se espera observar grandes células con inclusiones intracelulares o células eosinófilas, redondas u ovaladas, bien limitadas, de un halo más claro llamadas inclusiones de Crowdy tipo A o inclusiones de mayor tamaño, pero limitadas y coloración menos tenue que les da el aspecto de “lavado” o de “cristal esmerilado”, llamadas inclusiones de Crowdy tipo B, características de las llamadas células de Tzanck y casi patognomónicas de herpes zóster, simple, varicela.



Coloración de Giemsa (Citodiagnóstico)

Es un método habitual para el examen de frotis sanguíneo, cortes histológicos y otro tipo de muestras biológicas. Esta técnica está formado por varios colorantes: los tintes neutros utilizados combinan el azul de metileno como tinte básico y la eosina como tinte ácido, lo que proporciona una amplia gama de colores. El azul de metileno es un colorante metacromático, de ahí que muchas estructuras se tiñen de purpura y no de azul.

Materiales e insumos

- ✓ Muestra biológica
- ✓ Alcohol metílico absoluto
- ✓ Pipetas graduada de 10 ml
- ✓ Solución salina tamponada (PBS)
- ✓ Colorante de Giemsa
- ✓ Lámina portaobjetos
- ✓ Lámina cubreobjetos
- ✓ Agua destilada
- ✓ Aceite de inmersión
- ✓ Coplin
- ✓ Tubos de ensayo
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha
- ✓ Recipiente para descarte

Solución de Giemsa

- ✓ Preparar una solución con concentración de 1:9
- ✓ 1ml de colorante de Giemsa
- ✓ 9 ml de PBS

Equipo

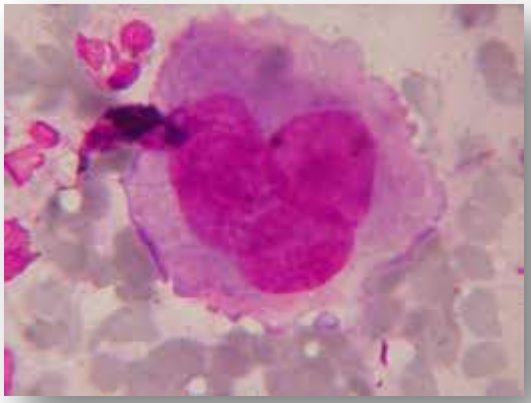
- ✓ Microscopio con objetivo de 40X y 100X

Procedimiento

1. Realizar frotis de la muestra en el portaobjetos
2. Fijar la muestra con alcohol metílico absoluto durante 3 minutos
3. Preparar una solución con de Giemsa 1:9
4. Por 10 minutos sumergir la muestra fijada en el portaobjetos de forma vertical en solución de Giemsa
5. Lavar el portaobjetos con agua destilada
6. Dejar secar
7. Colocar el cubre objetos sobre la coloración
8. Observar al microscopio en objetivo de 100X (DLNV/Laboratorio de Chagas,2013)

Resultado esperado

Los sincitios virales, se asocian habitualmente a la presencia de células gigantes con inclusiones intranucleares (Mario Bianchi, 2012).



Técnica ELISA

El nombre enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), fue acuñado por investigadores suecos Eva Engvall y Teter Perlmann, en 1971.

Materiales e Insumos

- ✓ Kit de ELISA para detección de inmunoglobulinas (IgM, IgG)
- ✓ Tubos de ensayo 13 x 100 mm / Microplacas
- ✓ Gradilla
- ✓ Marcador
- ✓ Micropipetas de 5µl, 100µl, 1000µ
- ✓ Puntas amarillas y azules
- ✓ Recipiente para descartar
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha
- ✓ Gafas protectoras

Equipo

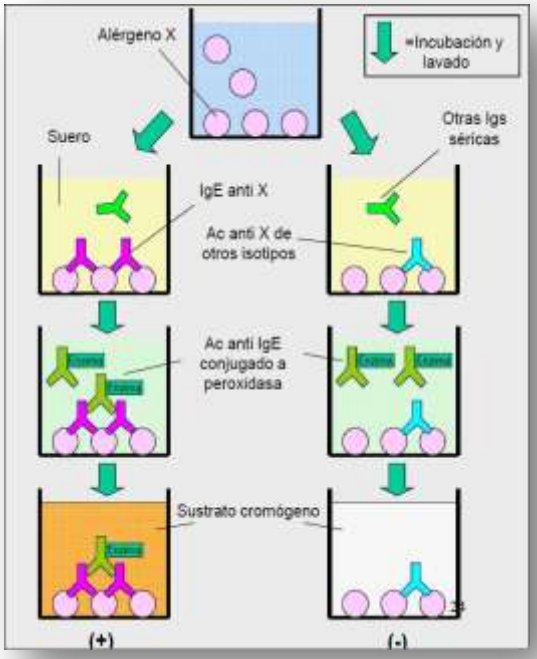
- ✓ Baño maría
- ✓ Incubadora
- ✓ Lavador de ELISA
- ✓ Lector de ELISA
- ✓ Lector y lavador de ELISA automatizada

Principio básico (ELISA)

- De la reacción consiste; al suero problema se le agrega un conjugado que son anticuerpos dirigidos contra anticuerpos humanos o antígeno, los cuales se unirán a una enzima.
- Las enzimas son capaces de modificar al sustrato en presencia de un cromógeno produciendo un producto coloreado que es detectado visualmente o por un espectrofotómetro o lector de ELISA

Procedimiento

1. En la placa de micro titulación se fijan anticuerpos específicos contra el antígeno que se quiere detectar (o vice versa).
2. Se añade la muestra al pocillo y si el antígeno del microorganismo buscado está presente, los anticuerpos lo fijan (se unen a él)
3. Se añade un anticuerpo dirigido contra el antígeno (igual al del pocillo, pero marcado con una enzima que se fija al antígeno)
4. Se añade el sustrato (incoloro)sobre el cual actúa la enzima
5. Aparece un color (producto coloreado), cuya intensidad es proporcional a la presencia de antígeno (anticuerpo), se puede observar visualmente o leerlo en un espectrofotómetro (lector de ELISA) a determinada longitud de onda.(métodos inmunológicos, 2014)



Resultado Esperado

Positivo: Producción/ cambio de color, el cual será inversamente proporcional a la cantidad de Anticuerpo ´o antígeno presente en la muestra.

Negativo: Ausencia de no hay cambio de color en la placa de lectura. Con base al valor de cohorte, si se tiene lector de ELISA

Prueba de Látex

Es la interacción entre un anticuerpo (que se produce ante la presencia de un agente infeccioso) y un antígeno ligado a una partícula de látex En este proceso, el anticuerpo es conocido como aglutinina y el antígeno como el aglutinógeno.

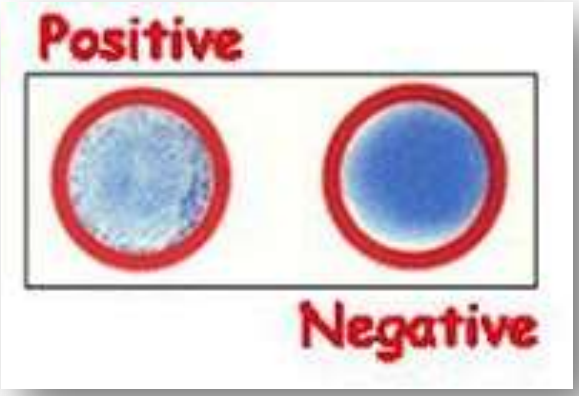
Cuando el anticuerpo está en exceso inhibe la reacción de precipitación, lo mismo ocurre en las reacciones de aglutinación. Esta inhibición es llamada el efecto pro-zona.

La temperatura, el pH, la concentración de electrolitos, son importantes para la realización de la prueba. La reacción final se evidencia por la formación de malla o grumos visibles macroscópicamente. (George C. Miranda Macavilca, 2010)

Resultado esperado

Resultado positivo: Observación de aglutinación

Resultado negativo: No se observa presencia de aglutinación



Bibliografía

1. Utilidad del citodiagnóstico de Tzanck en un hospital de enfermedades infecciosas de la ciudad de Buenos Aires
   Mario H. Bianchi, Gabriela Santiso. Otros
   2012
2. Diagnóstico microbiológico de infecciones de transmisión sexual. Parte II. ITS virales
   M. José Martínez G.
   Rev. Chil. Infectol. v.27 n.1 Santiago feb 2010
3. Práctica 2: Tinción de Giemsa
   wiki.fisiologia.me/images/4/49/Cris2.pdf
4. Métodos inmunológicos utilizados en la identificación rápida de bacterias y protozoarios en agua
   MSc. Hermes Fundora Hernández,[I] MSc. Yamila Puig Peña,[I]
   bvs.sld.cu/revistas/hie/vol51_1_13/hie09113.htm
   La Habana, Cuba; 20 de Noviembre del 2012
5. Herpes Simplex 1 IgM (HSV1 igM)
   Diagnostic automation INC. (Inserto).
6. Herpes zóster
   Lourdes Alonso-Romero Pareyón
   Dermatología Rev.Mex.2011; 55 (1):24-39
7. Guía de práctica clínica GPS
   "Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de Infección por Citomegalovirus en edad pediátrica"
   México Secretaría de Salud, 2012
   Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica: IMSS-610-13
8. Epidemiología, impacto y diagnóstico de la infección por CMV en el trasplante hepático
   Fernando Casafont
   www.roche-**trasplantes**.com/web/atos/pdf/document22.pdf
   Servicio de Digestivo
   Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander
9. Diagnóstico de la infección por virus de Epstein barr
   Cocho Gómez P. Grupo de patología infecciosa AEPap.
   https://www.aepap.org/.../diagnostico_de_mni_en_la_edad_pediitrica_fi...
   Diagnóstico de la infección por virus de Epstein Barr, Junio 2014
10. Desarrollo de improntas para el diagnóstico del virus Epstein barr por inmunofluorescencia indirecta.
    Geman R. Peréz, Miguel A. Taborda, Alicia Toffi, otros…
    MEDICNA (Buenos Aires) 2005; 65;315-320
11. Microbiología Médica
    JAWETZ; MELNICK Y ADELBERG
    Edición N° 25
    Editorial Mc Graw Hill
    México D.F. 2010

12. Diagnóstico y tratamiento de infecciones oportunistas en el paciente adulto con infección por VIH/SIDA
Martín Lasso B.
Rev. Chil Infect 2011; 28 (5); 440-460

13. Infecciones Oportunistas en Pacientes con VIH / SIDA
www.geosalud.com/vih-sida/infecciones-oportunistas.htm
Última revisión: 02/Noviembre/2011

14. Hepatitis B
Organización Mundial de la Salud (OMS)
www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/es/
Nota descriptiva N° 204
Junio 2014

15. AIDS *info*
Guidelines for Prevention and treatment of opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adololescents
aidsinfo.nih.gov/guidelines
2013

16. Epstein-Barr Virus in Systemic Autoimmune Disease
Anette Holck Draborg, Karen Duus and Gunnar Houen
Journal of Inmunology Research
Volume 2013, Article ID 535738,
http:// dx.doi.org/10.1155/2013/535738

17. HERPES
Beatríz Gómez García
www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/herpes.html
Laboratorio de Virología, Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina, UNAM
Última versión 2013

18. Aglutinación en Látex , PCR, ASO, FR
George C. Miranda Macavilca
es.scribd.com/doc/43927196/AGLUTINACION
Universidad Alas Peruanas
Huancayo 2010

19. *GENERALIDADES DE VIRUS*
Dra. Teresa Uribarren Berrueta
www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/.../generalidades.html
Última revisión 12 febrero 2013

20. Infecciones **Oportunistas (**IO) - AIDSmeds
www.aidsmeds.com/articles/Lecciones_7638.shtml
Última revisión: 12/13/2010

21. Enciclopedia Wikipedia, 2014

Capítulo III

INFECCIONES TRANSMITIDAS POR

Protozoos

Introducción

Las personas inmunocomprometidas presentan enfermedades parasitarias oportunistas que clínicamente son muy variadas y van desde infecciones asintomáticas hasta infecciones fatales. Las principales enfermedades producidas por parásitos y asociadas a la infección VIH son las que ocasionan los protozoarios. La alta movilidad existente en las sociedades desarrolladas, los patrones de inmigración cambiantes y los efectos inmunosupresores de la infección VIH hacen que se deba considerar el diagnóstico clínico de muchas de las parasitosis ocasionadas por protozoos aun cuando éstas se desarrollen fuera del ámbito geográfico en el que tienen una alta prevalencia.

En las personas con inmunodepresión severa se han observado infecciones por *Pneumocystis Jiroveci*, *Toxoplasma gondii*, y *Cryptosporidium*, además, la *entamoeba histolytica*, la *Giardia lambia* e *Isospora* suelen ser una causa frecuente de diarrea.

Los cuadros diarreicos agudos y crónicos son entidades comunes en la infección por el VIH, y son una causa importante de morbilidad y mortalidad asociada.

En las personas con VIH los cuadros diarreicos son un verdadero reto diagnóstico ya que no solo son causados por agentes comunes, sino también por otras clases de patógenos como el *Cryptosporidium parvum*, el *Microsporidium*, la *Cyclospora cayetanensis* y la *Isospora belli*, son los principales causantes de diarrea en persona con CD4 menores a 200 células/uL, (Sánchez-Martínez, 2011).

Diarreas causadas por parásitos

Las infecciones producidas por parásitos, han sido estudiadas a profundidad en la infección por VIH, debido a que microorganismos como *Cryptosporidium parvum* y *Microsporidium, Cyclospora cayetanensis* e *Isospora belli*, son los principales causantes de diarrea en personas con VIH.

Los portadores de VIH que con valores de CD4 menores a 200 células/uL, tienen un alto riesgo de desarrollar cuadros diarreicos, independientemente del agente causal en comparación con los que tienen 500 células o más (Sánchez-Martínez, 2011).

Definiciones

- **Apicomplexa:** Es un extenso grupo de protistas, caracterizado por la presencia de un orgánelo único, denominado complejo apical. Son unicelulares que forman esporas y exclusivamente en parásitos.
- Bradizoíto: Es la forma de replicación lenta del parásito, no solo de T. gondii, sino de otros protozoos responsable de infección parasitaria. En la toxoplasmosis latente el Bradizoíto se presenta en conglomerados microscópicos envueltos por una pared llamados quistes, en el músculo infectado y el tejido cerebral.
- **Coccidio:** Parásitos obligados intracelulares, lo que significa que deben vivir y reproducirse dentro de las células
- **Enterocitos:** Son células epiteliales del intestino encargadas de absorber diversas moléculas alimenticias y transportarlas al interior del organismo.
- **Eosinófilia:** Es la presencia de una cantidad anormalmente alta de eosinófilos en la sangre. Los eosinófilos (glóbulos blancos, encargados de la defensa inmunitaria) que se diferencian visualmente del resto en que si se colorean antes de observarlos al microscopio tienen apetencia por un colorante ácido llamado eosina que les da un color rojo-carmín, al igual que se llaman basófilos los que son apetentes por el colorante básico, en buena lógica los eosinófilos podrían llamarse acidófilos.
- **Epítope:** Es la porción de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmunitario, específicamente la secuencia a la que se unen los anticuerpos.
- **Esporoblastosto**: Toda célula que da lugar a un esporozoíto o espora durante la fase de reproducción sexual del ciclo vital de un esporozoario.
- **Hemostasia:** Es el conjunto de mecanismos aptos para detener los procesos hemorrágicos; Es la capacidad que tiene un organismo de hacer que la sangre en estado líquido permanezca en los vasos sanguíneos.
- **Necrosis:** Es la muerte patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido provocado por un agente nocivo que causa una lesión tan grave que no puede curar o reparar.
- **Ooquistes esporulados:** Estadio parasitario que se asocia con la criptosporidiosis, isosporosis y ciclosporosis causantes de diarrea en seres humanos
- **Parasitemia:** Es la presencia de parásitos en el torrente circulatorio. Entre los principales parásitos que provocan parasitemia se encuentran los microorganismo del género Plasmodium y Tripanosoma
- **Phylum**: En biología Phylum es un rango taxonómico debajo de reino y por encima de clase.
- **Quiste:** Es la fase esporulada de ciertos protistas, Este es un estado que puede sobrevivir por largos periodos de tiempo fuera del hospedador por su alta resistencia a factores del medio ambiente.

- **Taquizoitos:** Es el estadio observado en la fase aguda de la infección. Es intracelular obligado capaz de invadir cualquier tipo de célula con excepción de los eritocitrocitos tiene forma de media luna y mide de 4-8um de largo y de 2-4 de ancho.
- **Triatomínos:** Son una subfamilia de insectos pertenecientes a la familia Reduviidae. Las 130 especies que conforman esta subfamilia son todas hematófagas (se alimentan de sangre)

Toxoplasma gondii

El *T. gondii* es un coccidio tisular de distribución cosmopolita, intracelular obligado, del Phylum Aplicomplexa. Se estima que infecta de manera crónica aproximadamente de 20-50% de la población mundial; a un gran número de mamíferos tanto terrestres como acuáticos y aves. Los felinos son los hospederos definitivos. (Teresa Urribarren B., 2014)

La infección primaria es asintomática y habitualmente deja inmunidad no estéril; el grupo de mayor riesgo es de aquellos pacientes con recuento de linfocitos T-CD4 < 50 céls/ml y es inusual encontrarla en aquellos con > 200 linfocitos T-CD4 céls/ml.

El diagnóstico se establece por un cuadro clínico compatible. (Martín Lasso B., 2010)

La toxoplasmosis cerebral (TC), segunda infección más común que afecta el sistema nervioso central (SNC) en personas infectados por el VIH. El riego de desarrollar TC oscila entre 30-40% en pacientes con anticuerpos de *T. gondii* (60% de pacientes VIH positivos). El diagnóstico parasitológico definitivo se debe realizar evidenciando la presencia del parásito*T. gondii* a partir de cualquier muestra biológica contribuye a confirmar la infección activa. (Jazmín Cortes 2012)

El humano se infecta a través de: ingesta de carne contaminada con quistes tisulares cruda/mal cocida (la más relevante) y manipulación inadecuada de la misma; Ingesta de agua y alimentos contaminados con ooquistes esporulados; también por manipulación inadecuada de las cajas de arena de gatos.

Otro mecanismo es la transmisión congénita (transplacentaria), transplante de órganos, transfusión sanguínea e inoculación accidental del laboratorio. (Teresa Urribarren B., 2014)

1. Descripción de la enfermedad

Toxoplasma gondii, produce en las personas toxoplasmosis congénita o posnatal. La primera forma, se observa sólo cuando la mujer no inmune es infectada durante su embarazo, por lo común es muy intensa; suele ser menos intensa la toxoplasmosis postnatal.

Muchas de las infecciones en seres humanos son asintomáticas. Sin embargo, en personas con sida puede producir infecciones fulminantes y mortales, tal vez por la transformación de una infección crónica en otra aguda. En personas inmunodeprimidas se observan a veces grados variables de la enfermedad que originan rinitis o coriorretinitis, encefalitis, neumonitis, y otros trastornos.

El Taquizoíto destruye directamente las células y muestra predilección por las células del parénquima y las del sistema retículoendotelial. Los seres humanos son relativamente resistentes, pero a veces surge una infección leve en ganglios linfáticos, que se asemeja a una

mononucleosis infecciosa. Al romperse un quiste tisular se liberan innumerables bradizoítos, y la relación de hipersensibilidad local puede originar inflamación, bloqueo de vasos sanguíneos, y muerte celular cerca del quiste roto.

La infección congénita origina muerte fetal, coriorretinitis, calcificaciones intracerebrales, perturbaciones psicomotoras hidrocefalia o microcefalia: en dichos casos la mujer se infectó por primera vez durante el embarazo. La toxoplasmosis prenatal es una causa importante de ceguera y de otros defectos congénitos. (JAWETZ, 2010)

2. Manifestaciones Clínica

Las manifestaciones clínicas de la toxoplasmosis cerebral pueden ser muy variadas y depende de la zona afectada. Una presentación común es la de un cuadro febril subagudo, con cefalea, alteración del sensorio y síntomas focales, tales como hemiparesia, hemiamnesia, afasia, ataxia, crisis convulsivas y alteraciones del campo visual, presentes en un 50-90% de los casos. Las alteraciones del sensorio pueden manifestarse como cuadro confusional hasta letargia y coma.

La tomografía cerebral (TAC) y la resonancia magnética nuclear (RM) son los estudios neuroradiológicos practicados habitualmente para el diagnóstico de la toxoplasmosis cerebral.

Si bien las imágenes no son específicas, en la mayoría de los casos suelen ser bastante características.

El patrón habitual es una lesión hipodensa en forma de anillo con edema perilesional, reforzada por la captación del medio de contraste; pueden ver tres tipos de lesiones: lesiones solitarias, dos a cinco lesiones o múltiples lesiones, usualmente ubicadas en la región cortica medular y en los ganglios basales.

El principal diagnóstico diferencial es el linfoma primario del SNC (LPSNC); sin embargo, las lesiones de la Toxoplasmosis Cerebral suelen ser más pequeñas, homogéneas, con captación de contraste regular y menos edema que las lesiones

3. Diagnóstico de Laboratorio

El diagnóstico se basa en gran medida en los resultados de pruebas serológicas que detecten anticuerpos específicos anti-*T.gondii*. Tanto las especificidades como las sensibilidades de estas pruebas dependen fundamentalmente de los antígenos utilizados. La mayor parte de los kits comerciales están basados en lisados de antígenos de Toxoplasma. En años recientes,

varios estudios han demostrado la utilidad de emplear proteínas antigénicas recombinantes. (Holec-Gasior L. 2013). (Urribarren Berrueta, 2014).

3.1 Muestras clínicas/biológicas para diagnóstico

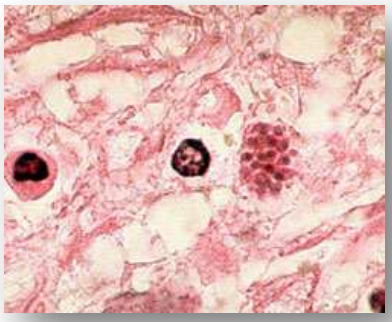
- ✓ Suero
- ✓ Sangre
- ✓ Biopsias
- ✓ LCR

3.2 Métodos de Diagnóstico

A. Directos

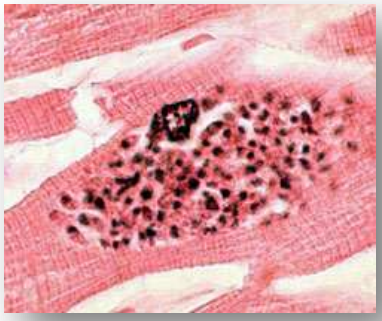
A.1 Observación Directa a través de tinciones

El diagnóstico del parásito puede realizarse mediante la observación directa en: líquido cefalorraquídeo (LCR) y material de biopsia. Estas técnicas se usan con menos frecuencia debido a la dificultad de obtener estas muestras.



Corte histopatológico. Taquizoítos e n cerebro. Paciente con sida

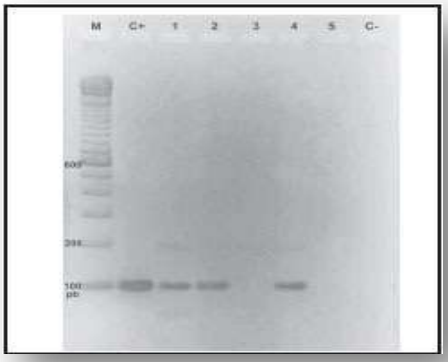
DCD/ Dr. Edwin P. Edwin Jr.



Corte histopatológico. Taquizoítos e n músculo cardiaco. Paciente con sida

A.2 Biología molecular:

Las técnicas moleculares que pueden detectar el parasito en el líquido amniótico, pueden ser útiles en los casos de posible transmisión (congénita) de madre a hijo.



Esta corrida se realizó con cinco muestras de sangre de mujeres gestantes. Como control negativo se usó una mezcla de PCR y como control positivo se empleó ADN de la cepa RH de *T. gondii*

A.3 Cultivo

Los parásitos también pueden aislarse y observarse en muestras de sangre u otros fluidos corporales (LCR) en su fase de taquizoitos, pero este proceso puede ser difícil y requiere un tiempo considerable (CDC-Toxoplasmosis, 2013). El cultivo celular es considerado como una técnica fundamental para el desarrollo de modelos experimentales, estudios genéticos, bioquímicos, farmacológicos y para la implementación de pruebas de laboratorio que permitan mejorar el diagnóstico de esta zoonosis

El cultivo se puede realizar en: líneas celulares Hep-2 y Vero. Las dos líneas celulares Hep-2 y Vero, se en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) y MEM (Minimum Essential Medium). (Lilianan Jazmín Cortés, 2013).

B. Indirectos

B.1 Serología

Pueden llevarse a cabo técnicas de hemaglutinación, inmunofluorescencia, ELISA y Western blot para la detección de IgM e IgA (fase aguda), IgE, e IgG, así como para determinar la avidez de IgG.

B.2 Prueba de avidez:

Se reconoce como avidez a la fuerza de afinidad que existe entre la IgG específica y el epítope de la proteína de *T. gondii.*

De acuerdo a diferentes estudios, esta afinidad aumentaría con el tiempo, lo que permitiría discriminar si la infección es resiente (< de 4 meses), o antigua (> de 4 meses). Entre las ventajas de la técnica se encuentra la rapidez. (Marilena Canales R., 2010)

B.3 La técnica de Sabin y Feldman

Es la prueba estándar de IgG; se realiza en laboratorios referencia, entre ellos el ubicado en el CDC y la OMS. Implica la manipulación de parásitos vivos. Es un método inmunológico que detecta anticuerpos Anti-Toxoplasma en el suero del paciente. En esta prueba los parasitos viables se incuban con el suero del paciente en presencia de complemento. En pacientes inmunodeprimidos, con deficiencia inmune combinada, celular y humoral, se recomienda el empleo de la batería serológica, imagenología, histopatología y PCR.

B.4 Prueba rápida

Para detección de anticuerpos. Tiene alta sensibilidad y especificidad

Cryptosporidium spp.

Cryptosporidium spp son protozoos del Phylum Aplicomplexa, ubicuos en el ambiente, que ocasionan infección aguda y autolimitada. Desde el punto de vista clínico, las personas inmunocompetentes pueden ser asintomáticas o manifestar cuadros de diarrea que tienden a ser graves y persistentes, con alto grado de morbilidad y mortalidad en los infectados inmunodeficientes.

Las especies se pueden diferenciar solamente mediante técnicas moleculares, debido a que la similitud de las características morfométricas de los ooquistes impide la diferenciación mediante tinción ácido alcohol resistente, como la de Ziehl-Neelsen. Esta última continua siendo la más usada rutinariamente, debido a su bajo costo en relación con la mayor sensibilidad de las técnicas moleculares. (Patricia Neira, 2012)

Cuadro 6 Especies de *Cryptosporidium* identificados con mayor frecuencia en el humano

C. hominis	Humano
C. parvum	Ganado, humano
C. andersoni	Ganado, camellos
C. felis	Gatos
C. canis	Perros
C. suis	Cerdos
C. muris	Roedores
C. meleagridis	Aves

1. Descripción de la enfermedad

La Criptosporidiasis se transmite por consumo de agua y alimentos contaminados. En VIH/SIDA tiene una prevalencia del 14 y 24% en países desarrollados y no desarrollados, respectivamente. Existen varios factores que contribuyen al desencadenamiento de Criptosporidiasis; la notable resistencia de estos ooquistes frente al tratamiento con cloro y derivados al igual que la ineficacia de los filtros utilizados en plantas potabilizadoras.

En un estudio (*Corti et al*), demostraron la presencia de *Cryptosporidium spp.* en secreciones broncopulmonares de pacientes con enfermedad VIH/SIDA avanzada. Se ha reportado mayor incidencia de infecciones por este parásito al comienzo y durante la temporada de lluvias. (Sánchez-Martínez, 2011).

2. Manifestaciones Clínica

La criptosporidiasis en pacientes coinfectado con el VIH presenta una gran variedad clínica, desde cosos asintomáticos hasta diarreas desbastadoras, dependiendo fundamentalmente de la afectación del sistema inmune.

Se ha descrito casos de afectación extra intestinal, en un estudio (Corti et al), demostraron la presencia de *Cryptosporidium spp*. en secreciones broncopulmonares de pacientes con enfermedad la infección del VIH avanzada, además de demostrarse afectación del estómago, páncreas, oído medio y vías biliares. La afectación biliar ocurre hasta en un 20% de los casos y suele presentarse con fiebre dolor en hipocondrio derecho, náuseas vómitos, remedando un caso de colecistitis o colangitis esclerosante. (Daniel Podzamezer, 2010)

3. Diagnóstico de laboratorio

El género Cryptosporidium se diagnóstica por medio de la visualización de ooquistes teñidos con la técnica de Ziehl-Neelsen y Kinyoun mediante microscopia de luz. (Patricia Neira O., 2012)

Es importante el diagnóstico diferencial con patologías causadas por *Cyclospora* e *Cystoisospora*, (no sabemos de él) y otros patógenos intestinales que producen cuadros clínicos similares. (Uribarren Burrieta 2014).

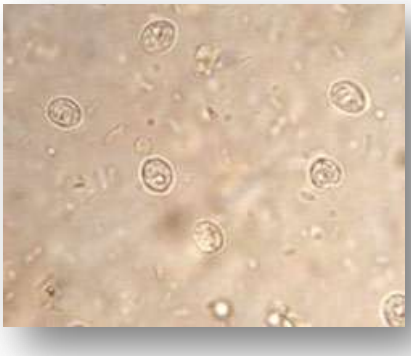
3.1 Muestras clínicas/biológicas para diagnóstico de laboratorio

- ✓ Muestra de heces
- ✓ Muestra de esputo

3.2 Métodos de Diagnóstico

A. Examen Directo

A.1. Observación en fresco



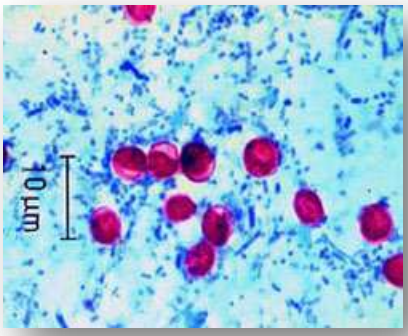
Los ooquistes se recobran en materia fecal. Cuando se sospecha compromiso extraintestinal, es prudente buscarlos en bilis o esputo.

La recuperación rutinaria se realiza por técnicas de concentración; entre ellas la técnica de flotación de Sweater (con sacarosa a una densidad de 1.27), la de sedimentación de Ritchie y la de flotación con sulfato de zinc o cloruro de sodio saturado.

A.2. Coloración

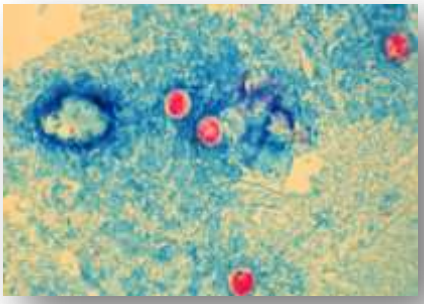
Coloración ácida mediante los métodos de Kinyoun en frío o caliente o Ziehl-Neelsen modificado (con ambos se obtienen

Ooquistes teñidos de color rojo.



A.3 Observación en contraste de fases

La observación de la muestra con microscopía de contraste de fase permite observar los ooquistes como cuerpos birrefringentes con uno o varios gránulos oscuros.



A.4 Biopsia

El material histológico obtenido por biopsia o durante la autopsia, previa fijación, se tiñe con hematoxilina-eosina o Giemsa, dadas las características basófilas de los estadios de desarrollo de *Cryptosporidium.*

Esta técnica se utiliza principalmente en estudios patológicos.[6]

A.5 Biología molecular (PCR)

Recientemente se ha descrito el empleo de una técnica de PCR en una plataforma robótica, para la identificación simultánea de *Cryptosporidium* spp. y otros patógenos concomitantes en materia fecal. (Fletcher et al., 2012).(Uribarren Burreta, 2014)

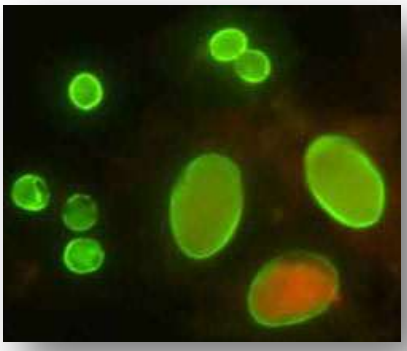
B. Examen Indirecto

B.1 Técnica de ELISA

También se utilizan kits (ELISA) para la identificación de coproantígenos

B.2. Inmunofluorescencia

(IFA) Este tipo de diagnóstico mejora la sensibilidad y especificidad en la búsqueda de los protozoos pero se aumentan de forma dramática los costos (R. Durango, 2011).



Isospora belli.

Isospora belli e *I. natalensis*, protozoos de la familia Eimeriidae, Orden *Eucoccidia,* Suborden *Eimeriorina,* Subclase Coccidia, Clase Sporozoa, *Phylum Apicomplexa.* Es un protozoo cuyas diversas especies infectan al hombre, a primates y otros vertebrados (gatos, perros, zorros y cerdos).

Isospora belli se transmite a través de alimentos o agua contaminada con materia fecal humana por lo tanto, no es una zoonosis. Se ha descrito la transmisión sexual, en hombres homosexuales, como consecuencia de prácticas de sexo oro-anal. La mayoría de los casos clínicos han ocurrido en adultos jóvenes, entre la tercera y cuarta década de la vida. Se presenta en personas inmunocompetentes e inmunodeprimidos -. Se ha asociado con brotes diarreicos en instituciones cerradas, en inmigrantes y en personas infectados con VIH. También se lo ha mencionado como agente etiológico de la diarrea del viajero. (Patricia Neira O., 2010)

1. Descripción de la Enfermedad

En pacientes inmunocompetentes, la infección por Isospora es asintomática o puede causar un cuadro de diarrea autolimitada leve, mientras en personas inmunodeprimidas causan diarreas crónicas esta se manifiesta por diarrea acuosa de 10 o más evacuaciones en 24 horas acompañadas por dolor abdominal tipo cólico, febrícula, náuseas y vómitos ocasionales con síndrome de desgaste físico. (Burrieta Urribarren, 2013)

2. Manifestaciones Clínicas

La sintomatología de la infección por I. belli aparece aproximadamente una semana después de la ingestión de los ooquistes. Se caracteriza por diarrea, dolor abdominal, febrícula, pérdida de peso y deshidratación, observándose eosinofilia en algunos pacientes.

En pacientes inmunocompetentes el síntoma principal es una diarrea intensa con 6 a 10 deposiciones acuosas diarias acompañadas de malabsorción. Clínicamente la enfermedad es indistinguible de la giardiasis, criptosporidiasis y microsporidiasis, presentándose como una diarrea sin sangre o leucocitos. La enfermedad es autolimitada en un período de 2-3 semanas, si bien la eliminación de ooquistes puede persistir durante 2-3 semanas más. Se han descrito formas crónicas con eliminación de ooquistes durante meses, siendo comunes las recurrencias. La enfermedad es más grave en niños y adolescentes.

Los pacientes inmunodeprimidos, especialmente pacientes con sida, presentan síntomas graves que pueden persistir durante meses o indefinidamente y producir deshidratación, requiriendo incluso hospitalización. Se han descrito presentaciones atípicas de la infección,

como colecistitis o artritis reactiva. En pacientes con SIDA se han documentado infecciones extraintestinales. (Farga, 2011)

3. Diagnóstico de Laboratorio

Se fundamenta en la observación microscópica de los ooquistes no esporulados: Su eliminación en la materia fecal es irregular y en poca cantidad por lo que son necesarios varios exámenes, Los cristales de Charcot Leyden, no específicos, son un hallazgo frecuente (Burrieta Urribarren, 2013)

3.1 Muestras clínicas/biológicas para diagnóstico de laboratorio

- ✓ Heces
- ✓ Sondeo duodenal
- ✓ Biopsias intestinales
- ✓ Bilis

3.2 Métodos de Diagnóstico

A. Examen Directo

A.1 Examen en fresco

El diagnóstico se logra con la detección de **ooquistes** en el examen directo de heces frescas o concentradas mediante el examen coproparasitario de rutina por las técnicas de:

A.1.1 Telemann modificado

A.1.2. Técnica de flotación de Sweater

A.1.3. Flotación con sulfato de zinc

Al detectar ooquistes que aparecen en las heces una a dos semanas post infección, pudiendo prolongarse por meses. (Patricia Neira O., 2010)

Los ooquistes son difíciles de visualizar, debido a que son eliminados en pequeñas cantidades, en forma intermitente y durante el procesamiento (centrifugación) se rompe la membrana del ooquiste, dificultando el reconocimiento de los esporoblastos u esporoquistes liberados.

Con mucha frecuencia la presencia de cristales de Charcot Leyden) orienta la búsqueda de estos elementos.

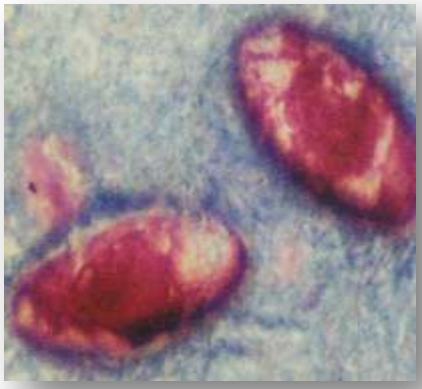
Los ooquistes inmaduros se caracterizan por ser elipsoidales y presentar una membrana que se observa como un halo transparente, su tamaño de 25 a 30 µm de largo x 10 a 19 µm de ancho, en su interior presenta un esporoblasto (cigoto). Si las condiciones ambientales lo permiten, el ooquiste esporula (madura). Los ooquistes esporulados se pueden observar si la muestra de heces que contiene el coccidio se mantiene en dicromato de potasio a temperatura ambiente durante más de dos días. (Patricia Neira O., 2010)

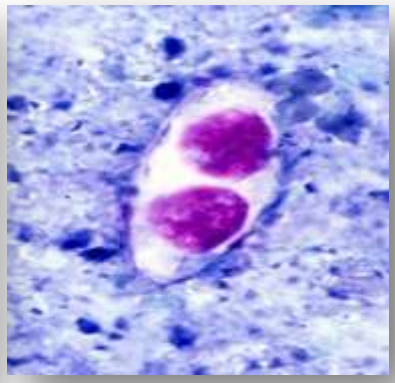
A.2.Coloración

Los métodos de coloración sobre extendidos de muestras fecales, tales como:

A.2.1 Ziehl –Neelsen en “frio”: Tinción de Kinyoun

Ayudan en la detección de los ooquistes. En un fondo contrastado de color azul de los desechos fecales se destacan los ooquistes teñidos en una variante de color desde rosado pálido a púrpura, o bien no se tiñen .Su estructura interna no se visualiza bien. Algunos ooquistes pueden aparecer distorsionados. Estos





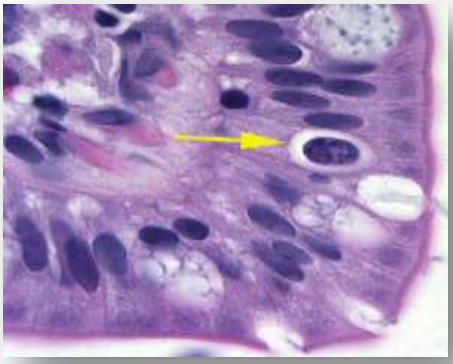
Ziehl-Neelsen modificado, los ooquistes se tiñe de rosa y los esporoblastos de rojo

métodos de tinción son fáciles, prácticos y proporcionan un registro permanente. (Patricia Neira O., 2010)

A.3 Biopsia

Procedimientos invasores para la obtención de muestras, como sondeo duodenal o biopsias intestinales permiten evidenciar la presencia del coccidio en los enterocitos y son útiles en casos de isosporosis en que no se detecten los ooquistes en las deposiciones,

Con tinción de safranina, los ooquistes se observan de color rojo anaranjado a rojizo. También pueden aparecer distorsionados o inclinados hacia un lado, con aureamina rodamina, los ooquistes también se tiñen con apareciendo fluorescentes, con Giemsa los ooquistes y esporoblastos se tiñen de azul. (Patricia Neira O., 2010)

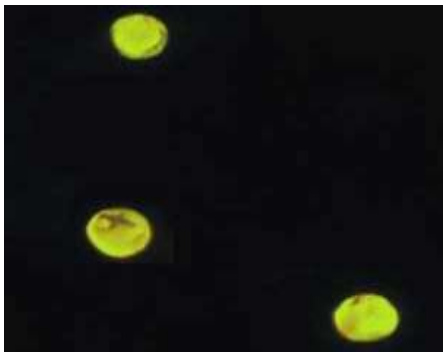


A.3.5 Tinciones fluorescentes

En deposiciones y bilis se han usado tinciones fluorescentes con Uvitex 2B u otros fluorocromos para la detección de *I. belli* en pacientes con infección por VIH, los que se visualizan blanco brillante/azul fluorescente y muestran una estructura similar a los ooquistes ácido alcohol resistentes

A.4 Método de Cuerda encapsulada

Puede utilizarse como una prueba diagnóstica adicional al examen de heces en pacientes seropositivos para VIH, cuyas ventajas son menor costo, menor invasión, no requiere personal especializado y no emplea sedante



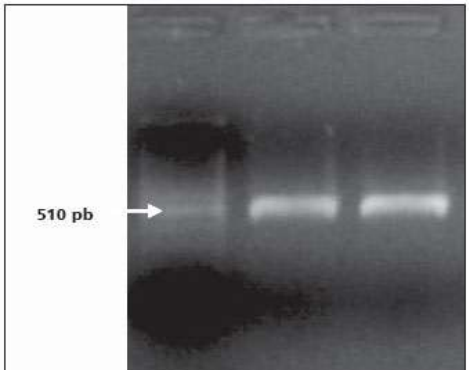
A. 5 Biología molecular (PCR)

PCR anidada, PCR en tiempo real y la posterior secuenciación, aunque de alto costo, serían útiles para el diagnóstico de infecciones leves y para constatar la eliminación del parásito post terapia. Esta técnica sería de utilidad para determinar fuentes y modos de transmisión del parásito. (Patricia Neira O., 2010).

B. Examen Indirecto

No existen pruebas serológicas disponibles para detectar la infección por este coccidio.

La visualización de protozoos intestinales se ve interferida por ciertas sustancias y/o medicamentos, tales como: antimicrobianos, aceite mineral, bismuto y preparados anti diarreicos que no se absorben.



RPC anidada en la identificación de *Isospora belli* en humanos (gel de agarosa 2%).
Carril 1: marcador de peso molecular (1 00 pb),
carril 2 y 3: muestras positivas para ooquistes de *Isospora belli.*

Dada la infrecuencia de esta parasitosis en humanos, las infecciones pueden ser subestimadas y sub-diagnosticadas, principalmente porque los ooquistes en las deposiciones pueden pasar inadvertidos, o bien existir una interferencia por el consumo de sustancias o medicamentos, o por un desfase entre el examen y la eliminación de los ooquistes inmaduros.

Isosporosis cursa con las eosinófilias de origen parasitario más elevadas (promedios de 4.500 eosinófilos/mm^3), detectado el agente y luego del tratamiento del paciente, se debe efectuar controles: hemograma y examen coproparasitario periódicos para asegurar la cura parasitológica y la normalización de los eosinófilos circulantes. (Patricia Neira O., 2010).

Cyclospora cayetanensis

Cyclospora cayetanensis es un protozoo coccidio con diversa prevalencia a nivel mundial que causa cuadros con diarrea acuosa y voluminosa tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunocomprometidos. En estos últimos, además de producir cuadros entéricos más severos, puede cursar con compromisos biliares. Su distribución es cosmopolita, jugando un rol importante en su transmisión, el suelo, el agua y los alimentos contaminados, especialmente las verduras ingeridas crudas. El hombre, único reservorio constatado hasta el presente, elimina con las heces ooquistes inmaduros, que evolucionan en el ambiente transformándose en ooquistes maduros infectivos. Como otros coccidios, presenta un ciclo evolutivo complejo con formas sexuada y asexuada de reproducción en un único hospedador. El diagnóstico se basa fundamentalmente en el hallazgo de ooquistes ácido alcohol resistentes variables en materia fecal. Se han desarrollado métodos moleculares para su detección tanto en muestras fecales como ambientales y de alimentos. (Susana Archeli 2012).

1. Descripción de la enfermedad

Las diarreas asociadas a *C. cayetanensis* han sido descritas tanto en los países en vías de desarrollo como en los desarrollados, lo que sugiere la distribución cosmopolita de este organismo. Su distribución es mundial pero existen países donde es endémico, como en Nepal, Perú y Haití.

Este parásito ha sido identificado tanto en individuos sanos como en pacientes sintomáticos inmunocompetentes e inmunodeprimidos. Las prevalencias en pacientes con infección por VIH/ SIDA y diarrea crónica, varían de 1,1 a 22%. En otras publicaciones no se han detectaron ooquistes de *C. cayetanensis* al estudiar casos de infección por VIH/sida y diarrea crónica. En Cuba se encontró en un estudio en inmunodeprimidos por SIDA que el 3% estaba infectado con este agente etiológico.

Se considera que el hombre es el único reservorio. A pesar de que algunos estudios mencionan la posibilidad de que algunas animales como monos, gallinas, etc. puedan también serlo, no se ha podido demostrar fehacientemente que la eliminación de ooquistes en las heces de esos animales no sea producto de la ingesta debido a hábitos coprofágicos y que se hayan eliminado directamente sin provocar infección. Los intentos por producir infecciones experimentales en diferentes especies aún no han tenido éxito. (Susana Archeli, 2012)

2. Manifestaciones Clínicas

El cuadro clínico que produce es similar al causado por otros organismos, tales como Cryptosporidium spp., Cystoisospora belli, algunos microsporidios, Giardia duodenalis y

Strongyloides stercoralis. El período de incubación oscila entre 2 - 11 días, con un promedio de una semana.

La infección puede encontrarse en sujetos asintomáticos, pacientes inmunocompetentes (con mayor frecuencia en los extremos de la edad) e inmunocomprometidos.

En sujetos inmunocompetentes las manifestaciones clínicas pueden ser leves o prominentes diarrea acuosa, anorexia, pérdida de peso, dolor y distensión abdominal, astenia, adinamia, cefalea, náusea, vómito, ocasionalmente mialgias y malabsorción de D-xilosa y grasas. La duración de la enfermedad sin tratamiento oscila entre 4 - 10 días.

En pacientes inmunocomprometidos (sida, diabetes u otros) las manifestaciones pueden ser transitorias (en los casos menos severos de inmunosupresión), crónicas (con remisiones) o fulminantes. Los cuadros en sujetos con sida se vinculan con mayor frecuencia a porcentajes de linfocitos T CD4+ menores que 200 células/µL.

Entre las complicaciones de la enfermedad se han mencionado el síndrome de Guillan-Barré, artritis reactiva y colecistitis alitiásica, pérdidas de importancia de fluidos debido a la diarrea. (Ortega YR et al. 2010) y además sintomatología respiratoria en algunos caso, existen dos reportes de hallazgo de ooquistes en esputo. (Berrueta, Teresa Uribarren, 2013)

3. Diagnóstico de Laboratorio

El estadio diagnóstico es el ooquiste inmaduro, no esporulado que se elimina con las heces, debe ser diferenciado de los ooquistes de otros coccidios fundamentalmente por su forma y tamaño. Los ooquistes de *C. cayetanensis* son esféricos y miden de 8 a 10µm de diámetro. (Susana Archeli, 2012)

3.1 Muestras clínicas/biológicas para el diagnóstico

- ✓ Heces

3.2 Métodos de diagnóstico

A. Examen Directo

A.1 Examen microscópico directo

El **ooquiste inmaduro**, no esporulado que se elimina con las heces. Se presenta como esferas con pequeños glóbulos refringentes en su interior. Los ooquistes de *C. cayetanensis* son esféricos y miden de 8-10 µm de diámetro.

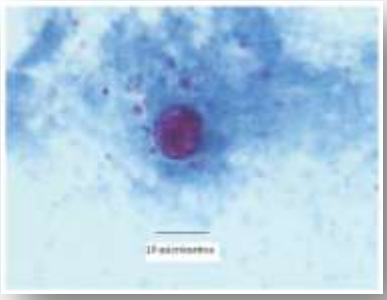
Como en el caso de otros protozoos, dado que la eliminación de ooquistes con las heces es discontinua, se prefieren muestras seriadas de materia fecal.

Se pueden buscar los ooquistes en preparaciones húmedas, previo enriquecimiento, especialmente por flotación por el **Método de Sweater** con solución saturada de sacarosa, donde se puede observar la pared gruesa que no asimila el lugol.

A.2 Coloraciones

A.2.1 Coloración de Ziehl Neelsen, (Kinyoun)

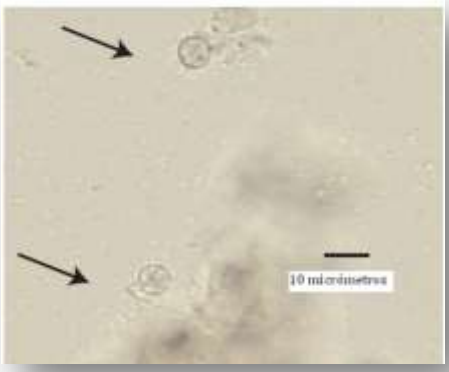
U otras de fundamento similar En este caso aparecen como esferas ácido alcohol resistentes variables, coloreadas desde rojo intenso a pálido e incluso sin colorear, con un aspecto "vidriado". (Susana Archeli, 2012)



Ooquiste de *C. cayetanensis*, teñido con Ziehl-Neelsen (1000X)

A.3 Gram Cromotropo caliente Quick-técnica"

Esta técnica reduce el tiempo de tinción a menos de 10 min y proporciona una buena diferenciación fondo ligeramente manchadas de material fecal de modo que las esporas se destacan por una fácil visualización. Las esporas se tiñen de violeta oscuro y la banda en forma de cinta es mayor. En algunos casos como en la coloración de Gram se ven claramente los gránulos oscuros (Gram positivos). (CDC, Cyclospora infection, 2013)



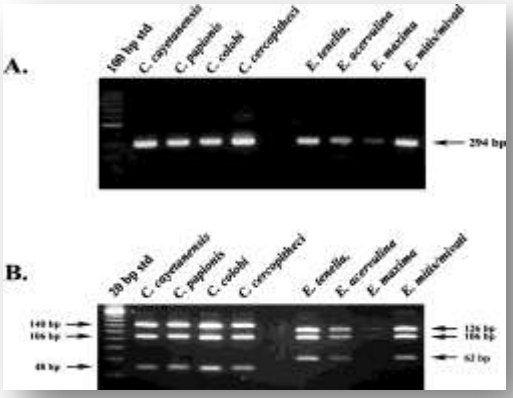
Ooquiste de *C. cayetanensis* en muestra de heces (1000x)

A.4 Esporulación:

Cuando se observan ooquistes no esporulados pero el diagnóstico es incierto este se puede confirmar mediante la inducción de esporulación.

A.5 Biología molecular (PCR)

PCR para *C. cayetanensis*, método que puede aplicarse tanto a muestras de materia fecal como de aguas y alimentos contaminados con el parásito con una sensibilidad del orden de 40 ooquistes por 100 g de alimento



B. Examen Indirecto

No existen pruebas serológicas disponibles para detectar la infección por este coccidio

Trypanosoma cruzi

La enfermedad de Chagas conocida también como tripanosomiasis americana es una infección sistémica (Uribarren Berrueta, 2012), causada por un protozoario flagelado a la vez sanguíneo y tisular; el *Trypanosoma cruzi*, que pertenece al orden Kinetoplástida. (Faustino Torrico, 2013)

Es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*. Se encuentra sobre todo en zonas endémicas de 21 países de América Latina, donde se transmite a los seres humanos principalmente por las heces de insectos triatomíneos conocidos como vinchucas, chinches o con otros nombres, según la zona geográfica.

La infección también se puede adquirir mediante transfusión de sangre, transmisión congénita (de la madre infectada a su hijo) y órganos donados, aunque estos modos de transmisión son menos frecuentes.

La enfermedad de Chagas se encuentra principalmente en América Latina, pero en las últimas décadas se ha observado con mayor frecuencia en los Estados Unidos de América, Canadá, muchos países europeos y algunos del Pacífico Occidental. Esto obedece sobre todo a la movilidad de la población entre América Latina y el resto del mundo. (OMS, N° 340, 2014)

1. Descripción de la enfermedad

En la persona con infección por VIH, la enfermedad de Chagas, representa una reactivación de una infección latente o crónica, asociada a altos niveles de parasitemia, inmunosupresión intensa (linfocitos T-CD4 < 200 céls/ml) o se presenta asociada a otras infecciones oportunistas.

Las personas portadores de VIH presentan, en 75% de los casos, manifestaciones del sistema nervioso central (SNC) como meningoencefalitis o masas cerebrales indistinguibles de la toxoplasmosis cerebral (TC); 25 a 50% puede presentar miocarditis pero no suele ser el elemento inicial o más destacado del punto de vista clínico.

El LCR demuestra pleocitosis de predominio linfocitario, con incremento de proteínas y ocasionalmente presencia de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi.* El diagnóstico definitivo se establece por biopsia cerebral y por identificación directa del parásito en tejido o en sangre. La centrifugación de la sangre o LCR mejora la sensibilidad de la visión directa.

La PCR para *T. cruzi* en LCR sirve para monitorear la respuesta a tratamiento.

Las pruebas serológicas son sensibles y específicas pero tienen con frecuencia falsos positivos y negativos. (Martín Lasso B., 2010).

El tratamiento de estos casos de reactivación de la infección por *T cruzi.,* es una urgencia para disminuir el alto riesgo de mortalidad debida a la asociación de las dos patología. (Faustino Torrico, 2013)

2. Manifestaciones Clínicas

Clínicamente, la enfermedad de Chagas se presenta en varias fases: aguda, indeterminada y crónica.

La fase aguda Generalmente este período es asintomático y más frecuente en personas jóvenes. Se evidencia una alta parasitemia, con síntomas y signos transitorios. Esta etapa es a menudo asintomática Los pacientes sintomáticos presentan: fiebre, signos clínicos de puerta de entrada, edema, adenopatías satélites, compromiso cardíaco, hepatomegalia y esplenomegalia.

La fiebre es frecuente e irregular, pero puede ser continua y alta. Se acompaña de anorexia, astenia, mialgias, cefalea y ocasionalmente artralgias.

El cuadro febril suele persistir por un período de 2 a 4 semanas pueden estar presentes malestar general, induración alrededor del sitio de la inoculación (chagoma) o edema periocular (signo de Romaña) también.

La fase crónica se manifiesta principalmente como cardiopatía, colopatía y esofagopatía. El compromiso de otros órganos tales como estómago, duodeno, vejiga, uréteres y otros, es infrecuente.

En esta etapa existe una parasitemia baja y fluctuante (la etapa agudas se caracteriza por abundantes parásitos en el torrente sanguíneo).

Se estima que alrededor de un 30% de las personas con Enfermedad de Chagas tendrían manifestaciones de la etapa crónica, lo que podría aumentar al emplear métodos diagnósticos más sensibles

3. Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico etiológico de la enfermedad de Chagas se basa en la evolución clínica, epidemiológica y prueba de diagnóstico de laboratorio, lo exámenes adecuados dependen de la etapa clínica del paciente; porque en las etapas iniciales de la enfermedad se encuentran parasitemias importantes y a medida que transcurre la infección van disminuyendo hasta hacerse mínimas y aleatorias

En las etapas crónicas (inaparente o indeterminada y sistemática) las parasitemias son transitorias y por ello el diagnóstico se realiza fundamentalmente mediante el hallazgo de anticuerpos circulantes contra *T. cruzi*. (Uribarren Berrueta, 2012).

3.1 Muestras para el diagnóstico

- ✓ Sangre
- ✓ Suero
- ✓ Biopsia

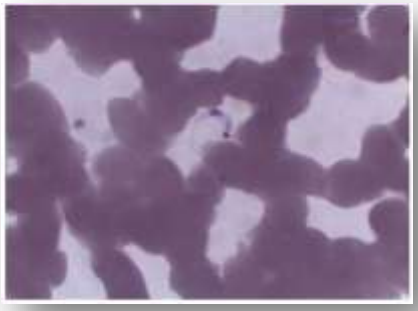
3.2 Técnicas de Diagnóstico

A. Exámenes Directos parasitoscópicos

Se recomienda practicarlo en la fase aguda de la enfermedad es decir, entre los 7 a 15 días de manifestaciones clínicas (donde puede alcanzar una sensibilidad superior al 95%) ya que en las indeterminadas y crónicas la sensibilidad puede ser menor al 50%

A.1 Examen en fresco

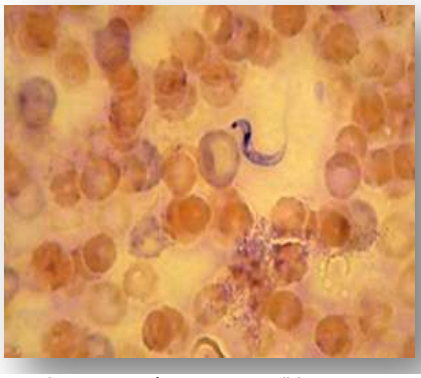
Consiste en examinar directamente con el microscopio una gota de sangre de la persona con sospecha de infección. Es la prueba más sencilla, rápida y económica que permite demostrar la presencia del parásito en la forma aguda o congénita de la enfermedad de Chagas. El rendimiento del examen es bueno, y la prueba es útil cuando la parasitemia es elevada.



A.2 Frotis sanguíneo (Extendido fino)

En el caso de *T. cruzi* so observan los tripomastigotes como estructuras alargadas en forma de “S” o “C” entre los eritrocitos. Los frotis deben ser lo suficientemente delgados para poder leer un texto a través de la extensión.

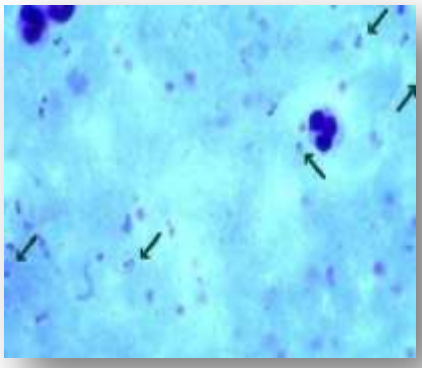
Los portaobjetos deben estar limpios y desgrasados.



Tripomastigotes sanguíneos en extendido. Imagen: MVZ José A. Jiménez Rodríguez, Facultad de Medicina, UNAM

A.3 Gota gruesa

Es un método de concentración para buscar parásitos sanguíneos y tiene mayor sensibilidad que el examen directo y el frotis. Es indispensable homogenizar la muestra sanguínea para que los eritrocitos acumulados no impidan la observación de los parásitos.



A.4 Microhematocrito

(Concentración del parásito mediante centrifugación)

El sistema de microhematocrito fluorescente (QBS) es un método de diagnóstico cualitativo de alta sensibilidad para descartar rápidamente la presencia de parásitos hemáticos como plasmodios, tripanosomas y microfilarias en sangre capilar o venosa centrifugada. La capa de leucocitos y plaquetas que se forman en los tubos capilares con sangre, al ser centrifugados se expande en una capa delgada a través del flotador cilíndrico de alta precisión introducido en el tubo capilar, formando tres estratos celulares.

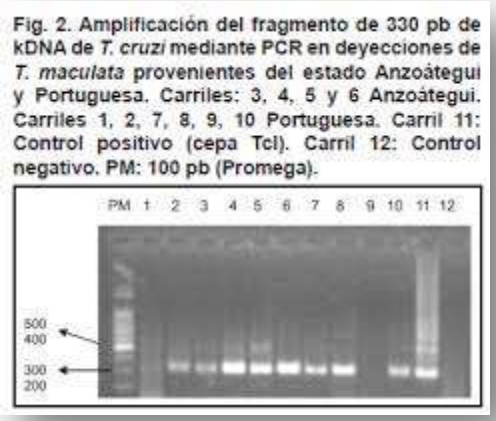
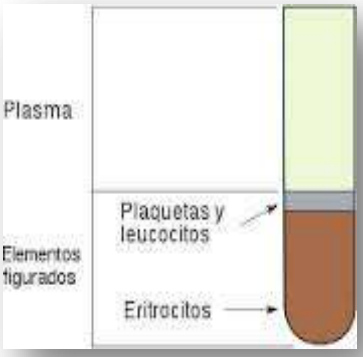


Fig. 2. Amplificación del fragmento de 330 pb de kDNA de *T. cruzi* mediante PCR en deyecciones de *T. maculata* provenientes del estado Anzoátegui y Portuguesa. Carriles: 3, 4, 5 y 6 Anzoátegui. Carriles 1, 2, 7, 8, 9, 10 Portuguesa. Carril 11: Control positivo (cepa Tcl). Carril 12: Control negativo. PM: 100 pb (Promega).

El sistema utiliza anaranjado de acridina para teñir las nucleoproteínas celulares, y la fluorescencia de los componentes incrementa su visibilidad. (InDRE 2012)

A.5 Método de Strout

Es un método sencillo, económico y muy útil para observar el tripanosoma en el sedimento del suero del paciente. (POE´s DLNV/CHAGAS, 2013)

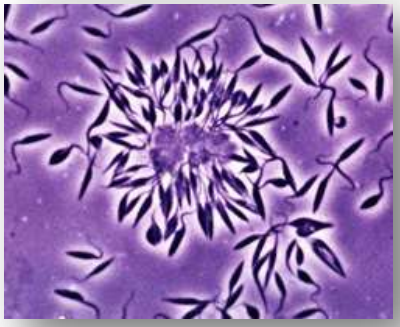


A.6 Cultivo

Es un método de diagnóstico parasitológico que permite la reproducción del parásito. La sensibilidad en los casos agudos es cercana al 100%, pero en las fases indeterminadas y crónicas puede disminuir hasta 50%. (InDRE 2012)

A.7 Biología molecular

Detección de DNA de *T. cruzi* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (altos costos).



B. Examen Indirecto

B.1 Inmunodiagnóstico (ELISA) para detección de anticuerpos

Se basa en la detección de anticuerpos específicos contra *Trypanosoma cruzi*. Es importante seleccionar adecuadamente el momento de toma de muestra y la interpretación adecuada de los resultados. El tipo de antígeno y conjugado utilizado, ya que algunas metodologías utilizan conjugados polivalentes (Anti IgM, IgG e IgA).

B.2 Otros métodos validados

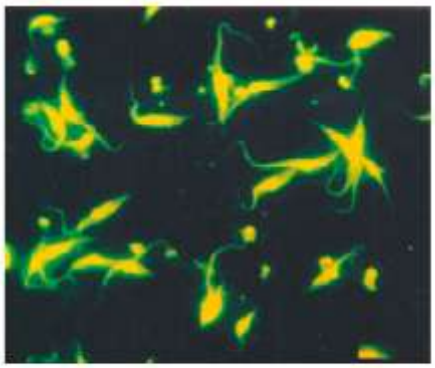


Figura 1. IFI aplicada al suero de un paciente con enfermedad de Chagas utilizando epimastigotos de *T. cruzi* como antígeno a 1000 X

Hemaglutinación indirecta (HAI) e Inmunofluorescencia (IFI), no existen actualmente otras pruebas validadas para diagnóstico de infección chagásica. Los parámetros para determinar la confiabilidad de un método son: Sensibilidad (S), Especificidad (E) y Valor predictivo (VP). Estos últimos dependen de la prevalencia de la infección (InDRE 2012).

Microsporidios

Los microsporidios son parásitos intracelulares obligados que pertenecen al filo Microsporidia. Por su simplicidad morfológica y fisiológica, así como su dependencia parasitaria, se les considera como células ancestrales, organismos con características muy básicas pero que han evolucionado hasta nuestros días. A partir de los datos genómicos y proteómicos de los que se dispone, puede deducirse que los microsporidios son parientes muy próximos a los hongos.

El filo Microsporidia, constituido por 144 géneros con más de 1,200 especies identificadas, se encuentra ampliamente distribuido en hospederos vertebrados e invertebrados. Hasta ahora, se consideran capaces de causar patología en el humano algunas especies de los siguientes géneros: *Encephalitozoon, Enterocytozoon, Microsporididum, Nosema* (syn. *Anncaliia*), *Pleistophora, Trachipleistophora* y *Vittaforma.* (Castañón Olivares, 2013).

1. Descripción de la enfermedad

Los microsporidios fueron identificados inicialmente como protozoos. Actualmente se encuentran clasificados como hongos, con alrededor 1,200 especies conocidas, aunque solo 15 de ellas se reconocen como patógenas para el humano.
Las infecciones en humanos eran prácticamente desconocidas antes de la epidemia de VIH/sida, cuando se identificó a *Enterocytozoon bieneusi* como principal agente causal de cuadros diarreicos en pacientes con cuentas linfocitarias CD4+ bajas. (Choudhary et al. 2011).
En los últimos 25 años han cobrado relevancia en seres humanos, sobre todo en personas con alteraciones inmunológicas, aunque se desconoce gran parte de la biología, epidemiología, especificidad por hospederos y mecanismos de transmisión. (Castañón Olivares, 2013)

2. Manifestaciones Clínicas

La manifestación más común de microsporidiosis es una enfermedad intestinal que cursa con diarrea acuosa. Sin embargo, el microsporidio puede infectar a la nasofaringe, los ojos, los pulmones y la infección puede diseminarse al cerebro y los riñones.

Síndromes clínicos varían según las especies: *Enterocytozoon bieneusi* se asocia con la mala absorción, diarrea y colangitis; *Encephalitozoon cuniculi* se asocia con la hepatitis, encefalitis y enfermedad diseminada, por lo general en el tracto urinario;

Encephalitozoon intestinalis se asocia con diarrea, infección diseminada, y la queratoconjuntivitis superficial; y *Encephalitozoon hellem* está asociada con la queratoconjuntivitis superficial, sinusitis, enfermedades respiratorias, abscesos prostáticos, y la enfermedad diseminada. (José M Miro, Miriam J Álvarez, 1012)

3. Diagnóstico de laboratorio

Para el diagnóstico de las microsporidiosis, las técnicas como examen directo y cultivo rutinarias y convencionales, quedan descartadas debido al tamaño de las esporas. (Castañón Olivares, 2013).

3.1 Muestras para diagnóstico de laboratorio

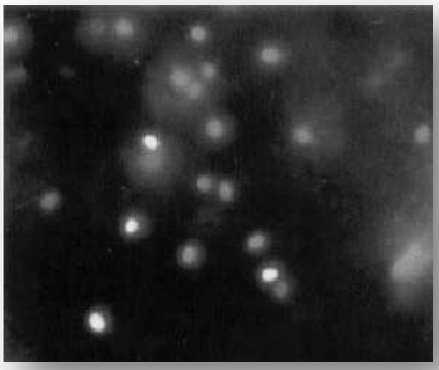
- ✓ Heces,
- ✓ Líquido intestinal,
- ✓ Secreción conjuntival,
- ✓ Raspado corneal,
- ✓ Fluido vítreo,
- ✓ Biopsias

3.2 Técnicas de Diagnóstico

A. Examen Directo

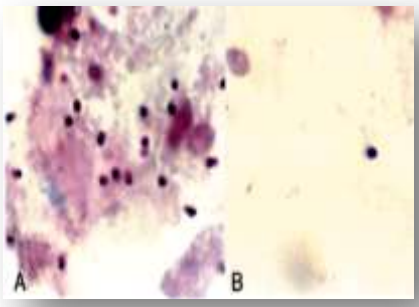
A.1 Examen microscópico directo y/o frote con fluorescencia.

El uso de blanco de calcoflúor, disponible en varias marcas comerciales (Fungi-Fluor®). Asimismo pueden utilizarse otros abrillantadores de la pared celular (Uvitex 2B® o Fungiqual®), todos ellos métodos utilizados para la identificación de esporas en heces.



A.2 Biopsías

A partir de citologías o cortes de tejido, se pueden teñir con hematoxilina-eosina, ácido periódico de Shiff, azul de toluidina o azul tricromo, así como también son útiles las tinciones modificadas de Gram (Brown-Brenn, Brown-Hopps), Giemsa o el uso de la tricrómica de Gomori (cromotropo), esta última frecuentemente usada en la identificación de esporas de *E. bieneusi* y *E. intestinalis* en heces y líquido duodenal.



A.3 Cultivo de células

Sólo se ha intentado para identificar a *E. intestinalis*.

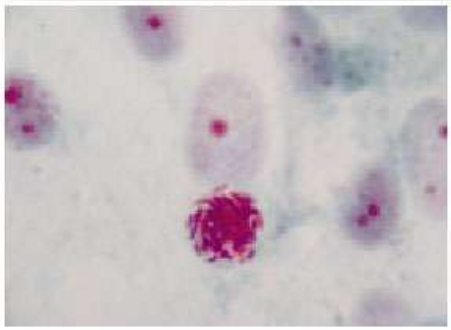


Figura 2. Esporas de *E. intestinalis* cultivadas en células Vero en la quinta semana después de la infección. Gram cromótropo rápido en caliente, 100X.

A.4 Biología molecular

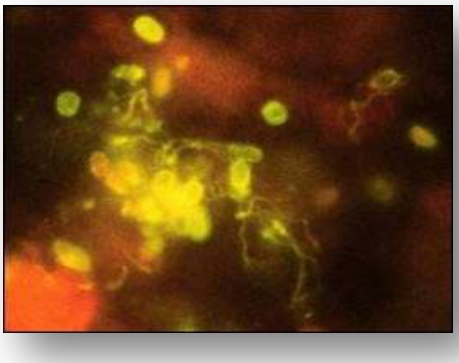
La hibridación in situ ha sido estandarizada para el diagnóstico de microsporidiosis humana causada por *E. bienusi*. Las sondas descritas son dirigidas hacia la sub-unidad pequeña-rRNA

Figura 2. PCR para microsporidios intestinales. A. Amplificación de ADN mediante PCR para *E. bieneusi*. Carril 1: marcadores de peso molecular; carril 2 y 6: control negativo y positivo, respectivamente; carriles 3, 4 y 7 al 12: pacientes.

B. Examen Indirecto

B.1 Métodos inmunológicos

Se han descrito varias técnicas: contrainmunoelectroforésis, Western blot, ensayos inmunoenzimáticos e inmunofluorescentes, para la identificación de IgM e IgG anti-microsporidios, especialmente para *E. cuniculi* y *E. intestinalis*; sin embargo, las pruebas han sido más utilizadas para estudios epidemiológicos, ya que la identificación de anticuerpos no refleja necesariamente una infección aguda.



Para *E. bieneusi*, uno de los microsporidios más frecuentes, no existen técnicas de diagnóstico serológico disponibles.(Castañón Olivares. 2013).

Obtención de muestras

Obtención de muestras de Líquido Cefalorraquídeo

Materiales e insumos

- ✓ Tubos de ensayo estériles con tapón de rosca
- ✓ Estilete para punción lumbar
- ✓ Torundas de algodón con desinfectante (alcohol al 70%, yodopovidona, etc.)
- ✓ Guantes estériles
- ✓ Gabacha
- ✓ Mascarilla

Procedimiento

1. Desinfectar la zona por punzar con yodopovidona al 2%
2. El médico debe realizar la punción en los espacios intervertebrales L3-L4, L4-L5 o L5-S1.
3. Al llegar al espacio subaracnoideo, retirar el estilete y dejar fluir libremente la muestra.
4. Recoger un volumen mínimo del espécimen de 5mL en un tubo estéril con tapa de rosca.

Transporte y almacenamiento

- ✓ Transportar al laboratorio a temperatura ambiente. De no procesar de inmediato conservar a temperatura ambiente, protegido de la luz, por un máximo de 12 horas, No transportar ni almacenar en refrigeración, debido a que las bajas temperaturas afectan a los microorganismos que se investigan en esta muestra. (Castañón Olivares, 2013)

Obtención muestra de Sangre venosa

Materiales e insumos

- ✓ Guantes desechables
- ✓ Tubos con sistemas al vacío o tubos con tapón rojo
- ✓ Camisa para extracción al vacío
- ✓ Jeringa de 5 o 10 ml
- ✓ Torundas de algodón con desinfectante (Alcohol al 70% / yodopovidona/ Clorhexidina acuosa 2%, etc.)
- ✓ Etiquetas de identificación
- ✓ Gradilla
- ✓ Recipiente para descarte
- ✓ Centrifuga
- ✓ Protopipetas
- ✓ Tubos de ensayo 13 X 100 mm
- ✓ Aplicador de madera sin algodón

Procedimiento

1. Colocarse los guantes desechables
2. Colocar cómodamente e inmovilizar al paciente
3. Rotular el tubo con nombre, edad, número de expediente, fecha y hora. (de acuerdo a solicitud de examen/boleta)
4. Preparar la jeringa (ajustar correctamente la aguja, aflojar el embolo, etc.)
5. Seleccionar la vena mediante tacto, (así determinaremos la profundidad, calibre, elasticidad, etc., de la vena).
6. Desinfectar el punto de punción con torundas impregnadas de alcohol al 70%, dejar que se seque el desinfectante utilizado.
7. Colocar el torniquete o compresor en la parte superior del brazo, para producir exaltación de la vena
8. Pinchar la piel, formando con la jeringa con un ángulo entre 15° y 30°, con el bisel de la aguja hacia arriba.
9. Extraer sangre, lentamente sin mover la aguja de la jeringa, para evitar perforar la vena.
10. Soltar el torniquete cuando la sangre fluya
11. Sacar la aguja y aplicar presión suave hasta lograr hemostasia, con la torunda de algodón.

12. Dispensar suavemente la sangre extraída en el tubo sin anticoagulante (tubo tapón color rojo)
13. En ayunas, generalmente la muestras es más homogénea y ofrece valores más precisos (María Isabel Bellón, 2014)

- ✓ **Separación de componentes sanguíneos**
- ✓ Dejar la sangre a temperatura ambiente de 10 a 20 minutos para que el coagulo se retraiga
- ✓ Con un aplicador de madera, remover el coagulo formado
- ✓ Centrifugar a 5,000rpm durante 10 minutos
- ✓ Con una protopipeta tomar el suero y trasvasarlo a un tubo limpio o vial, previamente rotulado con los mismos datos del paciente (nombre, edad, número de expediente fecha y hora de toma de muestra).

Transporte y almacenamiento

- ✓ Si la muestra no se trabajara de inmediato, almacenarla en refrigeración (4-8 °C) o congelación (-20°C) si no se procesara en mismo día.

Obtención muestra de biopsia

Materiales e insumos

- ✓ Frasco estéril, boca ancha y cierre hermético
- ✓ Solución salina isotónica estéril
- ✓ Formol al 10%

Procedimiento

- ✓ Se debe realizar en el quirófano o consultorio bajo las más rigurosas reglas de asepsia.
- ✓ Obtenida la muestra, ésta se divide en dos porciones (1mm cada una), una es colocada en un recipiente estéril con tapa de rosca conteniendo solución salina isotónica estéril. Para el examen micológico y la otra en formol al 10% en solución salina buferada para histopatología.

Transporte y almacenamiento

- ✓ La muestra para el estudio debe ser remitida de inmediato al laboratorio a temperatura ambiente. Sin embargo, de no ser procesada al momento, conservar a 4-8°C por dos a cuatro horas.

Obtención de muestra de Heces

Materiales e insumos

- ✓ Frasco de boca ancha, limpio y cierre hermético

Procedimiento

- ✓ Importante que la muestra de heces no esté mezclada con orina, que no haya antecedente de haber ingerido bario u otros productos de contraste.
- ✓ La muestra de heces se debe recolectar en un frasco boca ancha y con cierre hermético, debe ser llevada al laboratorio en un periodo no mayor de 2-4 horas después de su recolección

Transporte y almacenamiento

- ✓ Si la muestra no será procesada de inmediato, almacenar la muestra en condiciones de refrigeración (4-8°C) por un periodo no mayor de 4 horas, para evitar la acidificación de la muestra y destrucción de los estadios parasitarios, se debe proteger de la luz directa.

Obtención de muestras de esputo y secreciones bronquiales

Materiales e insumos

- ✓ Frasco de boca ancha, estéril y cierre hermético
- ✓ Solución salina al 0,85%, estéril

Procedimiento

- ✓ Debido a que las muestras de esputo pueden contener *Mycobacterium tuberculosis*, se deben adoptar precauciones al momento de su emisión para minimizar el riesgo de contagio:
- ✓ Por seguridad las muestras de esputo, deben tomarse fuera del laboratorio, para evitar los aerosoles.
- ✓ Debe preferirse la expectoración espontánea (esputo) como muestra de estudio para el diagnóstico de laboratorio de micosis broncopulmonares. Este es un espécimen representativo y puede repetirse sin inconvenientes. Sin embargo, tiene la desventaja de arrastrar microorganismos colonizantes de la boca y faringe.
- ✓ Para pacientes que no pueden expectorar fácilmente se puede utilizar la nebulización con solución salina hipertónica o con ayuda de fisioterapia para inducir la salida de esputo.
- ✓ La utilidad diagnóstica del esputo se medirá de acuerdo con su calidad valorada en función del número de leucocitos polimorfonucleares-PMN (más de 25 PMN) y células epiteliales (menos de diez células por campo) presentes en la muestra.
- ✓ Indicar al paciente que se realice la higiene bucal y hacer enjuagues con agua y bicarbonato de sodio (una cucharada sopera de bicarbonato de sodio en un litro de agua hervida que luego se entibia).
- ✓ Emitir la muestra en frasco estéril y boca ancha.

Transporte

- ✓ Las muestras deben de transportarse al laboratorio en un plazo de no mayor de dos horas desde su obtención a temperatura ambiente.
- ✓ Una vez recibido el espécimen en el laboratorio se deberá procesar de inmediato o en su defecto conservar en refrigeración a 4-8°C por cuatro a seis horas.

Obtención de muestra de sangre para hemocultivo

Materiales e Insumos

- ✓ Frascos de hemocultivo
- ✓ Torundas de algodón con desinfectante (alcohol al 70%, yodopovidona, etc.)
- ✓ Torniquete
- ✓ Jeringa
- ✓ Guantes estériles
- ✓ Gabacha
- ✓ Mascarilla

Procedimiento

- ✓ Es importante que el laboratorio de diagnóstico clínico de un centro de atención al paciente cuente con manual sobre el manejo, transporte y almacenamiento de muestras.
- ✓ Considerar las medidas de asepsia al obtener la muestra, para evitar contaminaciones en los hemocultivos.
    - Antes y después de tomar la muestra de hemocultivo se debe lavar las manos con agua y jabón
    - Colocarse los guantes estériles y el tapabocas justo antes de tomar la muestra.
    - Descontaminar el área de punción con algodón y desinfectante
    - Dejar por un minuto que el desinfectante ejerza su mecanismo de acción
    - El responsable de tomar la muestra debe manipular el área de punción sólo con guantes estériles, gabacha y mascarilla.
    - Una vez que ha esterilizado la zona de punción y necesita manipularla de nuevo, vuelva a desinfectar.
    - Desinfectante la boquilla del frasco de hemocultivo antes y después de inocular la muestra.
- ✓ En el caso de adultos tomar de dos a tres muestras de 8 a 10mL de sangre venosa de diferentes punciones y separadas por 30 minutos o una hora entre sí. En el caso de niños, obtener un solo espécimen de 1 a 5 ml, en lactantes de 1 a 2 ml y neonatos de 0,5 a 1mL
- ✓ Obtenida la muestra de sangre, ésta debe de ser inoculada de inmediato en el sistema de hemocultivo que el laboratorio trabaja.
- Rotular el frasco de hemocultivo con: nombre del paciente, número de expediente, edad, hora de toma de muestra y fecha

Transporte y almacenamiento

- ✓ El hemocultivo debe transportarse de inmediato al laboratorio a temperatura ambiente para evitar contaminación externa, con su respectiva solicitud de examen o ficha epidemiológica,

Procedimientos de Laboratorio

Examen Microscópico Directo de heces

(Cyclospora)

Permite observar directamente las características morfológicas de los parásitos o estadios y características organolépticas de las heces (color, consistencia, presencia de sangre, moco, etc.)

Materiales e insumos

- ✓ Muestra de heces
- ✓ Solución salina al 0.85%
- ✓ Solución de lugol
- ✓ Aplicador de madera sin algodón
- ✓ Lámina portaobjeto
- ✓ Lámina cubreobjetos
- ✓ Pinza de metal
- ✓ Aceite de inmersión
- ✓ Papel lente
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha
- ✓ Recipiente para descartar

Equipo

- ✓ Microscopio objetivo 10X, 40X y 100X

Procedimiento

1. En la lámina portaobjetos colocar en un extremo una gota de solución salina al 0.85% y al otro una gota de lugol.
2. Con el aplicador de madera tomar 1 o 2 gr. de heces y hacer una suspensión homogénea primero en la solución salina y luego repetir el mismo procedimiento en la gota de lugol.
3. Colocar cuidadosamente la lámina cubreobjetos en ambas suspensiones (solución salina y lugol)
4. Observar al microscopio con objetivo de 10X, 40X y 100X.
5. Con la solución salina, los trofozoítos y quistes de los protozoarios se observan de forma natural y con lugol, las estructuras internas núcleos y vacuolas.

Resultado esperado

Observar e Identificar el parásito (especie, estadio evolutivo) y determinar la carga parasitaria (número de microorganismos por campo)

Técnica de concentración/flotación. Técnicas de Sheather (Para diagnóstico de coccidios: Cryptosporidium spp, Cyclospora spp, Isospora spp.)

Utilizando una solución de azúcar que posee mayor densidad que los estadios parasitarios

Está técnica es útil para la concentración de quistes y ooquistes de protozoos y huevos de helmintos y se utiliza como método preferencial en el diagnóstico de los coccidios; *Cryptosporidium, Cyclospora, Isospora*, etc.

El hallazgo de *Isospora belli* requiere informe inmediato al médico.

Materiales e insumos

- ✓ Solución concentrada fenolada de azúcar
- ✓ Recipientes (vaso) de vidrio para preparar suspensión
- ✓ Portaobjetos (3 X 1 pulgadas o 3 X 2 pulgadas)
- ✓ Cubreobjetos (22 X 22 mm)
- ✓ Marcador
- ✓ Aplicadores de madera sin algodón
- ✓ Agua destilada
- ✓ Gasa
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha
- ✓ Material para descartar

Equipo

- ✓ Microscopio con objetivo 10X y 40X

Preparación de reactivos:

Solución concentrada fenolada de azúcar

1. Azúcar en cristales 500g
2. Agua destilada 320ml
3. Fenol en cristales 6.5g

Disolver el azúcar en el agua destilada usando calor, sin dejar llegar a ebullición, dejar enfriar. Filtrar por gasa, agregar el fenol y agitar hasta disolución, guardar en frasco tapado y rotulado.

Procedimiento

1. Identificar los portaobjetos con información de la muestra.
2. Agregar la solución concentrada (azucarada) hasta la mitad de vaso de vidrio
3. Con un aplicador agregar aproximadamente 1 gramos de heces y realizar suspensión homogénea.
4. Llenar el vaso con solución concentrada hasta el borde
5. Colocar un portaobjetos
6. cuidadosamente previamente rotulado sobre el vaso de vidrio y dejar reposar por 30 minutos.
7. Remover el portaobjetos cuidadosamente y colocar cubreobjetos.
8. Examinar la muestra en objetivo 10X

Resultados esperados

Se producen dos tipos diferentes de ooquistes, unos de paredes gruesas, que es usualmente excretado por el huésped, y otros de paredes finas, cuyo objeto primario es la autoinfección .Los ooquistes son infectantes después de la excreción, lo que permite una transmisión directa e inmediata por vía fecal-oral.

Ziehl –Neelsen en "frio": Coloración de Kinyoun (Para diagnóstico de coccidios: Cryptosporidium spp, Cyclospora spp, Isospora spp.)

Se basa en el comportamiento ácido-resistente de la cubierta en algunos parásitos como *Isospora*, *Ciclospora* y *Cryptosporidium*, los cuales se tiñen de rojo y destacan sobre un fondo verde azul, dependiendo del colorante de contraste usado. (Ortigada Gutiérrez, 2011).

Materiales e insumos

- ✓ Portaobjetos (3 X 1 pulgadas o 3 X 2 pulgadas)
- ✓ Cubreobjetos (22 X 22 mm)
- ✓ Marcador
- ✓ Aplicadores de madera sin algodón
- ✓ Coplin
- ✓ Puente de tinción
- ✓ Fucsina-fenicada
- ✓ Alcohol ácido
- ✓ Azul de metileno
- ✓ Agua de grifo
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha
- ✓ Material para descartar

Equipo

- ✓ Microscopio con objetivo 10X y 40X

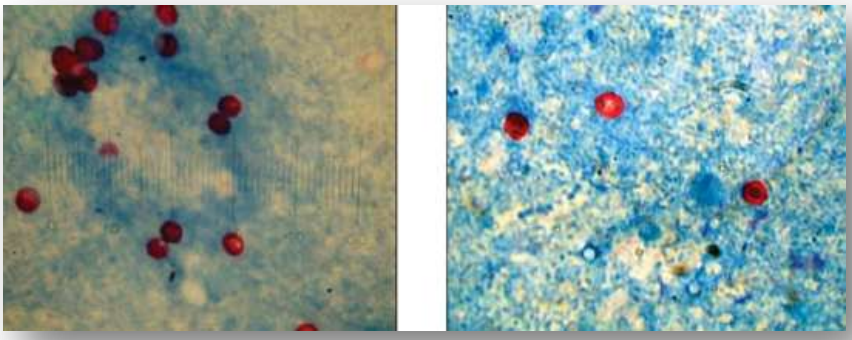
Procedimientos

1. Hacer frotis de la muestra.
2. Dejar que el frotis se seque perfectamente
3. Fijarlo con metanol (agregar dos-tres gotas sobre el frotis y dejar que se seque)
4. Dejarlo en el puente de tinción.
5. Aplicar fucsina-fenicada (solución con fenol y mayor concentración de fucsina) por 5 minutos
6. Decolorar (lavar) con alcohol ácido.
7. Lavar con agua del grifo.
8. Agregar como colorante de contrastar el azul de metileno y dejarlo actuar por un minuto
9. Lavar con agua del grifo y dejar secar

Resultados Esperados

Los parásitos ácido-alcohol resistentes se tiñen de color rojo.

Ooquistes teñidos de color rojo



Método de Flotación con Sulfato de Zinc

(Para Isospora)

Se fundamenta en concentrar huevos de helmintos y quistes de protozoos cuando las infecciones son muy leves y no se detectan en preparaciones directas. Utilizando líquidos de más alta densidad que los elementos buscados, (elementos menos densos flotarán a la superficie).

Materiales e insumos

- ✓ Solución de sulfato de Zinc
- ✓ Gasa
- ✓ Embudos de 5 cm
- ✓ Aplicadores
- ✓ Tubos de ensayo con tapón de rosca, o vasos plásticos pequeños para realizar suspensión de materia fecal
- ✓ Láminas portaobjetos
- ✓ Láminas cubre objetos
- ✓ Solución de lugol
- ✓ Asas bacteriológicas en anillo
- ✓ Gradilla para tubos
- ✓ Solución salina al 0,85%
- ✓ Aceite de inmersión
- ✓ Recipiente para descarte de material contaminado
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha

Preparación de reactivo

- ✓ Solución de sulfato de zinc
  Disolver 330gr. de cristales de sulfato de zinc, disolverlo en 670ml de agua destilada.

Equipo

- ✓ Microscopio con objetivo de 10X, 40X y 100X

Procedimiento

1. Identificar el vaso y el tubo de ensayo con la información de la muestra (nombre del paciente, edad, etc.)
2. Con un aplicador tomar 1 a 1.5gr de heces y hacer una suspensión en aproximadamente 2 ml de solución salina, en el vaso o tubo de ensayo
3. Filtrar la suspensión a través de gasa humedecida en un tubo de ensayo
4. Centrifugar a 1,500 – 2,000 rpm por 2 minutos
5. Decantar el sobrenadante

6. Agregar al sedimento de 2 a 3 ml de solución de sulfato de zinc y agitar con un aplicador hasta homogenizar el sedimento con la solución. Agregar más solución de sulfato de zinc hasta 1 cm abajo del borde del tubo de ensayo; sin dejar de agitar.
7. Centrifugar a 2000 rpm, por 2 minutos. Los tubos deben tener posición vertical en la centrífuga (taparlos)
8. Con sumo cuidado sacar el tubo de la centrifuga, remover varias asadas de la película superficial y colocarla sobre una lámina portaobjetos.
9. Cubrir con una lámina cubreobjetos, examinar sistemáticamente la preparación, para colorear los quistes; remover con un aplicar y mucho cuidado la lámina cubreobjetos y agregar una gota de lugol.
10. Para identificar los quistes se procede a examinarlos con el objetivo 100X, para lo cual debe colocarse una gota de aceite de inmersión. (DLNV/Lob de Parasitología POE´s 2013)

Resultados esperados

Quistes de protozoos, huevos de Helmintos, Ooquistes de *Isospora*.

Técnica de TELEMA (Microsporidium)

Se basa en la diferencia de densidades existentes entre las formas parasitarias presentes en la muestra y las soluciones empleadas.

Materiales e insumos

- ✓ Muestra biológica
- ✓ Ácido clorhídrico al 50% 250ml
- ✓ Éter etílico o de petróleo 250ml
- ✓ Lámina portaobjetos
- ✓ Lámina cubreobjetos
- ✓ Pipetas Pasteur (protopipetas)
- ✓ Gradillas
- ✓ Pipetas graduadas de 10ml
- ✓ Coladores (gasa)
- ✓ Embudos
- ✓ Tubos de ensayo 13 x 100
- ✓ Gabacha
- ✓ Guantes
- ✓ Recipiente para descarte

Equipo

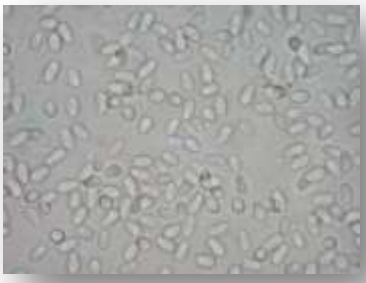
- ✓ Microscopio
- ✓ Centrifuga

Procedimiento

1. En 3ml de ácido clorhídrico suspender de 1 a 2 gr. aproximadamente de muestra fecal y emulsionarla
2. Añadir igual cantidad de éter, tapar y agitar hasta que se forme una emulsión homogénea.
3. Filtrar sobre colador (gasa) y embudo
4. Centrifugar 3 minutos a 2500rpm
5. Se forman cuatro capas: éter, detritus, ácido clorhídrico y sedimento
6. Tomar la muestra (sedimento) con pipeta Pasteur, para su observación del fondo del tubo
7. Observar a 10X y 40X
8. Reportar fase, género y especie de parásito, así como la cantidad por cruces. (Ortigada Gutiérrez 2012).

Resultado esperado

Quistes, ooquistes, larvas y huevos de parásitos. (Reportar fase, género y especie del parásito, así como la cantidad por cruces).



Examen en Fresco (para diagnóstico de parásitos sanguíneos)

Consiste en examinar directamente con el microscopio una gota de sangre del paciente sospechoso de infección de Chagas y es útil cuando la parasitemia es elevada.

Materiales e insumos

- ✓ Sangre total con anticoagulante EDTA
- ✓ Tubos de Vidrio 13x100,
- ✓ Aplicadores,
- ✓ Protopipetas (dispensadores)
- ✓ Láminas portaobjetos,
- ✓ Láminas cubreobjetos,
- ✓ Guantes,
- ✓ Agua destilada,

Equipo

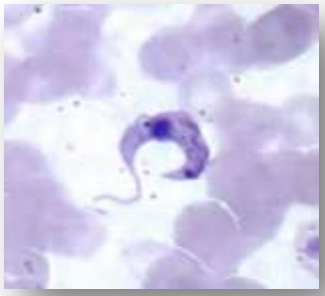
- ✓ Microscopio 10X y 40X
- ✓ Centrifuga

Procedimiento

1. Obtener la muestra de sangre venosa.
2. Rotular lámina portaobjetos.
3. Colocar una gota de sangre sobre cada lámina portaobjeto rotulado.
4. Cubrir la muestra con un cubreobjetos.
5. Conservar las preparaciones en cámara húmeda hasta su lectura.

Resultado esperado

Observación de tripomastigote en la muestra con objetivo de 40x



Frotis sanguíneo

En esta coloración la eosina tiñe de amarillo más o menos oscuro, las granulaciones eosinofílicas y el azul de metileno tiñe en azul ortocromático, las granulaciones de las basófilas, el azul revela en rojo intenso el núcleo de los hemoparásitos, en rojo purpura el de los leucocitos y el resto de las células nucleadas.

Materiales e insumos

- ✓ Muestra de sangre (punción digital)
- ✓ Alcohol metílico grado reactivo
- ✓ Colorante de Giemsa
- ✓ Lancetas
- ✓ Lámina portaobjetos
- ✓ Solución amortiguadora de fosfato pH 7.2 (PBS)
- ✓ Torundas de algodón humedecido con alcohol etílico al 70%
- ✓ Torundas de algodón secas

Equipo

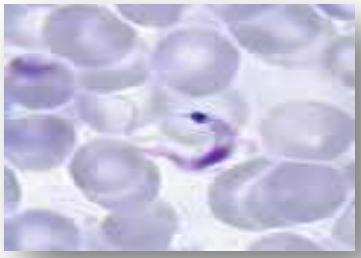
- ✓ Microscopio

Procedimiento

1. Realizar la punción digital
2. Desechar la primera gota de sangre y limpiar con una torunda de algodón seca
3. Obtener una segunda gota de sangre y colocarla sobre la mitad de una de las caras de un portaobjeto desengrasado
4. Colocar frente a la gota un portaobjeto auxiliar en un ángulo de 45°, sujetarla por sus bordes mayores
5. Proceder a extender la muestra con un movimiento uniforme con el extremo libre del portaobjeto, hasta terminar el extendido.
6. Dejar la preparación sobre una superficie horizontal hasta que se seque (protegerla de polvo, moscas y otros insectos).
7. Identificar el extendido escribiendo con: nombre, edad y sexo del paciente. El frotis siempre se deberá fijar con alcohol metílico.
8. Para fijar el extendido, introducir la parte correspondiente del frotis en un recipiente de boca ancha conteniendo alcohol metílico sin diluir, escurrir el alcohol excedente, son que se moje la gota gruesa.
9. Colocar el portaobjeto sobre una superficie horizontal hasta que se seque.
10. Teñir con Giemsa como se indica en el procedimiento de tinción de gota gruesa.

Resultado esperado

Observación del tripomastigote en el frotis



Gota gruesa (Identificación morfológica del agente en muestras de sangre), Chagas

La gota gruesa consiste en concentrar y defibrinar la gota de sangre de la muestra, la que posteriormente será deshemoglobinizada y teñida con Giemsa durante 10 minutos, este tipo de examen es útil cuando se tiene un pico en la parasitemia en la fase aguda de la enfermedad, en donde podremos encontrar la forma de tripomastigote en sangre.

Materiales e insumos

- ✓ Lancetas estériles desechables
- ✓ Láminas portaobjetos
- ✓ Torundas de algodón con alcohol etílico al 70%
- ✓ Aceite de inmersión.
- ✓ Papel lente
- ✓ Recipiente para descarte
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha
- ✓ Material para descarte

Equipo

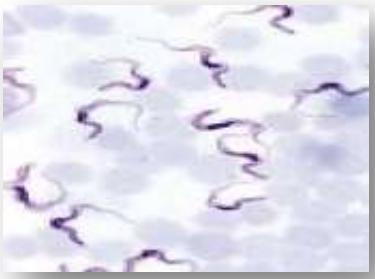
- ✓ Microscopio

Procedimiento

1. Realizar la punción digital
2. Desechar la primera gota de sangre y limpiar con una torunda de algodón seca
3. Obtener una segunda gota de sangre para el frotis sanguíneo, en la misma cara del portaobjeto donde se hizo el extendido (en la parte media libre, colocar otra gota de sangre más grande que la anterior).
4. Con el ángulo de la lámina portaobjeto auxiliar y con movimientos circulares se extiende la gota en un cuadro de más o menos 2 cm por lado.
5. Dejar la preparación sobre la superficie horizontal hasta que se seque, abanicar con la mano para obtener un secado más rápido (protegerla del polvo, moscas y otros insectos).

Resultado esperado

Observación del tripomastigote en el frotis



Coloración de Giemsa

Preparar la solución de trabajo del colorante de Giemsa con solución amortiguadora de fosfato, realizando una solución 1:10 de la solución madre.

1. Cubrir las láminas con solución de trabajo y dejar teñir durante 30 minutos
2. Transcurrido el tiempo de tinción lavar el frotis con agua de la llave
3. Colocar sobre una superficie horizontal hasta que se seque.

Punto crítico

El tiempo de tinción debe estandarizarse cada vez que se prepare colorante.

Lectura

1. Enfocar primero la gota gruesa, utilizando los objetivos de menor a mayor aumento
2. Cubrir con aceite de ambas muestras teñidas, hasta conseguir una imagen nítida con el objetivo de inmersión.
3. Emplear filtro azul
4. Buscar sistemáticamente la presencia del parásito en todo el portaobjetos hasta asegurarse de dar un resultado final correcto.
5. Observar todos los campos microscópicos de ambas muestras antes de emitir un resultado negativo.

Puntos críticos

Realizar el extendido de manera uniforme. Evitar que se moje la gota gruesa con el alcohol metílico. Usar portaobjetos limpios y desengrasados.

Método de Strout (diagnóstico de Chagas)

Método directo por el cual se puede detectar la presencia de Tripanosoma

Materiales e insumos

- ✓ Muestra de sangre
- ✓ Aplicador de madera sin algodón
- ✓ Protopipeta (dispensador)
- ✓ Lámina cubreobjetos
- ✓ Lámina portaobjeto
- ✓ Tubo de ensayo
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha
- ✓ Recipiente para descartar

Equipo

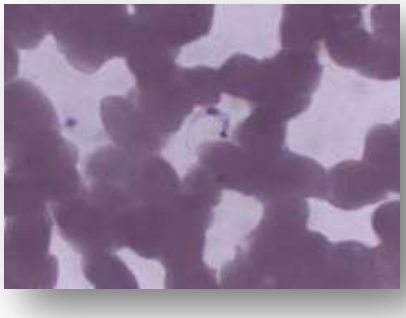
- ✓ Centrifuga
- ✓ Microscopio

Procedimiento

1. Muestra de sangre venosa
2. Una vez formado el coagulo removerlo con un aplicador y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos
3. Con una pipeta de bulbo pasar todo el sobrenadante a un tubo limpio
4. Centrifugar el suero a mayor velocidad (5000 rpm) para concentrar los parásitos en el sedimento
5. Con una pipeta de bulbo retirar con cuidado el suero y guardarlo a -21ºC
6. Observar el sedimento del suero con el objetivo de 40X
7. Si se encuentran tripanosomas en el sedimento, hacer un extendido en un portaobjetos, dejar secar, colorear con Giemsa para confirmación y observar al microscopio con objetivo de 100X

Resultado esperado

Observación de formas flageladas móviles de tripomastigote de *Trypanosoma cruzi*



Técnica (ELISA)

El nombre *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), fue acuñado por investigadores suecos Eva Engvall y Teter Perlmann, en 1971.

Materiales e insumos

- ✓ Kit de ELISA para detección de inmunoglobulinas (IgM, IgG)
- ✓ Tubos de ensayo 13 x 100 mm
- ✓ Microplacas
- ✓ Gradilla
- ✓ Marcador
- ✓ Recipiente para descarte
- ✓ Micropipetas de 5µl, 100µl, 1000µ
- ✓ Puntas amarillas y azules
- ✓ Recipiente para descartar
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha
- ✓ Gafas protectoras

Equipo

- ✓ Baño maría
- ✓ Incubadora
- ✓ Lavador de ELISA
- ✓ Lector de ELISA
- ✓ Inmunolite (cuando la ELISA es automatizad

Principio básico (ELISA)

- De la reacción consiste; al suero problema se le agrega un conjugado que son anticuerpos dirigidos contra anticuerpos humanos o antígeno, los cuales se unirán a una enzima.
- Las enzimas son capaces de modificar al sustrato en presencia de un cromógeno produciendo un producto coloreado que es detectado visualmente o por un espectrofotómetro.

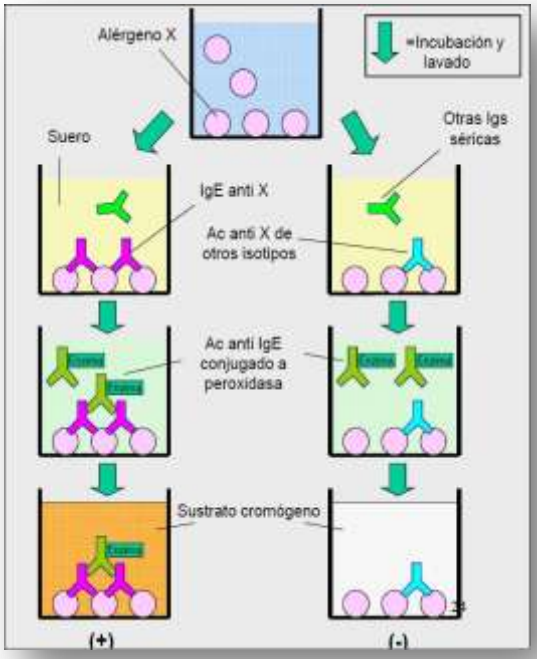
Procedimiento

1. En la placa de micro titulación se fijan anticuerpos específicos contra el antígeno que se quiere detectar (o vice versa).
2. Se añade la muestra al pocillo y si el antígeno del microorganismo buscado está presente, los anticuerpos lo fijan (se unen a él)

3 Se añade un anticuerpo dirigido contra el antígeno (igual al del pocillo, pero marcado con una enzima que se fija al antígeno)

4 Se añade el sustrato (incoloro)sobre el cual actúa la enzima

5 Aparece un color (producto coloreado), cuya intensidad es proporcional a la presencia de antígeno (anticuerpo), se puede observar visualmente o leerlo en un espectrofotómetro (lector de ELISA) a determinada longitud de onda.(métodos inmunológicos, 2014)



Resultado Esperado

Producción/ cambio de color, el cual será inversamente proporcional a la cantidad de Anticuerpo ´o antígeno presente en la muestra. Negativo: Ausencia de no hay cambio de color en la placa de lectura.

Técnica de Capsula de Beal (Para diagnóstico de coccidios biliares como, Isospora spp.)

Este examen es un complemento del coproparasitológico. Se usa para demostrar la presencia de parásitos intestinales que tienen por hábitat el duodeno y que pueden encontrarse en muestras biliares, obtenidas ya sea por sonda duodenal, pro el método de cuerda encapsulada (Enterotest) o por cápsula de Beal.

Se basa en el uso de una cápsula de gelatina que tiene en su interior un hilo de algodón absorbente, para la obtención de parásitos que se encuentran en el duodeno. Es una técnica útil para la búsqueda de *Giardia lamblia, Isospora belli, Strongyloides stercolaris, Ancylostoma* o *Necátor* y *Fasciola hepática*, cuyos adultos se localizan en las vías biliares.

(Sara Ortigoza Gutiérrez 2012)

Materiales e insumos

- ✓ Hidróxido de sodio 2% (500 ml)
- ✓ Solución de lugol, parasitológico (50 ml)
- ✓ Lámina portaobjetos
- ✓ Lámina cubreobjetos
- ✓ Tubos de ensayo 13 x 100 mm
- ✓ Protopipeta de 5ml
- ✓ Cápsula de Beal
- ✓ Cinta adhesiva
- ✓ Gradilla
- ✓ Mascarilla
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha

Equipo

- ✓ Microscopio con objetivo de 10X y 40X
- ✓ Centrifuga

Procedimiento

1. El método de la cuerda encapsulada o Enterotest requiere que el paciente este en ayunas
2. Fijar el extremo de la cuerda con una cinta adhesiva en la mejía del paciente y hacer deglutir la cápsula.
3. La cápsula se va desenrollando a medida que desciende por el estómago y duodeno.
4. Retirar la cuerda después de 4 o 5 horas, observándose el extremo que llegó al duodeno de color amarillo
5. Se exprime el extremo en una lámina excavada o lámina portaobjetos

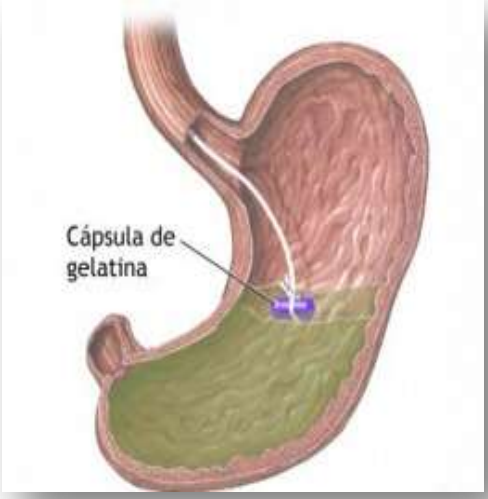
6. Observar 10X y 40X

Al resto del contenido duodenal obtenido con sonda se le agrega una solución de hidróxido de sodio al 2% en tubo de ensayo 13 x 100mm (produciendo una suspensión)

El tubo de 13 x 100 con la suspensión se tapa y se mezcla por agitación, se liberan las formas parasitarias del mucus duodenal.

Dejar reposar de 30 a 45 minutos, eliminar el sobrenadante y observar el sedimento directamente o con tinción de lugol.

Trabajar lo antes posible para aumentar las posibilidades de observar trofozoitos.



Resultados esperados

Observación de parásitos; reportar: Se observaron Fase del parásito, Género y especies del mismo y cruces de acuerdo a densidad parasitaria

Técnica de Esporulación

Las muestras de materia fecal se homogenizan con dicromato de potasio (2.5-5%) se incuban a temperatura ambiente y los ooquistes esporulados se pueden encontrar desde 5 a 15 días después.

Bibliografía

1. Diagnóstico y tratamiento de infecciones oportunistas en el paciente adulto con infección por VIH/SIDA
   Martín Lasso B. en representación de comité consultivo de SIDA, Sociedad Chilena de Infectología
   Hospital Dr. Sótero Del Rio. Noviembre del 2010
2. TOXOPLASMOSIS
   Dra. Teresa Uribarren Berrueta
   www.facmed.unam.mx/deptos/.../parasitologia/toxoplasmosis.html
   Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM
   Última revisión 20 de mayo del 2014
3. Toxoplasma gondii: Infección en perros y gatos
   Ricardo Durlach, Pablo Martino
   Del libro Temas de Zoonosis IV. Edit. Asociación Argentina de Zoonosis.
   Capítulo 42
   Agosto 2009.
4. Especies de Cryptosporidium en pacientes inmunodeficientes e inmunocompetentes de Valparaíso. Estudio descriptivo.
   Patricia Neira O., Nelson Muñoz S., Gonzalo Wilson L., otros…
   Rev.chil.infectol.vol.29 n° 1 Santiago feb.2012
5. CRIPTOSPORIDIOSIS o CRIPTOSPORISIS
   Teresa Uribarren Burreta
   www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/.../criptos**por**idiasis.html
   Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM
   Última revisión 16 de mayo 2014
6. Procedimientos Operativos Estándar
   DLNV/Laboratorio Nacional de Parasitología
   POE´s 2013
7. Tinción de Ziehl-Neelsen - Wikipedia, la enciclopedia libre
   es.wikipedia.org/wiki/Tinción_de_Ziehl-Neelsen
8. Infección por *Isospora belli* en pacientes con infección por VIH. Presentación de dos casos clínicos y revisión de literatura
   Patricia Neira O.
   Rev. chil. infectol. v.27 n.3 Santiago jun. 2010
9. Aislamiento de *Toxoplasma gondii* a partir de líquido cefalorraquídeo de dos pacientes VIH positivos
   Liliana Jazmín Cortés, Adriana Arévalo y Sofía Duque
   1023-9392/$- see from matter©2013 ACIN. Publicado por ELsevier España, S.L.
10. Diagnóstico de infección congénita
    Formato de archivo: PDF/Adobe Acrobat
    El **diagnóstico** de la infección congénita está basado en: a) serología materna; ... Las infecciones por citomegalovirus, virus de la rubéola y **T**. **gondii** pueden ...
    https://www.seimc.org/contenidos/.../ccs-2010-serologia.pdf

11. Comparación del cultivo “in vitro” de Toxoplasma gondii cepa RH en las líneas celulares Hep-2 y Vero
    Liliana Jazmín Cortés1, Carlos Ariel González2, otros…
    Noviembre 2013
12. Capítulo 33 Extracción de muestra d sangre
    María Isabel Bellón Elipe
    Unidad de Neonatología. Hospital Universitario Príncipe de Asturias: Alcalá de Henares. Madrid. España
    www.eccpn.aibarra.org/temario/seccion2/capitulo33/capitulo33.htm
    Actualización 26 de febrero 2014
13. Métodos inmunológicos en Microbiología Clínica
    asignatura.us.es/mbclinica/docs/recursos/34/tema-13.pdf
    Fecha de la última visita: 08-15-14
14. Diarrea infecciosa en VIH
    Sánchez-Martínez J. Antonio, Solís-Manzano M. Luciano
    Revista médica MD
    Volumen 3 (2); octubre-diciembre 2011
15. Manual de Procedimientos para el laboratorio de la E.E., Parasitología General
    Dra. Sara Ortigoza Gutiérrez, Dra. Martha Cruz Aguilar
    Facultad de Bioanálisis Región Veracruz
    2012.
16. Cyclospora cayetanensis: Un coccidio emergente
    Susana Archelli, Leonora Eugenia Kozubsky
    Acta bioquim.clím.latinoam.vol.46 n◦ 4 La Plata dic.2012
    www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-2957**2012**000400012...sci...
17. CDC A-Z Index
    Parasites_Cyclosporiasis (Cyclospora Infection)
    Fecha de última revisión 10 de enero 2013.
18. Co-infección por *trypanosoma cruzi* y VIH: reporte de un caso de meningoencefalitis Cochababa, Bolivia
    Faustino Suarez, Enrique Gonzalo Rojas, Roberto Israel Caero, otros…
    www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S1012-29662013000200010
    Gac Med Bol v.36 n.2 Cochabamba dic.2013
19. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana)
    Organización Mundial de la Salud
    www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/
    Nota descriptiva N° 340
    Marzo 2014
20. ENFERMEDAD DE CHAGAS
    Dra. Teresa Uribarren Berrueta
    www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/.../trypanosomosis.html
    Octubre **2012**.
21. LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE ENFERMEDAD DE CHAGAS
    InDRE-RNLSP
    2012
22. Microbiología Médica

JAWETZ; MELNICK Y ADELBERG
Edición N° 25
Editorial Mc Graw Hill
México D.F. 2010

23. Infestación por Cryptosporidium Spp e Isospora Belli ...
R Durango, K. Belandria, M. Quintero, G. García, K. López
www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0016.
Gen v.65 n.3 Caracas sep.2011
24. ISOSPOROSIS o ISOSPORIASIS - Facultad de Medicina
Dra. Teresa Urribarren Burreta
www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/.../isosporiasis.html
Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM
Última revisión febrero del 2013
25. Procedimientos Operativos Estándar
DLNV/Laboratorio de Chagas y Leishmania
2013
26. MICROSPORIDIOSIS
Laura Rosio Castañón Olivares, M.C. Javier Pineda Murillo
www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/.../microsporidiosis.html
Unidad de Micología Médica, Depto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.
Última revisión 28 noviembre 2013
27. Manual de procedimientos para el laboratorio de la E.E.
Dra. Sara Ortigoza Gutiérrez, Marta Cruz Aguilar
www.uv.mx/personal/sortigoza/files/2011/.../manual_para_gral_2012.pd...
Facultad de Bioanálisis; Región Veracruzana, 2011.

Capítulo IV

INFECCIONES PRODUCIDAS POR

Bacterias

Introducción

Las infecciones oportunistas que se presentan en las personas infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), tienen numerosas etiologías, entre las cuales las infecciones bacterianas representan un elevado porcentaje de morbi-mortalidad. La flora bacteriana normal puede volverse patógena en los pacientes que sufren el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

Las bacterias constituyen uno de los episodios de la naturaleza más grave que puedan presentarse y han sido objeto de atención especializada. Esta complicación aparece especialmente en personas hospitalizadas que suelen tener enfermedades subyacentes y las hacen más susceptibles a la invasión hematógena.

Es importante destacar que las infecciones respiratorias son una importante causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes con infecciones por el VIH, con una incidencia de 61-87/100 pacientes/año, siendo la causa más importante de ingreso en la era del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) (Edgar Ortega, 2011).

Definiciones

- **Agente etiológico**: Es el microorganismo responsable de producir una patología en el individuo susceptible.
- **Bacteria Gram Negativos:** Aquella bacteria que por la cantidad de peptidoglicano presente en su pared celular, es incapaz de retener el colorante primario (Cristal violeta) del método de coloración de Gram
- **Bacteria Gram Positivos:** Aquella bacteria que por la cantidad de peptidoglicano presente en su pared celular, es capaz de retener el colorante primario (Cristal violeta) del método de coloración de Gram
- **Condiciones microaerofílicas:** Es una atmósfera específica, establecida para el crecimiento óptimo del Campylobacter; formada por Oxigeno, Anhidro carbónico y Nitrógeno
- **FTA-Abs:** Absorción de anticuerpos fluorescentes para Treponema pallidum, prueba treponemica.
- **Pruebas Treponemicas:** Pruebas que usan el *Treponema pallidum* o componentes de éste como antígeno.
- **Pruebas no Treponemicas:** Pruebas realizadas con antígeno de naturaleza lipídico que miden tipo IgG e IgM formadas por el huésped como reacción a lipoproteínas y cardiolipinas consecuencia del daño producido.
- **Reaginas:** Anticuerpo inducido por alérgeno tipo IgE que se asemejan a los mastocitos y que se producen en el asma y fiebre del heno. En las reacciones de antígeno-anticuerpo desencadena la liberación de histamina y de otros mediadores por de granulación de los polinucleares que provocan síntomas atípicos.
- **RPR:** (Rapad Plasma Reagin) suspensión estandarizada que contiene cardiolipina, lecitina y colesterol, a la cual se le ha adicionado partículas de carbón.
- **Sepsis:** Patología compleja de respuesta sistémica con compromiso multiorgánico, secundario a la invasión del organismo por algún microorganismo.
- **VDRL:** (Veneral Disease Research Laboratory) es una suspensión alcohólica que contiene cantidades estandarizadas de cardiolipina, lecitina y colesterol.
- **CLSI**: (Clinical and Laboratory Standards Institute) Instituto de estándares clínicos y de laboratorio.
- **Cepa ATCC**: (AmericanType Culture Collection)

Bartonella spp.

Las tres especies médicamente importantes del género *Bartonella* son: *Bartonella bacilliformis* que causa la fiebre de La Oroya y la verruga peruana; *B. quintana*, causa de la fiebre quintana de la Primera Guerra Mundial y algunos casos de angiomatosis bacilar y *B*. *henselae*, que origina la linforreticulosis benigna y se ha vinculado con la angiomatosis bacilar.

El reservorio de *B. henselae* es el gato doméstico (y posiblemente sus pulgas), se considera que la tercera parte de estos pueden estar infectados. Según expertos, el contacto con dichos animales infectados a través de lesiones cutáneas es la forma en que se transmite la infección

1. Descripción de la enfermedad

Especies de *Bartonella* causan infecciones que incluyen; la enfermedad por arañazo de gato, rinitis fiebre de las trincheras, bacteriemia recidivante, endocarditis, angiomatosis bacilar (AB) y púrpura hepática bacilar. Las dos últimas manifestaciones se producen sólo en individuos inmunocomprometidos.

La angiomatosis pulmonar (AB) es causada ya sea por *Bartonella quintana o Bartonella henselae*. Veinticuatro especies y tres sub especies de *Bartonella* han sido aisladas y oficialmente reconocidas. Y ocho de estas han sido aislados de humanos. Sin embargo, sólo *B. henselae* y *B. quintana* han sido identificadas en pacientes infectados con VIH.

AB ocurre con frecuencia en la fase terminal de la infección por el VIH, en personas que median un recuento de linfocitos (CD4) < 50 células/mm^3. En personas infectados por el VIH; la bartonelosis es a menudo una enfermedad crónica. Después de meses o años, con lesiones de AB y bacteremias intermitentes.

El desarrollo de lesiones de AB causada por *B. henselae* está relacionado con la exposición a gatos que tienen como macotas las personas infectadas con VIH. En contraste, AB causado por *B quintana* está asociado con infección por pulgas y la falta de vivienda. Las pulgas sirven como vector de *B. quintana* en humanos. Para evitar la exposición a *B. henselae*- pulgas infectadas. En algunas áreas de Estados Unidos la vigilancia de *B. henselae* se basa en los gatos que personas infectadas con el VIH tienen como mascotas. (AIDS *info*, 2013).

2. Manifestaciones Clínicas

La enfermedad de Carrión

La enfermedad evoluciona en tres fases clínicas:

Fase aguda anemizante, caracterizada por fiebre, malestar, palidez, anorexia decaimiento, debilidad, sed aumentada, postración, cefaleas astenia, sudoración, dolor abdominal, coluria,

vómitos, e ictericia. Menos frecuentemente aparecen mialgias (dolores musculares), dolor intenso a nivel cervical, lumbalgia y dolores osteomioarticulares.

Pocos pacientes presentan epistaxis, lesiones dérmicas maculo papulosas tipo “roséola”.

La Fase Intercalar, usualmente asintomática y de duración variable, de meses a años y

La Fase eruptiva o crónica más conocida como Verruga Peruana y que se observa muy frecuentemente en la población preescolar y escolar de las zonas endémicas.

Se caracteriza por la presencia en cara, miembros superiores e inferiores de verrugas de diversas formas, habitualmente asintomáticas, que pueden curar en 4 a 6 meses o permanecer de por vida. La evolución se caracteriza por una fase de reblandecimiento y una etapa final de reabsorción. Las verrugas superficiales se esfacelan, sin dejar cicatriz, son frecuentes el sangrado de las verrugas, fiebre, dolores articulares, mialgias, prurito y adenopatías

Enfermedad por arañazo de gato

Enfermedad por arañazo de gato es causada por una infección por Bartonella henselae y se manifiesta por la presencia adenopatía dolorosa, que puede durar 2-3 meses.

La infección es autolimitada, los ganglios linfáticos pueden supurar y la mayoría de los pacientes pueden permanecer asintomáticos o sin fiebre.

Otras presentaciones incluyen fiebre de origen desconocido, encefalopatía y neurorretinitis.

La *Bartonella henselae* puede estar asociada con bacteriemia, a angiomatosis bacilar y a peliosis hepática, bacteriemia y endocarditis en pacientes con VIH.

Los síntomas pueden incluir fatiga, dolores de cabeza, fiebre, pérdida de memoria, desorientación, insomnio y pérdida de coordinación.

Angiomatosis bacilar

Esta patología es causada por la Bartonella henselae y Bartonella quintana, es una enfermedad proliferativa vascular que implica principalmente a la piel y otros órganos. La enfermedad fue descrita por primera vez en pacientes con sida y los receptores de trasplantes de órganos. Es una enfermedad grave, progresiva y diseminada sobre todo en pacientes con VIH. El diagnóstico diferencial incluye el sarcoma de Kaposi, granuloma piógeno, hemangioma, verruga peruana, tumores subcutáneo. Las lesiones pueden afectar a la médula ósea, el hígado, el bazo o los ganglios linfáticos.

Peliosis hepática

La peliosis hepática también causada por Bartonella henselae y se define como una proliferación vascular de los capilares sinusoide hepático resultando en espacios llenos de sangre en el hígado, sobre todo en pacientes VIH y en personas receptores de trasplantes de

órganos. Peliosis hepática pueden estar asociados por peliosis del bazo, en pacientes con VIH puede estar asociada a angiomatosis bacilar de la piel.

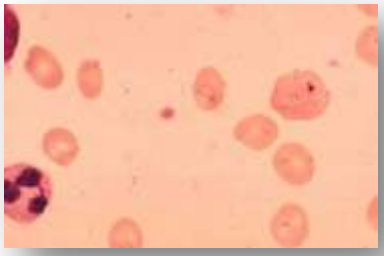
Fiebre de las trincheras

Fiebre de las trincheras, también conocida como fiebre de 5 días o la fiebre quintana es la manifestación inicial de la infección por Bartonella quintana. Las manifestaciones clínicas van desde la infección asintomática hasta una enfermedad grave. Las manifestaciones clásicas incluyen febril, cefalea, mareos

3. Diagnóstico de laboratorio

Bartonella son bacilos Gram negativos pleomórficos, proliferación lenta, y difíciles de aislar en el laboratorio, bacteria intracelular facultativa. Se les identifica en tejidos infectados teñidos con la técnica de impregnación argéntica de Warthin-Starry. (Jawetz 2010)

El diagnóstico puede ser confirmado por biopsia de tejido. Las lesiones de BA son caracterizadas por proliferación vascular, y coloraciones de plata modificada (tinción de Warhin-Starry), usualmente demostrando numerosos bacilos.



La coloración de Ziehl Neelsen y Gram no se recomiendan (AIDS *info*, 2013). En la fase aguda puede realizarse por frotis de sangre periférica teñido con Giemsa, donde se puede observar los bacilos intracelulares Para su aislamiento se requiere cultivos especiales que contengan agar, proteasas, peptona, aminoácidos y sangre. Su temperatura óptima es de crecimiento es de 19-29°C. (César Henríquez, 2012)

3.1 Muestras clínicas/ biológicas para diagnóstico

- ✓ Biopsia
- ✓ Sangre
- ✓ Cultivo de lesión

3.2 Métodos de diagnóstico

A. Examen Directo

A.1 Frotis de sangre periférica

El diagnóstico de la fase aguda puede realizarse por frotis de sangre periférica teñido con Giemsa.

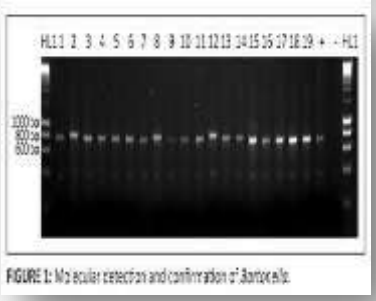
Se puede observar los bacilos intracelulares

A.2 Cultivo (hemocultivos)

Especies de *Bartonella* se pueden aislar de la sangre (con dificultad), en la fase crónica de la enfermedad donde se presenta bacteriemia. Los microorganismos se han aislado a partir de tejido en solo unos pocos laboratorios debido a la naturaleza exigente de *Bartonella.* (AIDS *info*, 2013)

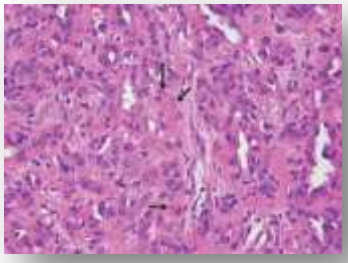
A.3 Biología molecular

Los métodos de reacción en cadena de la polimerasa se han desarrollado para la identificación de especies de Bartonella, pero no están ampliamente disponibles.



A.4 Biopsia

El diagnóstico puede ser confirmado por examen de biopsia, las lesiones de BA son caracterizadas por proliferación vascular. En la coloración de plata modificada (Warthin-Starry) usualmente se observan numerosos bacilos.



B. Examen Indirecto

B.1 Pruebas serológicas

Varios laboratorios ofrecen pruebas serológicas pero en ninguna de estas se ha comprobado la sensibilidad o especificidad. (AIDS *info*, 2013)

Bacterias que producen infecciones entéricas

Son muchos los microorganismos que causan diarrea crónica en personas VIH positivos (virus, parásitos, hongos, etc.).

Entre las bacterias que más afectan a estos pacientes podemos mencionar: *Salmonella, Shigella, Campylobacter, Escherichia coli* entre otros.

Salmonella, *Shigella* y *E. coli*, pertenecen a la familia de las Enterobacteriaceae,

Las Enterobacteriaceae son un grupo heterogéneo y extenso de bacilos gramnegativos cuyo hábitat natural es el intestino del ser humano y de los animales. La familia comprende muchos géneros (*Escherichia, Shigella, Salmonella, Enterobacter, Klebsiella, Serratia, Proteus* y otros más). Algunos microorganismos entéricos como la *E. coli* son parte de la microflora normal y en forma incidental producen enfermedad, en tanto que otros como la salmonelas y shigelas, son patógenas para el ser humano. Las Enterobacterias son anaerobias o anaerobias facultativas, fermentan una amplia gama de hidratos de carbono, producen diversas toxinas y otros factores de virulencia. (Jawtz 2010)

Las shigelas tienen como hábitat natural el tubo digestivo de seres humanos y otros primates, donde producen disentería bacilar; la invasión sanguínea es poco frecuente. Las shigelas son muy transmisibles; la dosis infecciosa es del orden de 10^3 microorganismos (por lo general es de 10^5 o 10^8 para salmonelas y vibrios). Con la autolisis todas las shigelas liberan su lipopolisacárido tóxico. Esta endotoxina probablemente contribuye a la irritación de la pared intestinal.

El grupo Salmonella-Arizona, suelen ser patógenas en el ser humano o los animales cuando se adquieren por vía oral, son transmitidas de los animales al ser humano, donde producen enteritis, infecciones sistémicas y fiebre entérica. Los microorganismo originalmente descritos en el género "*Arizona*" se incluyen como sub especies del grupo *Salmonella*. La dosis infecciosa media para producir infección manifiesta o asintomática en el ser humano es de 10^5 a 10^8 salmonelas (pero tal vez un mínimo de 10^3 m.o. para *Salmonella typhi*). La fiebre tifoidea es producido solo por alguna de las salmonelas de las cuales *Salmonella typhi*, es la más importante.

Campylobacter jejuni y *C. coli* han surgido como microorganismos patógenos humanos frecuentes y son causa principalmente de enteritis y a veces de infección generalizada. *C. jejuni* y *C. coli* producen infecciones que clínicamente son indistinguibles y los laboratorios por lo general no diferencian las dos especies. Son tan frecuentes como las salmonelas y shigelas.

C. Jejuni y los otros Campylobacter son bacilos gramnegativos con formas de coma, S, o de "ala de gaviota". Son móviles con un solo flagelo y no forman esporas. (Jawetz, 2010).

1. Descripción de la enfermedad

Las posibilidades de diarrea por bacterias entéricas gram negativas son 10 veces más altas en adultos infectados por el VIH que en la población general pero disminuye cuando el paciente está con terapia antirretroviral (TAR).

El riesgo de diarrea bacteriana varía en función de CD4 de los linfocitos T (CD4), es mayor en las personas con SIDA o en personas con recuentos de < 200 cel. /mm^3. Las bacterias entéricas que rutinariamente son aisladas de personas infectados por el VIH son *Salmonella* (particularmente *Salmonella* entérica serotipos Typhimurium y Enteritidis), *Shigella* y *Campylobacter*, la *Escherichia coli*, particularmente entero-agregativa, contribuye a la carga de la enfermedad diarreica. Pero su papel es poco conocida ya que el diagnóstico requiere un laboratorio especializado. La infección por *Clostridium difficile* es común en pacientes infectados por el VIH, aunque no está claro si la inmunosupresión se asocia con mayor riesgo.

La fuente más común de infección por bacterias entéricas en personas infectadas por el VIH es ingestión de comida o agua contaminada, actividad sexual por contacto directo o indirecto de exposición fecal-oral, también incrementa el riesgo de infectarse especialmente con *Shigella* y *Campylobacter.* (AIDS *info*, 2013)

2. Manifestaciones Clínicas

La shigelosis es una enteritis aguda que presenta un período de incubación de 1 - 5 días.

Las manifestaciones clínicas oscilan desde una infección asintomática o una diarrea leve hasta cuadros diarrea acuosa con fiebre, dolor abdominal tipo cólico, tenesmo y evacuaciones con sangre, moco y pus (disentería bacilar), náusea con /sin vómito.

La enfermedad se autolimita y llega a curar en pocos días, aunque puede prolongarse durante una a cuatro semanas en los niños y ancianos, en quienes la deshidratación, los trastornos del equilibrio ácido-base y el estado de choque pueden resultar letales.

Las complicaciones no son frecuentes. Cabe destacar el síndrome urémico hemolítico. También se han reportado desequilibrio hidroelectrolítico, convulsiones en niños pequeños, megacolon tóxico, prolapso rectal, bacteriemia, sepsis. Cerca del 3% de las personas con infección por *S. flexneri* y con una predisposición genética pueden desarrollar el síndrome de Reiter.

Salmonella entérica serotipos *Typhimurium* y *Enteritidis* es una diarrea secretora acuosa con moco y sangre, y febrícula. Un gran porcentaje de pacientes presentan lactoferrina fecal detectable (un indicador sensitivo de leucocitos fecales) y niveles elevados de IL-8 en las

heces. Datos de un estudio realizado por Eslava muestran que tiene efecto estimulante sobre macrófagos e induce en estos, la expresión de interleucinas pro inflamatorias. Esto sugiere que la infección por EAEC puede estar acompañada de una forma sutil de inflamación de la mucosa.

C. jejuni es una de los principales agentes causales de gastroenteritis a nivel global, se han identificado varias especies de *Campylobacter*, entre ellas *C. concisus*, *C. upsaliensis* y *C. ureolyticus*, asociadas a varias enfermedades gastrointestinales, principalmente gastroenteritis, enfermedad inflamatoria intestinal y periodontitis.

Las manifestaciones clínicas de las salmonelosis se presentan básicamente bajo tres modalidades: las denominadas fiebres entéricasentre las cuales la más común es la fiebre tifoidea producida por la *Salmonella typhi*; las gastroenteritis producidas por varios tipos, entre ellas la *S.typhimurium*; y la forma septicémica, caracterizada por la bacteriemia asociada a lesiones focales debida frecuentemente a la *S.choleraesuis*.

Dentro de las manifestaciones clínicas comunes está la fiebre acompañada de dolor abdominal, evacuaciones intestinales frecuentes, líquidas, de aspecto verdoso, fétidas, mucoides y en ocasiones con estrías de sangre.

En niños desnutridos puede observarse la diseminación hematógena dando lugar a bacteriemias con compromiso de otros órganos tales como las meninges, el oído, los pulmones, los riñones y el hueso

Manifestaciones clínicas en la Fiebre entérica: las características principales de esta enfermedad; como son la fiebre y el dolor abdominal, son variables. La fiebre es un signo inicial en más de 75% de los casos, mientras que el dolor abdominal solo aparece entre el 20 – 40% de los pacientes.

El periodo de incubación para la S. typhi oscila entre 3 y 21 días. Esta variabilidad depende del tamaño del inoculo inicial y del estado inmunitario y de la salud del huésped. El síntoma más sobresaliente es la fiebre prolongada que varía entre 38.8° a 40.5°.

3. Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de infecciones producidas por bacterias entéricas Gram negativas se realiza a través del cultivo de heces o sangre.

La incidencia de gastroenteritis bacteriemias asociadas con *Salmonella* es alta en pacientes infectados con el VIH. Los cultivos de sangre se pueden realizar en cualquier paciente que presente diarrea y fiebre. Para las shigelas los cultivos de sangre (hemocultivos) son más útiles pero menos propensos a ser positivos que salmonelosis.

Campylobacter puede crecer en medios usuales para hemocultivos, sin embargo es poco probable que sean aislados en ese tipo de muestra por las condiciones de incubación que se dan a los medios de cultivo.

Generalmente la muestra utilizada para su aislamiento es la de heces.

Se considera como un organismo fastidioso por sus requerimientos para ser aislado. (AIDS *info*, 2013)

3.1 Muestras clínicas/biológicas para diagnóstico

- ✓ Heces
- ✓ Sangre

3.2 Métodos de diagnóstico

A. Examen Directo

A.1 Cultivo para Enterobacterias

Se basa en el aislamiento para identificación del agente causal de la enfermedad o infección generado al paciente, “es el método Estándar de Oro”, con una alta sensibilidad y 100% confirmatoria porque determina la presencia del agente infeccioso. Con el aislamiento podemos determinar, género y especie, perfiles de resistencia, serotipificación para vigilancia epidemiológica.

A.1.2 Shigella

Las shigelas son anaerobias facultativas pero se son convexas, circulares, transparentes, con bordes intactos, alcanzan un diámetro de casi 2mm en 24 horas; no móviles y no fermentan la lactosa, pero si fermentan otros hidratos de carbono, produciendo ácido pero no gas. No producen H_2S. La *S. dysenteriae* tipo 1 (bacilo deshiga) produce una exotoxina termolábil lo mismo que la toxina Shiga de *E. coli*, afecta tanto al intestino como al sistema nervioso central. (Jawetz 2010).

A.1.3 Salmonella

Las salmonelas tienen una longitud variable. La mayor parte de las cepas son móviles con flagelo perítrico; se multiplican fácilmente en medios simples, pero casi nunca fermentan lactosa ni sacarosa, de manera característica fermentan glucosa y manosa.

Son productoras de gas, ácido sulfhídrico (H_2S) y son patógenas para el ser humano o los animales cuando se ingieren. (Jawetz 2010).

Las colonias sospechosas de medios sólidos se identifican por los tipos de reacción bioquímica y se confirman a través de antisueros específicos (pruebas de aglutinación).

A.1.3 Aislamiento en diferentes clases de medios de cultivo

Cultivos en medio diferencial

El medio EMB, Mac Conkey o desoxicolato permite la detección rápida de microorganismos que no fermentan lactosa. Los microorganismos grampositivos son inhibidos en cierto grado. El medio de sulfito de bismuto permite la detección rápida de salmonelas que forman colonias negras a partir de la producción de H_2S.

Cultivos en medios selectivos

La muestra de heces se siembra en placa de agar salmonela-shigela (SS), agar entérico Hektoen, XLD o agar desoxicolato-citrato, que favorece la multiplicación de las salmonelas y las shigelas más que otras enterobacterias.

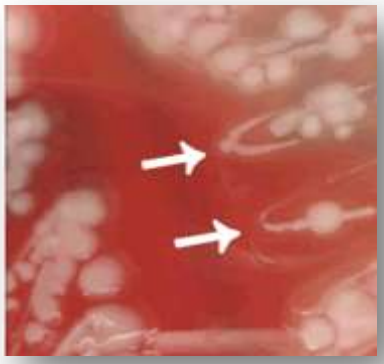
Cultivos de enriquecimiento

La muestra de heces, por lo general también se coloca en caldo selenito o de Tetrationato, los cuales inhiben la replicación de las bacterias intestinales normales y permiten la multiplicación de las salmonelas. Se agrega 4 gotas de Yodo de Kauffman inmediatamente después de sembrada la muestra. Incubar durante 24 horas, este se resiembra en placa con medios diferenciales y selectivos.

A.1.4 Identificación bioquímica

Las colonias sospechosas de medios sólidos se identifican por los tipos de reacción bioquímica y pruebas de aglutinación con sueros específicos.

A.1.5 Pruebas de sensibilidad antimicrobiana



La determinación de los patrones de sensibilidad antimicrobiana, se puede llevar a cabo por diferentes métodos, de acuerdo con las facilidades de cada laboratorio:

A.1.5.1 Kirby Bauer (difusión en agar)

El método de se realiza en agar Mueller Hinton, En los cuales se adicionan discos que nos permiten detectar mecanismos de resistencia natural e inducida

A.1.5.2 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

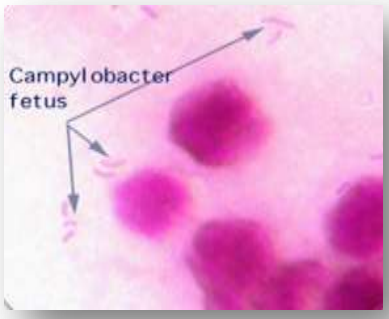
- Macrodilución en tubo
- Microdilución en placa
- Prueba epsilon o E-test

A los aislamientos fecales de *Salmonella* y *Shigella* se les prueba: ampicilina, una fluoroquinolona y trimetroprin sulfa-metoxazole, los cuales pueden ser reportados de manera rutinaria. Con los discos de amoxicilina clavulanico, cefotaxime y ceftazime se identifican las β-lactamasas de expectro extendido (BLEE).

Para los aislamientos extra intestinales de *Salmonella spp*. Se utilizan una cefalosporina de tercera generación y cloranfenicol, si se solicita. (CLSI, 2013)

A.2 Campylobacter

A.2.1 Coloración de Gram



Los frotis de las heces con tinción de Gram pueden mostrar la presencia de- bacilos típicos en forma de “ala de gaviota”.

A.2.2 Cultivo

Las característica de cultivo son muy importantes para la identificación de *C. jejuni* y los otros *Campylobacter*. Se necesitan medios selectivos y la

incubación debe ser en una atmósfera con poco O_2 (O_2 al 5%) con CO_2 añadido al 10% y 85% de nitrógeno. La incubación de las placas primarias para el aislamiento de C. jejuni debe ser a una temperatura de 42°C. Aunque *C. jejuni* se multiplica bien a una temperatura de 36 a 37°C, la incubación a 42°C impide la proliferación de la mayor parte de las otras bacterias presentes en las heces. Entre los medios de cultivos más utilizados podemos mencionar el de Skirrow, Campy-Bap y Butzler, a los que se les agrega suplemento conteniendo polimixina, vancomicina y trimetoprim para inhibir otras bacterias. Las colonias tienden a ser incoloras o grises. Pueden ser traslucidas, difusas o redondas y convexas, a veces los dos tipos de colonia aparecen en una placa.

Para la identificación de *C. jejuni* y otros *Campylobacter* patógenos se utilizan las pruebas de oxidasa y catalasa que resultan ser positivas, los *Campylobacter* no oxidan ni fermentan carbohidratos. En los cuadros 7 y 8 se describe crecimiento por temperatura y diferenciación por pruebas bioquímicas.

B. Examen Indirecto

B.1 Serología para Shigella

Las personas normales a menudo tienen aglutinina contra varias especies de Shigella. Sin embargo las determinaciones seriales de títulos de anticuerpos pueden mostrar una elevación del anticuerpo específico.

B.2 Serología para Salmonella

Se utilizan técnicas serológicas para identificar cultivos desconocidos con sueros conocidos, también se puede utilizar para determinar títulos de anticuerpo, aunque estas últimas no son muy útiles para el diagnóstico de las infecciones por Salmonella. (Jawetz, 2010).

B.2.1 Identificación por temperatura de incubación y pruebas bioquímicas

Cuadro 7. Identificación de *Campylobacter spp* por temperatura
(María Realpe, 2011)

	25°C	37°C	42°C
***C. jejuni* subsp. Jejuni**	**-**	**+**	**+**
***C. jejuni* subsp. Doylei**	**-**	**+**	**-**
C. coli	**-**	**+**	**+**
***C. fetus* subesp Fetus**	**+**	**+**	**d**
***C. fetus* subesp Veneralis**	**+**	**+**	**-**
C. lari	**-**	**+**	**+**
C. upsaliensis	**-**	**+**	**+**
C. hyointestinalis	**d**	**+**	**d**
***C sputorum* subesp sputorum**	**-**	**+**	**+**
***C sputorum* subesp bubulus**	**d**	**+**	**-**
C. curvus	**-**	**+**	**+**
C. rectus	**-**	**+**	**d**
C. showae	**-**	**-**	**+**

Cuadro 8. Identificación de Campylobacter spp. por pruebas bioquímicas

	C. fetus		***Campylobacter hyointestinalis***	***C. sputorum***		***C. curvus***	***C. rectus***	***C. chowae***
	fetus	veneralis		sputorum	bubulus			
Hidrólisis del Hipurato	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+			
Producción de catalasa	+	+	+	-	-	-	-	+
Reducción de Nitritos	-	-	-	+	+	+	+	+
Producción de H_2S	-	-	+	+	+	+	+	+
Resist. a Ác. nalidixico	R	d	R	S	R	S	S	R
Resist. a Cefalotina	S	S	S	S	S			S
Indoxil Acetato	-	-	-	-	-	+	+	+
Glycina 1%	+	-	+	+	+	+	+	V

S: sensible, R: resistente; d: débil; V: variable; TTC: cloruro de trifenil tretazolium

Bacterias que producen neumonías

Las neumonías bacterianas adquiridas en la comunidad son causa frecuente de morbi-mortalidad en la población general. En personas VIH positivos la incidencia de esta enfermedad se ve aumentada debido a la disminución de recuento linfocitario de células CD4, entre otras causas.

Son varios los agentes etiológicos que se ven involucrados en el desarrollo de esta patología entre los más importantes podemos mencionar: *Streptococcus pneumoniae*, especies de *Haemophilus* y bacterianos atípicos como *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* y especies de *Chlamydophila.* El *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA), puede también ser considerado como una agente etiológico potencial.

La frecuencia *de Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* como patógenos adquiridos en la comunidad es mayor en los individuos infectados por el VIH que en los no infectados.

Staphylococcus aureus meticilina-resistente (SAMR), puede ser considerado como un agente etiológico potencial de neumonía, dado que brotes comunitarios de SAMR han sido diagnosticados en los hombres que tienen sexo con hombres por la aportación nasal de SAMR que es más común en personas infectados por VIH, particularmente, en los que tienen recuentos más bajos células CD4. (AIDS *info*, 2013)

Streptococcus pneumoniae

Es un habitante normal de la nasofaringe humana; su número es limitado por la competencia con otros microorganismos de la nasofaringe e igualmente por los mecanismos de defensa específicos del hospedero. La enfermedad generalmente se asocia con la adquisición de una nueva cepa, seguida por la alteración de la microbiota.

Por lo tanto, el estado inmune del hospedero en el momento de la colonización, así como la virulencia de la nueva cepa adquirida determinarán si el neumococo lo invadirá o no

Los neumococos son bacterias Gram positivas, encapsuladas, con morfología de diplococos lanceolados, con 0,5 a 1,25 µm de diámetro, arregladas en pares o en cadenas cortas, inmóvil, no formadora de esporas; típicamente crecen de modo difuso en caldo con suero y requieren medios complejos para su desarrollo.

El cultivo en agar sangre ovina, presenta colonias lisas, pequeñas, brillantes, circundadas por un halo verde de α hemólisis. Es soluble en bilis y sensible a la Optoquina (SIREVA II, 2011).

Haemophilus spp.

Haemophilus influenzae es patógeno de animales y de humanos; forma parte de la flora de las superficies mucosas de las vías respiratorias superiores, de modo que los animales y humanos actúan como hospederos naturales de una gran variedad de especies del género; entre estas, H. influenzae es la más importante desde el punto de vista clínico. (SIREVA II, 2011).

El género *Haemophilus* está constituido por bacilos o cocobacilos Gram negativos, generalmente menores de 1 µm de ancho y de longitud variable; a veces forman filamentos largos con marcado pleomorfismo. Son inmóviles, no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos. Se desarrollan a una temperatura óptima de 35-37ºC en atmósfera del 5% de CO2. Son organismos quimiorganotróficos exigentes: requieren del factor X (hemina), que es un pigmento que contiene hierro y suministra los compuestos tetrapirrólicos necesarios para la síntesis de citocromos y enzimas y del factor V (NAD), que es una coenzima que participa en las reacciones de óxido reducción del metabolismo.

Staphylococcus aureus

Algunas especies son miembros de la microflora normal de la piel y las mucosas del ser humano; otros producen supuración formación de abscesos, diversas infecciones piógenas e incluso septicemia mortal.

S. aureus es coagulasa-positiva, lo que lo distingue de otras especies. *S aureus* es un patógeno importante en el ser humano

Los estafilococos son células esféricas de aproximadamente 1 µm de diámetro, grampositivas por lo general dispuestas en racimos irregulares parecidas a las uvas. Crecen rápidamente en muchos tipos de medios, fermentan carbohidratos y producen pigmentos que varían de un color blanco hasta un amarillo intenso.

Se desarrollan a una temperatura de 35 a 37°C, pero forman pigmento mejor a temperatura ambiente (20 a 25°C).

1. Descripción de la enfermedad

Las enfermedades respiratorias bacterianas incluyendo otitis bronquitis sinusitis y la neumonía; son algunas de las consecuencias infecciosas más comunes en las personas con VIH, se producen con una mayor frecuencia en pacientes inmunosuprimidos de linfocitos T CD4 (CD4)

Las neumonías bacteriana son causa frecuente de morbilidad asociada al VIH, (se pueden presentar 2 o más episodios en un período de 1 año); es una enfermedad determinante del SIDA. La incidencia de la neumonía bacteriana es mayor en las personas infectados por el VIH que en los que no lo están. Recientemente, la incidencia de neumonía bacteriana se redujo de 22,7 a 9,1 episodios por 100 personas al año, debido a la terapia antirretroviral (TAR).

La neumonía bacteriana suele ser la primera manifestación subsecuente de la infección por VIH, puede ocurrir en cualquier etapa de la enfermedad y con cualquier recuento de CD4.

Las altas tasas de neumonía bacteriana en las personas infectadas por el VIH, probablemente son el resultado de múltiples factores, incluyendo disminución de las células B que reduce la capacidad de producir anticuerpos específico; el deterioro de la función de los neutrófilos o el números de estos, o ambos, y los factores, tales como el uso de drogas inyectables, que están asociados con la infección por VIH, el tabaquismo y la hepatitis viral crónica. (AIDS *info*, 2013)

2. Manifestaciones Clínicas

Streptococcus pneumoniae

La presentación clínica de la neumonía neumocócica en pacientes con infección por VIH es similar al de los pacientes sin esta enfermedad de base, las principales características clínicas que caracterizan a esta infección son la aparición repentina de los síntomas con presentación de horas o pocos días después de la aparición de fiebre, tos productiva esputo purulento y disnea.

Las personas con infección por VIH parecen tener una predisposición a la neumonía neumocócica, incluso en las primeras etapas de la infección por VIH cuando el recuento de células CD4 es relativamente alto, los hallazgos de laboratorio que caracterizan por leucocitosis y un recuento de células CD4 que puede ser relativamente alto, aunque la incidencia se incrementa con la última etapa de la enfermedad.

La radiografía de tórax tiende a mostrar la enfermedad focal, como la consolidación lobar, a veces con un derrame pleural. Sin embargo, puede haber una variedad de diferentes hallazgos radiológicos. Por definición casi todas las personas presentan infiltrado pulmonar. (Bartlett, 2012)

Haemophilus influenzae

La tasa de infección por el *H. Influenzae* en las personas infectadas por el VIH es mucho más elevada que la observada en la población general, y su gravedad es también mucho mayor.

La clínica de esta infección es de aparición aguda y radiológicamente remeda a las imágenes observadas en la neumonía producida por el *N. Jirovecii*. El diagnóstico correcto es por medios de laboratorio ya que el cuadro clínico es similar al resto de las neumonías causadas por otros agentes.

Staphylococcus aureus

La neumonía por él *Staphylococcus aureus* es precedida comúnmente por un cuadro de influenza, generalmente se presenta durante la adolescencia o la adultez temprana y su presentación clínica consiste en un cuadro de sepsis grave con neumonía necrotizante, la tasa de mortalidad ha sido reportada en 30% al 50%. (Bartlett, 2012)

3. Diagnóstico de Laboratorio

3.1 Muestras clínicas/biológicas para diagnóstico

- ✓ Sangre (hemocultivo)
- ✓ Líquido pleural

3.2 Métodos de diagnóstico

A. Examen Directo

A.1 Cultivo

A.1.1 Streptococcus pneumoniae

Existen numerosas bases comerciales que pueden ser usadas para preparar los medios enriquecidos con sangre, las más conocidas son: Casman, Columbia, la base de agar tripticasa soya con levadura. Paralelamente existen caldos de cultivo que favorecen la buena recuperación de *S. pneumoniae*, como el caldo Todd Hewitt, la infusión cerebro corazón y el caldo enriquecido de tioglicolato.

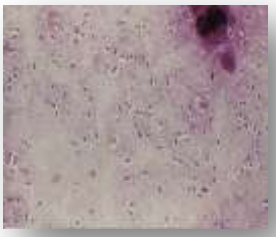
S. pneumoniae es anaerobio facultativo; la atmósfera de CO_2 al 5-7%, favorece el crecimiento. El rango de temperatura a la cual se debe incubar *S. pneumoniae* es de 30 -36°C.

En agar sangre bovina al 5%; las colonias jóvenes de neumococos son abultadas, rodeadas de una zona verde de hemólisis parcial (hemólisis α), pero después de 24 a 48 horas de cultivo, las colonias se achatan y puede formarse una depresión en el centro de cada una de ellas (apariencia umbilicada) (SIREVA, 2011)

A.1.2. Identificación de aislamiento

Las pruebas de Optoquina y Solubilidad en bilis se fundamentan en diferenciar el *S. pneumoniae* de otras especies de Streptococcus**.**

A.1.2.1 Coloración de Gram



A.1.2.2.Prueba de Optoquina

La optoquina (hidrocloruro de etilhidrocupreína), es un compuesto al cual *S. pneumoniae* es susceptible en bajas concentraciones (5µg o concentraciones menores), por lo tanto inhibe su crecimiento.

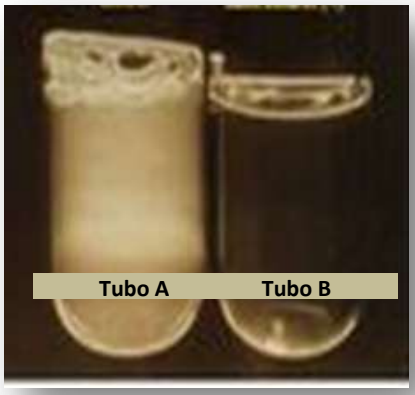
Cada vez que realice la prueba debe incluir cepas control. (Preferible cepas ATCC, para:

Control positivo: *S. pnenumoniae* ATCC 49619

Control negativo: *Streptococcus* del grupo viridans (SIREVA, 2011)

A.1.2.3.Solubilidad en bilis

Las sales de bilis específicamente el desoxicolato y el taurocolato de sodio tienen la capacidad de lisar *S. pneumoniae*.



Cada vez que realice la prueba debe incluir cepas control. (Preferible cepas ATCC, para:

Control positivo: *S. pnenumoniae* ATCC 49619

Control negativo: Streptococcus del grupo viridans

(SIREVA, 2011)

A.1.3 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

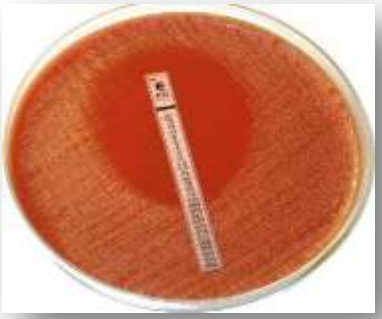
En algunos casos, los neumococos presentan resistencia no sólo a la penicilina sino también a cefalosporinas, incluyendo las de tercera generación; la aparición de neumococos multirresistentes es un problema alarmante.

Con objeto de continuar tratando a los pacientes con enfermedades neumocócicas en forma adecuada, los clínicos deberán cambiar, en algunas comunidades, sus esquemas tradicionales de tratamiento. Estos cambios solo podrán ser dirigidos en forma correcta mejorando la vigilancia epidemiológica para conocer y mantenerse al tanto de los patrones de susceptibilidad antimicrobiana regionales, reevaluando los antibióticos de primera y segunda elección para cada infección neumocócica. (SIREVA II, 2011).

La determinación de los patrones de sensibilidad antimicrobiana de *S. pneumoniae*, ya sea en forma cualitativa o cuantitativa, se puede llevar a cabo por diferentes métodos, de acuerdo con las facilidades de cada laboratorio:

A.1.3.1 El método de Kirby Bauer

Se realiza en agar Mueller Hinton con sangre de cordero al 5%.



En los cuales se adicionan discos que nos permiten detectar mecanismos de resistencia natural e inducida

A.1.3.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

- Macrodilución en tubo
- Microdilución en placa
- Prueba epsilon o E-test

S. pneumoniae susceptible a levofloxacina es predecible que sea susceptible a gemifloxacin y moxifloxacino. Sin embargo, *S. pneumoniae* susceptible a la gemifloxacina o la moxifloxacina no se puede predecir que es susceptible a la levofloxacina.

En aislamientos de S*. pneumoniae* de líquido cefalorraquídeo, la penicilina y cefotaxima, ceftriaxona, o meropenem deben ser probados por la concentración mínima inhibitoria. Estos aislamientos también pueden ser probados con vancomicina utilizando el método de concentración mínima o difusión en disco.

Con los aislados de otros sitios, se puede utilizar la prueba de detección de disco de oxacilina. Si el tamaño de la zona de oxacilina es ≤ 19 mm, se considera

sensible a penicilina, cefotaxima, ceftriaxona, o meropenem y posteriormente deberá determinarse por concentración mínima. (CLSI, 2013)

A.2 Haemophilus

Haemophilus es nutricionalmente fastidioso por lo que requiere de medios enriquecidos con hemina (factor X) y con nicotinamida adenina dinucleótido (NAD o factor V), (agar chocolate suplementado), una temperatura de 35 °C y una atmósfera de 5-10% de CO2.

El género *Haemophilus* es muy susceptible a las temperaturas extremas, por lo tanto las muestras clínicas de ser enviados al laboratorio sin refrigerar**.**

La mayoría de las infecciones invasoras son causadas por *H. influenzae* serotipo b, que crece sobre agar chocolate, presenta unas colonias típicas de color gris, con un olor característico y que pueden ser identificadas fácilmente a través de pruebas bioquímicas, se describen en el cuadro 9.

A.2.1 Identificación de aislamiento

A.2.1.1 Coloración de Gram a partir de cultivo

Se observe cocobacilos Gram negativos pleomórficos.

A.2.1.2.Prueba de Catalasa

Esta prueba identifica bacterias que producen la enzima catalasa.

El peróxido de hidrogeno a través de la enzima catalasa se convierte en oxígeno y agua. La liberación del oxígeno se puede observar a simple vista por la formación de burbujas, cuando el aislamiento testado posee esta enzima.

Cada vez que realice la prueba debe incluir cepas control. (Preferible cepas ATCC, para:

Control positivo: *S. aureus* ATCC 25923

Control negativo: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

A.2.1.3 Prueba de Oxidasa

Esta prueba identifica bacterias que producen la citocromo oxidasa.

El tetrametil-parafenilendiamina dihidrocloruro al 1% se emplea para la determinación de la citocromo oxidasa.

En su estado reducido es incoloro pero en la presencia de la enzima citocromo oxidasa del microorganismo y el oxígeno atmosférico, se oxida y da un color morado o purpura de indofenol.

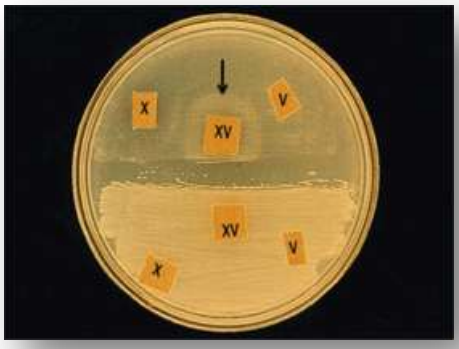
Cada vez que realice la prueba debe incluir cepas control. (Preferible cepas ATCC, para:

Control positivo: *P. aeruginosa* ATCC 27853

Control negativo: *E. coli* ATCC 25922

A.2.1.4 Determinación de factores X y V

Es una prueba para comprobar el requerimiento del factor V y X indispensable para el crecimiento de *Haemophilus.*

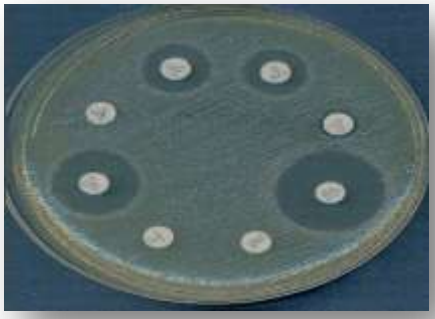


Control positivo*: H. influenzae* ATCC 49247 (requiere los factores V y X)

Control negativo*: H. parainfluenzae*

Cada vez que realice la prueba debe incluir cepas control. (Preferible cepas ATCC)

A.2.2 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana



La resistencia de *H. influenzae* a los antimicrobianos es un problema clínico y epidemiológico de dimensiones internacionales. Por este motivo, además de la identificación de *H. influenzae,* es imprescindible realizar las pruebas in vitro que demuestren la susceptibilidad a la acción de antimicrobianos. Se han informado cepas multirresistentes, aunque las resistentes al cloranfenicol son poco comunes.

La resistencia más importante es la dirigida a los antimicrobianos beta-lactámicos, por lo tanto todos los laboratorios deben realizar la prueba de la **beta lactamasa** a todos los aislamientos de *H. influenzae.*

La determinación de los patrones de sensibilidad antimicrobiana de *Haemphilus spp.*, ya sea en forma cualitativa o cuantitativa, se puede llevar a cabo por diferentes métodos, de acuerdo con las facilidades de cada laboratorio:

A.2.2.1 **El método de Kirby Bauer** se realiza en Haemophilus Test Medium (HTM)
Adicionar discos que nos permiten detectar mecanismos de resistencia natural e inducida

A.2.2.2 **Determinación de la concentración inhibitoria mínima** (CIM)

- Macrodilución en tubo
- Microdilución en placa
- Prueba epsilon o E-test

Para los aislamientos de *H. influenzae* de LCR, se reportan de forma rutinaria, resultados de las pruebas con: ampicilina, una cefalosporinas de tercera generación, cloranfenicol y meropenem.
La amoxicilina-ácido clavulánico, azitromicina, cefaclor, cefixima, cefuroxima, claritromicina, loracarbef y telitromicina son agentes orales que se pueden utilizar como terapia empírica para las infecciones del tracto respiratorio.
En la mayoría de los casos, una prueba β -lactamasa directa puede proporcionar un medio rápido para la detección de resistencia a la ampicilina y amoxicilina.

A.2.3. Prueba presuntiva para detección de resistencia a los antimicrobianos beta-lactamicos.

A.2.3.1. Producción de enzima ß-lactamasa

Hay varias pruebas para demostrar la producción de β-lactamasas, la mayoría basadas en la determinación de la producción de ácido penicilinóico.

Las pruebas utilizadas comúnmente para ello son:

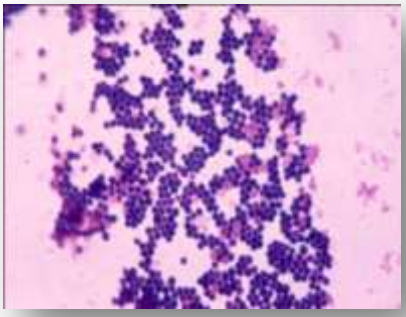
- **Método acidométrico.** Denota un cambio de pH que se visualiza por un cambio de color del indicador rojo de fenol.
- **Método yodométrico.** Este método se basa en que el ácido penicilinóico producido por la acción de la enzima β- lactamasa sobre el anillo betalactámico de la penicilina reduce el yodo a yoduro decolorando la mezcla del almidón-yodo empleada para visualizar la reacción.
- **Método de la cefalosporina cromogénica (cefinasa)** Se basa en el cambio de color de una cefalosporina incolora a un color rosa, en presencia de la enzima β-lactamasa.

La mayoría de los laboratorios han adoptado esta última prueba por la facilidad del procedimiento y lo económica de esta.

A.3 *Staphylococcus aureus*

Crece bajo condiciones aerobias o microaerofílicas en casi todos los medios bacteriológicos. Se desarrollan con mayor rapidez a una temperatura de 35-37°C pero forman pigmento a temperatura ambiente (20 a 25 °C), las colonias en medios sólidos son redondas, lisas, elevadas y brillantes. *S. aureus* suele formar colonias de color gris a amarillo dorado profundo, con β hemólisis marcada. Algunas características del S.aureus se describen en los cuadros 10 y11.

A.3.1 Pruebas de identificación



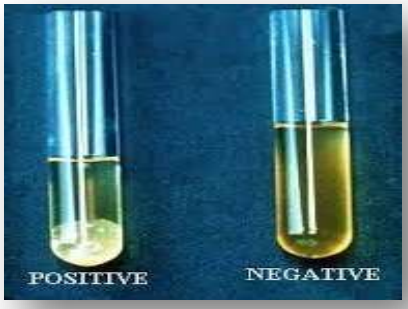
A.3.1.1. Coloración de Gram a partir de cultivo

Los estafilococos son células esféricas de aproximadamente 1-2 µm de diámetro, grampositivas por lo general dispuestas en racimos irregulares parecidas a las uvas.

A.3.1.2 Catalasa

Esta prueba identifica bacterias que producen la enzima catalasa.
Se utiliza para diferenciar microorganismo del género *Streptococcus* de *Staphylococcu; S. aureus* es catalasa positiva, por lo que produce gas al estar en presencia del peróxido de hidrogeno.
Cada vez que realice la prueba debe incluir cepas control. Preferible cepas ATCC para:
Control positivo: *S. aureus* ATCC 25923
Control negativo: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

A.3.1.3 Coagulasa en plasma



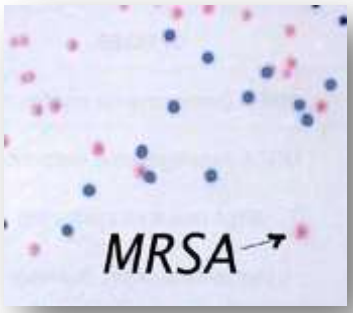
Permite diferenciar *S. aureu*s que posee la enzima coagulasa, de otras especies de estafilococos que genéricamente se les denomina *Estaphylococos* coagulasa negativa. Se determina por la formación total o parcial de un coagulo, del *S. aureus* en plasma.
Cada vez que realice la prueba debe incluir cepas control. Preferible cepas ATCC para:
Control positivo*: S. aureus* ATCC 25923
Control negativo: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

A.3.1.4 Determinación de Coagulasa en prueba látex.

Se utilizan partículas de látex, cubiertas con plasma. El fibrinógeno se une al látex y detecta el *cupling factor*. Además las inmunoglobulinas presentes en las partículas detectan la proteína A, capaz de unirse a la porción Fc de la IgG. (Mª. José García, 2012).

Cada vez que realice la prueba debe incluir cepas control. (Preferible cepas ATCC)
Control positivo*: S. aureus* ATCC 25923
Control negativo: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

A.3.3 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

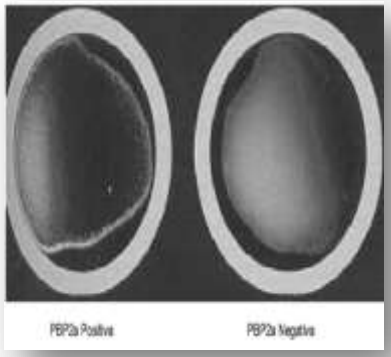


La determinación de los patrones de sensibilidad antimicrobiana de *Staplylococcus spp.*, ya sea en forma cualitativa o cuantitativa, se puede llevar a cabo por diferentes métodos, de acuerdo con las facilidades de cada laboratorio:

A.3.3.1 Difusión en agar o Kirby Bauer (Prueba tamiz de la oxacilina). El método de Kirby Bauer se realiza agar Mueller Hinton adicionar discos que nos permiten detectar mecanismos de resistencia natural e inducida

A.3.3.2 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

- Macrodilución en tubo
- Microdilución en placa
- Prueba epsilon o E-test



Estafilococos sensibles a la penicilina también son susceptibles a otros agentes β-lactámicos con eficacia clínica.

Estafilococos resistentes a oxacilina son resistentes a todos los agentes β-lactamicos actualmente disponibles, con la excepción de las cefalosporinas más nuevos con actividad anti-SAMR. Por lo tanto, la susceptibilidad o resistencia a una amplia gama de agentes antimicrobianos β-lactámicos puede ser concluidas de las pruebas de penicilina y cefoxitina o ya sea por oxacilina.

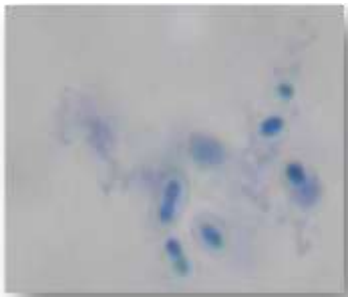
Los resultados de difusión en disco o CIM para cefoxitina se pueden utilizar para predecir la resistencia a oxacilina mediada por mecA en *S. aureus* y *S. lugdunensis*.

Para detectar la resistencia inducida a eritomicina se coloca en el antibiograma los discos de eritromicina y clindamicina a una distancia de 5mm aproximadamente.

A.2.4. Prepueba presuntiva para detectar resistencia a los antimicrobianos beta-lactamicos

***Staphylococcus aureus* ß-lactamasa positiva**

A.2.4.1. Producción de enzima de ß-lactamasa



Hay varias pruebas para demostrar la producción de ß-lactamasas, la mayoría basadas en la determinación de la producción de ácido penicilinóico.

Las pruebas utilizadas comúnmente para ello son:

•Método acidométrico. Denota un cambio de pH que se visualiza por un cambio de color del indicador rojo de fenol.

•Método yodométrico. Este método se basa en que el ácido penicilinóico producido por la acción de la enzima ß-lactamasa sobre el anillo betalactámico de la penicilina reduce el yodo a yoduro decolorando la mezcla del almidón-yodo empleada para visualizar la reacción.

•Método de la cefalosporina cromogénica (cefinasa) Se basa en el cambio de color de una cefalosporina incolora a un color rosa, en presencia de la enzima ß-lactamasa.

La mayoría de los laboratorios han adoptado esta última prueba por la facilidad del procedimiento y lo económica de esta.

La producción de ß-lactamasa es frecuente, está sujeta a control por plásmido y hace que los microorganismos sean resistentes a muchas penicilinas (penicilina G, ampicilina, ticarcilina, piperacilina y fármacos afines). Los plásmidos son transmitidos mediante transducción y tal vez mediante conjugación.

Por lo general *S. aureus* se ha aislado de pacientes con infeccionas complejas que han recibido tratamiento prolongado con vancomicina. El mecanismos de resistencia se relaciona con un incremento en la síntesis de la pared celular y alteraciones de la misma y no se debe al gen *van* que se encuentra en los enterococos, Las cepas de *S. aureus* de susceptibilidad intermedia a la vancomicina por lo general son resistentes a la nafcilina pero generalmente son susceptibles a las oxazolidinonas y a quinupristina/dalfopristina. (Jawetz, 2010).

B. Examen Indirecto

B.1 Pruebas serológicas (Serotipificaciòn)

No hay pruebas serológicas para determinación de la mayoría de bacterias, los antisueros específicos se utilizan para identificar serotipos una vez que se ha definido el género y especie de la bacteria.

B.2 Rayos X

El análisis radiológico es una herramienta importante en el diagnóstico de las neumonías bacterianas graves y muy graves, por el hecho de sugerir la etiología; permite identificar complicaciones como derrame del líquido pleural o atelectasia.

Las alteraciones radiológicas típicas de neumonía bacteriana son las condensaciones unifocales o multifocales.

Según la OMS, la interpretación de radiografía de tórax de neumonías bacterianas es una imagen densa, de aspecto algodonoso (infiltrado alveolar), que compromete parcial o totalmente uno o ambos lóbulos pulmonares Frecuentemente se presenta el broncograma aéreo y en algunas situaciones se asocia a derrame pleural.

La atelectasia se observa se observa en la radiografía por una disminución del volumen del parénquima distal y desplazamiento de las cisuras, el mediastino y el radiograma hacia el lado afectado (Protocolo Nacional de Vigilancia Neumonías y Meningoencefalitis, 2008).

Cuadro 9. Requerimiento de factores para Haemphilus

Especie	Requerimiento de			Hemólisis [1]
	X	V	CO_2	
H. influenzae	+	+	+	-
H. haemolyticus	+	+	-	+
H. ducrey	+	-	-	-
H. parainfluenzae	-	+	V	-
H. parahaemolyticus	-	+	-	+
H. segnis	-	+	-	-
H. paraphrophilus	-	+	+	-
H. aphrophilus	-	-	+	-

[1] Hemólisis en sangre de caballo; V variable

Cuadro 10. Identificación preliminar de bacterias Gram positivas por el tipo de colonias

Grupo de Bacterias	Tipo de Colonia	Pruebas Adicionales
Staphylococcus spp	Colonias convexas, borde entero, de 2-3mm, color crema, amarillentas, con zonas de ß-hemolisis.	Catalasa: (+) Coagulasa: *S. aureus* (+) DNasa: *S. aureus* (+) Utilización de Manitol: *S. aureus* (+)
Streptococcus spp y Enterococcus spp	Colonias convexas, traslucidas, puntiformes, butirosas, zona de ß- hemolisis	Catalasa: (-) Tolerancia del NaCl al 6.5%: *Enterococcus* (+) Bilis-Esculina: *Enterococcus* (+) CAMP test: *S. agalactiae* (+) Hidrólisis del Hipurato: *S. agalactiae* (+) L-pyrrolidonil- ß-naftilamina (PYR): *S. pyogenes, S. milleri, Enterococcus* (+)
Streptococcus pneumoniae	Umbilicadas (fantasma), traslucidas, puntiformes o mucoides, con una zona de α hemolisis.	Optoquina (+) Solubilidad en Bilis (+)

Cuadro 11. Diferenciación Importante entre los Staphylococcus

Características	*S. aureus*	*S. epidermidis*	*S. saprophyticus*
Pigmentación	+	-	v
Coagulasa	+	-	-
Hemolisis	v	-	A-
Reducción de Nitratos	+	+	-
DNasa	+	-	-
Resistencia a la Novobiocina	-	-	+
Producción de ácido a partir de:			
Manitol	+	-	v
Trehalosa	+	-	+
Manosa	+	+ (retrasado)	-

Técnicas de hemocultivo

Muchas variables influyen en la sensibilidad de los hemocultivos. Las bacteriemias lo son en forma fugaz por lo que son difíciles de captar en el momento que se realiza la extracción de sangre para el hemocultivo. Influyen también, el número de extracciones, la cantidad de sangre que se extraiga cada vez y las medidas que se tomen para inhibir o neutralizar las propiedades bactericidas normales de la sangre.

La cantidad de sangre que se obtenga en cada extracción dependerá de la edad del paciente: Los hemocultivos de niños pequeños (lactantes y preescolares) deben diluirse en una proporción de 1-2 ml de caldo (de 1:10 a 1:20). Y los adultos de 5 a 10 ml de acuerdo a las indicaciones del frasco de hemocultivo.

El principal objetivo del hemocultivo es lograr recuperar el agente causal de la sepsis o neumonía, para realizar estudios sensibilidad y serotipificación. (SIREVA, 2011)

Materiales e insumos

- ✓ Jeringa
- ✓ Aguja
- ✓ Torniquete
- ✓ Gasas
- ✓ Torundas de algodón con antiséptico (yodopovidona, alcohol al 70%, etc.)
- ✓ Vendas
- ✓ Medio de cultivo(Frascos de hemocultivo, medios para sembrar la muestra)
- ✓ Guantes estériles
- ✓ Mascarilla
- ✓ Gabacha

Inoculación de los frascos de hemocultivo

Si el frasco de hemocultivo tiene un diafragma (tapón de hule), desinféctelo con alcohol al 70% o con yodopovidona e inyecte la sangre en el medio. Haga girar el frasco varias veces para lograr que la sangre se mezcle bien. Limpie nuevamente el diafragma, rotule el frasco con el nombre y código del paciente, la fecha, la hora correspondiente y la cantidad aproximada de sangre inoculada (a veces hay dificultades y se obtiene menor volumen que el deseado pero no debe descartarse).

Condiciones para la incubación

Por lo general, los hemocultivos de las casas comerciales, tienen atmósfera adecuada para la recuperación de *S. pneumoniae*, por tanto no es necesario ventilarlos, Los frascos inoculados deben incubarse inmediatamente a 35-37°C.

Procesamiento

Cuando se trata de frascos de hemocultivo corrientes, a las 18 h se efectuará una resiembra, y luego se continuará incubando el frasco observándolo diariamente durante 7 días. Cualquier turbidez o lisis de los eritrocitos indica crecimiento, y en ese caso se deben hacer subcultivos. Como *S. pneumoniae* tiene tendencia a la autólisis, los subcultivos deben realizarse precozmente (18hs) y repetirse 48 horas después y al séptimo día, independientemente del aspecto de los frascos de hemocultivo.

Para hacer los subcultivos, se limpia con alcohol yodado el tapón de caucho del frasco del hemocultivo, se aspira con una jeringa y aguja pequeña cantidad del material aproximadamente (0,5 ml) y se inocula por goteo el líquido en placas de agar sangre de cordero al 5%, agar chocolate y agar Mc conkey. Adicionalmente se prepara un extendido para colorear con Gram. También existen dispositivos que permiten resiembras diarias.

Agar Sangre de cordero al 5%	
Agr Chocolate	
Agar Mc Conkey	

Treponema pallidum

El género *Treponema* incluye las sub especies *pallidium* que causa la sífilis; la sub especie *pertenue* que causa la frambesia; la subespecie *endemicus* que ocasiona la sífilis endémica (llamada también bejel); y el *Treponema carateum* que ocasiona mal de pinto.
El microorganismo es una espiroqueta fina que mide 0.2µm de ancho y de 5 a 15 µm de largo, aproximadamente.
Los gérmenes son muy móviles y rotan de manera constante alrededor de su endoflagelo.
Las espiroquetas son tan finas que no se les identifica con facilidad, salvo que se utilice tinción inmunofluorescente o campo oscuro. No captan de manera adecuada la anilina y otros colorantes, pero se les observa en tejido si se les tiñe con el método de impregnación argéntica.

1. Descripción de la enfermedad

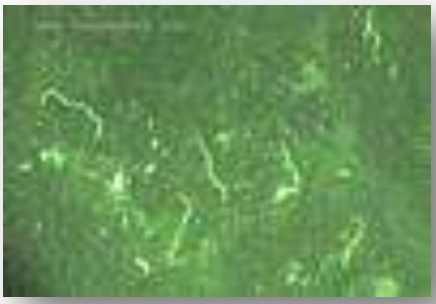
La sífilis maligna es una forma clínica grave de esta enfermedad que en la actualidad se observa en asociación con la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Se caracteriza por manifestaciones clínicas inespecíficas y lesiones cutáneas extensas, polimorfas, destructivas y ulcerativas, algunas con características rupioides, que pueden comprometer la vida del paciente. Las lesiones papulosas, nodulares y ulcerativas pueden estar cubiertas por costras y evolucionan en forma lenta hacia la cicatrización. La incidencia global de sífilis secundaria maligna es baja; Shulkin y cols., identificaron sólo 14 casos publicados en la literatura científica en idioma inglés entre los años 1900 y 1988. Sin embargo, a partir de la epidemia de VIH/ SIDA la incidencia se ha incrementado, sugiriendo que la infección por el retrovirus podría ser un factor de riesgo para desarrollar esta forma clínica.

2. Manifestaciones clínicas

Aunque la sífilis se ha clasificado típicamente en 3 fases -primaria, secundaria y terciaria- su presentación clínica puede ser muy variable. En los pacientes con infección por el VIH la sífilis se presenta con frecuencia de forma atípica y generalmente de un modo más radical que en la población no infectada.

La sífilis primaria es frecuentemente más asintomática y la lesión inicial puede ser extra genital en un número considerable de casos. La sífilis secundaria y la infección latente son las formas más habituales de presentación en los pacientes con el VIH.

En la sífilis secundaria las lesiones cutáneas son la manifestación más común y generalmente consisten en una erupción cutánea maculopapular generalizada con afección de palmas y plantas, con frecuencia la erupción es atípica.



Las manifestaciones musculoesqueléticas pueden asociarse a la sífilis secundaria y terciaria. La artritis puede ser la forma inicial de presentación de la sífilis en pacientes con VIH y la sinovitis puede ocurrir en casos de inmunodepresión grave. La afección ocular, fundamentalmente la uveítis, puede ocurrir en cualquier fase de la infección y en los individuos con VIH suele ser más grave.

Independientemente de la serología para el VIH, el *Treponema pallidum* invade el sistema nervioso central (SNC) en el 25% de los pacientes con sífilis temprana no tratada, sin embargo, en los pacientes con VIH, la afección del SNC es más frecuente. Aunque la afección del SNC en los individuos con VIH es con más frecuencia asintomática, la clínica puede ser muy diversa, y puede incluir cefalea, alopecia, meningomielitis, síndromes medulares, goma con manifestaciones focales, alteraciones del comportamiento y deterioro cognitivo. El VIH acelera y modifica el curso clínico de la neurolúes y las complicaciones neurológicas son más frecuentes y pueden aparecer con cualquier grado de inmunodepresión. Las personas con recuento de linfocitos CD4 inferior a 350 células/ml pueden presentar un riesgo de neurolúes, definida por una pleocitosis superior a 20 células/ml o VDRL positivo en LCR. (Rosario Palacios Muñoz, 2014)

3. Diagnóstico de laboratorio

1.1 Muestras para diagnóstico
- ✓ Suero
- ✓ Biopsia
- ✓ Líquido hístico

1.2 Métodos de diagnóstico

A. Directos

A.1 Cultivo

Nunca se ha logrado el cultivo de *T. pallidium* patógeno, en medios artificiales, huevos fecundados o cultivo de tejidos. Es posible cultivar *in vitro*, en medio anaerobio, los treponemas no patógenos (como la subespecie Reiter); son saprófitos con una vinculación antigénica con *T. pallidum*.

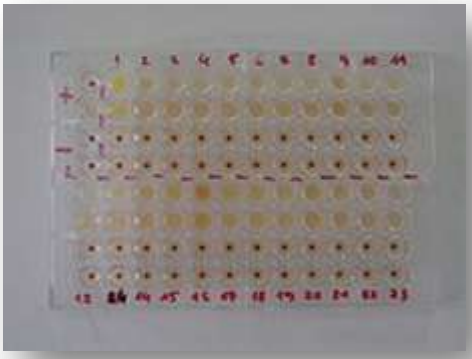
A.2 Observación en campo oscuro

Se coloca una gota de líquido o exudado hístico en una lámina portaobjetos y sobre ella se coloca la lámina

cubreobjetos para crear una capa fina. Después se observa el preparado con aceite de inmersión y con iluminación de campo oscuro, para identificar las espiroquetas móviles típicas.

A.3 Inmunofluorescencia (FTA-ABS)

La prueba FTA-ABS se utiliza para detectar anticuerpos humanos contra antígenos de *T. pallidum*, agente etiológico de la sífilis. El suero tratado con el diluente del kit, se coloca en los pocillos tapizados con antígeno donde el anticuerpo, sí está presente, se une al antígeno. La reacción se visualiza utilizando un conjugado. El conjugado es antiglubulina humana marcado con isotiocianato de fluoresceína. La excitación del isotiocianato mediante luz ultra violeta hace que este colorante emita longitudes de onda más largas y visibles en la zona amarillo-verde. Del espectro de color. El conjugado se une a los anticuerpos humanos fijados a la célula y hace que estas presenten una fluorescencia visible con un microscopio equipado con una fuente de luz ultra violeta



B. Indirectos

B.1 Pruebas no treponémicas

Estas pruebas se utilizan a nivel general para detección de sífilis. Se les practica ampliamente y pueden ser objetos de automatización para facilitar su realización en gran número, y son poco costosas. También se les utiliza para vigilar la eficacia del tratamiento.

La desventaja de este tipo de prueba es que no son muy sensibles en la fase temprana de la sífilis y se tornan positivas solo después de que han transcurrido unas semanas de haber ocurrido la lesión inicial; puede dar resultados positivos falsos por otras enfermedades y también aparecer un fenómeno de pro-zona, en particular en la sífilis secundaria.

Para la práctica de las pruebas VDRL (**Veneral Disease Research Laboratory; Laboratorio de Investigación de Enfermedades Venéreas**) y de **reagina sérica sin calentamiento.** Se necesita el estudio microscópico para detectar floculación. En el método de **reagina plástica rápida** (RPR) y del suero no calentado tratado con rojo de toluidina**,** se cuenta con partículas de color que quedan atrapadas dentro de la trama del complejo antígeno-anticuerpo y así se puede “interpretar” las pruebas sin la amplificación del microscopio. Los resultados se obtienen en cuestión de minutos, particularmente si se agita la suspensión.

Estos métodos generan resultados cuantitativos si se utilizan de manera seriada diluciones al doble. La positividad de métodos no treponémicos surge después de dos a tres semanas en el caso de sífilis no tratada.

El método de VDRL se ha estandarizado para aplicarlo en Líquido Cefalorraquídeo (LCR), y cambia a positivo en la neurosífilis. El diagnóstico serológico de la neurosífilis es complejo.

B.1.2 Pruebas treponémicas

Los métodos de esta categoría miden anticuerpos IgG, contra antígenos de *T. pallidum*.

El método más utilizado es el de aglutinación de pasiva de *T. pallidum* (TP-PA) o microhemaglutinación de T. pallidum (MHA-TP), la cual se fabrica con trasportadores de partículas de gelatina sensibilizadas con el patógeno purificado *Treponema pallidum* (cepa de Nochols). El ensayo está basado en que las partículas sensibilizadas se aglutinan en presencia de anticuerpos contra *Treponema pallidum* en plasma/suero humano. (Inserto serodia-TP-PA)

B.1.3 Prueba rápida de Sífilis

- **Determine Syphilis TP**, es un ensayo inmunocromatográfico para la detección cualitatitiva de los anticuerpos frente a los antígenos del *Treponema pallidum.*

La muestra se añade en la superficie absorbente. Mientras la muestra traspasa el área del conjugado, lo reconstituye de coloide de selenio de los antígenos del *Treponema pallidum*. Esta mezcla traspasa la fase sólida hasta llegar a los antígenos inmovilizados del *Treponema pallidum* en la ventana del resultado del paciente.

Si los anticuerpos frente a *Treponema pallidum* están presentes en la muestra, se unen a los antígenos del *Treponema pallidum* del coloide de selenio y a los antígenos del *Treponema pallidum* de la ventana de resultados del paciente, formándose una barra roja en esta ventana.

Si los anticuerpos frente al *Treponema pallidum* no están presentes, el coloide de selenio con antígenos del *Treponema pallidum* traspasa la ventana de resultados del paciente y no aparece ninguna línea roja en esta ventana.

Obtención de muestras

Obtención muestra de biopsia

Materiales e insumos

- Frasco estéril, boca ancha y cierre hermético
- Solución salina isotónica estéril
- Formol al 10%

Procedimiento

- Se debe realizar en el quirófano o consultorio bajo las más rigurosas reglas de asepsia.
- Obtenida la muestra, ésta se divide en dos porciones (1mm cada una), una es colocada en un recipiente estéril con tapa de rosca conteniendo solución salina isotónica estéril. Para el examen micológico y la otra en formol al 10% en solución salina buferada para histopatología.

Transporte y almacenamiento

- La muestra para el estudio debe ser remitida de inmediato al laboratorio a temperatura ambiente. Sin embargo, de no ser procesada al momento, conservar a 4-8°C por dos a cuatro horas.

Obtención de muestra de sangre para hemocultivo

Materiales e insumos

- Frascos de hemocultivo
- Torundas de algodón con desinfectante (alcohol al 70%, yodopovidona, etc.)
- Torniquete
- Jeringa
- Guantes estériles
- Gabacha
- Mascarilla

Procedimiento

1. Es importante que el laboratorio de diagnóstico clínico de un centro de atención al paciente cuente con manual sobre el manejo, transporte y almacenamiento de muestras.
2. Considerar las medidas de asepsia al obtener la muestra, para evitar contaminaciones en los hemocultivos.
3. Antes y después de tomar la muestra de hemocultivo se debe lavar las manos con agua y jabón
4. Colocarse los guantes estériles y el tapabocas justo antes de tomar la muestra.
5. Descontaminar el área de punción con algodón y desinfectante
6. Dejar por un minuto que el desinfectante ejerza su mecanismo de acción
7. El responsable de tomar la muestra debe manipular el área de punción sólo con guantes estériles, gabacha y mascarilla.
8. Una vez que ha esterilizado la zona de punción y necesita manipularla de nuevo, vuelva a desinfectar.
9. Desinfectante la boquilla del frasco de hemocultivo antes y después de inocular la muestra.
10. En el caso de adultos tomar de dos a tres muestras de 8 a 10mL de sangre venosa de diferentes punciones y separadas por 30 minutos o una hora entre sí. En el caso de niños, obtener un solo espécimen de 1 a 5 ml, en lactantes de 1 a 2 ml y neonatos de 0,5 a 1mL
11. Obtenida la muestra de sangre, ésta debe de ser inoculada de inmediato en el sistema de hemocultivo que el laboratorio trabaja.
12. Rotular el frasco de hemocultivo con: nombre del paciente, número de expediente, edad, hora de toma de muestra y fecha

Transporte y almacenamiento

El hemocultivo debe transportarse de inmediato al laboratorio a temperatura ambiente para evitar contaminación externa, con su respectiva solicitud de examen o ficha epidemiológica,

Obtención muestra de Sangre venosa

Materiales e insumos

- ✓ Guantes desechables
- ✓ Tubos con sistemas al vacío o tubos con tapón rojo
- ✓ Camisa para extracción al vacío
- ✓ Jeringa de 5 o 10 ml
- ✓ Torundas de algodón con desinfectante (Alcohol al 70% / yodopovidona/ Clorhexidina acuosa 2%, etc.)
- ✓ Etiquetas de identificación
- ✓ Gradilla
- ✓ Recipiente para descarte
- ✓ Centrifuga
- ✓ Protopipetas
- ✓ Tubos de ensayo 13 X 100 mm
- ✓ Aplicador de madera sin algodón

Procedimiento

- ✓ Colocarse los guantes desechables
- ✓ Colocar cómodamente e inmovilizar al paciente
- ✓ Rotular el tubo con nombre, edad, número de expediente, fecha y hora. (de acuerdo a solicitud de examen/boleta)
- ✓ Preparar la jeringa (ajustar correctamente la aguja, aflojar el embolo, etc.)
- ✓ Seleccionar la vena mediante tacto, (así determinaremos la profundidad, calibre, elasticidad, etc., de la vena).
- ✓ Desinfectar el punto de punción con torundas impregnadas de alcohol al 70%, dejar que se seque el desinfectante utilizado.
- ✓ Colocar el torniquete o compresor en la parte superior del brazo, para producir exaltación de la vena
- ✓ Pinchar la piel, formando con la jeringa con un ángulo entre 15° y 30°, con el bisel de la aguja hacia arriba.
- ✓ Extraer sangre, lentamente sin mover la aguja de la jeringa, para evitar perforar la vena.
- ✓ Soltar el torniquete cuando la sangre fluya
- ✓ Sacar la aguja y aplicar presión suave hasta lograr hemostasia, con la torunda de algodón.
- ✓ Dispensar suavemente la sangre extraída en el tubo sin anticoagulante (tubo tapón color rojo)
- ✓ En ayunas, generalmente la muestras es más homogénea y ofrece valores más precisos (María Isabel Bellón, 2014)

Separación de componentes sanguíneos

- Dejar la sangre a temperatura ambiente de 10 a 20 minutos para que el coagulo se retraiga
- Con un aplicador de madera, remover el coagulo formado
- Centrifugar a 5,000rpm durante 10 minutos
- Con una protopipeta tomar el suero y trasvasarlo a un tubo limpio o vial, previamente rotulado con los mismos datos del paciente (nombre, edad, número de expediente fecha y hora de toma de muestra).

Transporte y almacenamiento

- Si la muestra no se trabajara de inmediato, almacenarla en refrigeración (4-8 °C) o congelación (-20°C) si no se procesara en mismo día.

Obtención de muestra de Raspado de base de la lesión

Materiales e insumos

- ✓ Bisturí estéril
- ✓ Torunda de algodón
- ✓ Torundas de algodón con desinfectante (alcohol al 70%, yodopovidona, etc.)
- ✓ Placa petri o lámina portaobjetos
- ✓ Solución salina al 0.85% estéril
- ✓ Guantes estériles
- ✓ Gabacha
- ✓ Recipiente para descarte

Procedimiento

- ✓ Limpiar debidamente con algodón y desinfectante la lesión de donde se tomara la muestra
- ✓ Con el bisturí hacer un raspado de la base de la lesión (con sumo cuidado)
- ✓ Fijar la muestra a la lámina portaobjetos (pasándola por la llama de un mechero, si requiere humedad, utilizar una gota de solución salina estéril).
- ✓ Realizar procedimiento de coloración (Giemsa).
- ✓

Transporte y almacenamiento

La muestra se debe fijar se manera inmediata y luego guardar la lámina a temperatura ambiente, protegida del polvo, insectos y humedad que pueda dañar el frotis.

Toma de muestra de Heces

Materiales e insumos

- ✓ Frasco de boca ancha, limpio y cierre hermético

Procedimiento

- ✓ importante que la muestra de heces no esté mezclada con orina, que no haya antecedente de haber ingerido bario u otros productos de contraste.
- ✓ La muestra de heces se debe recolectar en un frasco boca ancha y con cierre hermético, debe ser llevada al laboratorio en un periodo no mayor de 2-4 horas después de su

Transporte y almacenamiento

- ✓ Si la muestra no será procesada de inmediato, almacenar la muestra en condiciones de refrigeración (4-8°C) por un periodo no mayor de 4 horas, para evitar la acidificación de la muestra y destrucción de los estadios parasitarios, se debe proteger de la luz directa.

Obtención muestra de Sangre venosa

Materiales e insumos

- ✓ Guantes desechables
- ✓ Tubos con sistemas al vacío o tubos con tapón rojo
- ✓ Camisa para extracción al vacío
- ✓ Jeringa de 5 o 10 ml
- ✓ Torundas de algodón con desinfectante (Alcohol al 70% / yodopovidona/ Clorhexidina acuosa 2%, etc.)
- ✓ Etiquetas de identificación
- ✓ Gradilla
- ✓ Recipiente para descarte
- ✓ Centrifuga
- ✓ Protopipetas
- ✓ Tubos de ensayo 13 X 100 mm
- ✓ Aplicador de madera sin algodón

Procedimiento

- ✓ Colocarse los guantes desechables
- ✓ Colocar cómodamente e inmovilizar al paciente
- ✓ Rotular el tubo con nombre, edad, número de expediente, fecha y hora. (de acuerdo a solicitud de examen/boleta)
- ✓ Preparar la jeringa (ajustar correctamente la aguja, aflojar el embolo, etc.)
- ✓ Seleccionar la vena mediante tacto, (así determinaremos la profundidad, calibre, elasticidad, etc., de la vena).
- ✓ Desinfectar el punto de punción con torundas impregnadas de alcohol al 70%, dejar que se seque el desinfectante utilizado.
- ✓ Colocar el torniquete o compresor en la parte superior del brazo, para producir exaltación de la vena
- ✓ Pinchar la piel, formando con la jeringa con un ángulo entre 15° y 30°, con el bisel de la aguja hacia arriba.
- ✓ Extraer sangre, lentamente sin mover la aguja de la jeringa, para evitar perforar la vena.
- ✓ Soltar el torniquete cuando la sangre fluya
- ✓ Sacar la aguja y aplicar presión suave hasta lograr hemostasia, con la torunda de algodón.
- ✓ Dispensar suavemente la sangre extraída en el tubo sin anticoagulante (tubo tapón color rojo)

- ✓ En ayunas, generalmente la muestras es más homogénea y ofrece valores más precisos (María Isabel Bellón, 2014)

Separación de componentes sanguíneos

- ✓ Dejar la sangre a temperatura ambiente de 10 a 20 minutos para que el coagulo se retraiga
- ✓ Con un aplicador de madera, remover el coagulo formado
- ✓ Centrifugar a 5,000rpm durante 10 minutos
- ✓ Con una protopipeta tomar el suero y trasvasarlo a un tubo limpio o vial, previamente rotulado con los mismos datos del paciente (nombre, edad, número de expediente fecha y hora de toma de muestra).

Transporte y almacenamiento

- Si la muestra no se trabajara de inmediato, almacenarla en refrigeración (4-8 °C) o congelación (-20°C) si no se procesara en mismo día.

Procedimientos de Laboratorio

Procedimiento para aislamiento bacteriano

Materiales e insumos

El cultivo en la microbiología se considera el diagnostico estándar ya que es a través de él que podemos confirmar el agente causal de la patología. Nos permite poder identificar y confirmar a través de pruebas bioquímicas género y especie del microorganismo, realizar estudios de sensibilidad, pruebas de serotipificación y nos brinda una información epidemiológica sumamente valiosa, para la toma de medidas preventivas y de control.

- ✓ Muestra clínica.
- ✓ Medios de cultivo, los cuales se seleccionan de acuerdo microorganismo que se va a cultivar, orientado por aspectos clínicos y pruebas presuntivas (Examen microbiológico directo, Gram, pruebas látex, etc.)
- ✓ Mechero
- ✓ Asa bacteriológica/micológicas
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha
- ✓ Aceite de inmersión
- ✓ Recipiente para descarte
- ✓ Desinfectantes

Equipo

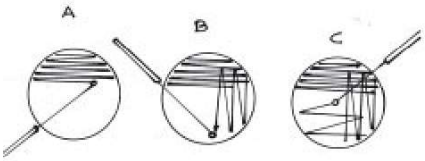
- ✓ Incubadora (la temperatura y las condiciones atmosféricas se programa de acuerdo a los requerimientos del microorganismo que se va a cultivar)

Procedimiento

1. Tener los medios de cultivo a temperatura ambiente etc.).
2. Antes de sembrar la muestra, verificar que los medios estén en las condiciones óptimas (no contaminados, no estén secos, fecha de vencimiento, etc.)
3. Rotular las placas o tubos con la información necesaria (Número de registro, nombre del paciente, fecha, etc.)
4. Tomar parte de la muestra con una asa bacteriológica/micológica y sembrar por método de estría en superficie, Si el medio esta en tubo sembrar en la parte superior (pico de flauta) por estría.

Método por estría en superficie

Incubar las placas o tubos con medios de cultivo a temperatura y condiciones atmosféricas de acuerdo al microorganismo que estamos investigando.



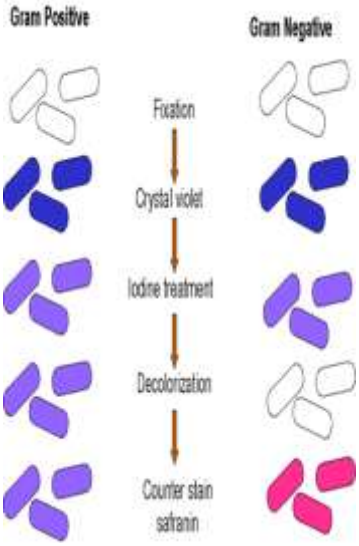
Resultado esperado

Crecimiento bacteriano presente en la muestra.

Coloración de Gram

Este procedimiento permite distinguir entre microorganismos Gram positivos y Gram negativos; de acuerdo a la presencia de peptidoglicano en la pared celular del microorganismo.

Insumos y materiales



- ✓ Muestra biológica
- ✓ Lámina portaobjeto
- ✓ Solución salina al 0.85%estéril
- ✓ Mechero
- ✓ Pinzas
- ✓ Aceite de inmersión
- ✓ Set de coloración de Gram (Cristal violeta, lugol, alcohol acetona, safranina)
- ✓ Protopipetas
- ✓ Papel lente
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha

Equipo

- ✓ Microscopio 100X

Procedimiento

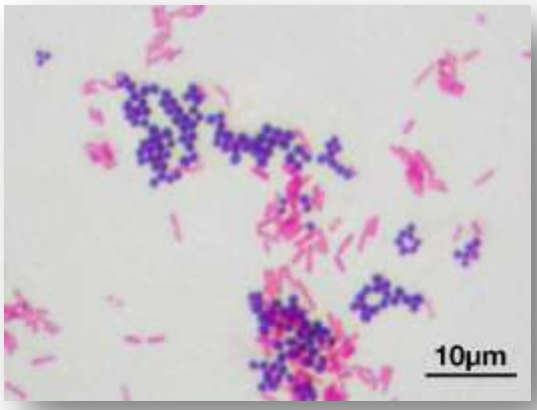
1. En la lámina portaobjetos hacer una pequeña suspensión de solución salina y muestra biológica o cultivo bacteriano, secar a temperatura ambiente.
2. Fijar con calor (pasando tres veces por el mechero)
3. Cubrir la lámina con cristal violeta (o violeta de genciana) durante 1 min. y después se lava ligeramente con agua corriente
4. Cubrir con solución de yodo durante 1 min.
5. Lavar con agua corriente
6. Decolorar con alcohol acetona 30seg.
7. Lavar ligeramente con agua corriente
8. Cubrir con safranina durante 30 seg.
9. Lavar con agua corriente
10. Dejar secar a temperatura ambiente
11. Observar al microscopio con objetivo 100X

Resultado esperado

Cada vez que realice la prueba debe incluir cepas control. Preferible cepas ATCC para:

Bacterias Gram positivas: *S. aureus* ATCC 25923

Bacterias Gram negativas: *E. coli* ATCC 35218



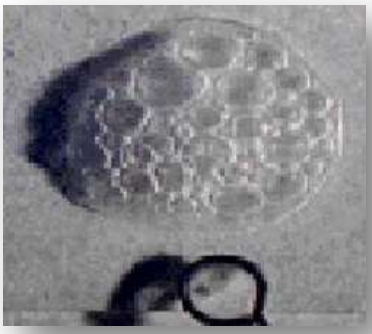
Prueba de Catalasa

Esta prueba identifica bacterias que producen la enzima catalasa.
Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso, y como resultado se liberan burbujas de gas.

Materiales e insumos

- ✓ Aislamiento problema
- ✓ Solución de peróxido de hidrógeno (guardar en refrigeradora y no exponer a la luz)
- ✓ Solución salina al 0.85%
- ✓ Lámina portaobjetos
- ✓ Aplicador de madera sin algodón
- ✓ Protopipeta
- ✓ Aislamiento control (cepa ATCC)
- ✓ Gabacha
- ✓ Guantes
- ✓ Recipiente para descarte

Procedimiento en lámina



1. Colocar en una lámina porta objeto una gota de solución salina y con el aplicador de madera o una asa plástica, una colonia preferiblemente de un medio sin sangre (si el medio es sangre no debe tocarse el agar), hacer una suspensión homogénea.
2. Añadir una gota de peróxido de hidrogeno
3. Lectura de 10 a 20 segundos.

Interpretación de resultados

Cada vez que realice la prueba debe incluir cepas control. Preferible cepas ATCC para:
Positivo: formación de burbujas en la suspensión
S. aureus ATCC 25923
Negativo: No formación de burbujas o muy escasas producidas tras 20 segundos.
E. fecales ATCC29212
(Fernández Olmos, 2010).

Prueba de Oxidasa

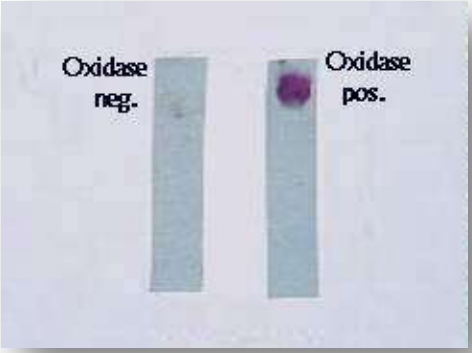
Esta prueba identifica bacterias que producen la enzima citocromo oxidasa.
Se utiliza en la caracterización inicial de bacterias gramnegativos (entrobacterias
Para diferenciar bacilos Gram negativos no fermentadores de glucosa

Materiales e insumos

- ✓ Aislamiento problema
- ✓ Solución de Cloruro de N,N,N,N tetrametil-*p*-fenilendiamina (reactivo de oxidasa)
- ✓ Aplicador de madera sin algodón o asas bacteriológicas plásticas
- ✓ Papel absorbente
- ✓ Dispensador
- ✓ Gabacha
- ✓ Guantes
- ✓ Recipiente para descarte

Procedimiento

- ✓ Dispensar una o dos gotas de solución de Cloruro de N, N, N, N tetrametil-*p*-fenilendiamina en el papel absorbente.
- ✓ Con un aplicador o asa descartable, tomar una colonia sospechosa y ponerla sobre el papel absorbente humedecido con el Cloruro de tetrametil.
- ✓ Interpretar el resultado en término de 10 a 30 segundos.



Interpretación de resultados

Positivo: se colorea de azul-violeta (no leer después de 60 segundos). Puede producirse una reacción positiva lenta después de los 30-60 segundos.
Cada vez que realice la prueba debe incluir cepas control
Preferible cepas ATCC para:
P. aeruginosa ATCC 25923
Negativo: No se produce ningún tipo de color en 30-60 segundos. (Fernández Olmos, 2010)
E. coli ATCC 29212

Prueba de Coagulasa

Permite diferenciar *S. aureus* que posee la enzima coagulasa, de otras especies de estafilococos que genéricamente se les denomina *Estaphylococos* coagulasa negativa. (M. José García, 2012)

Materiales e insumos

- ✓ Aislamiento problema
- ✓ Plasma
- ✓ Protopipeta
- ✓ Tubos de ensayo de 13 x75mm
- ✓ Solución salina al 0.85%
- ✓ Gabacha
- ✓ Guantes
- ✓ Recipiente para descarte

Equipo

- ✓ Incubadora 35-37°C

Procedimiento

1. Emulsionar varias colonias en un tubo con 0.5 ml de plasma.
2. Incubar a 35°C
3. Observar la formación de coágulo a las 4 horas, si es negativo se reincuba toda la noche y se procede a su lectura a las 18 horas.

La lectura a las 4 hora es fundamental, porque puede suceder que las fibrolisinas de *S. aureus* lisen el coágulo luego de 18 horas de incubación y de esta manera se produzca un test falso negativo.

Interpretación de resultados

Cada vez que realice la prueba debe incluir cepas control. Preferible cepas ATCC para:

Positivo: formación de coagulo en la suspensión

S. aureus ATCC 25923

Negativo: No hay formación de coagulo *E. faecalis* ATCC 29212

Prueba de Optoquina

Se utiliza para diferenciar *Streptococcus pneumoniae* de otros especies de *Streptococcus*. El neumococo es sensible a hidrocloruro de etilhidrocupreína (optoquina) (SIREVA, 2011)

Materiales e insumos

- ✓ Aislamiento problema
- ✓ Discos de Optoquina (hidrocloruro de etilhidrocupreína)
- ✓ Asas bacteriológicas
- ✓ Placa de agar sangre ovina al 5%
- ✓ Regla o vernier
- ✓ Pinzas
- ✓ Jarra con vela
- ✓ Gabacha
- ✓ Guantes
- ✓ Recipiente para descarte

Equipo

- ✓ Incubadora de 35-37°C

Procedimiento

1. Trabaje con un cultivo puro. Inocule una placa de agar sangre ovina al 5%.
2. Siembre con asa el inóculo, en 3 o 4 direcciones, lo cual favorecerá un crecimiento homogéneo del microorganismo.
3. Coloque el disco de optoquina sobre el inóculo inicial e incube de 18-24 horas en condiciones de CO2.
4. Mida el tamaño del halo de la zona de inhibición (en mm).
5. Recomendable realizar procedimiento con cepa control. (*S.pnumoniae* ATCC 49619)

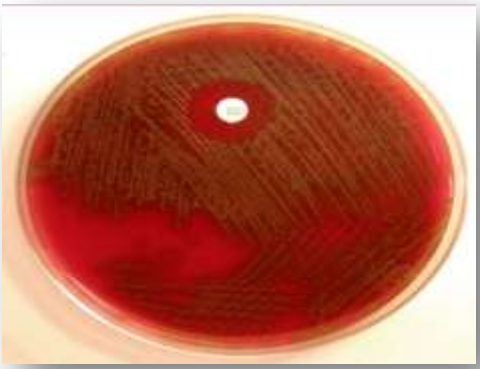
Resultado esperado

Positivo: producción de zona de inhibición. Un halo mayor o iguales a 14 mm son interpretados como susceptibles

S. penumoniae ATCC 49612

Negativo: No hay producción de zona de inhibición *E. faecalis* ATCC 29212

Cada vez que realice la prueba debe incluir cepas control. (Preferible cepas ATCC).



Prueba de Solubilidad en bilis

Se utiliza para diferenciar *Streptococcus pneumoniae* de otros especies de *Streptococcus,* el neumococo se lisa al estar expuesto a soluciones de desoxicolato o taurocolato de sodio.

Materiales e insumos

- ✓ Aislamiento problema
- ✓ Solución de desoxicolato de sodio al 10%
- ✓ Asas bacteriológicas
- ✓ Escala de McFarland N° 0.5
- ✓ Solución salina 0.85%
- ✓ Tubos de ensayo de 13 X 75mm
- ✓ Jarra con vela
- ✓ Gabacha
- ✓ Guantes
- ✓ Recipiente para descarte

Equipo

- ✓ Incubadora de 35-37°C o
- ✓ Baño maría

Procedimiento

1. A partir de un subcultivo puro, prepare una suspensión del microorganismo en solución salina estéril, con una turbidez igual al Escala de McFarland N° 1
2. Para cada microorganismo se utilizan dos tubos de 12x75 mm, identificar un tubo de prueba (P), y el otro como tubo control (C).
3. Coloque en cada tubo 0,5 de la suspensión del microorganismo; al tubo prueba (P) adicione 0,5 ml de desoxicolato de sodio al 10% y al tubo control (C) adicione 0,5 ml de solución salina estéril (0,85%).
4. Mezcle suavemente los tubos e incube a 37°C en el baño María, o a 35°C en la incubadora por un período de 2 h.
5. Examine la lisis del cultivo por aclaramiento del mismo después de 1, 2 y 3 h. de incubación.

Interpretación de resultado

Cada vez que realice la prueba debe incluir cepas control. (Preferible cepas ATCC).

Positivo: claridad o transparencia en el tubo con el

(Desoxicolato de sodio al 10%). *S. penumoniae* ATCC 49612

Negativo: Presencia de turbidez en tubo de suspensión con solución salina *E. faecalis* ATCC 29212

Prueba de determinación de factores

Se utiliza para comprobar el requerimiento del factor V y X por parte del género *Haemophilus*, indispensables para su crecimiento. (SIREVA, 2011)

Materiales e insumos

- ✓ Aislamiento problema
- ✓ Discos de factor V, X y XV
- ✓ Hisopos estériles
- ✓ Placa de agar soya tripticasa (agar Mueller Hinton, Agar nutriente)
- ✓ Escala de McFarland N° 0.5
- ✓ Solución salina 0.85%
- ✓ Tubos de ensayo de 13 X 75mm
- ✓ Jarra con vela
- ✓ Gabacha
- ✓ Guantes
- ✓ Recipiente para descarte

Equipo

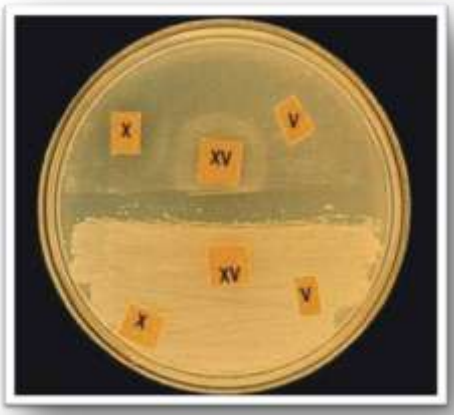
- ✓ Incubadora de 35-37°C o

Procedimiento

1. Prepare una suspensión en solución salina con el aislamiento problema; con una turbidez Escala de McFarland N° 0.5
2. Con un hisopo estéril, dispense la suspensión en tres direcciones (mismo procedimiento del ATB)
3. Coloque los discos o tiras X y V (BBL, Difco), sobre la superficie del agar en el área de inoculación, a una distancia de 1 a 2 cm entre ellos.
4. Incube la placa a 35°C en 3 - 5% de CO2 durante 18 a 24 h.

Interpretación de resultados

Revise el crecimiento alrededor de los discos/tiras. Los aislamientos que dependen únicamente del factor X crecerán alrededor del disco/tira X y los que dependen solamente del factor V, crecerán alrededor del factor V.



Cada vez que realice la prueba debe incluir cepas control.

Preferible cepas ATCC, para:

Control Positivo: H. influenzae ATCC 49247

Control Negativo: *Haemophilus parainfluenzae*

Pruebas de identificación bacteriana utilizando sistemas comerciales

<u>Sistemas comerciales manuales o galerías múltiples</u>

Se trata de celdillas aisladas con sustratos liofilizados que se inoculan individualmente y permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas bioquímicas.

Algunos de los sistemas comerciales disponibles en el mercado son: API, Enterotube, Oxi/ferm tube, PapID system (REMEL) y MicroID, Biochemical ID systems, etc.

<u>Sistemas comerciales automatizados</u>

Algunos de los sistemas de paneles comerciales disponibles y de uso más extendido son: MicroScan, Vitek, ATB, Pasco, Wider, Phoenix, etc.

Prueba de ß lactamasa (Método Cromogénica)

Se basa en el cambio de color de rojo a amarillo de una cefalosporina cromogénica (nitrocefina), cuando la fracción amida del compuesto unida al anillo betalactámico es hidrolizada por la β-lactamasa.

Materiales e insumos

- ✓ Aislamiento problema
- ✓ Discos impregnados con cefalosporina cromogénica (BBL-OXOID)
- ✓ Agua destilada
- ✓ Reloj
- ✓ Placas petri, vacía
- ✓ Asas bacteriológicas
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha
- ✓ Recipiente para descartar

Procedimiento

1. Coloque el disco de ß lactamasa en una caja de Petri y humedézcalo con una gota de agua destilada
2. Con un asa estéril, remueva una colonia bien aislada y frótela sobre la superficie del disco.
3. Cronometre el tiempo de acuerdo a inserto de la prueba
4. Observe el cambio de color.

Interpretación de resultados

Positivo: La presencia de color rosado en la superficie del disco indica la producción de ß lactamasa, por parte del microorganismo estudiado.

Cada vez que realice la prueba debe incluir cepas control. Preferible cepas ATCC para:

Control positivo: *S. aureus* ATCC 29213

Control negativo*: S. aureus* ATCC 25923

Método de Difusión en Disco/Kirby Bauer

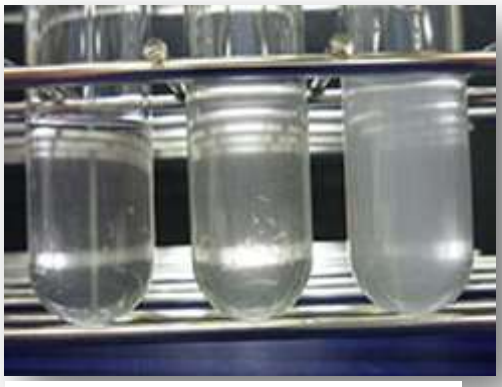
Es un método que se basa en la formación de un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de un disco de papel filtro impregano con el antimicrobiano.

Materiales e insumos

- ✓ Aislamientos de cultivo puro de 18-24 horas
- ✓ Placas de Mueller Hinton
- ✓ Escala de Mc Farland (tubo número 0.5)
- ✓ Hisopos estériles
- ✓ Tubo de ensayo con solución salina 0,85% estéril
- ✓ Discos de antibióticos
- ✓ Jarra con vela (para *S.pneumoniae* y *H. influenzae*)
- ✓ Pinzas
- ✓ Recipiente de descarte
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha

Equipo

- ✓ Incubadora 35-37°C
- ✓ DensiCHEK (0,5, 2,0 y 3.0 Mc Farland Standards)
- ✓ Espectrofotómetro a 625nm



Escala McFarland 0.5, 1 y 2

Preparación del inoculo

1. A partir de un cultivo puro de 18-24 horas de incubación, tomar varias colonias
2. Hacer una suspensión de la bacteria en 3ml de solución salina estéril, con una densidad igual al estándar 0,5 de McFarland.
3. Controle la concentración de la suspensión mediante el uso del espectrofotómetro a 625 nm (o DensiCHEK) y ajuste si es necesario, la lectura en el espectrofotómetro a 625 nm debe dar cercana a 0,1 para obtener la concentración requerida de $1X10^8$ UFC/ml

Procedimiento

1. Inmediatamente después de ajustada la suspensión, introduzca un hisopo estéril en el tubo y rótelo varias veces. Antes de retirarlo, presionelo firmemente en las paredes del tubo con objeto de eliminar el exceso de líquido.

2. Inocule la superficie seca de las placas de agar Mueller-Hinton, estríe la superficie en tres direcciones cubriéndola en forma total y homogénea.

Sí la placa se inoculó adecuadamente y la suspensión es la correcta, las zonas de inhibición del antimicrobiano se observarán perfectamente circulares y el crecimiento será confluente en toda la placa.

Permita que el exceso de humedad se absorba por 3-5 minutos a temperatura ambiente, pero no deje la placa por más de 15 minutos antes de aplicar los discos.

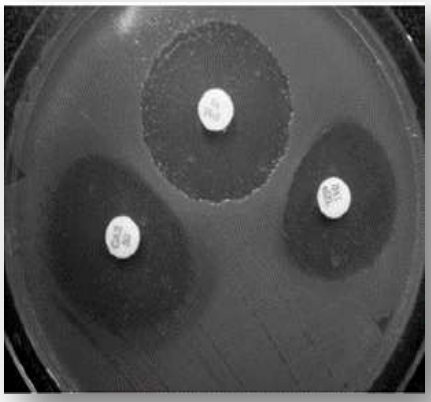
3. Coloque los discos con los antimicrobianos a probar en la superficie inoculada con ayuda de unas pinzas estériles o directamente con el dispensador que algunas firmas comerciales tienen.
4. Suavemente, presione el disco sobre la superficie del agar para asegurar el contacto completo con él.
5. Distribuya los discos en la placa de 100 mm de diámetro sin colocar más de 5 – 6 discos por placa.

Debido a que los fármacos comienzan su difusión en el momento de entrar en contacto con el agar, los discos no deberán moverse ni despegarse después de ser colocados.

6. Sin dejar pasar más de 15 minutos, coloque las placa en la incubadora a 35ºC (si requiere atmósfera de 5 a 7 % de CO2, ponerlo en jarra con vela, durante 18 -24h.)

Interpretación de resultados

Después del período de incubación, mida los diámetros de las zonas de completa inhibición de crecimiento con un vernier (pie de rey o regla graduada en mm) y escríbalas en un formato de resultados. El punto de corte deberá tomarse como el **área en la cual no se observa desarrollo obvio de la bacteria**. La interpretación de los resultados así como los agentes antimicrobianos que deben probarse para cada aislamiento están dadas por la CLSI. (Se actualizan anualmente).



Cuadro 12. Guía para el procesamiento de los hemocultivos

Muestra	Tiempo de Incubación					
	24 horas	48 horas	72 horas	4° día	5° día	6° día
I	• Gram • Resiembra en ACh.	Observar	Observar	Observar	• Gram • Resiembra	Observar Informar
II	• Gram • Resiembra	Observar	Observar	Observar	• Gram • Resiembra	Observar Informar
III	• Gram • Resiembra	Observar	Observar	Observar	• Gram • Resiembra	Observar Informar

Observar diariamente, la turbidez, el gas y la hemólisis en caso positivo *resembrar* en AS, Ach y MC

ACh = agar chocolate incubar en atmósfera de 5% CO2

AS = agar sangre incubar en atmósfera de 5% CO2

MC = agar MacConkey incubar en aerobiosis

Resultado esperado

Crecimiento bacteriano, para identificación, determinación de sensibilidad y serotipificación.

Prueba de VDRL en suero

La prueba de VDRL es un análisis microscópico que utiliza un antígeno no treponemico, el cual al unirse a los anticuerpos en el suero o líquido cefalorraquídeo de pacientes con sífilis y ocasionalmente en pacientes que cursa con ciertos procesos agudos o crónicos, produce el fenómeno de floculación. (Trejos Moncayo, 2011).

Materiales e insumos

- ✓ Suero, plasma ò LCR,
- ✓ Jeringa desechable
- ✓ Tubo de ensayo estéril sin anticoagulante en caso de LCR
- ✓ Tubo de ensayo con o sin anticoagulante
- ✓ Torunda de algodón con desinfectante (Alcohol al 70%, Yodopovidona, etc.).
- ✓ Termómetro para temperatura ambiente
- ✓ Lámina de vidrio con círculos en relieve
- ✓ Puntas para pipeta automática
- ✓ Kit de reactivo VDRL-USR
- ✓ Aplicadores o palillo plástico
- ✓ Solución salina 0.9%
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha
- ✓ Recipiente para descarte

Equipo

- ✓ Centrifuga
- ✓ Pipeta automática de 50 µl
- ✓ Agitador mazzini revoluciones graduables de 100 a 200 por minuto
- ✓ Reloj
- ✓ Microscopio

Prueba cualitativa en suero

Procedimiento

1. Cada vez que realice la prueba se deben utilizar los sueros control de reactividad conocida (reactivo, débil reactivo y no reactivo) para determinar la calidad del antígeno con la cual se va a realizar la prueba. Las reacciones con los sueros control deben reproducir exactamente el patrón de reactividad para tales sueros.
2. La muestra de suero debe ser limpia y obtenida por centrifugación de sangre recolectada sin anticoagulante.
3. Se deben examinar cuidadosamente los sueros y centrifugar nuevamente si presentan partículas, hematíes o turbidez.

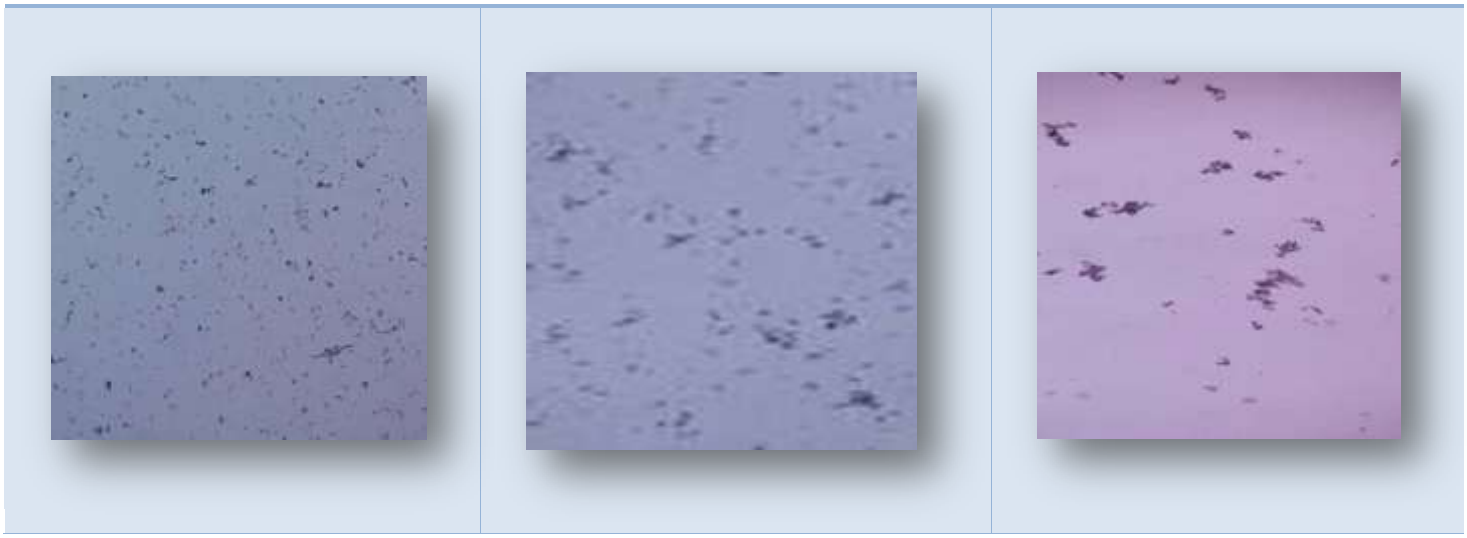
4. Incubar el suero calentándolo a 56°C en baño maría por 30 minutos antes de realizar la prueba, si la técnica que va a realizar así lo exige (si utiliza la técnica USR, este paso no será necesario).
5. En el momento de realizar la prueba, los sueros y reactivos deben estar a temperatura ambiente (23 a 29°C).
6. Con una micro pipeta, coloque 50 µl de suero dentro de un círculo de la lámina de vidrio.
7. Con un palillo plástico, de madera o con la misma punta de la pipeta extienda el suero en la superficie de la placa de vidrio.
8. Mezcle muy bien el antígeno que va a utilizar para la prueba y adicione una gota de este sobre cada uno de los sueros con el gotero dispensador que cada kit trae para este fin.
9. Rote las láminas durante 4 minutos en un agitador mecánico a 180 ± 2 rpm.
10. Leer las pruebas inmediatamente después de la rotación, con el microscopio y objetivo 10X informar los resultados de la siguiente manera:

Cuadro 13 Interpretación VDRL

Lectura	Interpretación
Floculos grandes y medianos	Reactivo (R)
Floculos pequeños	Reactivo débil (RD)
No formación de floculos	No reactivo

Fuente: A Manual of test for syphilis

Reaction No Reactiva **Reaction Débil Reactiva** **Reacción-Reactiva**



NOTA: ocasionalmente puede presentarse en fenómero de pro-zona. Este fenómeno se observa cuando hay de anticuerpos y se presenta una completa o parcial inhibición de la reactividad de un suero no diluido. En ocasiones dicho fenómeno es muy grande, dando reacciones débilmente reactivas, o ligeramente grumosas. Por lo anterior se

recomienda que a todo suero que presenta reacción débil o ligeramente grumosa en la prueba cualitativa, se le haga la prueba cuantitativa antes de dar el resultado de la prueba VDRL.

- Toda prueba con resultado Reactivo o Reactivo Débil en la fase cualitativa debe titularse para informase cuantitativamente.

Prueba cuantitativa en suero (tubo)

Realizar la prueba cuantitativa a todos los sueros reactivos, reactivos débiles o no reactivos grumosos (por efecto de pro-zona) titulando hasta la dilución, en la que sean no reactivos.

Para las diluciones se marcan los tubos así: (1:1 suero sin diluir), 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y así sucesivamente.

1. Adicione 200 µl solución salina 0.9% en cada uno de los tubos de ensayo utilizados para titular a partir del 1:2.
2. Adicione 200 µl de suero al tubo 1:2, mezcle muy bien y transfiera 200 µl de la suspensión al tubo 1:4 y continuar haciendo diluciones dobles consecutivas hasta llegar al título en que se negativiza el suero. (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, etc.)
3. Tomar 50 µl de cada una de las diluciones (comenzando por el suero más diluido) y colocarlo dentro de un círculo de la lámina de vidrio, previamente marcada.
4. Agregue una gota de la suspensión de antígeno sobre cada una de las diluciones de los sueros con el gotero dispensador que cada kit provee para este fin
5. Rotar la lámina de vidrio durante 4 minutos en agitador mecánico a 180 ± 2 rpm
6. Leer las pruebas inmediatamente después de la rotación con el microscopio y objetivo 10X
7. Reportar hasta el último título de la dilución en que se observó claramente la floculación como se observa en la siguiente tabla. (Trejos Moncayo, 2011).

Cuadro 14 Reporte cuantitativo de resultados en suero

Cualitativa	**Cualitativa**					
	Dilución en suero					**Reporte**
Sin dilución (1:1)	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
Reactivo	RD	N	N	N	N	Reactivo 1:2
Reactivo	R	RD	N	N	N	Reactivo 1:4
Reactivo	R	R	RD	N	N	Reactivo 1:8
Débil Reactivo	_	R	R	RD	N	Reactivo 1:16
No Reactivo grumosa	_	R	R	R	N	Reactivo 1:32
Débil Reactivo	N	N	N	N	N	Débil reactivo 0 diluciones

Fuente: A manual of test for syphilis (RD: Reactive Devil; R: Reactive; N: Negative; -: No Reactive)

Prueba de VDRL en Líquido Cefalorraquídeo

Preparar de la suspensión de antígeno

- ✓ Adicionar una parte de solución salina al 10% a una parte de la suspensión de antígeno VDRL
- ✓ Mezclar suavemente por rotación o por inversión por 5 minutos
- ✓ La sensibilidad antígeno VDRL para LCR es buena solamente por dos horas después de su preparación.

Procedimiento prueba cualitativa

1. En el momento realizar la prueba, la muestra debe estar a temperatura ambiente (23 a 29°C).
2. Depositar 50 µl de LCR en una lámina plana con cavidades circulares de 14mm de diámetro utilizando las normas de bioseguridad para la manipulación
3. Mezclar suavemente el antígeno
4. Agregar una gota de la suspensión de antígeno a la muestra de LCR con aguja despuntada, por precaución dispense algunas gotas para asegurarse que no salga con aire, la gota adicionada al LCR equivale a 10µl
5. Rotar la lámina de vidrio durante 8 minutos en agitador mecánico a 180 ± 2 rpm
6. Si la atmósfera donde se realiza la prueba es muy seca elaborar una cámara húmeda y cubra la lámina para evitar la excesiva evaporación durante la rotación
7. Leer las pruebas inmediatamente después de la rotación con el microscopio y objetivo 10X
8. Toda la prueba con resultado Reactivo en la fase cualitativa debe titularse para informarse cuantitativamente.

Prueba cuantitativa en LCR

Para las diluciones se marca en los círculos cóncavios de lámina así: (1:1 LCR sin diluir), 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y así sucesivamente.

1. Coloque 50 µl solución salina 0.9% en cada uno de los círculos de la lámina, utilizados para titular
2. Adicione 50 µl de LCR al círculo 1:2, mezcle muy bien y transfiera 50 µl de la suspensión al círculo 1:4 y continuar haciendo diluciones dobles consecutivas hasta llegar al título en que se negativiza el LCR. (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, etc.)
3. Descartar 50 µl restantes en el círculo de la última dilución
4. Agregue una gota de la suspensión de antígeno sobre la muestra de LCR con aguja despuntada y jeringa en posición vertical, por precaución dispense algunas gotas para asegúrese que no salga con aire, la gota adicionada a el LCR equivales a 10 µl
5. Rotar la lámina de vidrio durante 8 minutos en agitador mecánico a 180 ± 2 rpm
6. Leer las pruebas inmediatamente después de la rotación con el microscopio y objetivo 10X

7. Reportar hasta el último título de la dilución en que se observó claramente la floculación como se describe en la tabla. (Trejos Moncayo, 2011)

Cuadro 14 Reporte cuantitativo de resultados en LCR

Cualitativa	**Cualitativa**					
	Dilución de LCR					**Reporte**
Sin dilución (1:1)	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
Reactivo	N	N	N	N	N	No reactiva
Reactivo	R	N	N	N	N	Reactivo 1: 2
Reactivo	R	R	N	N	N	Reactivo 1: 4
Reactivo	R	R	R	N	N	Reactivo 1:8
No Reactivo grumosa	R	R	R	R	N	Reactivo 1:16

Fuente: A manual of test for syphilis (R: Reactivo; N: Negativo)

Pruebas no treponémicas macroscópicas RPR

El antígeno utilizado en este análisis es una modificación del antígeno VDRL, el cual contiene cloruro de colina para eliminar la necesidad de inactivar el suero y micropartículas de carbón para aumentar la diferencia visual entre un resultado Reactivo y No Reactivo. Si una muestra contiene anticuerpos anti-reaginicos, se observa una aglutinación de las partículas antígeno-carbón.

Materiales e insumos

- ✓ Plasma, suero inactivado o no inactivado por calor. (las muestras deben estar libres de contaminación y no hemolizadas).
- ✓ Láminas de cartón con círculos de relieve
- ✓ Puntas para pipeta automática
- ✓ Kit de reactivo RPR
- ✓ Solución salina
- ✓ Aplicadores o bastoncillos de plástico
- ✓ Gabacha
- ✓ Guantes
- ✓ Recipiente para descarte

Equipo

- ✓ Termometro para temperatura ambiente
- ✓ Pipeta automática de 50 microlitros
- ✓ Agitador mazzini revoluciones graduables de 100 a 200 por minuto
- ✓ Reloj

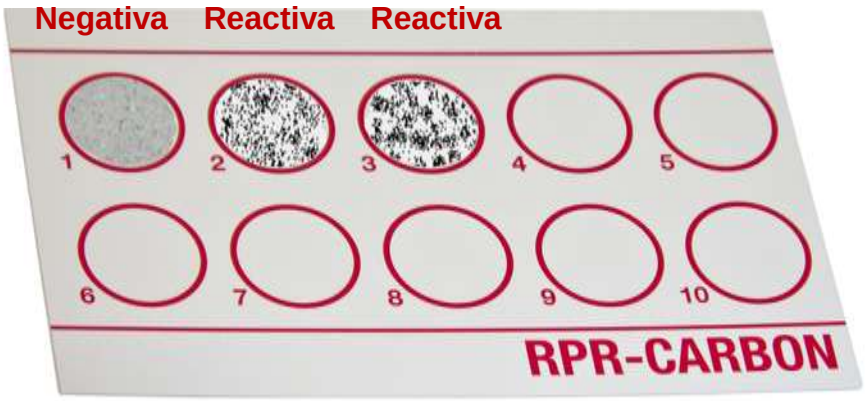
Procedimiento

1. Cada vez que realice la prueba se deben utilizar los sueros control de reactividad conocida (reactivo y no reactivo) para determinar la calidad del antígeno con la cual se va a realizar la prueba. Las reacciones con los sueros control deben reproducir exactamente el patrón de reactividad establecidos para tales sueros.
2. La muestra de suero debe ser limpia y obtenida por centrifugación de sangre recolectada sin anticoagulante.
3. Se deben examinar cuidadosamente y centrifugar nuevamente los sueros que presenten partículas, hematíes o turbidez.

4. En el momento de realizar la prueba, los sueros y reactivos deben estar a temperatura ambiente (23 a 29°C).
5. Con una micropipeta, coloque 50 µl de suero dentro de un círculo de la lámina de cartón.
6. Con un palillo plástico, de madera o con la misma punta de la pipeta extienda el suero en la superficie de la placa de cartón.
7. Mezcle muy bien el antígeno que va a útilizar para la prueba sacándolo por succión directamente con la aguja conectada en el frasco dispensador, adicione una gota de éste sobre cada uno de los sueros. Nunca agitar el antígeno.
8. Rote las láminas durante 8 minutos en un agitador mecánico a 100 ± 2 rpm.
9. Leer las pruebas inmediatamente después de la rotación, macrocoscopicamente a luz directa
10. Informar los resultados de la siguiente manera:

Cuadro 16 Lectuta por aglutinación del RPR

Lectura	Interpretación
Aglutinación gruesa en el centro y periferia	Reactivo (R)
Presencia de pequeñas aglutinaciones al borde del círculo	Reactivo (R)
Suspensión homogénea	No Reactivo (NR)



Prueba cuantitativa en suero

Realizar la prueba cuantitativa a todos los sueros reactivos, y a los no reactivos (fenómeno de pro-zona), titulando hasta una dilución; en la que sean no reactivos.

Para las diluciones se marcan los tubos así: (1:1 suero sin diluir), 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y así sucesivamente.

1. Adicione 200 µl solución salina 0.9% en cada uno de los tubos de ensayo utilizados para titular a partir del 1:2.
2. Adicione 200 µl de suero al tubo 1:2, mezcle muy bien y transfiera 200 µl de la suspensión al tubo 1:4 y continuar haciendo diluciones dobles consecutivas hasta llegar al título en que se negativiza el suero. (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, etc.)

3. Tomar 50 µl de cada una de las diluciones (comenzando por el suero más diluido) y colocarlo dentro de un círculo de la lámina de cartón, previamente marcada.
4. Adicione una gota de la suspensión de antígeno sobre cada una de las diluciones de los sueros con el gotero dispensador que cada kit provee para este fin
5. Rotar la lámina de vidrio durante 8 minutos en agitador mecánico a 100 ± 2 rpm
6. Leer macroscópicamente a la luz, las pruebas inmediatamente después de la rotación.
7. Reportar hasta el último título de la dilución en que se observó claramente la floculación como se observa en la siguiente tabla. (Trejos Moncayo, 2011).

Cuadro 17 Reporte por dilución de la prueba en suero (RPR)

Cualitativa	**Cualitativa**					
	Dilución en suero					Reporte
Sin dilución (1:1)	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
Reactivo (floculación mínima)	N	N	N	N	N	No Reactivo
Reactivo	R	N	N	N	N	Reactivo 1:2
Reactivo	R	R	N	N	N	Reactivo 1:4
Reactivo	R	R	R	RD	N	Reactivo 1:8

Fuente: A manual of test for syphilis (RD: Reactiivo Débil; R: Reactivo; N: No Reactivo)

Bibliografía

1. AIDS*info*
   Guidelines for Prevention and Treatment of Oportunistic infections in VIH-Infected Adults and Adolescents
   http:// aidsinfo.nih.gov/guidelines on 2013
2. Microbiología Médica
   JAWETZ; MELNICK Y ADELBERG
   Edición N° 25
   Editorial Mc Graw Hill
   México D.F. 2010
3. Métodos de Identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología, 2010
   Ana Fernández Olmos, Cecilia García de la Fuente, Juan Antonio Saéz Nieto, Sylvia Valdezate Ramos.
   Seimc ISBN-978-84-614-7932-0
4. Manual de Procedimientos para la identificación de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*
   SIREVA II
   Honduras, 2011.
5. Manual de Laboratorio de microbiología para el diagnóstico de infecciones respiratorias
   María José García, María Cárdenas Povedano, Aurora Urbano Felices
   1ª edición 2012 Omnia Science.
   http:// dx.doi.org/10.3926/oss.4
6. Prevalencia de Infecciones Bacterianas por Gérmenes Oportunistas o Comunes en PVVS
   Edgar Ortega, Aurelia Taboada.
   Rev. Inst.Med.Trop. Vol.6 (1); Julio 2011
7. Sífilis maligna en un paciente con infección por VIH. Presentación de un caso y revisión de la literatura
   Marcelo Corti, Rubén Solari, Luis De Carolis, Olga Figueiras, Natalia Vittar y Esteban Maronna
   Rev. Chil. Infectol. vol.29 no.6 Santiago dic. 2012
   http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000700017
8. Vigilancia Centinela de las Neumonías y Síndrome Meningo Encefalítico en Honduras
   Tegucigalpa, Diciembre del 2008.
9. Medios Auxiliares de Bacteriología
   Identificación de Bacilos Gram negativos no fermentadores y Vibrio cholerae
   Roxana Elizabeth Castillo
   Primera Edición, 2011
10. Manual de procedimientos para el aislamiento y la identificación de Campylobacter spp a partir de muestra de fecal
    María Elena Realpe, Angela Carolina Vallejo, Evelsy Leney Gómez
    www.ins.gov.co/.../MNL%20-R01.001.5030-006%20Campyliobacter.pd..
    Julio 2011
11. Manual para el diagnóstico de Sífiliis
    Sadith Trejos Moncayo, Jenny Zambrano

Instuto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia
Código MNL-R01.001.5030-013
14/07/2011

12. Tablas CLSI 2013
13. Bartonelosis humana – SlideShare
    César Henríquez, Paul Pachas, Phillip Lawyer, Ciro Maguiña
    es.slideshare.net/ceshencam/bartonelosis-humana
    29/8/2012
14. SERODIA- TP-PA
    Inserto
    Passive Particle Aglutination Test for Detección of antibodies to Treponema pallidum

Capítulo V

INFECCIONES CAUSADAS POR

Mycobacterias

Introducción

La tuberculosis en el paciente con infección por el VIH representa una infección primaria en 1/3 de los casos, y una reactivación de infección latente en 2/3 de ellos. A su vez causa muerte en 13% de los paciente infectados por VIH, según OMS. (Lozano Salazar, 2012)

La tuberculosis (TB) se puede reactivar rápidamente después de que una persona se infecte con VIH. Se estima que el riesgo anual de TB en pacientes que no son tratados por VIH y con infección latente por tuberculosis (ILTB) está entre el 3 al 16% y en individuos seronegativos por VIH y con ILTB está entre el ≈5%. La infección por TB puede ocurrir con conteo de linfocitos T-CD4 normal, aunque el riesgo aumenta a medida que la inmunodeficiencia progresa.

A pesar de las tendencias epidemiológicas favorables, y la terapia antirretroviral (ART), la TB continúa siendo una importante enfermedad oportunista, para las personas VIH positivos. (AIDS*info* 2013).

La tuberculosis incrementa la tasa de replicación viral por 160, al acelerar la progresión de la infección por VIH al SIDA y, con ello, a la muerte. La evolución al sida es de 6 meses en personas con TB y de 14,5 meses en pacientes con VIH seropositivos solamente; siendo la tuberculosis la principal causa de enfermedad y muerte en personas que viven con el VIH; de hecho, muchos brotes de formas de tuberculosis farmacorresistente se han dado en lugares donde un gran número de pacientes seropositivos están en contacto directo. (Lozano Salazar, 2012).

En los individuos con inmunidad relativamente preservada (linfocitos T-CD4 > 350 cél/ml), las manifestaciones clínicas de tuberculosis son similares a las de pacientes de las personas seronegativos para HIV: compromiso pulmonar predominante, fiebre y sudoración prolongada, tos y ocasionalmente expectoración hemoptoica por más de dos semanas, radiografía de tórax con infiltrados nodulares apicales, con o sin cavernas.

La tuberculosis extra-pulmonar como linfadenitis, pleuritis, pericarditis, meningitis y septicemia es más frecuente en los pacientes con infección por HIV, por lo que se debe buscar dirigidamente. (Lozano Salazar, 2012)

Definiciones

- **Aerobio estricto:** Dícese del microorganismo al que le es imprescindible el oxígeno libre, ya que su fuente de energía la obtiene de la respiración aeróbica, donde se requiere oxígeno molecular como oxidante terminal.
- **Bacilos acidorresistentes**: Es la propiedad física de algunas bacterias y la resistencia a la decoloración de la fucsina básica (rojo) la cual penetra en la célula por acción del fenol y el calor.
- **Baciloscopía:** Prueba que se utiliza para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis, que permite identificar al 70-80% de los casos pulmonares positivos.
- **Cultivo confluente**: Durante la incubación, las células sedimentan, se adhieren a la superficie y comienzan a dividirse hasta que se obtiene un crecimiento confluente que cubre toda la superficie del medio. Luego de obtenida la monocapa, las células no continúan dividiéndose por un fenómeno que se conoce como “inhibición por contacto”.
- **Farmacorresistente:** Es la disminución de la eficacia de un medicamento específico diseñado para curar una enfermedad o para mitigar sus síntomas.
- **Infección latente:** Infección que no causa ninguna reacción aparente del organismo durante un tiempo.
- **Recuento de colonias:** Es el conteo de microorganismos capaces de formar colonias en un medio de cultivo adecuado.

Mycobacterium tuberculosis

Las micobacterias son bacterias aeróbias de contornos cilíndricos que no forman esporas. No se tiñen fácilmente con los colorantes, pero una vez teñidos resisten la decoloración por ácido o alcohol y por esta razón se les ha llamado bacilos "ácido-alcohol-resistentes" o "acidorresistentes" (BAAR).

Se conocen más de 125 especies de *Mycobacterium* incluidas muchas formas saprófitas,

Mycobacterium tuberculosis, causa tuberculosis y es un patógeno de extraordinaria importancia para los seres humanos. *Mycobacterium leprae* causa lepra. *Mycobacterium avium-intracellulare* (complejo de: *M. avium*, o MAC [*M. avium complex*]) y otras micobacterias no tuberculosas suelen infectar individuos inmunosuprimidos y a veces causan enfermedad en personas con sistemas inmunitarios normales.

1. Descripción de la enfermedad

La infección por tuberculosis ocurre cuando una persona susceptible inhala gotas minúsculas de saliva (25µm) que contienen el organismo de *Mycobacterium tuberculosis*. La respuesta inmune usualmente limita la multiplicación del bacilo de la tuberculosis en 2 a 12 semanas después de la infección, sin embargo el bacilo permanece viable por años, como infección latente de TB (ILTB) pueden ser asintomáticos y no desarrollar la infección.

La enfermedad de la TB (clínicamente activa, con cultivo positivo), puede desarrollarse pronto después de la exposición (infección primaria) o reactivación de una infección latente.

Siendo la TB causada por una bacteria aerobia estricta, la tuberculosis pulmonar es más frecuente que la extrapulmonar, esta última no se considera transmisible, a excepción de la laríngea, con 80% y 20%, respectivamente. En las personas con inmunodepresión por el VIH menos del 50% de los casos son exclusivamente pulmonar, el resto de los casos presentan afección extrapulmonar exclusiva o mixta. (Moreno, 2010)

Entre la población general, la tuberculosis extrapulmonar afecta con más frecuencia a los niños y las personas con VIH; también en ellos la tuberculosis pulmonar es la forma más habitual.

Infecciones por micobacterias no tuberculosas (MNT)

Las micobacterias atípicas son agentes y que no se transmiten de persona a persona a diferencia de *M. tuberculosis*. Las presentaciones clínicas más habituales en los pacientes seropositivos para VIH son las formas diseminadas y la pulmonar.

Infecciones por *Mycobaterium avium complexa* (MAC)

Es la infección sistémica multifocal más frecuente en paciente infectado por VIH con grave inmunosupresión. Se caracteriza por fiebre prolongada, sudoración baja de peso, diarrea y dolor abdominal.

Tuberculosis cutánea

La TB cutánea (TBc) es la infección crónica de la piel producida por el *Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis* y, en ciertas ocasiones por el BCG.

La TBc representa el 1 al 2% de las formas extrapulmonares: Su asociación con la TB visceral se observa alrededor de un 28% de los casos. El conocimiento de la TBc permite, muchas veces, descubrir una forma visceral hasta ese momento ignorada.

Las lesiones se pueden producir por extensión de un foco tuberculoso subyacente ya sea ganglionar, ósea, articular, por diseminación hematógena o linfática desde un foco visceral.

2. Manifestaciones Clínicas

Los síntomas y signos de la tuberculosis en las personas infectadas por el VIH son inespecíficos y no permiten distinguir la enfermedad de otras infecciones oportunistas. La fiebre es un signo constante mucho más frecuentes que en las personas inmunocompetentes; va acompañada de síntomas constitucionales (anorexia, astenia y pérdida de peso).

La presentación radiológica de la tuberculosis pulmonar es variable, desde una radiografía normal hasta patrones bilaterales que semejan a una neumonía por *neumosistis jirovecii*. Son muy frecuentes las adenopatías endotorácicas.

Los ganglios linfáticos tanto periféricos, endotorácicos como endoabominales son los órgano extrapulomonares más frecuentemente afectados, hasta el punto que la presencia de adenopatías significativas en cualquier parte del cuerpo debe sugerir como primera posibilidad diagnostica tuberculosis. La presencia de adenopatías con centros hipodensos y captación de contraste en anillo en la tomografía axial computarizada se ha sugerido como de alta especificidad para el diagnóstico de tuberculosis. (Moreno, 2010)

3. Diagnóstico de Laboratorio

El diagnóstico de la TB se basa en la identificación del agente causal que forman el Complejo de Mycobacterium tuberculosis: M. tuberculosis; M. bovis; M.bovis var BCG; M. canetti; M. africanum; M. pinnípeda; M. microti; M. mungui.

3.1 Muestras clínicas/biológicas para diagnóstico

- ✓ Esputo normal o inducido
- ✓ Contenido gástrico
- ✓ Lavado bronquial y broncoalveolar
- ✓ Biopsias endoscópicas
- ✓ LCR
- ✓ Sangre
- ✓ Médula ósea
- ✓ Biopsias
- ✓ Orina
- ✓ Heces

3.2 Métodos de Diagnóstica

El diagnóstico se establece de acuerdo al estadio de la tuberculosis.

A. Directos

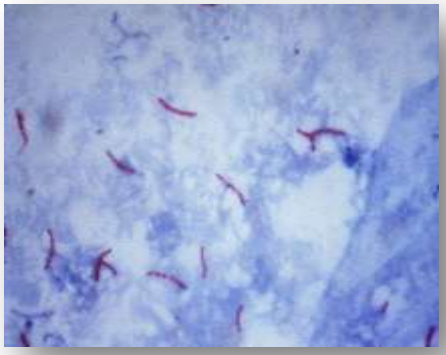
A.1. Baciloscopía

Es el examen microscópico del extendido de la muestra en estudio, utilizando la tinción de Zihel-Neelsen. La baciloscopia se cuantifica en cruces luego de la lectura de 100 campos microscópicos leídos de forma sistemática (Omar Aidar. 2010). El cuadro 17, presenta como se reporta en el sistema nacional la coloración de Ziehl-Neelsen

Cuadro 18. Reporte del Ziehl-Neelsen

Cruces	Baar observados por campo
Negativo	Ausencia de Baar
Positivo/Contable	1-9 Baar en 100 campos
Positivo +	10-99 Baar en 100 campo
Positivo ++	1-10 Baar en 50 campos
Positivo+++	> 10 Baar en 20 campos

La baciloscopía se considera positiva/**contable** cuando se observan de 1 a 9 bacilos en 100 campos, cantidad que debe informarse y el médico considerará en el contexto clínico, la repetición del examen y la administración de antibiótico.



Muestra de Esputo coloreada por Ziehl- Neelsesn donde se observa la presencia de Baar

La baciloscopía tiene un alto rendimiento diagnóstico, las normas vigentes nacionales mencionan que se debe realizar un total de 3 muestras, la primera el día de consulta y al día siguiente el paciente deberá entregar al laboratorio una muestra por la mañana (segunda muestra), en ese momento el paciente recibirá un tercer

frasco para entregar la tercer muestra.

A.2 Cultivo

Permite el aislamiento del mycobacterium para la identificación de género y especie a través de pruebas bioquímicas (catalasa, niacina y nitrato reductasa) confirmando el diagnóstico de la enfermedad. La identificación del complejo tuberculosis se debe acompañar de una prueba de sensibilidad.

El medio de Lowenstein Jensen (en base de huevo) es el más utilizado, para el cultivo del complejo *Mycobacterium*. Previo a la siembra el material debe descontaminarse; el método de *Petroff-modificado* utilizando el NaOH al 4% es uno de los más utilizados.

El método de Kudoh Ogawa modificado que se recomienda solo para procesar esputos en laboratorios sin equipamientos adecuados o suficientes para aplicar la técnica de Petroff. Si el laboratorio no cuenta con cabina de bioseguridad se deberán aplicarse las prácticas y medidas de bioseguridad para realizar labaciloscopia.

(Omar Aidar 2010). El cuadro 2 presenta la interpretación de crecimiento del *M. tuberculosis.*

A.3.1 Identificación bioquímica de M. Tuberculosis

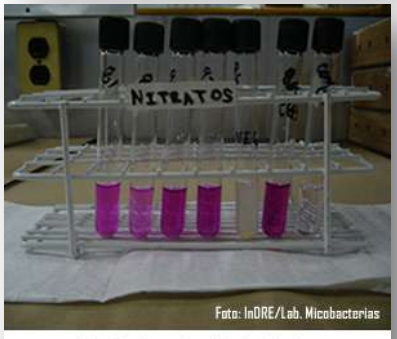
Prueba de Niacina

Aunque todas las micobacterias producen algo de niacina, sólo *M. tuberculosis* la produce y acumula en gran cantidad. Es una prueba básica para hacer la diferenciación de *M. tuberculosis* y *M. bovis* de otras micobacterias

Prueba de niacina. El color amarillo confirma la presencia de M. *tuberculosis* o M. *bovis*

Prueba de Reducción de Nitratos

M. tuberculosis utilizan nitratos como fuentes de nitrógeno, reemplazando a las sales de amonio y reduciéndolos a nitritos. Se detecta la presencia de nitritos cuando se forma un colorante rojo de diazonio (InDRE, 2011)



Prueba de reducción de nitratos

Prueba de Catalasa a temperatura ambiente y 68°C

Prueba de catalasa

Todas las micobacterias excepto las mutantes isoniazida-resistentes de *M. tuberculosis* y *M. gastri,* sintetizan catalasa en mayor o menor cantidad. Esta prueba permite diferenciar el *complejo M. tuberculosis* de las otras micobacterias.

Los organismos que producen la enzima catalasa, tienen la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre. (InDRE, 2011)

A.4 Pruebas de sensibilidad

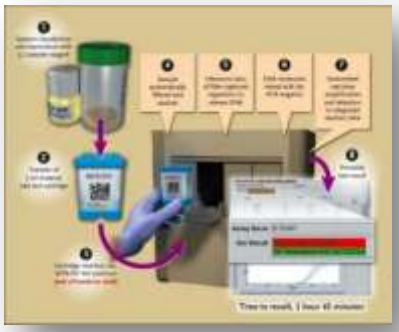
Se aconseja el estudio como mínimo de la resistencia a todos los casos de TB pulmonar. La isoniazida y la rifampicina el etambutol y la pirazidamida se utilizan como fármacos de primera línea.

El estándar de oro es el método de la proporciones de Canetti, Rist y Grosset, en el que se mide el desarrollo microbacteriano en tubos con concentraciones estandarizadas de las drogas de 1° y 2° línea. El mínimo desarrollo para efectuar este método es de19 - 20 colonias (Omar Aidar. 2010).

A.3.1.1 Métodos rápidos

La OMS aprobó tres métodos rápidos económicos para detectar farmacorresistencia: Nitratasa (Griess), que se realiza en el país, la rezasurina y el MODS que permiten detectar resistencia a isoniazida y la rifampicina, etambutol y la pirazidamida.

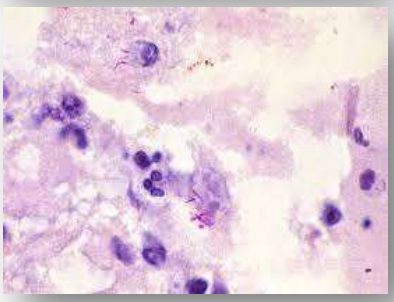
A.4 Métodos automatizados



Los métodos automatizados como el BACTEC MGIT 960, permite obtener resultados positivos en 10-13 días. Los negativos se observan hasta 42 días.

El G expert RT-PCR es como se ha llamado a la máquina que permite en no más de dos horas, diagnosticar la tuberculosis.

A.5 Biopsia



En muestras de biopsias (pleural, ganglionar, transbronquial, dérmica, etc.) el hallazgo microscópico del granuloma caseificante característico de la TB es altamente sugestivo de la enfermedad. Aunque las tinciones para Baar sean positivas, no confirman en forma absoluta la enfermedad. Parte del

material obtenido debe enviarse en solución fisiológica al laboratorio de TB para homogenización (macerado) y cultivo.

A.6 Biología molecular

Está la posibilidad de identificar el complejo *M. tuberculosis* a través de la amplificación de material genético bacilar de las muestras e identificación por hibridación de sondas ADN. La alta sensibilidad del PCR exige para evitar falsos positivos trabajar solamente con muestras que tengan Baar positivas. (Omar Aidar. 2010)

B. Indirectas

B.1 Agregar ADA

Es un marcador de actividad linfocitaria y está elevado en la tuberculosis de serosas y tuberculosis de meningitis. Un valor de ADA ≥ 600UL tiene una sensibilidad de 84% y especificidad de 94% para diagnóstico de la tuberculosis.

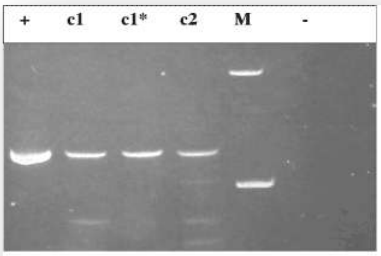


Fig.1. PCR positiva: amplificación para la secuencia de inserción IS6610 de Mycobacterium tuberculosis. +: caso problema. C1: caso problema a distintas diluciones; C2: otro caso +; M: peso molecular; -: control negativo.

B.4 Radiografía en la TB extraprimaria

El hallazgo más temprano es la consolidación del espacio aéreo. Habitualmente localizada en segmentos apicales y posteriores de los lóbulos superiores. Con el progreso de la enfermedad podamos observar compromiso lobular superior, habitualmente excavado: lobitis superior excavada. (Omar Aidar. 2010)

B.5 Tomografía axial computada (TAC)

Si bien la mayor parte de los casos de TB pueden seguirse solo con rayos x de tórax, existen circunstancias en las que es necesario el uso de la TAC. La misma permite detectar lesiones mínimas, enfermedad de la vía aérea y diseminación endobronquial observándose en denominado patrón de árbol en brote, que no es específico de la TB y corresponde al llenado de bronquios centrilobulares con exudado inflamatorio.

B.6 Test cutáneo en TB latente: (PPD)

El test cutáneo de tuberculina, por el método de Mantoux, ampliamente conocido y que consiste en la aplicación de 0,1ml intradérmico del derivado proteico purificado (PPD) de 5U, (especificidad 56-95%). Una prueba alternativa que se deberá usar con mayor frecuencia en el futuro es la medición de IFN (interferón) gamma específicos para péptidos de *Mycobacterium tuberculosis,* (especificidad 92-97%). (Martín Lasso B., 2011)

Interpretación: es positiva una induración > 5mm.

Procedimientos de Laboratorio

Coloración de Ziehl-Neelsen

Técnica de extensión de Esputo

Lo ideal sería realizar en una Cabina de Bioseguridad Biológica. Sin embargo en lugares en que carecen de este equipo se puede realizar frente a un mechero con medidas de bioseguridad, procurando realizarlas en lugares donde no mucho haya flujo de personas, en un lugar ventilado y con todos los insumos cerca, para evitar el movimiento excesivo del operador.

Marcar en un extremo del portaobjetos el número de registro de la muestra a estudiar.

Muestras bronco-alveolares

Seleccionar la parte más purulenta de la muestra. Con un asa bacteriológica estéril se cogerá una porción significativa de la misma y se extenderá sobre el portaobjetos (aproximadamente revisar norma de TB 1,5 cm de ancho por 3 cm de largo).

Muestras traqueo-bronquiales

(Esputo, aspirado traqueal), Estas muestras serán pre-tratadas y concentradas por centrifugación a excepción del esputo, se homogenizará el sedimento con la ayuda de una pipeta Pasteur de plástico y se transferirá una gota a la lámina portaobjetos que se extenderá como se ha mencionado previamente.

Líquido pleural

Superposición secuencial en una lámina portaobjetos de varias gotas.

Nota

- No se deberá preparar más de una extensión por lámina portaobjetos
- Fijar el material a la lámina portaobjetos mediante un calentador eléctrico (60 a 90°C) o bien dejándola secar a temperatura ambiente
- la fijación mediante calor puede mantener la viabilidad de algunas micobacterias. Por ello, estas preparaciones deberían manejarse con extremo cuidado

Insumos y materiales

- ✓ Muestra biológica
- ✓ Láminas portaobjetos
- ✓ Aplicadores de madera o asas bacteriológicas
- ✓ Mechero
- ✓ Chispero, encendedor o fósforos
- ✓ Soporte para colorear
- ✓ Solución de azul de metileno
- ✓ Marcador
- ✓ Aceite de inmersión
- ✓ Guantes
- ✓ Gabacha
- ✓ Mascarilla

- ✓ Solución de Fucsina fenicada filtrada
- ✓ Agua destilada
- ✓ Solución de alcohol-clorhídrico(97ml de alcohol y 3 ml de ácido clorhídrico)
- ✓ Recipiente para descarte
- ✓ Solución clorada 0.5%
- ✓ Tubos de ensayo

Equipo

- ✓ Microscópico
- ✓ centrifuga

Procedimiento para coloración

1. Colocar los portaobjetos sobre el soporte de tinción dejando suficiente espacio entre ellos para evitar arrastres y transferencias entre muestras diferentes.
2. Cubrir la preparación totalmente con la solución de fucsina fenicada filtrada
3. Calentar la lámina portaobjetos flameando hasta emisiones de vapor por tres veces, evitando la desecación y la ebullición. Esperar un minuto y medio entre cada emisión de vapor.
4. Lavar con agua (preferiblemente destilada en muestras estériles)
5. Añadir el decolorante alcohol-ácido y mantener hasta que no se desprenda más colorante, durante 1-3 minutos dependiendo del grosor del extendido.
6. Lavar con agua y decantar
7. Añadir el azul de metileno dejándolo durante 1 minuto revisar norma
8. Lavar con agua y dejar secar a temperatura ambiente.

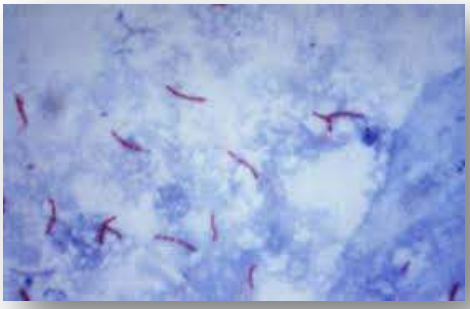
Valoración

Examinar en un microscopio (luz visible) con un objetivo de inmersión (100X).

Se debe examinar de forma sistemática 100 campos antes de dar una tinción negativa.

Resultados esperados

Bacilos ácido-resistentes se tiñen de color rojo brillante sobre un fondo azulado. Estos tienen aproximadamente de 1 a 10 um de longitud y de 0,2 a 0,6 um de ancho, puede estar ligeramente curvos y no suelen teñirse de manera uniforme adoptando un aspecto granulado a lo largo del bacilo.



Método de Petroff –Modificado

(Para cultivo de Mycobacterium tuberculosis)

El aislamiento del agente causal es el método Gold Stantard en el campo de la bacteriología permite la identificación de género y especie del *complejo Mycobacterium;* través de pruebas bioquímicas así como determinar parones de sensibilidad y resistencia para la toma de decisión en el tratamiento del paciente.

Insumos y materiales

- ✓ Muestra (Expectoración, orina, líquidos biológicos, tejidos y secreciones)
- ✓ Tubos de ensayo 180 x 180mm
- ✓ Tubos con medios de cultivo Lowenstein-Jensen (pico de flauta)
- ✓ Solución de NaOH al 3.5%
- ✓ Solución de NaOH al 2%
- ✓ Solución de ácido sulfúrico al 7% más tornasol
- ✓ Dispensador
- ✓ Mechero
- ✓ Recipiente para descarte
- ✓ Gabacha
- ✓ Guantes
- ✓ Marcador
- ✓ Mascarilla
- ✓ Chispero, encendedor o fosforos
- ✓ Solución clorada al 0.5%
- ✓ Tubos falcon estériles
- ✓ Papel pH

Equipo

- ✓ Cabina de bioseguridad
- ✓ Incubadora
- ✓ Microscopio
- ✓ Vórtex
- ✓ Centrifuga refrigerada.

Descontaminación y Neutralización

1. Colocar en cada tubo de ensayo falcón estéril aproximadamente 2ml de muestra
2. En el caso de muestras centrifugadas ocupar todo el sedimento.
3. Agregar a la muestra un volumen igual de hidróxido de sodio (NaOH) al 4%
4. Agitar las muestras por 20 segundos en vórtex para homogenizar
5. Centrifugar por 15 minutos a 3,000 rpm a 4 °C
6. Dejar reposar por 5 minutos, por la emisión de vapores
7. Decantar el sobrenadante dejando aproximadamente un volumen de 0.5 ml
8. Agregar gota a gota, ácido sulfúrico al 7% más tornasol, hasta que se produzca el cambio de color de azul a rosado
9. Agregar gota a gota hidróxido de sodio al 2%, agitando constantemente, para ajuste de pH de 6,6 a 7,2

10. Controlar el pH con el papel indicador, especialmente en las muestras que tienen color propio, por ejemplo; sangre o cuando hay poca experiencia en la técnica
11. Sacar las muestras del interior de la cabina de bioseguridad, dejando solo los tubos con muestra ya descontaminada y neutralizada.

Siembra e incubación

1. Colocar en el interior de la Cabina 2 tubos de medio Lowenstein-Jensen para las muestras pulmonares y 3 para los de origen extrapulmonar; los tubos deben estar previamente numerados y rotulados
2. Sembrar de 0,2 ml de muestra en cada tubo
3. Incubar los tubos de forma inclinada a 37°C, por 48-72 horas, con la tapa ligeramente suelta para permitir la evaporación del líquido de siembra y observar si hay contaminación (crec. En este tiempo).
4. Cerrar los tapones de los tubos en forma hermética
5. Incubar los tubos nuevamente en posición horizontal a 37°C por un periodo de 30 a 60 días. (6 a 8 semanas)

Revisión de cultivos

El informe se hace en base a la suma de los recuentos de las colonias, desarrolladas en todos los tubos sembradas. Las colonias típicas de *M. tuberculosis* variedad humana son secas, rugosas y con una leve coloración marfil.

Cadro 19. Recuento colonias de Mycobacterium

Resultado de cultivo	Conteo por colonia
Negativo	No hay crecimiento bacteriano
Positivo +	De 1 – 19 colonias
Positivo ++	colonias separadas > de 100
Positivo +++	Colonias completas
Contaminado	Solicitar nueva muestra

Recomendaciones

- Una vez terminado todo el trabajo descartar para autoclave todo el material utilizado
- Esterilizar la cabina de bioseguridad con luz ultravioleta durante 20 minutos.
- Una vez esterilizada la cabina realizar limpieza en toda la superficie, utilizando un paño con alcohol de 70% (Cloro al 0.2%)

Pautas de informe de cultivo

En caso de colonias anormales en morfología o pigmentación

- Efectuar frotis de las colonias, para confirmar presencia de BAAR
- Se informa “Cultivo positivo para Micobacterias, el número de colonias desarrolladas, se confirmara por tipificación”.

Bibliografía

1. Coinfección por tuberculosis y virus de la inmunodeficiencia humana: confluencia de dos epide
   Dr. Jorge Luis Lozano Salazar,[I] Dra C. Carolina Plasencia Asorey,[II] Dr. Daniel Marino Costa Montané[I] y MsC. Ventura Puente Saní[I]
   bvs.sld.cu/revistas/san/vol_16_9_12/HTM/san15912.htm
   Marzo de 2012.
2. Guías de Diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis
   Omar Aidar, Marta Ambrogii, Arévalo Jave José, otros…
   www.intramed.net/userfiles/2011/file/Maria/**guia_tuberculosis**.pdf
   Curso 2010 de Actualizacione para la Calidad de gestión clínica
3. Diagnóstico y tratamiento de infecciones oportunistas en el paciente adulto con infección por VIH/SIDA
   Martín Lasso B.
   Rev.Chil.Infec 2011; 28 (5); 440-460
4. Método de Petroff modificado
   Instructivo de trabajo
   Código CAVRR-LAB-M-IT-21
   Hospital Los Angeles
   Fecha de Emisión 20.06.2011
5. Tinciones básicas en el laboratorio de Microbiología
   Luis Esaú López-Jácome
   www.medigraphic.com/pdfs/invdis/ir-**2014**/ir141b.pdf
6. Manual de laboratorio de microbiología para el diagnóstico de infecciones respiratorias
   Mª José García, María Cárdenas Povedano, Arturo Urbano Felices
   Omnia Science
   1ª edición 2012
7. Departamento de Bacteriología InDRE - Dirección General ...
   www.indre.salud.gob.mx/interior/lab_micobacterias.html
   pruebas de identificación de especie y pruebas ... Esta prueba permite diferenciar el Complejo M. tuberculosis. 07 de Abril 2011 por InDRE.