

Procedimientos en Microbiología Clínica

RECOMENDACIONES DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ENFERMEDADES
INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

19.

Técnicas rápidas de detección
de antígeno

2 0 0 5

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

Coordinador: José Domínguez

**Autores: Carles Alonso
Rosa Bartolomé
José Domínguez
Lurdes Matas
Nuria Rabella**



ISBN: 84-609-9045-1

INDICE:

INDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1. Técnicas de detección de antígeno. Introducción general.
 - 1.1 Presentación del procedimiento
 - 1.2 Justificación de la estructura del procedimiento
 - 1.3 Objetivos del procedimiento
 - 1.4 Fundamento de las técnicas de detección de antígeno
 - 1.5 Principales técnicas de detección de antígeno
 - 1.6 Controles de calidad
 - 1.7 Consideraciones finales y perspectivas de futuro
2. Técnicas rápidas en el diagnóstico de las enfermedades de transmisión sexual.
3. Técnicas rápidas en el diagnóstico de las infecciones respiratorias.
4. Técnicas rápidas en el diagnóstico de las infecciones bacterianas del sistema nervioso central.
5. Técnicas rápidas en el diagnóstico de las gastroenteritis.
6. Técnicas rápidas en el diagnóstico de las parasitosis.
7. Técnicas rápidas en el diagnóstico de las infecciones por herpesvirus.
8. Técnicas rápidas en el diagnóstico de las micosis invasoras.
9. Técnicas rápidas en el diagnóstico de las hepatitis víricas y la infección por el VIH.
10. Bibliografía
 - 10.1 Enfermedades de transmisión sexual
 - 10.2 Infecciones respiratorias
 - 10.3 Infecciones bacterianas del sistema nervioso central
 - 10.4 Gastroenteritis
 - 10.5 Parasitosis
 - 10.6 Herpesvirus
 - 10.7 Micosis invasoras
 - 10.8 Hepatitis víricas e infección por el VIH

INDICE DE LOS DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. Técnicas rápidas de diagnóstico de las enfermedades de transmisión sexual.
2. Técnicas rápidas de diagnóstico de las infecciones respiratorias.
3. Técnicas rápidas de diagnóstico de las infecciones bacterianas del sistema nervioso central.
4. Técnicas rápidas de diagnóstico de las gastroenteritis.
5. Técnicas rápidas de diagnóstico de las parasitosis.
6. Técnicas rápidas de diagnóstico de las infecciones por herpesvirus.
7. Técnicas rápidas de diagnóstico de las micosis invasoras.

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

19. TÉCNICAS RÁPIDAS DE DETECCIÓN DE ANTÍGENO. 2005

Coordinador: José Domínguez

Autores: Carles Alonso

Rosa Bartolomé

José Domínguez

Lurdes Matas

Nuria Rabella

1. TÉCNICAS RÁPIDAS DE DETECCIÓN DE ANTÍGENO. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 PRESENTACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Las técnicas inmunológicas de detección de antígenos nos permiten detectar la presencia de microorganismos o de fragmentos de los mismos en las muestras clínicas. El desarrollo de estas técnicas se inició con el propósito de poder acelerar el diagnóstico de las enfermedades infecciosas tratando de superar algunos de los inconvenientes, especialmente la lentitud, de las técnicas convencionales. Que duda cabe que disponer de resultados rápidos es de utilidad para el manejo clínico y terapéutico de los pacientes.

Son técnicas especialmente útiles en aquellos casos en que el microorganismo causal crece lentamente o bien, no crece en los medios de cultivo. Además, los resultados de los mismos no se ven alterados por la administración previa de antimicrobianos.

Como inconvenientes principales de las mismas cabe destacar que no ofrecen información sobre la sensibilidad del microorganismo detectado a los antimicrobianos, y que en algunos casos no han alcanzado los niveles de sensibilidad y especificidad deseados.

1.2 JUSTIFICACIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL PROCEDIMIENTO

Dado el gran número de técnicas de detección de antígenos disponible y la enorme cantidad de microorganismos susceptibles de poder ser detectados resulta imposible desarrollar un único documento científico y un único documento técnico que incluya todas las posibilidades. En este sentido, el documento científico ha sido estructurado en síndromes, destacando en cada caso cual es el papel de las técnicas rápidas y qué microorganismos se pueden detectar por ellas.

Por lo que respecta al procedimiento técnico hemos desarrollado uno diferente por cada síndrome. Hubiera resultado imposible describir en un único procedimiento de forma suficientemente clara, todas las técnicas, todos los tratamientos de las muestras, todas las posibles aplicaciones y las interpretaciones de los resultados con todos sus matices. De forma que para cada síndrome hemos planteado un documento técnico, en formato de procedimiento normalizado de trabajo, en el cual se recogen qué muestras se deben utilizar, cómo deben manipularse, conservarse y tratarse, qué microorganismos podemos detectar en estas muestras, mediante qué técnicas y cómo debemos interpretar los resultados obtenidos.

1.3 OBJETIVOS DEL PROCEDIMIENTO

El objetivo del procedimiento es el de elaborar un documento de trabajo que permita conocer las técnicas disponibles y que microorganismos podemos detectar con ellas en cada caso.

Por otro lado, en los documentos técnicos no hacemos un abordaje detallado de cómo se realizan las técnicas ya que muchas de ellas están comercializadas, existen numerosas variantes para

la detección de microorganismos concretos y resultaría imposible, además de poco práctico, describir todas ellas. En cambio, incidimos en qué muestras son las más adecuadas para optimizar el rendimiento de las técnicas y cuál es el tratamiento previo que se les debe aplicar a las mismas. También se plantean las ventajas e inconvenientes de las técnicas, qué dan de sí, qué podemos esperar de ellas, qué se les puede pedir, etc. En definitiva, hemos querido dotar al procedimiento de la suficiente información práctica para que sea una herramienta útil en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas.

1.4 FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE ANTÍGENO

Las técnicas de detección de antígeno son técnicas inmunológicas que se fundamentan en la afinidad antígeno-anticuerpo. Definiríamos el antígeno como aquella molécula estructural o metabólica de origen microbiano que es reconocida como extraña por el organismo humano y que es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria. Por otro lado, un anticuerpo es una gammaglobulina sintetizada por las células plasmáticas en respuesta a la estimulación ejercida por un antígeno, con el que reacciona de forma específica, gracias a la correspondencia entre sus estructuras.

De forma que si disponemos de anticuerpos específicos podemos detectar los antígenos correspondientes en una muestra clínica. Esta es la base de las técnicas de detección de antígenos microbianos. Los anticuerpos específicos empleados en estas técnicas son obtenidos como antisueros de animales inmunizados, que serían **anticuerpos policlonales**, o por producción *in vitro* mediante hibridomas con la obtención de **anticuerpos monoclonales**. Los anticuerpos monoclonales pueden utilizarse solos o combinando diferentes anticuerpos dirigidos contra dos o más epítopos diferentes. La principal ventaja de los anticuerpos monoclonales es su alto grado de especificidad, lo cual los hace extremadamente útiles para distinguir entre microorganismos muy próximos antigénicamente. Sus limitaciones incluyen, por lo tanto, una incapacidad de detectar todas las variedades de un mismo microorganismo debido a su alta especificidad y una teórica baja afinidad.

1.5 PRINCIPALES TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE ANTÍGENO

A pesar de que el fundamento de todas estas técnicas requiere de la utilización de un anticuerpo específico, las técnicas existentes se diferencian en función del soporte en que tiene lugar la reacción y en la forma de revelar la presencia de este antígeno. A nivel estructural los anticuerpos presentan dos extremos iguales que son los que se unen específicamente al antígeno, es decir cada anticuerpo puede unirse a dos moléculas de antígeno (fragmentos Fab: *fragment antigen binding*), y un extremo diferente con propiedades biológicas relacionadas con la activación del sistema del

complemento y con la fagocitosis (fragmento Fc: llamado así porque cristaliza con facilidad). El revelado de la presencia del antígeno se realiza mediante anticuerpos conjugados. Los anticuerpos a través del fragmento Fc pueden ser fijados a partículas (moléculas de oro coloidal, partículas de látex, etc) y también pueden unirse químicamente a enzimas, moléculas fluorescentes, radioactivas o lumínicas.

Las principales técnicas de detección de antígenos son: a) contrainmunolectroforesis, b) técnicas de aglutinación, c) inmunocromatografía, d) enzimo-inmunoanálisis, e) inmunofluorescencia y f) métodos luminométricos. Seguidamente se describen los fundamentos de estos métodos.

Contrainmunolectroforesis.- En un par de pocillos practicados en un gel de agarosa se enfrentan la muestra en la cual deseamos estudiar la presencia de antígeno y el antisuero homólogo. Al aplicar un campo eléctrico a través del gel, el antígeno migra hacia el pocillo del antisuero y las inmunoglobulinas hacia el del antígeno, bien como consecuencia de la carga eléctrica o bien arrastradas en sentido contrario por el flujo osmótico que se establece en el interior del agar. Este flujo osmótico (o electroendosmosis) se debe a que en un gel de agar los residuos aniónicos (fundamentalmente sulfato y piruvato) se encuentran fijados covalentemente a la matriz del gel sin poder migrar dentro del campo magnético. En cambio, los cationes con las moléculas de agua asociadas sí son capaces de migrar catódicamente. Como consecuencia, se produce un movimiento neto de agua que puede arrastrar a las moléculas que, en las condiciones en que se practique la electroforesis, presenten carga neutra. De una forma o de otra, el antígeno y el anticuerpo se concentran en una zona de reacción entre los dos pocillos donde al encontrarse en la proporción adecuada forman una banda de precipitación (**Figuras 1a y 1b**).

Técnicas de aglutinación.- Sobre una tarjeta de reacción se mezclan la muestra clínica que alberga al antígeno con el reactivo que contiene a los anticuerpos específicos. Al entrar en contacto los anticuerpos mediante los dos puntos de unión con el antígeno establecen entramados de muchas moléculas de antígeno y de anticuerpos. Esta aglutinación de partículas antigénicas forma grumos (**Figuras 2a y 2b**). Para que estos grumos sean fácilmente visibles macroscópicamente, los anticuerpos están unidos por el fragmento Fc a partículas inertes de mayor tamaño, tales como partículas de látex. Estas técnicas son extraordinariamente rápidas, ofreciendo resultados en 2-10 minutos, pero en general adolecen de buena sensibilidad.

Inmuncromatografía.- Sobre una membrana de nitrocelulosa o *nylon* se encuentran absorbidos en la línea de reacción anticuerpos contra el antígeno que buscamos y sobre la línea control anticuerpos anti-conjugado, de forma que cuando la muestra contiene antígeno, este fluye por la membrana quedando retenido en la línea de reacción. El conjugado, que también es un anticuerpo específico frente al

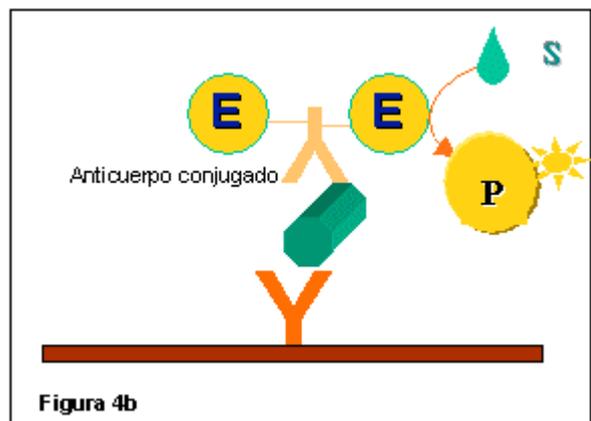
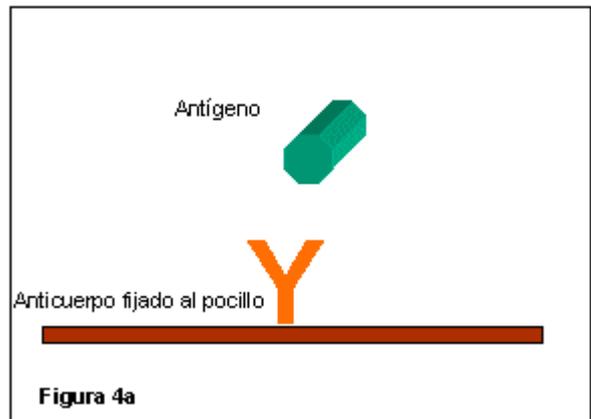
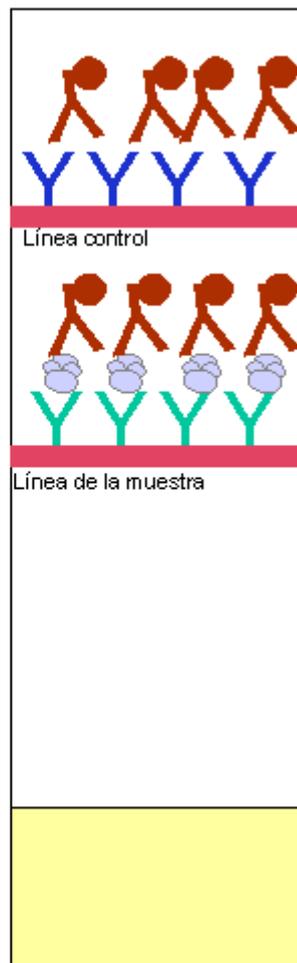
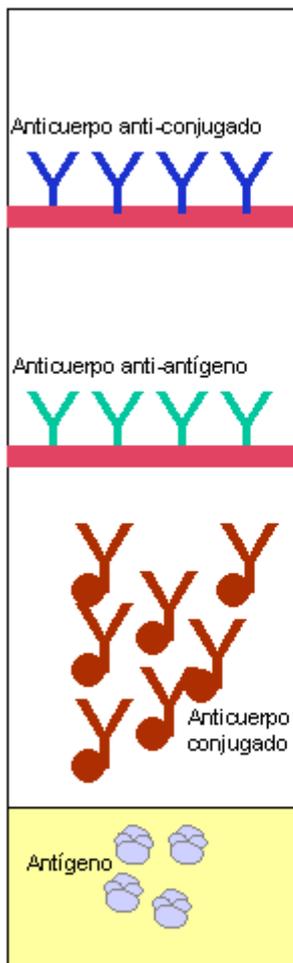
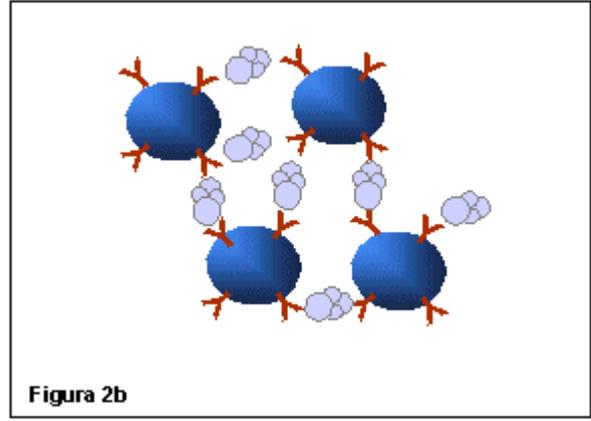
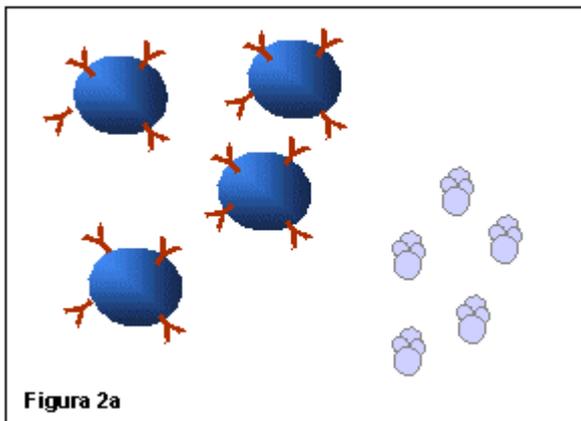
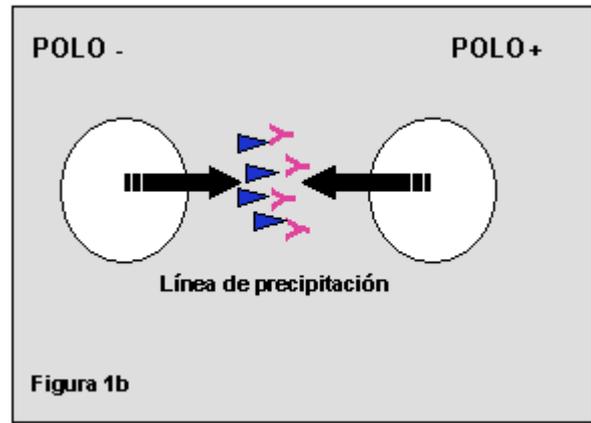
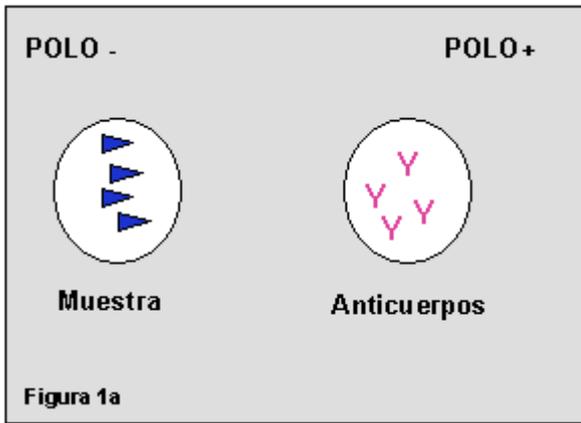
antígeno que buscamos, está marcado con una molécula de oro coloidal, que también fluye por la membrana, es retenido por el antígeno en la línea de reacción y por el anticuerpo en la línea control (**Figuras 3a y 3b**). En el caso de muestras negativas que no contienen antígeno, el conjugado es retenido únicamente en la línea control. Estas técnicas son rápidas, obteniéndose resultados en 15-30 minutos.

Enzimo-inmunoanálisis (EIA).- Normalmente la detección tiene lugar en placas de poliestireno, donde los anticuerpos específicos están fijados sobre la superficie de los pocillos. Estos anticuerpos retienen a los antígenos presentes en la muestra y su presencia es revelada posteriormente mediante la utilización de anticuerpos también específicos del antígeno conjugados con enzimas. Estas enzimas provocan un cambio de color al interaccionar con el sustrato específico. Las enzimas más utilizadas son la fosfatasa alcalina y la peroxidasa que actúan sobre el p-nitrofenil fosfato y el agua oxigenada, respectivamente. En el caso de la peroxidasa el oxígeno liberado del agua oxigenada actúa sobre otro sustrato: o-fenilendiamina, ácido 5-aminosalicílico o la 3,3',5,5'tetrametilbencidina. De forma, que en este tipo de EIA, a mayor intensidad de color mayor cantidad de antígeno fijado al pocillo (**Figuras 4a y 4b**).

Existen otros tipos de EIA, como son los EIA competitivos, en que el antígeno de la muestra compite por los anticuerpos específicos con antígenos sintéticos que nosotros añadimos, de forma que a mayor intensidad de color menor cantidad de antígeno fijado. También es posible realizar EIA cuantitativos, que mediante la inclusión de calibradores, que tienen una concentración conocida de antígeno, permiten extrapolar la cantidad de antígeno presente en las muestras.

La posibilidad de emplear como conjugado un anticuerpo marcado con un isótopo radioactivo cada vez es menos frecuente. La necesidad de disponer de instalaciones adecuadas, la necesaria recogida selectiva de los desechos, los riesgos derivados de trabajar con isótopos radioactivos y el hecho que los conjugados enzimáticos ofrecen unos resultados similares en sensibilidad han limitado el desarrollo de estas técnicas.

Inmunofluorescencia.- Las pruebas de inmunofluorescencia se basan en la adición de anticuerpos específicos sobre extensiones de muestras clínicas realizadas sobre un portaobjetos. En la inmunofluorescencia directa el anticuerpo empleado está marcado con una sustancia fluorescente (fluorocromos), una de las más utilizadas es la fluoresceína. En la inmunofluorescencia indirecta el anticuerpo empleado no está marcado con ninguna sustancia, revelándose la presencia del antígeno al emplear un segundo anticuerpo marcado con un fluorocromo frente al anticuerpo primario. La lectura de los



resultados se realiza por observación al microscopio de fluorescencia de los microorganismos o de las células infectadas fluorescentes sobre un fondo oscuro.

Métodos luminométricos.- La reacción tiene lugar en tubos de propileno o poliestireno donde se encuentran fijados los anticuerpos específicos. La presencia de antígeno fijado por los anticuerpos del tubo se evidencia por la adición de anticuerpos también específicos marcados con sustancias luminícas como son los ésteres de acridina (existen otras sustancias como el luminol o el adamantil dioxietano). La rotura de los ésteres de acridina por la adición de agua oxigenada en ácido nítrico con hidróxido sódico libera luz que es leída por un luminómetro como unidades relativas de luz (RLU). Este tipo de técnica también permite realizar determinaciones cuantitativas.

1.6 CONTROLES DE CALIDAD

En la interpretación de los resultados obtenidos por técnicas inmunológicas de detección de antígeno es fundamental introducir suficientes medidas de control que aseguren la calidad de los mismos. Es imprescindible incluir siempre controles positivos y negativos. Estos controles pueden ser facilitados por los fabricantes de los métodos comercializados, pueden ser muestras propias del laboratorio o bien pueden ser adquiridos controles comercializados y estandarizados de laboratorios y agencias internacionales. En función de la técnica puede ser necesario controles adicionales, como "blancos" en las técnicas de EIA o controles de partículas no sensibilizadas en las técnicas de aglutinación.

Por otro lado, no debe descuidarse el registro de control de lotes, de temperaturas de neveras para la conservación de los reactivos, control de los incubadores y calibración de las pipetas automáticas y de los aparatos necesarios. La participación en programas nacionales e internacionales de control de calidad en los que se debe determinar la presencia o no de antígeno en un lote de muestras, es vital para asegurar la calidad de los resultados.

1.7 CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

El futuro en este campo está fundamentalmente en manos de las compañías de reactivos de laboratorio, que han de ser capaces de ofrecer una batería de técnicas sensibles y específicas que, empleando preferentemente muestras clínicas no obtenidas por procedimientos invasores, proporcionen un diagnóstico etiológico rápido, de forma que sea posible establecer una orientación terapéutica adecuada y precoz de las enfermedades infecciosas. Que duda cabe que la activa investigación en nuevos formatos de estas técnicas que se está llevando a cabo actualmente, puede conducir a que en poco tiempo hayan cambios significativos que modifiquen las pautas de actuación, incluidos los procedimientos establecidos en el presente documento.

2. TÉCNICAS RAPIDAS EN EL DIAGNOSTICO DE LAS ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL

De los microorganismos cuya transmisión sexual tiene importancia epidemiológica, únicamente nos referiremos a las causadas por *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* serogrupos B,D,E,F y K.

En el hombre ambos microorganismos producen uretritis, con discretas diferencias en las características clínicas por lo que se refiere al tiempo de incubación, a los síntomas y a las posibles complicaciones, especialmente la orquiepididimitis.

En la mujer el cuadro inicial es una cervicitis generalmente poco sintomática (discreto aumento de flujo vaginal o dolor pélvico-perineal). Las complicaciones, se producen por progresión ascendente de la infección y que pasa a afectar endometrio, trompas y anejos, produciendo endometritis, salpingitis y enfermedad pélvica inflamatoria. Ello puede condicionar a largo plazo problemas de esterilidad y embarazo ectópico. También se ha implicado *C. trachomatis* en el síndrome uretral agudo.

Con el fin de limitar la cadena epidemiológica, el seguimiento de los pacientes con infecciones de transmisión sexual debe incluir el estudio de la/s pareja/s sexuales, independientemente de la presencia o no de sintomatología.

Las manifestaciones clínicas de estas infecciones acostumbran a ser más evidentes en el hombre que en la mujer de manera que las técnicas de detección de antígeno ofrecen mejores resultados para el diagnóstico de la uretritis que de la cervicitis. Además la sensibilidad para la detección de portadores asintomáticos es realmente limitada. Para el estudio de contactos y portadores asintomáticos, las técnicas de detección genética presentan mejor rendimiento. En diversos estudios realizados en nuestro medio, la prevalencia de infecciones por *C. trachomatis* es considerablemente menor que en los países anglosajones. Esta circunstancia obliga a seleccionar y valorar con mucha atención la técnica diagnóstica a aplicar. Al igual que en muchos países europeos, se observa un incremento de frecuencia de aislamiento de *N. gonorrhoeae*, especialmente en la población de hombres homo y bisexuales.

3. TÉCNICAS RAPIDAS EN EL DIAGNOSTICO DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS

El aparato respiratorio es una de las principales vías por la que los agentes patógenos penetran en el organismo; se ha calculado que diariamente llegan a los pulmones más de 10.000 microorganismos viables. La nasofaringe está colonizada por una gran cantidad y variedad de microorganismos que pueden ser aspirados hacia las vías aéreas bajas; la diseminación desde otros territorios orgánicos o la inhalación de microorganismos exógenos también puede dar lugar a una infección pulmonar. Atendiendo a aspectos anatómicos podemos dividir a las infecciones de las vías aéreas en dos grandes

grupos: las de la vía aérea superior y las de la inferior.

Infecciones del tracto respiratorio superior

Sinusitis. - Los principales agentes responsables de sinusitis aguda son *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* no tipable y *Streptococcus pyogenes*. En fases iniciales es fácil identificar virus respiratorios como virus parainfluenza, virus de la gripe, adenovirus y rinovirus.

Otitis media. - La otitis media es una de las patologías más frecuentes en el niño. Los principales patógenos son *S. pneumoniae* y *H. influenzae* no tipable. Otros patógenos menos frecuentes son *S. pyogenes* y *Moraxella catarrhalis*.

Laringotraqueitis. - La mayor parte de los episodios son de origen vírico. Los virus más frecuentemente implicados son parainfluenza 1, 2 y 3, y con menor frecuencia, gripe A y B, y virus respiratorio sincitial. También pueden estar implicados rinovirus, enterovirus, coronavirus, metaneumovirus y adenovirus. Únicamente en un pequeño porcentaje la etiología no es vírica, estando implicado en estos casos *Mycoplasma pneumoniae*.

Epiglotitis. - La introducción de la vacuna frente a *H. influenzae* tipo b ha reducido la incidencia del que era el principal patógeno responsable. Excepcionalmente se han implicado otros microorganismos como son *S. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *S. pyogenes*. La etiología vírica es infrecuente.

Faringoamigdalitis. La etiología más frecuente es vírica (adenovirus, rinovirus, enterovirus, y, excepcionalmente, el virus de Epstein-Barr). En segundo lugar, bacteriana, concretamente *S. pyogenes* (otras bacterias aparecen en menos del 5% de los casos). La etiología estreptocócica es la única forma de la enfermedad en la que el tratamiento antibiótico está claramente indicado. El principal objetivo del tratamiento antibiótico es la prevención de la *fiebre reumática*, y la erradicación de *S. pyogenes* de la orofaringe. En este sentido las técnicas de detección de antígeno estreptocócico en muestra orofaríngea han mostrado una elevada rapidez y especificidad. La sensibilidad dependerá del método empleado y del número de microorganismos presentes en la muestra. En muestras con baja carga microbiana es posible obtener falsos negativos, por lo que deben confirmarse por cultivo.

Infecciones del tracto respiratorio inferior

Bronquiolitis. - La bronquiolitis es una infección aguda de las vías inferiores. Este término se ha utilizado tradicionalmente para definir un síndrome vírico con sibilancias en los niños pequeños. La bronquiolitis implica inflamación de las vías aéreas pequeñas caracterizada por la obstrucción de los bronquiolos. Durante el primer año de vida, la bronquiolitis es la manifestación más frecuente de la infección del tracto respiratorio inferior. El principal agente etiológico es el virus respiratorio sincitial.

Bronquitis aguda. - Es un proceso inflamatorio que afecta a tráquea y bronquios. Se da a cualquier edad, aunque la población fumadora y los niños

presenta una mayor incidencia. La etiología vírica es responsable del 50-90% de los casos, los virus respiratorios más frecuentemente involucrados son adenovirus, virus de la gripe A y B, virus respiratorio sincitial, parainfluenza, rinovirus y coronavirus

Bronquitis crónica. - La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es la enfermedad respiratoria de mayor prevalencia e impacto socioeconómico. En España un 9% de la población de entre 40 y 70 años cumple criterios de EPOC. Además, en nuestro país, la EPOC representa la cuarta causa de mortalidad, con una tasa global de 33 por 100.000 habitantes. En la bronquitis crónica se ha postulado que la infección bacteriana juega un papel patogénico clave en la lesión del tejido pulmonar. Se establece un círculo vicioso donde la lesión favorece la infección y viceversa. Estos pacientes sufren anualmente entre 1 y 4 reagudizaciones. Aunque la infección no es la única causa, sí representa un porcentaje próximo al 50%. Son tres los microorganismos asociados a la reagudización de la bronquitis crónica: *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *M. catarrhalis*. Estos mismos microorganismos es posible encontrarlos en pacientes bronquíticos no reagudizados colonizando la vía respiratoria.

Neumonía. - Las neumonías son la primera causa de mortalidad entre las enfermedades infecciosas, particularmente en los individuos de más de 65 años. Desde un punto de vista práctico resulta útil clasificar las neumonías de acuerdo con el grupo de población que afectan.

Neumonía adquirida en la comunidad. Son muy constantes los principales agentes etiológicos responsables de las neumonías adquiridas en la comunidad (NAC). Así, *S. pneumoniae* es el principal agente etiológico de neumonía adquirida en la comunidad en todo el mundo. *H. influenzae* se encuentra en los primeros lugares como agente etiológico en los cuadros clínicos de neumonía típica. *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae* y *M. pneumoniae* se encuentran también en los primeros puestos en casi todos los estudios. Los bacilos gramnegativos aerobios son una causa poco frecuente de NAC en la población no inmunodeprimida. En las etiologías de las neumonías más graves *S. pneumoniae*, *L. pneumophila* y bacilos gramnegativos (incluido *H. influenzae*), son los patógenos a considerar en todos los casos. En función de los datos disponibles sobre la gravedad de la neumonía en relación a la etiología, los esfuerzos deberían ir dirigidos fundamentalmente a diagnosticar las neumonías por neumococo y por *L. pneumophila*. Así mismo en los adultos no debemos olvidar al virus de la gripe A como causante de neumonía. Otros virus respiratorios también pueden estar implicados aunque su frecuencia es mucho menor.

En los niños el virus respiratorio sincitial es el agente etiológico más común y en los niños más

pequeños es frecuente el ingreso hospitalario. Por otra parte la infección en estos pacientes por el virus de la gripe y otros virus respiratorios puede dar lugar a manifestaciones clínicas graves.

Neumonía nosocomial. La neumonía nosocomial es la segunda causa de infección hospitalaria y la primera en las Unidades de Cuidados Intensivos, llegando la mortalidad en algunas estadísticas al 30-50% de todos los casos. La implicación de los bacilos gramnegativos (enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*) en la neumonía nosocomial es muy frecuente. En el paciente sometido a ventilación mecánica, *S. aureus* se situaría en segundo lugar, mientras que los microorganismos más prevalentes en la comunidad serían únicamente frecuentes en aquellas neumonías nosocomiales de aparición precoz.

Neumonía en el paciente inmunodeprimido. Actualmente, una elevada proporción de pacientes hospitalizados o de individuos residentes en la comunidad presentan defectos específicos de los sistemas defensivos que es preciso conocer ya que los expone de forma particular a etiologías específicas. Actualmente la mayoría de estos pacientes presentan infección por el virus de inmunodeficiencia humana o reciben tratamiento inmunosupresor con corticoides o quimioterapia para evitar el rechazo de órganos transplantados. Los pacientes inmunodeprimidos pueden presentar neumonías de etiología muy diversa, dependiendo del tipo y grado de su déficit inmunitario.

El diagnóstico de las neumonías plantea más dificultades que el de cualquier otro síndrome infeccioso; esto es debido fundamentalmente, a que la neumonía es un síndrome plurietiológico; en relación a la edad, lugar de adquisición y estado del huésped, los microorganismos implicados pueden ser muy diferentes.

Además muchos agentes causales pueden formar parte, regular o transitoriamente, de la flora comensal de la vía respiratoria y en el caso de las neumonías es especialmente difícil obtener muestras representativas del foco de infección por técnicas no invasoras, no pudiéndose realizar técnicas invasoras de forma indiscriminada, sino quedando su utilización limitada a pacientes con neumonías de alto riesgo. Además, debe tenerse en cuenta que numerosos microorganismos que producen patología respiratoria no pueden aislarse en cultivos convencionales (*M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *Coxiella burnetii*...). La serología únicamente proporciona un diagnóstico retrospectivo de escaso valor para la orientación terapéutica de los pacientes. Las técnicas inmunológicas más utilizadas presentan problemas de especificidad y sensibilidad tanto en muestras respiratorias como extra-respiratorias. Actualmente, no se dispone de técnicas de amplificación genética comercializadas estandarizadas para detectar los agentes causales más habituales.

Las técnicas inmunológicas de detección de antígenos de los diferentes patógenos respiratorios, algunas de las cuales se han consolidado en sus posibilidades reales en los últimos años, pueden aplicarse a muestras procedentes del foco de infección, suero por el que circulan y orina por la que se eliminan. Esto permitiría poder aplicarlas de forma general, independientemente de la gravedad del proceso en estudio.

4. TÉCNICAS RAPIDAS EN EL DIAGNOSTICO DE LAS INFECCIONES BACTERIANAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La clínica de presentación de las infecciones del sistema nervioso central puede ser aguda, subaguda o crónica y depende de la virulencia del agente infeccioso y de la localización de la infección.

Meningitis agudas bacterianas

La inflamación de las meninges se conoce como meningitis y cuando está ocasionada por bacterias, hablamos de meningitis bacteriana, siendo las más frecuentes las agudas, causadas por microorganismos piógenos. Los tres patógenos más frecuentes causantes de meningitis bacteriana aguda son, *Neisseria meningitidis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae*.

N. meningitidis es la causa más común de meningitis en niños y adultos jóvenes y se asocia a un porcentaje de mortalidad del 3% al 13%. Se subdivide en serogrupos y serotipos. Se han descrito trece serogrupos según las características antigénicas de los polisacáridos de la cápsula. Los serogrupos A, B, C, X, Y y W135 son los que se asocian con más frecuencia a la enfermedad meningocócica y los más frecuentes son el C, el B y el Y. Mientras el serogrupo B causa la mayoría de casos esporádicos, la enfermedad debida a los serogrupos A y C puede presentarse en forma epidémica.

S. pneumoniae es la causa más frecuente y grave de meningitis aguda adquirida en la comunidad. Las cepas virulentas de *S. pneumoniae* se encuentran cubiertas por una capa compleja de polisacáridos. Estos polisacáridos capsulares se han utilizado para la clasificación serológica de las cepas y en la actualidad se han identificado más de 90 serotipos de los cuales, sólo 18, son los responsables del 80% de la patología humana. La incidencia de meningitis por *S. pneumoniae* en niños menores de 2 años en España es de 13'13 por 100.000 niños cada año, siendo sus tasas de letalidad (6%) y secuelas superiores a las ocasionadas por otros microorganismos. La comercialización en España de una vacuna conjugada antineumocócica eficaz ha supuesto que los expertos recomienden su administración sistemática en menores de 2 años. Un aspecto importante a tener en cuenta en esta meningitis es su tratamiento que presenta problemas debido al aumento de la prevalencia de la resistencia del microorganismo a las cefalosporinas de tercera generación.

La mayoría de las meningitis causadas por **H. influenzae** tienen lugar en niños menores de 5 años

de edad con un máximo de incidencia entre 6 y 12 meses. La superficie de muchas cepas de este microorganismo está cubierta por una cápsula de polisacáridos y se han identificados seis serotipos antigénicos (de la a hasta la f). Antes de la introducción de la vacuna de *H. influenzae*, el serotipo b era el responsable de más del 95% de las infecciones invasivas por este microorganismo, con una incidencia de 7,5 casos por 100.000 niños menores de 5 años, no obstante, su incidencia ha disminuido espectacularmente en aquellos países en los que se ha introducido la vacuna conjugada frente a *H. influenzae* tipo b de forma sistemática en el calendario vacunal. Actualmente los serotipos c y f, así como los serotipos no encapsulados de *H. influenzae*, son los responsables de la mayor parte de las infecciones.

Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli son una causa común de meningitis bacteriana en neonatos. ***Listeria monocytogenes*** y en especial los serotipos 1/2b y 4b están implicados en la meningitis neonatal, pero también pueden provocar enfermedad en los adultos mayores de 60 años, pacientes alcohólicos, con neoplasias y con tratamientos inmunosupresores. Otros factores predisponentes incluyen diabetes, insuficiencia renal y hepática crónica, enfermedades autoinmunes y situaciones asociadas a un aumento de los depósitos de hierro.

En la tabla 1 se exponen las etiologías más frecuentes de las meningitis bacterianas según la edad.

Los métodos de diagnóstico microbiológico presentan algunas limitaciones. La **tinción de Gram** del líquido cefalorraquídeo (LCR) permite una identificación bacteriana rápida y precisa en el 60%-90% de los pacientes con una meningitis bacteriana y presenta una especificidad de $\geq 97\%$. La probabilidad de que se visualice algún microorganismo mediante esta tinción se correlaciona con la concentración bacteriana en el LCR. Una concentración de $\leq 10^3$ UFC/ml se asocia a un 25% de positividad de la tinción de Gram. Una concentración de 10^3 - 10^5 UFC/ml se asocia a un 60% de positividad y una concentración $>10^5$ UFC/ml se correlaciona con el 97% de casos con tinción de Gram positiva.

La probabilidad de que esta tinción sea positiva depende también del tipo específico de bacteria que cause la meningitis. *S. pneumoniae* se observa en el 90% de casos, *H. influenzae* en el 86%, *N. meningitidis* en el 75%, bacilos gramnegativos en el 50% y aproximadamente en un tercio de los casos de meningitis causadas por *L. Monocytogenes* se observan bacilos grampositivos.

Tabla 1. Etiologías más frecuentes de meningitis bacteriana aguda según la edad.

Edad	Etiología
Neonatos < 1 mes	<i>S. agalactiae</i> <i>E. coli</i> <i>L. monocytogenes</i>
Niños 1 mes – 5 años	<i>N. meningitidis</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i>
Pacientes de 5 a 19 años	<i>N. meningitidis</i>
Adultos hasta 65 años	<i>N. meningitidis</i> <i>S. pneumoniae</i>
Adultos > 65 años e inmunodeprimidos	<i>N. meningitidis</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>L. monocytogenes</i>

La tinción de Gram es un método rápido, barato y específico para el diagnóstico de las meningitis, pero en los pacientes que han recibido tratamiento antibiótico previo, la sensibilidad de esta tinción puede disminuir en un 20%. Maxson y cols. indican que un tratamiento antibiótico oral o parenteral de menos de 24 horas de duración antes de la realización de la punción lumbar, no da lugar, necesariamente, a una tinción de Gram del LCR negativa. Algunos autores consideran que la tinción de Gram puede ser más sensible que las técnicas de detección de antígeno, en concreto, que la prueba de aglutinación por látex y que, por ello, esta tinción debe realizarse siempre.

El **cultivo** de LCR ha sido considerado como la técnica de referencia para el diagnóstico de las meningitis bacterianas, no obstante, el resultado tarda en obtenerse 24 horas o más y puede ser negativo si el paciente ha recibido tratamiento antimicrobiano. Se ha observado que la administración previa de antibióticos afecta más al porcentaje de positividad de los hemocultivos que del cultivo del LCR. Esta persistencia en el LCR puede estar en relación con la presencia de una alta concentración bacteriana en dicha muestra. Los leucocitos polimorfonucleares presentes en el LCR desempeñan un papel menos importante en la eliminación bacteriana. Algunos estudios presentan unos porcentajes de cultivos positivos de LCR del 90%. Otro aspecto importante del aislamiento del microorganismo en el cultivo es la detección de serogrupos, como en el caso de *N. meningitidis*, mediante técnicas de coaglutinación y la posibilidad de realizar determinaciones de sensibilidad a antimicrobianos.

La meningitis bacteriana sigue siendo en la actualidad una importante causa de morbilidad y mortalidad que exige un tratamiento antibiótico urgente y eficaz, por ello, es importante la realización de un diagnóstico etiológico rápido que, además de basarse en la anamnesis y la exploración del paciente, se fundamente en la realización de una tinción de Gram, cultivo del LCR y de la puesta en marcha de otras técnicas rápidas como la detección de antígenos.

5. TÉCNICAS RAPIDAS EN EL DIAGNOSTICO DE LAS GASTROENTERITIS

Los microorganismos asociados con las gastroenteritis incluyen bacterias, virus y parásitos. Tanto en la población adulta como en la infancia, *Salmonella* y *Campylobacter* son los enteropatógenos bacterianos que se aíslan con más frecuencia en nuestro medio, especialmente durante los meses cálidos del año. *Shigella* y *Yersinia enterocolitica* son bacterias que causan gastroenteritis también por mecanismo invasor como las dos anteriores pero con una frecuencia mucho más baja. Las especies de *Shigella* se aíslan preferentemente durante los meses cálidos y son causa frecuente de enteritis en los viajeros. *Yersinia enterocolitica* se aísla durante los meses fríos.

Otros enteropatógenos poco frecuentes en nuestro medio son los diferentes tipos de *E. coli* **diarreagénicos** que causan enfermedades entéricas con una sintomatología que varía desde una diarrea coleriforme hasta una disentería grave. *E. coli* enteropatógeno (ECEP) es responsable de un gran número de casos de diarrea infantil en países subdesarrollados. *E. coli* enterohemorrágico (ECEH) y en especial *E. coli* O157:H7 ha sido la causa en nuestro medio de casos esporádicos poco frecuentes de colitis hemorrágica y de muy escasos brotes de toxiinfección alimentaria asociada a la ingesta de agua o alimentos contaminados. El ganado vacuno y ovino constituye el principal reservorio siendo la carne picada y las hamburguesas los principales vehículos de transmisión. *E. coli* enterotoxigénico (ECET), excepcional en nuestro medio, está considerado como la causa más frecuente de diarrea infantil en países subdesarrollados, y también es el agente causal más frecuente de la diarrea del viajero. ECET producen una enterotoxina termoestable (ST), otra termolábil (LT) o ambas, que dan lugar a la secreción de electrolitos y agua en la luz intestinal. *E. coli* enteroagregativo (ECEA) da lugar a diarrea persistente en niños tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo y en pacientes con SIDA. *E. coli* enteroinvasivo (ECEI) se ha detectado en brotes por alimentos contaminados. Otras bacterias patógenas también poco comunes son *Vibrio cholerae* O1, O139, bacterias toxigénicas causantes del cólera, *V. cholerae* de otros serotipos, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio parahaemolyticus* que dan lugar a casos esporádicos o a brotes de toxiinfección alimentaria asociados a la ingestión de mariscos crudos o poco cocidos.

En nuestro medio, las bacterias toxigénicas que causan con mayor frecuencia infección por enterotoxinas vehiculadas por alimentos son, sin duda, *S. aureus*, *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus*.

S. aureus es causante de enteritis por mecanismo toxigénico que con gran frecuencia ocasiona brotes de toxiinfección alimentaria. Este microorganismo produce una gran variedad de sustancias extracelulares que se definen como toxinas porque afectan la función de la célula huésped o a su morfología. Algunas de ellas expresan su efecto

perjudicial mediante una acción enzimática, otras como las enterotoxinas y las toxinas implicadas en el shock tóxico son potentes inductores de citocinas que actúan como superantígenos bacterianos. Alrededor del 50% de los aislamientos de *S. aureus* producen enterotoxinas de las cuales se reconocen cinco tipos serológicos distintos (A, B, C, D y E) subdividiéndose el tipo C en tres subtipos (C₁, C₂ y C₃). Todas estas enterotoxinas son polipéptidos de entre 20 y 30 kDa y son producidas por *S. aureus* en los alimentos contaminados antes de su ingesta (toxinas preformadas). Por ello, la sintomatología de la gastroenteritis aparece tras un periodo de incubación muy corto (1-6 horas) y de forma brusca. El diagnóstico de esta toxiinfección alimentaria se basa, fundamentalmente, en la detección de las enterotoxinas en los alimentos y/o en las heces.

El reservorio de **B. cereus** es fundamentalmente telúrico y está ampliamente distribuido en la naturaleza. Se encuentra en la materia orgánica en descomposición, en el polvo, el suelo, los vegetales y el agua. Son bacilos aerobios o anaerobios facultativos formadores de esporas. Estas esporas pueden contaminar accidentalmente los alimentos crudos, secos y cocidos o preparados, que si se mantienen a temperatura ambiente, permitan la multiplicación del microorganismo y la producción y liberación en el alimento de toxinas que ocasionan brotes de toxiinfección alimentaria con relativa frecuencia. Existen dos tipos diferentes de enterotoxinas producidas por *B. cereus*, las enterotoxinas termolábiles que provocan diarrea y las toxinas eméticas que son termoestables. El diagnóstico de esta toxiinfección alimentaria también debe hacerse mediante la detección de la toxina en los alimentos y/o en las heces.

C. perfringens es un bacilo grampositivo esporulado que forma parte de la microbiota anaeróbica normal del tubo digestivo del ser humano y de los animales. Además sus esporas se encuentran ampliamente distribuidas por el medio ambiente. Este microorganismo produce cuatro toxinas diferentes (alfa-toxina, beta-toxina, epsilon-toxina e iota-toxina) y sus cepas se distribuyen en cinco tipos (A-E) dependiendo del tipo de toxina que produzcan. Algunos estudios han implicado a *C. perfringens* en casos esporádicos de diarrea, diarrea asociada al uso de antibióticos y diarrea en instituciones para cuidados crónicos, no obstante este microorganismo produce con relativa frecuencia toxiinfecciones alimentarias. *C. perfringens* del tipo A produce una enterotoxina termolábil citotóxica que en el hombre da lugar a un cuadro secretor benigno a nivel del intestino delgado. *C. perfringens* del tipo C se ha asociado a enteritis necrotizante del intestino delgado por acción de la toxina beta. Las cepas tipo A de *C. perfringens* son las responsables de casi todos los casos de intoxicación alimentaria y dan lugar a la formación de una alfa toxina que es una enterotoxina. La intoxicación alimentaria por *C. perfringens* se debe a la ingestión de alimentos que contienen más de 10⁶ unidades formadoras de colonias (UFC)/g de alimento, productoras de

enterotoxina y casi siempre se asocia con alimentos proteicos de origen animal que se almacenan inadecuadamente. En el intestino delgado la enterotoxina se une a un receptor de membrana induciendo una ruptura de la permeabilidad dependiente del ión calcio que da lugar a la pérdida de metabolitos e iones de bajo peso molecular. Esta pérdida modifica la función metabólica intracelular que incluye la síntesis de macromoléculas y se asocia con daño morfológico y lisis celular final. Esta toxina no está preformada en el alimento, sino que se libera en el intestino después de la ingesta de alimentos contaminados.

Clostridium difficile causa desde una diarrea leve hasta un cuadro grave de colitis pseudomembranosa. Es la principal causa de la diarrea asociada al tratamiento antibiótico y frecuentemente es de adquisición nosocomial, siendo responsable directo de la prolongación de la estancia hospitalaria en un número sustancial de pacientes con un gran coste económico asociado. Este microorganismo puede aislarse también de las heces en un 3% de individuos sanos y de hasta un 80% de los niños menores de un año, siendo las manifestaciones clínicas extraordinariamente escasas, en esta población, debido, probablemente, a la ausencia, en el colon de estos niños, de los receptores para las toxinas que produce esta bacteria. En la patogenia de la infección por este microorganismo es importante la reducción de la flora intestinal normal por el tratamiento antibiótico y la acción de las toxinas A y B. Las cepas de *C. difficile* asociadas a enfermedad en humanos generalmente producen ambas toxinas. La toxina B es una potente citotoxina y la toxina A es una enterotoxina con capacidad para romper las estrechas uniones existentes entre las células epiteliales intestinales. Probablemente, ambas toxinas actúan de forma sinérgica. Recientemente se han comunicado casos de infección por *C. difficile* causados por cepas productoras sólo de toxina B, que representan el 10% del total de las cepas toxigénicas.

Las especies enteropatógenas del género **Campylobacter** son microaerófilas y crecen bien a 37°C, no obstante, la temperatura óptima de crecimiento de *C. jejuni* es de 42°C. Las colonias de esta especie se observan en los medios de cultivo selectivos después de 48-72 horas de la incubación. Generalmente no son necesarios los medios de enriquecimiento para el aislamiento de *C. jejuni* debido a que las personas infectadas excretan de 10⁶ a 10⁹ UFC del microorganismo por gramo de heces.

La investigación de **Helicobacter pylori** tiene, en la actualidad, un gran interés por su papel en la patología gastroduodenal. Se acepta a *H. pylori* como agente etiológico de la gastritis activa y crónica tipo B del hombre, así como su implicación en las úlceras pépticas y en el carcinoma gástrico tipo MALT en adultos, desempeñando también un papel importante en la patología gastrointestinal infantil. En el procedimiento microbiológico 17 de la SEIMC (Diagnóstico microbiológico de la infección por

Helicobacter pylori. M. López-Brea, T. Alarcón, M. Baquero, D. Domingo y G. Royo. 2004) se describe todo lo relacionado con este microorganismo, incluyendo los métodos de detección de antígeno.

Los principales agentes clásicamente implicados en las gastroenteritis víricas son rotavirus, norovirus, adenovirus entéricos y astrovirus. Actualmente, la importancia médica de rotavirus es indiscutible y su prevalencia es muy elevada. Constituye, en nuestro medio y especialmente durante los meses fríos, la causa principal de diarrea aguda con deshidratación en los niños menores de cinco años de edad. La mayoría de hospitalizaciones por esta infección tienen lugar durante los dos primeros años de vida, no siendo infrecuente su transmisión nosocomial. Los **rotavirus**, pertenecientes a la familia *Reoviridae*, son virus sin envoltura que miden alrededor de 75 nm de diámetro. La cápside está constituida por tres capas concéntricas de proteínas y el genoma está formado por una doble cadena de ARN de 11 segmentos. En relación a sus características antigénicas, estos virus se subdividen en grupos, subgrupos y serotipos. Existen siete grupos denominados de la A a la G. En humanos, la gastroenteritis es debida fundamentalmente al grupo A y con mucha menor frecuencia a los grupos B y C. Los antígenos de grupo se localizan preferentemente en la proteína VP6 de la cápside, donde, en los rotavirus del grupo A, también se encuentran los antígenos de subgrupo. En este grupo, las características antigénicas del serotipo están en relación con las proteínas externas de la cápside, la glicoproteína VP7 (serotipo G) y con la proteína VP4 (serotipo P).

Las infecciones por **astrovirus** ocurren en los cinco continentes. A pesar de que en la mayoría de los casos estas infecciones son benignas, los casos de hospitalización debidos a astrovirus son relativamente frecuentes, así como también su transmisión nosocomial. A pesar de que las infecciones por astrovirus ocurren con menor frecuencia que las infecciones por rotavirus o calicivirus, desde el punto de vista de la salud pública deben tenerse en cuenta, puesto que han sido responsables de brotes de gastroenteritis en colegios, escuelas militares, geriátricos, guarderías y entre individuos inmunodeprimidos. La prevalencia de infecciones por astrovirus varía en función de los grupos de edad estudiados, pero por regla general parece que es mayor en niños menores de dos años. Actualmente, los astrovirus humanos se clasifican en ocho serotipos, de los cuales se considera que el serotipo 1 es el más prevalente en todo el mundo.

Los **adenovirus** son virus sin envuelta con una doble cadena de ADN y cuya cápside presenta simetría icosaédrica. Existen 45 serotipos distintos de estos virus que están asociados a una gran variedad de cuadros clínicos, incluyendo faringitis, neumonía, conjuntivitis, cistitis hemorrágica y diarrea. El tipo de infección depende del serotipo, no obstante, no es infrecuente detectar un mismo serotipo en diferentes cuadros clínicos. La mayoría de adenovirus entéricos detectados hasta ahora pertenecen al subgénero F,

especialmente, los adenovirus tipo 40 y 41 son en nuestro medio la tercera causa de diarrea en la población infantil después de rotavirus y astrovirus. Los **calicivirus** humanos fueron en 1972 los primeros agentes víricos asociados a gastroenteritis y desde entonces han provocado numerosos brotes epidémicos y hoy en día se consideran como la primera causa de brotes de gastroenteritis víricas en adultos.

Los **norovirus** son virus ARN sin envuelta que pertenecen a la familia *Caliciviridae* y que previamente se conocían como virus Norwalk-like (NLV). Existe una gran diversidad antigénica y actualmente la mayoría de norovirus humanos se han clasificado genéticamente en dos grupos, el genogrupo I y el II. El genogrupo I comprende al menos 7 subgrupos y el genogrupo II al menos 10.

Las gastroenteritis producidas por parásitos quedan recogidas en la sección "Técnicas rápidas en el diagnóstico de las parasitosis" de este documento científico y en el documento técnico PNT-TDA-05.

6. TÉCNICAS RÁPIDAS EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS PARASITOSIS

Las enfermedades causadas por parásitos continúan siendo una causa muy importante de morbilidad y mortalidad en el mundo, especialmente en países en vías de desarrollo. En el nuestro, algunas parasitosis son endémicas y otras se diagnostican en personas que han viajado a determinadas regiones del globo.

El diagnóstico microbiológico tradicional de las parasitosis intestinales se basa, en la mayor parte de los casos, en la visualización del parásito en las heces. Las pruebas de detección de antígeno tienen, en general, una muy buena sensibilidad y especificidad. Su principal inconveniente es que sólo pueden detectar uno o pocos parásitos a la vez. Por ello, el examen microscópico de las heces debe continuar utilizándose si se pretende realizar un estudio completo. Debido a la expulsión intermitente de la mayoría de los parásitos, se necesita el examen de tres muestras para poder conseguir una sensibilidad del 90%. Además, es preciso que se realice por personal especialmente formado en parasitología. Las pruebas de amplificación de secuencias genómicas son las que se considera que tienen mayor sensibilidad y especificidad, pero no están comercializadas.

Las parasitosis hemotisulares se diagnostican por el examen microscópico de la sangre periférica. En muchas áreas de bajo desarrollo económico son difíciles de realizar porque requieren personal especialmente formado y material no siempre disponible. La mayoría de las pruebas de detección de antígeno se han desarrollado para poder ser practicadas sin ningún equipamiento especial y por personas sin formación específica.

Entamoeba histolytica causa entre 34 y 50 millones de infecciones sintomáticas y entre 50.000 y 100.000 muertes al año. Tiene distribución mundial, aunque es más frecuente en zonas con malas condiciones higiénicas. El protozoo provoca ulceraciones en la mucosa intestinal, que pueden llegar a originar una

perforación, evolucionar a un ameboma o, a través de la vena porta, distribuirse al hígado y a toda la economía y ocasionar abscesos. Así, la infección puede cursar de manera asintomática, o bien manifestarse clínicamente en forma de cuadros intestinales de curso crónico y recidivante, o agudo (disentería amebiana); o en forma de absceso amebiano, más frecuentemente de localización hepática. El diagnóstico microbiológico de las formas intestinales se realiza por el examen directo de las heces o de muestras del borde de las úlceras, visualizando los trofozoítos o los quistes en preparaciones en fresco o sin teñir. Desgraciadamente, a menos que se observen restos de hematíes en su interior que demuestren su patogenicidad, estas formas son indistinguibles de las de *Entamoeba dispar*, mucho más prevalente que *E. histolytica* y que no causa infección alguna. En esta situación, el clínico sólo debería valorar los casos en que existe un cuadro clínico compatible. El absceso amebiano se diagnostica por detección de anticuerpos circulantes.

Las pruebas de detección de antígeno, realizadas en heces y en el contenido de los abscesos, son específicas de la especie patógena. La distinción entre *E. histolytica* y *E. dispar* se ha hecho tradicionalmente por el análisis de cistodemas a partir del cultivo de heces, proceso lento y difícil de realizar rutinariamente. Actualmente se puede realizar por tipado con anticuerpos monoclonales frente a antígenos de superficie y por análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción; en la actualidad se dispone de pruebas de EIA que se basan en la detección de epítomos específicos de la lectina amebiana. La detección de anticuerpos es indicativa de infección, ya sea presente o anterior (pueden persistir durante años).

Giardia lamblia es un protozoo flagelado cosmopolita que se adquiere por la ingestión de agua contaminada o por contacto directo de persona a persona y que produce cuadros diarreicos y/o de malabsorción. Su prevalencia se calcula en 5-50% en países en desarrollo, 1-7% en países industrializados, y, en ciertas circunstancias, como en determinadas instituciones, hasta el 90%. El diagnóstico etiológico se efectúa por el examen microscópico de las heces. Al ser su eliminación intermitente, se recomienda recoger tres muestras en días alternos para aumentar la sensibilidad. Además, suele estar en el moco intestinal, hecho que dificulta su visualización. En algunos casos es preciso obtener una muestra duodenal para examen directo y a veces se diagnostica por endoscopia. Existen diversos métodos de detección de antígeno, cuya sensibilidad y especificidad de más del 90%, superan a las del examen microscópico.

Cryptosporidium parvum es un coccidio de distribución mundial, que se transmite por vía fecal-oral y, más raramente, sexual. Se calcula que su prevalencia en humanos oscila entre el 0,6% y el 10,4%. Provoca cuadros de gastroenteritis, especialmente en pacientes inmunodeprimidos,

particularmente los infectados por el VIH. En el examen microscópico de las heces conservadas y teñidas con mertiolato-yodo-formol (MIF), los ooquistes de *C. parvum* se pueden confundir con levaduras, aunque, a diferencia de éstas, no se tiñen con el yodo ni se reproducen por gemación. En consecuencia, es preferible realizar una preparación permanente de las heces, con tinciones que manifiestan su ácido-alcohol resistencia, como la tinción de Kinyoun. La de auramina-rodamina puede servir como cribado, que se debe confirmar. Las pruebas de detección de antígeno y PCR constituyen alternativas válidas al examen microscópico tradicional.

El **paludismo** o malaria es una infección causada por una o varias de las cuatro especies de *Plasmodium* patógenas para el hombre: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*. Es transmitida por el mosquito *Anopheles*. Su incidencia y mortalidad se estiman en unos 300 millones y 1,5 millones de personas al año, respectivamente. En España, se declaran unos 400 casos/año, especialmente en pacientes que viajan a zonas endémicas y que no han efectuado la quimioprofilaxis. Son especialmente frecuentes las infecciones por *P. falciparum* en pacientes procedentes de África. En los que proceden de Sudamérica se suele encontrar *P. vivax* o *P. falciparum* y en los que proceden de Centroamérica, *P. vivax*. Causan una infección sistémica, que puede llegar a ser mortal, especialmente la infección por *P. falciparum*. El tratamiento antipalúdico depende de la especie implicada y de la presencia de resistencia en la región en que se haya adquirido.

El diagnóstico se efectúa por el examen microscópico de sangre periférica teñido con tinciones hematológicas, como el Giemsa o Diff-Quick. La debe hacer personal experimentado. Las preparaciones hechas con la técnica de la gota gruesa sirven como prueba de cribado. El estudio de las extensiones es imprescindible para el diagnóstico de especie y para la cuantificación de la parasitemia. Se han desarrollado muchos otros tipos de pruebas para el diagnóstico de la malaria, basadas en el examen con microscopio de fluorescencia o en la citometría de flujo. Las técnicas de amplificación genética por PCR son las más sensibles, tienen mayor capacidad de diagnosticar infecciones mixtas y se consideran de referencia.

En las zonas pobres de los países endémicos es difícil efectuar el diagnóstico etiológico por examen microscópico, ya sea por falta de instalaciones y/o de personal entrenado. Por ello, el tratamiento se administra de forma empírica. Evidentemente, es inevitable que en muchas situaciones el tratamiento sea inadecuado, hecho que repercute en la evolución del paciente y en la generación de resistencias a los antipalúdicos en la región.

Las técnicas de detección de antígeno se han diseñado para ser realizadas en cualquier tipo de laboratorio, no siendo necesario personal técnico especializado. De esta manera se evitarían tratamientos inadecuados, se mejoraría la atención a

los pacientes y también se controlaría el incremento en la aparición de resistencias de *Plasmodium*. Por desgracia, el coste económico de estas pruebas no permite que sean accesibles en las zonas con menos recursos. Además, su sensibilidad es menor que el examen microscópico directo.

La **leishmaniasis** visceral es una infección endémica en el área mediterránea. Desde la década de los 80 se está produciendo un aumento de la incidencia de la coinfección *Leishmania*-VIH. En nuestro país, entre el 2 y el 9% de los pacientes infectados por el VIH desarrollan una leishmaniasis visceral, siendo especialmente frecuente en los diagnosticados de SIDA y con una cifra de CD4 inferior a 200/μl. En nuestro medio el 70% de los pacientes con leishmaniasis visceral están infectados por el VIH, y de estos el 71% son adictos a drogas por vía parenteral. El diagnóstico clínico de la leishmaniasis asociada al SIDA se ve dificultado por la presencia de manifestaciones atípicas, posibles enfermedades coexistentes y al hecho de que los enfermos seropositivos difícilmente desarrollan anticuerpos frente a nuevos agentes infecciosos.

Debido a la baja sensibilidad de la serología, el diagnóstico microbiológico de certeza se lleva a cabo mediante la visualización del parásito y cultivo de muestras de aspirado de médula ósea. Sin embargo, se trata de una técnica invasora y que implica una cierta habilidad debido en ocasiones a la poca cantidad de parásitos, lo que hace necesario el desarrollo de métodos diagnósticos más simples pero con elevada sensibilidad y especificidad.

Existen diferentes especies de filarias, todas ellas transmitidas por artrópodos, que afectan a los tejidos linfático, subcutáneo y cutáneo. Las hembras adultas producen microfilarias, que se pueden encontrar en la sangre o en la piel. Afectan a 120 millones de personas al año y ***Wuchereria bancrofti*** causa más del 90% de los casos. Se encuentra en regiones tropicales y subtropicales y se transmite por la picadura de mosquitos de los géneros *Anopheles*, *Culex* y *Aedes*. El adulto vive en el sistema linfático, causando linfangitis, linfadenitis, fibrosis obstructiva, elefantiasis de las extremidades y los genitales e hidrocele. El parásito circula en la sangre periférica generalmente por la noche, excepto en la región del sur del Pacífico, en la que no se observa ninguna periodicidad.

El diagnóstico se basa en la observación de las microfilarias presentes en la sangre periférica. En preparaciones en fresco, se observa el movimiento de las filarias fácilmente. Sin embargo, para el diagnóstico de especie se necesita observar preparaciones teñidas, ya sea de extensiones de sangre o de preparaciones hechas con la técnica de la gota gruesa. El número de microfilarias puede ser muy escaso y muchas veces es preciso emplear técnicas de concentración, como la de Knott o la de membrana. Aún así, el examen microscópico directo no es capaz de diagnosticar todos los casos.

Debido a que no existe ningún reservorio animal, la OMS se ha planteado la posibilidad de eliminar definitivamente esta enfermedad. Las pruebas de

detección de antígeno, sencillas de realizar, podrían desempeñar un importante papel en el control de la misma. También existen pruebas de detección de anticuerpos y PCR. Debido al carácter crónico de la infección, es posible encontrar personas infectadas en nuestra área geográfica que anteriormente hayan vivido en zonas endémicas.

7. TÉCNICAS RAPIDAS EN EL DIAGNOSTICO DE LAS INFECCIONES POR HERPESVIRUS

Los herpesvirus pertenecen a la familia *Herpesviridae*. Son un grupo de virus morfológicamente similares, cuyo genoma consiste en ADN bicatenario, recubierto de una cápside proteica de morfología icosaédrica rodeada de una envuelta de estructura lipoproteica de la cual parten unas proyecciones glicoproteicas. La principal propiedad de los herpesvirus es su capacidad de permanecer latentes en el organismo y reactivarse, a pesar de la presencia de anticuerpos específicos, dando lugar a infecciones recurrentes. Estas recurrencias pueden darse en personas previamente sanas como consecuencia de diversos estímulos o en personas inmunodeprimidas. Actualmente se reconocen ocho herpesvirus humanos (Tabla 2) que poseen características biológicas distintivas que son la base de su identificación en el laboratorio.

Los HHV-1 y 2 están relacionados antigénicamente con el HHV-3 pero no con el HHV-4, 5, 6, 7 y 8. Los HHV-1 y 2 entran en el organismo a través de la piel o mucosa oral (HHV-1) y/o genital (HHV-2), multiplicándose en las células epiteliales y dando lugar a lesiones vesiculares. Difunden a los ganglios linfáticos regionales, donde se multiplican nuevamente, causando, ocasionalmente, viremia. Simultáneamente, el virus alcanza los ganglios

nerviosos sensoriales, en cuyas neuronas se establece la persistencia vírica.

Tras diferentes estímulos el virus puede reactivarse llegando por migración centrifuga a través de los axones neuronales hasta las superficies mucosas o cutáneas, innervadas por ellos y produciendo lesiones de características semejantes a las de la primoinfección. La primoinfección por HHV-2 puede estar asociada a fiebre, malestar, disuria y adenopatías inguinales. Una de las complicaciones más frecuentes es la meningitis aséptica que se presenta en un 10% de los casos. La queratoconjuntivitis herpética se caracteriza por la formación de úlceras dendríticas que pueden afectar el estroma corneal. Las recurrencias en esta localización pueden conducir a la ceguera.

Los HHV-1 y 2 pueden afectar cualquier zona de la piel y las lesiones pueden adoptar diferentes disposiciones que en ocasiones pueden mimetizar la infección por HHV-3. La principal forma clínica de la recurrencia de la infección herpética es la lesión de la mucosa oral o labial. En los enfermos inmunodeprimidos esta recurrencia se manifiesta a menudo como una mucositis localizada en un área de la boca o generalizada a toda la mucosa oral y en cuya etiología se asocian frecuentemente hongos del género *Candida*. Estos pacientes pueden desarrollar una neumonitis, hepatitis o una infección diseminada. La infección orofaríngea en niños está causada generalmente por el HHV-1 mientras que las infecciones por el HHV-2 se adquieren al iniciar la vida sexual activa durante la adolescencia.

La puerta de entrada del HHV-3 es la mucosa del aparato respiratorio, donde éste se multiplica.

Tabla 2. Clasificación, nomenclatura actual y abreviaturas oficiales de los virus de la familia *Herpesviridae*

Subfamilia	Género	Especie
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	Herpesvirus humano 1 (HHV-1) (v. herpes simple 1) Herpesvirus humano 2 (HHV-2) (v. herpes simple 2)
	<i>Varicellovirus</i>	Herpesvirus humano 3 (HHV-3) (v. varicela zoster)
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	Herpesvirus humano 5 (HHV-5) (citomegalovirus)
	<i>Roseolovirus</i>	Herpesvirus humano 6 (HHV-6) Herpesvirus humano 7 (HHV-7)
<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	Herpesvirus humano 4 (HHV-4) (v. Epstein Barr)
	<i>Rhadinovirus</i>	Herpesvirus humano 8 (HHV-8)

Seguidamente se produce la viremia que permite la diseminación del virus a todo el organismo y su llegada a la piel, donde produce la lesión vesicular característica desde la cual y a través de los axones nerviosos el virus alcanza el ganglio nervioso sensorial de la zona donde permanece en estado de latencia.

Las membranas mucosas de la boca, la faringe, la conjuntiva y los genitales externos también suelen estar afectadas, sin embargo en estas localizaciones las vesículas se rompen fácilmente y en muchas ocasiones pasan desapercibidas. La estomatitis es frecuente en el caso de la varicela grave siendo las lesiones dolorosas. En caso de reactivación, los viriones llegan a la piel a través de los nervios sensitivos, donde producen lesiones vesiculares (herpes zoster) muy similares a las de la varicela pero caracterizadas por su distribución en un único dermatoma.

Las manifestaciones clínicas causadas por los HHV1, 2 y 3 pueden ser indistinguibles por lo que la confirmación de la etiología de la infección es necesaria para el inicio precoz del tratamiento y el establecimiento de las dosis adecuadas del mismo. La técnica de referencia para el diagnóstico de laboratorio de las infecciones por HHV-1, 2 y 3 es el aislamiento en cultivo celular. La multiplicación vírica se manifiesta por un efecto citopático característico, generalmente de 24 a 48 horas después de la inoculación para HHV-1 y 2 y es de evolución muy lenta (aparece de 5 a 7 días después de la inoculación) en el caso de HHV-3. La identificación definitiva se realiza por medio de antisueros específicos marcados con fluoresceína. La sensibilidad del método depende de la fase en la que se encuentre la lesión, del estado de inmunocompetencia del paciente y de si se trata de una primoinfección o de una reactivación. Las muestras adecuadas para el aislamiento consisten en el líquido vesicular obtenido a partir de la lesión o bien el exudado del fondo de las úlceras cualquiera que sea su localización. En todos los casos, para facilitar la obtención de resultados positivos, las muestras deben tomarse precozmente. El método de cultivo-centrifugación en el que tras la inoculación de la muestra al cultivo celular (tubo *shell-vial*) se favorece la infección mediante una centrifugación suave durante unos 40 minutos y se realiza, sin esperar a la aparición del efecto citopático, una detección de los antígenos víricos a las 24-48 horas, permite disminuir el tiempo de diagnóstico habitual de 5-7 días. La sensibilidad de esta técnica es similar a la del cultivo convencional. Estos métodos requieren instalaciones adecuadas para el mantenimiento y/o propagación de cultivos celulares. La puerta de entrada del HHV-4 es la orofaringe. Aquí, el virus se multiplica y llega a los linfocitos B, donde persiste. La respuesta inmune celular frente a la infección es la principal causante de la sintomatología del enfermo. La infección es usualmente asintomática en niños pero los adolescentes y adultos jóvenes presentan una enfermedad característica que es el síndrome mononucleósico.

El diagnóstico de laboratorio de la mononucleosis infecciosa es serológico y la prueba más ampliamente utilizada es la detección de anticuerpos heterófilos frente a hematies de carnero, según la técnica de Paul-Bunnell. La presencia de estas aglutininas se detecta en el 50% al 80% de los pacientes entre la primera y la tercera semana de la enfermedad. Una vez que aparecen pueden persistir durante varios meses. Su ausencia es más frecuente en los pacientes más jóvenes, sobre todo los menores de 5 años.

El aislamiento del virus a partir de muestras orofaríngeas o linfocitos periféricos requiere su inoculación en linfocitos de sangre de cordón umbilical y la observación de su transformación. La complejidad de estos procedimientos y el conocimiento de la frecuente eliminación del virus por portadores sanos determinan que esta técnica esté reservada a los laboratorios de investigación. Los anticuerpos de la clase IgG frente al antígeno de la cápside vírica se encuentran en general a un título elevado en el suero tomado en la fase aguda y se mantienen a lo largo de toda la vida. La seroconversión solo se detecta en el 10-20% de los casos. Los anticuerpos de la clase IgM frente al antígeno de la cápside sólo aparecen durante la mononucleosis infecciosa y persisten 4-8 semanas, por lo que su detección tiene significado diagnóstico.

El HHV-5 (citomegalovirus) se transmite probablemente por contacto directo a través de la saliva, la orina, por transfusión, a través de la placenta y, en el trasplante, por el órgano transplantado. En las poblaciones con bajo nivel socioeconómico la infección postnatal por HHV-5 es muy frecuente mientras que cuando este nivel es alto solo el 10-15% de los adolescentes han estado en contacto con el virus, aumentando rápidamente el porcentaje en los adultos jóvenes hasta los 35 años. Aunque en general la adquisición de la infección es asintomática algunos pacientes desarrollan un síndrome mononucleósico. La diseminación se produce por vía hematogena. Esta enfermedad se caracteriza por la aparición en sangre periférica de linfocitos atípicos indistinguibles de los que aparecen en la infección por virus Epstein-Barr acompañados clínicamente de fiebre prolongada, malestar y mialgias. Asimismo suele constatarse discreta alteración de las pruebas hepáticas. El virus persiste indefinidamente en múltiples tejidos del huésped, en los linfocitos y en las células de las glándulas salivales entre otros. Cuando la inmunidad celular disminuye, ya sea por enfermedad o por tratamiento, el virus se reactiva y puede dar lugar a neumonía, hepatitis, afectación del tracto gastrointestinal y, ocasionalmente, a infección diseminada.

El método de elección para el diagnóstico de las infecciones por HHV-5 es el aislamiento en cultivos celulares. Las muestras para aislamiento de HHV-5 no deben ser nunca congeladas debido a la rápida destrucción del virus en los procesos de congelación y descongelación. Sin embargo la viabilidad se mantiene a 4°C durante 24 a 48 horas. Debido a la lenta multiplicación del HHV-5 en los cultivos celulares, éstos deben mantenerse durante 4 a 6 semanas antes de considerarlos negativos. La observación del efecto citopático característico del virus permite detectar su

presencia. Las células se caracterizan por estar aumentadas de tamaño y por poseer una inclusión intranuclear eosinófila separada de la membrana nuclear por un halo claro. Este tipo de células pueden detectarse también en la orina y en las secreciones respiratorias de los pacientes, así como en las biopsias de los órganos afectados y en las muestras de autopsia. Si bien cuando es positiva es diagnóstica, puede ser negativa en pacientes virémicos, así como en muestras de órganos a partir de los cuales se aísla HHV-5.

La lentitud de aparición y desarrollo del efecto citopático reduce la utilidad clínica del aislamiento vírico. La disponibilidad de anticuerpos monoclonales frente a varios antígenos de HHV-5 ha permitido poner a punto diferentes técnicas para el diagnóstico rápido de estas infecciones. Entre ellas una de las más utilizadas en la actualidad es la detección de antígeno precoz de HHV-5 en cultivo celular. En esta técnica se inocula la muestra mediante centrifugación en dos tubos *shell-vial* que contienen un cubreobjetos recubierto de células MRC5, a las 24 y 48 horas respectivamente se retira este cubreobjetos y se tiñe con un anticuerpo monoclonal específico para antígeno precoz de HHV-5 marcado con fluoresceína. Este método, al igual que el aislamiento en cultivo celular, requiere un laboratorio con instalaciones adecuadas para el mantenimiento y/o propagación de cultivos celulares.

El HHV-6 consiste en dos virus muy parecidos pero claramente diferentes que se denominan HHV-6A y HHV-6B. El HHV-6A no se ha relacionado con ninguna enfermedad hasta el momento mientras que el HHV-6B es el agente etiológico del exantema súbito y de otros síndromes en los niños y frecuentemente es activo en los pacientes inmunodeprimidos. La infección en el adulto se puede presentar como un síndrome mononucleósico, hepatitis y encefalitis. En los pacientes inmunodeprimidos, transplantados o con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) el virus es capaz de reactivarse. En los pacientes con trasplante de médula ósea y de órgano sólido la viremia por HHV-6 puede inducir supresión medular. Por otro lado parece que la infección sintomática por HHV-6 está casi siempre asociada a la infección por HHV-5. En los pacientes infectados por el VIH el HHV-6 actúa como inmunomodulador modificando la replicación del VIH y colaborando en la disminución del número de linfocitos T CD4.

La técnica de referencia para el diagnóstico de laboratorio es el aislamiento en cultivo celular a partir de leucocitos de sangre periférica. Al cabo de 5 a 21 días aparece un efecto citopático específico que requiere la confirmación mediante anticuerpos monoclonales. Una adaptación rápida de la técnica es el cultivo-centrifugación (*shell-vial*) con el que se obtienen resultados en 1 a 3 días. La complejidad de los métodos de cultivo empleados en el aislamiento del HHV-6 ha llevado a que el diagnóstico de laboratorio utilizado de rutina sea el serológico. La infección por HHV-6 se demuestra serológicamente por la presencia de anticuerpos específicos de la clase IgM o bien por la seroconversión.

El HHV-7 ha sido aislado de linfocitos T CD4+ de personas sanas. Hasta el momento sólo ha sido relacionado con un caso de exantema súbito en el que no se detectó el HHV-6 por lo que su papel patógeno es desconocido hasta el momento. El hecho de que el HHV-7 se pueda aislar de la saliva del 75% de los adultos sanos sugiere que se transmita mediante las secreciones orales. La detección de este virus no se realiza de forma rutinaria.

El HHV-8 se considera como el agente etiológico del sarcoma de Kaposi ya que se ha detectado ADN vírico en todas las formas del tumor incluyendo pacientes seropositivos para el VIH, pacientes con sarcoma de Kaposi endémico y aquellos con la llamada forma mediterránea. También se ha detectado el genoma del virus en los linfocitos de sangre periférica de pacientes seropositivos para el VIH con o sin sarcoma de Kaposi, en linfomas de células B y en células uroteliales de pacientes inmunocompetentes.

El HHV-8 es de distribución universal. Los estudios de seroprevalencia sugieren la transmisión sexual de la infección aunque la presencia de anticuerpos en niños apunta a la existencia de otros mecanismos de infección. El diagnóstico de laboratorio puede realizarse mediante técnicas de PCR. Por otra parte existen diversos reactivos para la determinación de anticuerpos. Sin embargo, no hay información suficiente sobre la historia natural de la infección por HHV-8 y la eficacia de las pruebas de laboratorio para la interpretación clínica de los resultados obtenidos.

8. TÉCNICAS RÁPIDAS EN EL DIAGNOSTICO DE LAS MICOSIS INVASORAS

En los últimos años la frecuencia de las infecciones fúngicas se ha incrementado principalmente por un aumento en la supervivencia de pacientes inmunodeprimidos. Como en todas las infecciones, la instauración precoz del tratamiento adecuado es imprescindible para mejorar el pronóstico, pero algunos antifúngicos pueden ocasionar toxicidad importante y por esta razón es preciso obtener un diagnóstico etiológico que ajuste el tratamiento empírico. Las micosis a las que se refiere el presente documento son la candidiasis, la aspergilosis, la criptococosis y la neumonía por *Pneumocystis jiroveci*, para cuyo diagnóstico o seguimiento se han desarrollado métodos estandarizados de detección de antígeno. Existen muchas otras micosis, pero no se dispone de este tipo de metodología, o bien son muy infrecuentes en nuestro medio y se realizan sólo en laboratorios de referencia (histoplasmosis).

En muchas ocasiones, las micosis invasoras presentan manifestaciones clínicas inespecíficas. En general, se requiere un alto índice de sospecha para diagnosticarlas. Las pruebas de detección de antígeno ayudan en la toma de decisiones clínicas, muchas veces en combinación con otras pruebas microbiológicas (detección de anticuerpos, PCR) o con exploraciones complementarias (diagnóstico por imagen o broncoscopias). En la criptococosis y en la histoplasmosis, el hallazgo del hongo en una

muestra clínica siempre es patológico. En cambio, en la candidiasis y en la aspergilosis no siempre es fácil distinguir entre colonización e infección.

La **aspergilosis** es una infección típicamente oportunista. El hongo es cosmopolita y vive en restos orgánicos en descomposición. Los conidios, ubicuos en la atmósfera, tienen el tamaño adecuado para poder alcanzar el alvéolo pulmonar, venciendo todos los mecanismos de defensa externos del árbol respiratorio. Una vez allí, son fagocitados por los macrófagos. En caso que alguna germine y empiece a desarrollar un filamento, el neutrófilo ejerce su acción. Las distintas formas clínicas de aspergilosis invasoras (pulmonar, sinusal, traqueobronquial, cerebral, cutánea, diseminada, etc) suelen afectar a pacientes inmunodeprimidos, especialmente en estados de neutropenia importante, receptores de trasplantes de órganos sólido o médula ósea, tratamiento con dosis altas de corticoides, quimioterapia antineoplásica (en especial ciclosporina) y pacientes con SIDA. Tienen un mal pronóstico y una alta mortalidad. La instauración precoz de un tratamiento antifúngico adecuado puede mejorar considerablemente el desenlace de la infección. Por desgracia, el cuadro clínico suele ser inespecífico.

El diagnóstico de certeza se establece con la práctica del examen microscópico directo y el cultivo de una muestra apropiada, como una biopsia o un lavado broncoalveolar obtenido por broncoscopia. Pero la mayoría de las veces es imposible de recoger, debido a la presencia de hipoxemia, trombocitopenia y/o al mal estado general del paciente. Por otra parte, un cultivo positivo de una muestra obtenida por broncoscopia no indica siempre aspergilosis invasora, especialmente en pacientes con EPOC o sometidos a trasplante de órgano sólido. Además, el resultado suele ser tardío. Los hemocultivos suelen ser negativos. El problema principal en el diagnóstico de la aspergilosis invasora es, pues, la dificultad del diagnóstico de forma suficientemente precoz como para que sea de utilidad para el paciente. Todo ello ha justificado el desarrollo de métodos alternativos de diagnóstico precoz en muestras sencillas de obtener. La detección de anticuerpos de forma aislada no es útil por la inmunodepresión de los enfermos afectados y la respuesta presente en la mayoría de personas sanas. En cambio, las pruebas de diagnóstico directo, ya sea detección de antígeno, de secuencias genómicas o de metabolitos, han dado mejores resultados. Su sensibilidad y especificidad son aceptables, al menos en las situaciones más frecuentes. Realizadas en pacientes pertenecientes a los grupos de más riesgo, de manera sistemática y repetida, proporcionan un alto índice de sospecha diagnóstica que, junto con el resto de datos clínicos, ayudan a tomar decisiones diagnósticas y terapéuticas precozmente.

Los hongos del género **Candida** son capaces de causar infecciones oportunistas de muchos tipos diferentes: de piel, mucosas, uñas, infecciones urinarias, de catéter, de otras localizaciones y,

finalmente, sistémicas. Las infecciones localizadas suelen sospecharse por los signos clínicos y se diagnostican con un examen microscópico directo o con el cultivo. Sin embargo, las manifestaciones clínicas de las candidiasis sistémicas son inespecíficas y requieren un alto índice de sospecha. Además, su incidencia ha ido en aumento en los últimos años. Un hemocultivo positivo establece el diagnóstico, pero por razones que se desconocen, los hemocultivos suelen ser negativos. Para incrementar su sensibilidad, es conveniente usar el sistema de lisis-centrifugación o, en su defecto, airearlos e incubarlos durante 30 días. Un cultivo positivo en una muestra de un territorio normalmente estéril tiene valor diagnóstico. Sin embargo, en la mayoría de las ocasiones no se dispone del mismo. Al igual que en la aspergilosis, es difícil dar valor patológico a un cultivo positivo de un territorio normalmente colonizado por microbiota comensal o saprofita, especialmente frecuente en este caso porque *Candida* forma parte de la microbiota comensal de la especie humana. Muchas muestras positivas en diferentes regiones anatómicas sugieren enfermedad invasora. La detección de anticuerpos tampoco es útil, debido a que muchas personas los desarrollan sin presentar candidiasis y a que los pacientes que la padecen no suelen poder producirlos. Es preciso disponer de otras pruebas que la confirmen. Por ello, las de detección de antígeno en sangre deberían solucionar el problema. Las técnicas de PCR son útiles. Se amplifican diferentes genes cromosómicos (lanosterol demetilasa, proteniasa aspártica, quitina sintasa y actina), o bien genes presentes en múltiples copias como rARN 18S, o 28S o genes mitocondriales. Tienen una alta sensibilidad y además, existe una correlación con la evolución. Es preciso eliminar cualquier fuente de contaminación (en el enzima lítico, hongos en el aire o en el agua). No están disponibles comercialmente.

Cryptococcus neoformans es un hongo levaduriforme que causa infecciones en pacientes generalmente inmunodeprimidos, especialmente en los infectados por el VIH. Se adquiere por vía inhalatoria, pero la forma clínica más frecuente es la meningoencefalitis. Las manifestaciones clínicas suelen ser de aparición relativamente lenta, con cefalea, irritabilidad y cambio de carácter; pero existen casos de progresión rápida. La fiebre es baja, o está ausente. La rigidez de nuca y los signos de Kernig y Brudzinski no existen o son leves y aparecen signos de edema cerebral o de hidrocefalia. Las anomalías analíticas del LCR pueden ser leves en cualquiera de sus parámetros (leucocitos, proteínas o glucosa) o faltar en absoluto (en el 20% de los casos en pacientes con SIDA). Sin tratamiento la enfermedad es mortal en todos los casos. Otras formas clínicas son la neumonía, la afectación cutánea (presente en el 10% de los casos y más frecuente en inmunodeprimidos), ósea, articular, ocular y la de la próstata, entre otras. La mayoría pueden evolucionar a la forma meningoencefalítica. El diagnóstico se puede realizar

fácilmente y de manera rápida si el examen microscópico con tinta china del líquido cefalorraquídeo es positivo; pero la sensibilidad de este método es limitada. El hongo se cultiva en los medios micológicos habituales, aunque a veces crece muy lentamente. El uso de agar con semillas de níger o negrilla (*Guizotia abyssinica*) es muy útil para aislarlo de muestras en que también *Candida* está presente, porque su actividad fenoxidásica metaboliza el ácido cafeico del medio, desarrollando a los 5 días unas colonias de color marrón oscuro. Las pruebas de detección de antígeno son muy sensibles y específicas y se pueden utilizar en suero y líquido cefalorraquídeo siempre que se sospeche una criptococosis del sistema nervioso central.

Histoplasma capsulatum (*H. capsulatum* var. *capsulatum* y *H. capsulatum* var. *duboisii*) es un hongo dimórfico que se encuentra principalmente en América y África, que se adquiere por vía aérea y que causa infecciones subclínicas, o bien infecciones localizadas y diseminadas, de curso parecido a la tuberculosis. Afecta especialmente a pacientes con SIDA. El cultivo de las lesiones o de la sangre suele ser positivo, pero tardíamente (hasta 60 días en algunos casos). La detección de anticuerpos específicos para el diagnóstico de la histoplasmosis presenta algunos problemas. Por ejemplo, las precipitinas al antígeno M aparecen si se efectúa una intradermoreacción a la histoplasmina y su sensibilidad es del 75%. La aparición de precipitinas al antígeno H es tardía y la sensibilidad es del 20%. Además, existen falsos positivos. Existen reacciones cruzadas con otras micosis. También existen pruebas de fijación de complemento, inmunodifusión, aglutinación de partículas de látex y hemaglutinación, pero su efectividad es limitada. Cuando está indicado el tratamiento, es preciso que sea de larga duración. Actualmente la prueba de detección de antígeno en orina y sangre tiene una alta sensibilidad y especificidad. Es una técnica que únicamente se desarrolla en laboratorios de referencia (Dr. Wheat, <http://www.miravistalabs.com/>.)

Pneumocystis jiroveci antes *Pneumocystis carinii* es un patógeno oportunista que produce neumonía, fundamentalmente en pacientes inmunodeprimidos. Es la infección oportunista más frecuente en los pacientes con SIDA. Es un microorganismo de distribución universal. El 80-90% de los niños se han expuesto al microorganismo en los primeros 3-4 años de vida. La adquisición ocurre probablemente por vía respiratoria, aunque se desconocen las fuentes. Tras su inhalación *P. jiroveci* entra en estado de latencia debido a la respuesta humoral y celular del huésped y permanece en estado latente hasta que se produce la inmunodepresión que le permite reactivarse. En este sentido se comporta como un oportunista estricto. La neumonía intersticial de células plasmáticas constituye una entidad clínica de características diferentes a la típica neumonía de pacientes inmunodeprimidos. Suele cursar de forma insidiosa e inespecífica y evoluciona progresivamente hacia el distrés respiratorio y la cianosis. Los síntomas más frecuentes son la fiebre,

la tos sin expectoración y la disnea. En los pacientes con SIDA se han descrito localizaciones extrapulmonares. La mayoría de exploraciones complementarias son absolutamente inespecíficas y aunque la radiografía de tórax suele presentar alteraciones, una radiografía normal no descarta la neumonía por *Pneumocystis*. El cuadro clínico y la radiografía de tórax no permiten diferenciar la neumonía por *P. jiroveci* de otras afecciones pulmonares en los pacientes inmunodeprimidos. Los intentos de realizar el diagnóstico mediante detección de antígenos en suero han resultado infructuosos. Tampoco los métodos serológicos son útiles. Por ello, el diagnóstico definitivo debe establecerse mediante la demostración de alguna forma de *P. jiroveci* en muestras respiratorias. A pesar que en determinadas circunstancias una muestra de esputo puede ser adecuada para proporcionar el diagnóstico, el método más utilizado es la fibrobroncoscopia con lavado broncoalveolar.

9. TÉCNICAS RÁPIDAS EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS HEPATITIS VÍRICAS Y LA INFECCIÓN POR EL VIH

La detección del antígeno de superficie (HBsAg) es el primer y principal marcador de infección en el diagnóstico de las **hepatitis víricas**, tanto en forma de cuadro agudo como en las formas crónicas producidas por el virus B de la hepatitis (VHB)

En la hepatitis C (VHC) también es posible determinar la presencia en el suero del paciente del antígeno del core de la hepatitis C (HCcAg). Ambas determinaciones deben realizarse en función del cuadro clínico del paciente y junto a la detección de otros marcadores de infección aguda o crónica.

El diagnóstico de la infección por el **virus de la inmunodeficiencia humana** (VIH) se basa principalmente en la detección de anticuerpos frente a este virus. La detección de antígeno p24 tiene interés teórico en dos situaciones; en primer lugar para el diagnóstico de la primoinfección y en segundo lugar como indicador de progresión y pronóstico de la infección. Para esta segunda situación, actualmente está generalizado el uso de técnicas moleculares de cuantificación viral (carga vírica) que permiten el seguimiento y control evolutivo y de respuesta terapéutica en el paciente infectado por el VIH.

Durante la primoinfección y antes de la seroconversión podemos detectar altos títulos de antígeno p24 del VIH. Posteriormente la formación de inmunocomplejos antígeno p24 y anticuerpos anti-p24 circulantes dificulta su detección. Actualmente las técnicas de disociación por calor junto a amplificaciones de la señal en el EIA ofrecen resultados de mayor confianza que las técnicas antiguas por acidificación.

Existen muchos reactivos comercializados que combinan la detección de anticuerpos frente a VIH 1 y VIH 2 y a su vez la detección de antígeno p24. Estos reactivos pueden conseguir disminuir el periodo ventana sin que se vea afectada la sensibilidad y especificidad para la detección de

anticuerpos frente al VIH. En cualquier caso la antigenemia primaria dura 1-3 semanas, de modo que únicamente es realmente útil su detección, en situaciones clínicas de elevada sospecha de infección por el VIH.

Las recomendaciones y observaciones sobre las técnicas rápidas de detección de antígeno en las hepatitis víricas y en la infección por el VIH quedan recogidas en los procedimientos SEIMC 2a (*Serología de las hepatitis víricas*. A. Delgado-Iribarren García-Campero, J.M.I Echevarría Mayo y P. León Rega. SEIMC, 2004) y 6 (*Diagnóstico microbiológico de la infección por VIH*. 6. R. Ortiz de Lejarazu Leonardo, R. Cisterna Cáncer, J.M. Eiros Bouza, A. González López, M.C. Maroto, T. Pumarola Suñe y J.R. Vivas. SEIMC. 1998) por lo que este apartado no se acompaña del correspondiente documento técnico.

10. BIBLIOGRAFÍA

10.1 ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL

1. Chavez M, Vargas J, Pueyo I, Valverde A, Serrano MC, Claro R, Martín-Mazuelos E. Incidence of genitourinary infection caused by *Chlamydia trachomatis* in a STD center calculated by direct antigen detection. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2000; 18:392-395.
2. Donders GG, van Gerven V, de Wet HG, van Straten AM, de Boer F. Rapid antigen test for *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* are not accurate for screening women with disturbed vaginal lactobacillary flora. *Scand J Infect Dis* 1996; 28:559-562.
3. Mardh PA. Chlamydia screening—yes, but of whom, when, by whom, and with what?. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 900:286-292.
4. Ostergaard L. Microbiological aspects of the diagnosis of *Chlamydia trachomatis*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002; 16:789-799.
5. Schachter J. DFA, EIA, PCR, LCR and other technologies: what test should be used for diagnosis of chlamydia infection?. *Immunol Invest* 1997; 26:157-161.
6. Warford A, Chernesky M and E.M. Peterson 1999. Cumitech 19^a, Laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. Coordinating ed., C.A. Gleaves. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

10.2 INFECCIONES RESPIRATORIAS

1. Bartlett JG, Breiman RF, Mandell LA, File TM Jr. Community-acquired pneumonia in adults: Guidelines for management. *Clin Infect Dis* 1998;26:811-838.
2. Benson RF, Tang PW, Fields B. Evaluation of the Binax and Biotest urinary antigen kits for detection of Legionnaires' disease due to multiple serogroups and species of *Legionella*. *J Clin Microbiol* 2000;38:2763-2765.
3. Biso AL, Gerber MA, Gwaltney JM, Kaplan EL, Schwart RH. Diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: a practice guideline. *Clin Infect Dis* 1997;25:574-583.
4. Bromberg K, Tannis G, Rodgers A. Pneumococcal C and type polysaccharide detection in the concentrated urine of patients with bacteremia. *Med Microbiol Immunol* 1990;179:335-338.
5. Coonrod JD. Urine as an antigen reservoir for diagnosis of infectious diseases. *Am J Med* 1983;75(1B):85-92.
6. Domínguez J, Galí N, Blanco S, Pedroso P, Prat C, Matas L, Ausina V. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen by a rapid immunochromatographic assay in urine samples. *Chest* 2001;119:243-249.

7. Domínguez JA, Matas L, Manterola JM, Blavia R, Sopena N, Padilla E, Giménez M, Sabrià M, Morera J, Ausina V. Comparison of radioimmunoassay and enzyme immunoassay kits for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples. *J Clin Microbiol* 1997;35:1627-1629.

8. Domínguez JA, Galí N, Pedroso P, Fargas A, Padilla E, Manterola JM, Matas L. Comparison of the Binax *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay (EIA) with the Biotest *Legionella* urine antigen EIA for detection of *Legionella* antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples. *J Clin Microbiol* 1998;36:2718-2722.

9. Edelstein PH. Legionnaires' disease. *Clin Infect Dis* 1993;16:741-749.

10. González Y, Martino R, Rabella N, Labeaga R, Badell I, Sierra J. Community respiratory virus infections in patients with hematologic malignancies. *Haematologica* 1999; 84: 820-823.

11. Harrison T, Uldum S, Alexiou-Daniel S, Bangsborg J, Bernander S, Drasar V, Etienne J, Helbig J, Lindsay D, Lochman I, Marques T, de Ory F, Tartakovskii I, Wewalka, Fehrenbach F. A multicenter evaluation of the Biotest *Legionella* urinary antigen EIA. *Clin Microbiol Infect* 1998;4:359-365.

12. Martino R, Ramila E, Rabella N, Muñoz JM, Peyret M, Portos JM, Laborda R, Sierra J. Respiratory virus infections in adults with hematological malignancies: a prospective study. *Clin Infect Dis* 2003; 36:1-8.

13. Minnich LL, Smith TF, Ray CG. Cumitech 24. Rapid detection of viruses by immunofluorescence. Coordinating ed., S. Specter. American Society for Microbiology, 1988. Washington, D.C.

14. Musher DM. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: Clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin Infect Dis* 1992;14:801-804.

15. Rabella, N, Prats G. Respiratory tract infections of viral origin in immunocompetent patients. *Clin Pulm Med* 1999;6: 9-17.

16. Rabella R, Prats G. Neumonías víricas. En: J. Rello, J. Valles. Ed. Infecciones graves. Implicaciones terapéuticas de la neumonía extrahospitalaria grave. Edika Med, S.L. Barcelona 1999; 71-87.

17. Rabella N, Rodríguez P, Labeaga R, Otegui M, Mercader M, Gurguí M, Prats G. Conventional respiratory viruses recovered from immunocompromised patients: clinical considerations. *Clin Infect Dis* 1999; 28:1043-1048.

18. Rabella N. Community respiratory virus infections: an overlooked cause of acute respiratory failure in transplant recipients admitted to the intensive care unit. En: N. Singh, J.M. Aguado. *Infectious Complications in Transplant Recipients*. Kluwer Academic Publishers. Boston 2001; 57-73.

19. Sagrera X, Ginovart G, Raspall F, Rabella N, Sala P, Sierra M Demestre X, Vila C. Outbreaks of Influenza A virus infection in neonatal intensive care units. *Pediatr Infect Dis J*. 2002; 21: 196-200.

20. Vergis EN, Yu VL. New directions for future studies of community-acquired pneumonia: optimizing impact on patient care. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:847-851.

10.3 INFECCIONES BACTERIANAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

1. Cubells CL, Gracia JJG, Martínez JR, Otín CL. Clinical data in children with meningococcal meningitis in a Spanish hospital. 1997; 86:26-29.

2. Feigin RD, McCracken GH, Klein JO. Diagnosis and management of meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11:785-814.
3. Goepf JG, Hohenboken M, Almeida-Hill J, Santosham M. Persistent urinary antigen excretion in infants vaccinated with *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide conjugated with outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11: 2-5.
4. Gray LD, Fedorko DP. Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5:130-145.
5. Gray SJ, Sobanski MA, Kaczmarek EB, Guiver M, Marsh WJ, Borrow R, Barnes RA, Coakley WT. Ultrasound enhanced latex immunoagglutination and PCR as complementary methods for non culture based confirmation of meningococcal disease. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1797-1801.
6. Hayden RT, Frenkel LD. More laboratory testing: greater cost but not necessarily better. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19:290-292.
7. Ingram DL, Pearson AW, Occhiuti AR. Detection of bacterial antigens in body fluids with the Wellcogen *Haemophilus influenzae* b, *Streptococcus pneumoniae*, and *Neisseria meningitidis* (ACYW135) latex agglutination tests. *J Clin Microbiol* 1983; 18: 1119-1121.
8. La Scolea LJ, Dryja D. Quantitation of bacteria in cerebrospinal fluid and blood of children with meningitis and its diagnostic significance. *J Clin Microbiol* 1984; 187-190.
9. Lebel MH, McCracken GH. Delayed cerebrospinal fluid sterilization and adverse outcome of bacterial meningitis in infants and children. *Pediatrics* 1989; 83: 161-167.
10. Marcos MA, Martinez E, Almela M, Mensa J, Jimenez de Anta MT. New rapid antigen test for diagnosis of pneumococcal meningitis. *Lancet* 2001; 357:1499-1500.
11. Maxson S, Lewno MJ, Schutze GE. Clinical usefulness of cerebrospinal fluid bacterial antigen studies. *J Pediatr* 1994; 125:235-238.
12. Murphy TV, Clements JF, Granoff DM. Excretion of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide antigen in the urine of healthy nasopharyngeal carriers. *Pediatr Res* 1989; 26: 491-495.
13. Perkins MD, Mirrett S, Reller LB. Rapid bacterial antigen detection is not clinically useful. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1486-1491.
14. Porritt RJ, Mercer JL, Munro R. Ultrasound-enhanced latex immunoagglutination test (USELAT) for detection of capsular polysaccharide antigen of *Neisseria meningitidis* from CSF and plasma. *Pathology* 2003; 35: 61-64.
15. Rai GP, Zachariah K, Sharma R, Phadke S, Belapurkar KM. Pneumococcal antigen detection in cerebrospinal fluid: a comparative study on counter immunoelectrophoresis, latex agglutination and coagglutination. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 2003; 26: 261-267.
16. Rai GP, Zachariah K, Sharma R, Phadke S, Belapurkar KM. Development of a sandwich dot-enzyme linked immunosorbent assay for *Streptococcus pneumoniae* antigen detection in cerebrospinal fluid. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 2004; 27: 217-223.
17. Samra Z, Shmueli H, Nahum E, Pagáis D, Ben-Ari J. Use of the NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in cerebrospinal fluid for rapid diagnosis of pneumococcal meningitis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 45:237-240.
18. Sánchez PJ, Siegel JD, Cushion NB, Threlkeld N. Significance of a positive urine group B streptococcal latex agglutination test in neonates. *J Pediatr* 1990; 116:601-606.
19. Tarafdar K, Rao S, Recco RA, Zaman MM. Lack of sensitivity of the latex agglutination test to detect bacterial antigen in the cerebrospinal fluid of patients with culture negative meningitis. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 406-408
20. Thirumoorthi MC. Bacterial meningitis in children. *Indian J Pediatr* 1995; 62: 265-279.
21. Tunkel AR, Scheld WM. Acute bacterial meningitis. *Lancet* 1995; 346:1675-1680.
22. Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Michael W, Whitley RJ. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis 2004; 39:1267-1284.
23. Villó N, Blanco JE, Sevilla P, Vegas E, Garcia MA, Alvarez J, Romanyck J. Enfermedad invasiva por *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* serotipo b. Estudio retrospectivo de 12 años. *An Pediatr* 2004; 61: 150-155.
24. Weinberg GA, Storch FA. Preparation of urine samples for use in commercial latex agglutination tests for bacterial meningitis. *J Clin Microbiol* 1985; 21: 899-901.
25. Wolk DM, Roberts GD. Commercial methods for identification and susceptibility testing of fungi p.225-255. In Truant AL (ed), *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology*, 2002. American Society for Microbiology, Washington, DC.

10.4 GASTROENTERITIS

1. Burton-MacLeod JA, Kane EM, Beard RS, Hadley LA, Glass RI, Ando T. Evaluation and comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of antigenically diverse human noroviruses in stool samples. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2587-2595.
2. Cubitt WD, Mitchell DK, Carter MJ, Willcocks MM, Holzel H. Application of electronmicroscopy, enzyme immunoassay, and RT-PCR to monitor an outbreak of astrovirus type 1 in a paediatric bone marrow transplant unit. *J Med Virol.* 1999;57:313-321.
3. Dediste A, Vandenberg O, Vlaes L, Ebraert A, Douat N, Bahwere P, Butzler JP. Evaluation of the ProSpecT Microplate Assay for detection of *Campylobacter*: a routine laboratory perspective. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9:1085-1090.
4. Gunson RN, Mackie P, Leanord A, Carman WF. First rotavirus, now astrovirus: the evolving benefits of RT-PCR. *Commun Dis Public Health.* 2003;6:66-67.
5. Hindiyyeh M, Jense S, Hohmann S, Benett H, Edwards C, Aldeen W, Croft A, Daly J, Mottice S, Carroll KC. Rapid detection of *Campylobacter jejuni* in stool specimens by an enzyme immunoassay and surveillance for *Campylobacter upsaliensis* in the greater Salt Lake City area. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3076-3079.
6. McIver CJ, Palombo EA, Doultree JC, Mustafa H, Marshall JA, Rawlinson WD. Detection of astrovirus gastroenteritis in children. *J Virol Methods.* 2000;84:99-105.
7. Ortiz de Lejarazu R, Eiros Bouza JM. Gastroenteritis de etiología vírica. En *Medicina Interna*. Farreras-Rozman. 15ª edición. Elsevier. Barcelona. 2004 315:2509-2512.
8. Park CH, Vandell MN, and Hixon DL. Rapid immunoassay for detection of *Escherichia coli* O157 directly from stool antigens. *J Clin Microbiol.* 1996;34:988-990.
9. Rohayem J, Berger S, Juretzek T, Herchenroder O, Mogel M, Poppe M, Henker J, Rethwilm A. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect Norovirus, Astrovirus and Adenovirus in clinical stool samples. *J Virol Methods* 2004;118:49-59.
10. Tolcin R, LaSalvia MM, Kirkley BA, Vetter EA, Cockerill FR 3rd, Procop GW. Evaluation of the Alexon-trend ProSpecT *Campylobacter* microplate assay. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3853-3855.

10.5 PARASITOSIS

Amebiasis

1. Gonin P y Trudel L. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* Isolates in Clinical Samples by PCR and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J Clin Microbiol 2003; 41:237-241.
2. Haque R, Ali IKM, Akther S et al. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. J Clin Microbiol 1998; 36:449-452.
3. Haque R, Neville LM, Hahn P et al. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. J Clin Microbiol 1995; 33:2558-2561.
4. Mirelman D, Nuchamowitz Y y Stolarsky T. Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. J Clin Microbiol 1997; 35:2405-2407.
5. World Health Organization. Amoebiasis. W.H.O. Weekly Epidemiol Rec 1997; 72:97-100.

Cryptosporidium parvum

1. Bialek R, Binder N, Dietz K. Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. Diag Microbiol Infect Dis 2002; 43:283-288.
2. Llorente MT, Clavel A, Varea M et al. Evaluation of an immunochromatographic dip-strip test. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21:624-625.
3. Rosenblatt JE y Sloan LM. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* spp. in stool specimens. J Clin Microbiol 1993, 31:1468-1471.

Giardiasis

1. Aldeen WE, Carroll K, Robison A et al. Comparison of nine commercially available enzyme-linked immunosorbent assays for detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. J Clin Microbiol 1998; 36:1338-1340.
2. Fedorko DP, Williams EC, Nelson NA. Performance of three enzyme immunoassays and two direct fluorescence assays for detection of *Giardia lamblia* in stool specimens preserved in ECOFIX. J Clin Microbiol 2000; 38:2781-2783.
3. Hanson KL y Cartwright CP. Use of an enzyme immunoassay does not eliminate the need to analyze multiple stool specimens for sensitive detection of *Giardia lamblia*. J Clin Microbiol 2001; 39:474-477.
4. Maraha B, Buiting AGM. Evaluation of four enzyme immunoassays for the detection of *Giardia lamblia* antigen in stool specimens. Eur J Clin Jmicrobiol Infect Dis 2000; 19:485-487.
5. Scheffler EH ,van Etta LL. Evaluation of rapid comercial enzyme immunoassay for detection of *Giardia lamblia* in formalin-preserved stool specimens. J Clin Microbiol 1994; 32:1807-1808.

Pruebas combinadas en heces

1. Alles AJ, Waldron MA, Sierra LS et al. Prospective comparison of direct immunofluorescence and conventional staining methods for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in human fecal specimens. J Clin Microbiol 1995; 33:1632-1634.
2. Chan R, Chen J, York MK et al. Evaluation of a combination rapid immunoassay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* antigens. J Clin Microbiol 2000; 38:393-394.
3. Garcia LS, Shimizu RY. Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPAC combination rapid solid-phase qualitative immunochromatographic assay. J Clin Microbiol 2000; 38:1267-1268.

4. Garcia LS, Shimizu RY, Novak S et al. Comercial assay for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens by rapid solid-phase qualitative immunochromatography. J Clin Microbiol 2003; 41:209-212.
5. Johnston SP, Ballard MM, Beach MJ et al. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. J Clin Microbiol 2004; 41:623-626.
6. Schunk M, Jelinek T, Wetzel K et al. Detection of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* in stool samples by two enzyme immunoassays. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20:389-401.
7. Verweij JJ, Blangé RA, Templeton K, et al. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. J Clin Microbiol 2004; 42:1220-1223.
7. Zimmerman SK, Needham CA. Comparison of conventional stool concentration and preserved-smear methods with Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* direct immunofluorescence assay and ProSpecT *Giardia* EZ microplate assay for detection of *Giardia lamblia*. J Clin Microbiol 1995; 33:1942-1943.

Plasmodium

1. Coleman RE, Maneechai N, Rachaphaew N. Field evaluation of the ICT Malaria PF/PV immunochromatographic test for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. Am J Trop Med Hyg 2002; 66:379-383.
2. Guthmann JP, Ruiz A, Priotto G, et al. Validity, reliability and ease of use in the field of five rapid tests for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in Uganda. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002; 96:254-257.
3. Hänscheid T. Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. Clin Lab Haem 1999; 21:235-245.
4. Huong NM, Davis TME, Hewitt S et al. Comparison of three antigen detection methods for diagnosis and therapeutic monitoring of malaria: a field study from southern Vietnam. Trop Med Int Health 2002; 7:304-308.
5. Iqbal J, Sher A, Hira PR et al. Comparison of the OptiMAL Test with PCR for diagnosis of malaria in immigrants. J Clin Microbiol 1999; 37:3644-3646.
6. Lema OE, Carter JY, Nagelkerke N et al. Comparison of five methods of malaria detection in the outpatient setting. Am J Trop Med Hyg 1999; 60:177-182.
7. Palmer CJ, Lindo JF, Klaskala WI et al. Evaluation of the OptiMAL Test for rapid diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria. J Clin Microbiol 1998; 36:203-206.
8. Proux S, Hkirijareon L, Ngamngonkiri C et al. Short communication: Paracheck-Ff®: a new, inexpensive and reliable rapid test for *P. falciparum* malaria. Trop Med Int Health 2001; 6:99-101.
9. Richardson DC, Ciach M, Zhong KJY et al. Evaluation of the Makromed Dipsitck assay versus PCR for diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in returned travelers. J Clin Microbiol 2002; 40:4528-4530.
10. Singh N, Saxena A, Valecha N. Field evaluation of the ICT Malaria P.f/P.v immunochromatographic test for diagnosis of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infection in forest villages of Chindwara, central India. Trop Med Int Health 2000; 5:765-770.
11. Tjitra E, Suprianto S, Dyer M et al. Field evaluation of the ICT Malaria P.f/P.v immunochromatographic test for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in patients with a presumptive clinical diagnosis of malaria in Eastern Indonesia. J Clin Microbiol 1999; 37:2412-2417.

Leishmania

1. Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, Molina R, Moreno J. *Leishmania* and Human Immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:298-319.
2. Attar Z J, Chance M L, El-Safi S, Carney J, Azazy A, El-Hadi M, Dourado C, Hommel M. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Act Trop* 2001; 78:11-16.
3. Berhe N, Wolday D, Hailu A, Abraham Y, Ali A, Gebre-Michael T, Desjeux P, Sonnerborg A, Akuffo H, Britton S. HIV viral load and response to antileishmanial chemotherapy in coinfecting patients. *AIDS* 1999; 13:1921-25
4. Gradoni L, Scalone A, Gramiccia M, Troiani M. Epidemiological surveillance of leishmaniasis in HIV-1-infected individuals in Italy. *AIDS* 1996; 10:785-791.
5. Hommel M. Le KATEX pour le diagnostic de la Leishmaniose Viscerale. *Med Trop* 2001; 61:255.
6. Morales MA, Cruz I, Rubio JM, Chicharro C, Canavate C, Laguna F, Alvar J. Relapses versus reinfections in patients coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 2002; 185:1533-1537.
7. Pineda JA, Gallardo JA, Macias J, Delgado J, Regordan C, Morillas F, Relimpio F, Martin-Sanchez J, Sanchez-Quijano A, Leal M, Lissen E. Prevalence of and factors associated with visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1-infected patients in Southern Spain. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2419-2422.
8. Sarkari B, Chance M, Hommel M. Antigenuria in visceral leishmaniasis: detection and partial characterisation of a carbohydrate antigen. *Act Trop* 2002; 82:339-348.
9. Vilaplana C, Blanco S, Domínguez J, Giménez M, Tural C, Muñoz C, Ausina V. Non invasive diagnosis of visceral leishmaniasis by a latex antigen detection test in urine samples. *J Clin Microbiol* 2004; 4:1853-1854.
10. World Health Organization (WHO). *Leishmania/HIV* coinfection: Southwestern Europe 1990-1998. Retrospective analysis of 965 cases. *Wkly Epidemiol Rev* 2000; 74:365-375.

Wuchereria bancrofti

1. Braga C, Dourado MI, Ximenes RAA et al. Field evaluation of the whole blood immunochromatographic test for rapid bancroftian filariasis diagnosis in the northeast of Brazil. *Rev Inst Med trop S. Paulo* 2003; 45:125-129.
2. Itoh M, Weerasooriya MV, Gunawardena NK et al. Short communication: *Wuchereria bancrofti* antigenaemia in Sri Lanka. *Trop Med Int Health* 1999; 4:207-210.
3. Rajgor D, Gogtay NJ, Garg BS et al. Reading ICT filariasis rapid diagnostic card tests under field conditions and issues of good clinical practice in clinical trials. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96:574-575.
4. Schuetz A, Addiss DG, Eberhard ML. Evaluation of the whole blood filariasis ICT test for short-term monitoring after antifilarial treatment. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62:502-503.
5. Simonsen PE, Dunyo SK. Comparative evaluation of three new tools for diagnosis of bancroftian filariasis based on detection of specific circulating antigens. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93:278-282.
6. Weerasooriya MV, Gunawardena NK, Itoh M et al. Prevalence and intensity of *Wuchereria bancrofti* antigenaemia in Sri Lanka by Og4C3 ELISA using filter paper-absorbed whole blood. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96:41-45.

10.6 HERPESVIRUS

1. Barraquer P, Rabella N, Labeaga R, Mercader M, Prats G. Diagnóstico de las infecciones causadas por el virus varicela zoster. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1996;14:277-278.
2. García A, Niubó J, Benitez MA, Viqueira M, Perez JL. Comparison of two leukocyte extraction methods for cytomegalovirus antigenemia assay. *J Clin Microbiol*. 1996; 34:182-184.
3. Niubó J, Perez JL, Carvajal A, Ardanuy C, Martin R. Effect of delayed processing of blood samples on performance of cytomegalovirus antigenemia assay. *J Clin Microbiol*; 1994; 32:1119-1120.
4. Pérez JL, García A, Niubó J, Salvá J, Podzamczar D, Martín R. Comparison of techniques and evaluation of three commercial monoclonal antibodies for laboratory diagnosis of varicella-zoster virus in mucocutaneous specimens. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1610-1613.
5. Pérez JL, De Oña M, Niubó J, Villar H, Melon S, García A, Martín R. Comparison of several fixation methods for cytomegalovirus antigenemia assay. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1646-1649.
6. Rabella Garcia N, Labeaga Puchas R, Margall Coscojuela N, Sánchez López I. Inmunofluorescencia directa para el diagnóstico de las infecciones mucocutáneas causadas por virus herpes simple. *Med Clin (Barc)* 1994;102:637.
7. Rabella N, Pérez JL, Pumarola T. El laboratorio de virología en la infección por citomegalovirus. Posibilidades actuales. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1997;15 (Supl 2): 69-76.

10.7 MICOSIS INVASORAS

1. Del Palacio A, Cuétara MS y Pontón J. El diagnóstico de laboratorio de la aspergilosis invasora. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20:90-98.
2. Durkin MM, Connolly PA, Wheat LJ. Comparison of radioimmunoassay and enzyme-linked immunoassay methods for detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* antigen. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2252-2255.
3. Erjavec Z, Verweij PE. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. *Drug Resist Update* 2002; 5:3-10.
4. Gade W, Hinnefeld SW, Babcock LS. Comparison of the PREMIER cryptococcal antigen enzyme immunoassay and the latex agglutination assay for detection of cryptococcal antigens. *J Clin Microbiol* 1991; 29:1616-1619.
5. Gadea I, Cuenca-Estrella M. Recomendaciones para el diagnóstico micológico y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22:32-29.
6. Hamilton JR, Noble A, Denning DW et al. Performance of *Cryptococcus* antigen latex agglutination kits on serum and cerebrospinal fluid specimens of AIDS patients before and after praziquantel Treatment. *J Clin Microbiol* 1991; 29:333-339.
7. Kralovic SM, Rhodes JC. Utility of routine testing of bronchoalveolar lavage fluid for cryptococcal antigen. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3088-3089.
8. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:310-350.
9. Leight B, Parson P, Hume C, Hosain Dan, Gazzard B, Collins JV. Sputum induction for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* 1989; 2:205-206.
10. Lumbreras C, Gavalda J. Aspergilosis invasora: manifestaciones clínicas y tratamiento. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20:79-89.
11. Mennik-Kersten MA, Klont RR, Warris A, Op den Camp HJ, Verweij PE. *Bifidobacterium* lipoteichoic acid and false ELISA reactivity in aspergillus antigen detection. *Lancet* 2004; 363:325-327.

12. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E et al. β -D-Glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 2004; 39:199-205.

13. Reiss E, Morrison CJ. Nonculture methods for diagnosis of disseminated candidiasis. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6:311-323.

14. Stevens D. Diagnosis of fungal infections: current status. *J Antimicrob Chemother* 2002; Suppl. S1:11-19.

15. Stoekli TC, Burman WJ. Inactivated pronase as the cause of false-positive results of serum cryptococcal antigen tests. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 836-837.

16. Taner DC, Weinstein MP, Fedorciw B et al. Comparison of commercial kits for detection of cryptococcal antigen. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1680-1684.

17. Verweij PE, Stynen D, Rijs AJMM et al. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with Pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1912-1914.

18. Wu T, Koo SY. Comparison of three commercial cryptococcal latex kits for detection of cryptococcal antigen. *J Clin Microbiol* 1983; 18:1127-1130.

19. Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:465-484.

10.8 HEPATITIS VÍRICAS E INFECCIÓN POR EL VIH

Ver bibliografía de los siguientes procedimientos SEIMC:

1. Serología de las hepatitis víricas. 2a. A. Delgado-Iribarren García-Campero, J.M. Echevarría Mayo y P. León Rega. SEIMC. 2004.

2. Diagnóstico microbiológico de la infección por VIH. 6. R. Ortiz de Lejarazu Leonardo, R. Cisterna Cáncer, J.M. Eiros Bouza, A. González López, M.C. Maroto, T. Pumarola Suñe y J. Romero Vivas. SEIMC. 1998.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las enfermedades de transmisión sexual	Fecha: PNT-TDA-01	
		Edición 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es normalizar el diagnóstico de las enfermedades de transmisión sexual (ETS) mediante técnicas de detección de antígeno. Su aplicación se extiende al proceso diagnóstico en el laboratorio. Los procedimientos de la fase preanalítica deben consignarse en documento/s independientes dada la conveniencia de participación de diferentes facultativos para la obtención de algunas muestras.

2. FUNDAMENTO

El diagnóstico rápido de las ETS permite el tratamiento dirigido de las formas de enfermedad no complicada, así como las indicaciones epidemiológicas (estudio de pareja/s). Ambas circunstancias ayudan a limitar la progresión de la cadena de transmisión del microorganismo.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Joergensen JH, and Tenover FC, ed. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. American Society for Microbiology, 2003. Washington, DC.
- Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. 2004. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Procedimientos en Microbiología Clínica. Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. 1a. C. Sánchez y C. Guerrero. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2003.

4. TIPOS DE MUESTRA.

En la tabla 1 se detallan las principales muestras a recoger, en función de la patología y la situación epidemiológica presentada. Debemos recordar el axioma de que en las ETS generalmente se transmite más de un microorganismo y que el estudio de pacientes, parejas y posibles portadores debe ser lo mas amplio posible.

En función del cuadro clínico y los antecedentes epidemiológicos en el momento de recoger las muestras para el diagnóstico etiológico de las ETS, debemos atender a las recomendaciones para el aislamiento de los microorganismos posiblemente implicados.

5. REACTIVOS

El manejo y la conservación de reactivos deben ajustarse a las instrucciones de los fabricantes. Cualquier modificación respecto de aquellas deberá constar en el correspondiente PNT.

6. TÉCNICAS DISPONIBLES

Existen diferentes reactivos comerciales, con diferentes técnicas: EIA, ELISA de membrana,

inmuncromatografía e inmunofluorescencia indirecta.

Cada centro debe valorar cual de ellos es más conveniente en función del número y cadencia de determinaciones, de la prevalencia de cada uno de los microorganismos implicados en su área y de los recursos humanos disponibles.

7. APARATOS Y MATERIAL

El equipamiento necesario para la realización de las técnicas descritas, incluyendo el tratamiento de las muestras, es el siguiente:

- Centrífuga
- Vórtex
- Pipetas automáticas
- Centrífuga
- Microscopio de fluorescencia

8. PROCEDIMIENTO

Los procedimientos concretos de las técnicas, al realizarse mediante reactivos comercializados, no se detallan, ya que se encuentran debidamente descritos en la documentación de cada equipo comercial. Debe constar como se identifican las muestras o si se ha optado por ello, referirse al procedimiento de identificación y registro de muestras. Deben señalarse también los controles a incluir y cualquier modificación introducida a las recomendaciones del fabricante.

9. CONTROL DE CALIDAD

Siguiendo las recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica (CCI-SEIMC) para los reactivos comerciales, debe solicitarse al fabricante que disponga de un Sistema de Calidad reconocido y que facilite al laboratorio los datos relativos al control de cada lote de reactivo.

La mayoría de técnicas comerciales incluyen actualmente controles positivo y/o negativo para realizar bien a la vez que cada una de las determinaciones bien cada vez que se realice un grupo de ellas, en función del sistema de presentación.

Cada centro debe también considerar la conveniencia de participar en programas externos de control de calidad.

10. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

Previamente a la interpretación de los resultados se debe realizar la validación de los mismos en función de los controles incluidos. Es importante definir los criterios de validación técnica y facultativa, así como el procedimiento a seguir en caso de resultados dudosos. En la interpretación deben seguirse las instrucciones del fabricante.

Tabla 1. Muestras para diagnóstico de ETS por *N.gonorrhoeae* y/o *C. Trachomatis*

Síndrome clínico	Sospecha etiológica	Muestra	Método	Comentarios
Cervicitis	<i>N. gonorrhoeae</i>	Exudado endocervical	Escobillón endocervical introducir 1-2 cm y rotar durante 10 seg.	Transporte rápido y a temperatura ambiente para cultivo
	<i>C. trachomatis</i>		Escobillón o cepillo endocervical introducir 1-2 cm y rotar durante 10 seg	Previamente retirar moco y pus exocervical
Endometritis	<i>N. gonorrhoeae</i>	Biopsia endometrio	La muestra debe ser colocada en un bote estéril y añadir suero fisiológico o medio de transporte para evitar desecación	Transporte rápido y a temperatura ambiente para cultivo
	<i>C. trachomatis</i>			
Enfermedad pélvica inflamatoria	<i>N. gonorrhoeae</i>	Biopsia trompa Falopio / punción absceso tubo-ovárico	La muestra debe ser colocada en un bote estéril y añadir suero fisiológico o medio de transporte para evitar desecación	Transporte rápido y a temperatura ambiente para cultivo
	<i>C. trachomatis</i>			
Uretritis	<i>N. gonorrhoeae</i>	Exudado uretral	Escobillón endouretral fino. Introducir 1-2 cm y rotar 2-3 veces	Recoger la muestra antes de la primera micción matinal o esperar un mínimo de una hora desde la micción
	<i>C. trachomatis</i>	Exudado uretral	Escobillón endouretral fino. Introducir 1-2 cm y rotar 2-3 veces	Recoger la muestra antes de la primera micción matinal o esperar un mínimo de una hora desde la micción. Previamente eliminar exudado purulento
		Orina	Recoger 10-20 mL de la primera parte de la micción	También para síndrome uretral femenino.
Prostatitis y epididimitis	<i>N. gonorrhoeae</i>	Secreción prostática o seminal y orina	La muestra debe ser colocada en un bote estéril y añadir suero fisiológico o medio de transporte para evitar desecación	Transporte rápido y a temperatura ambiente para cultivo
	<i>C. trachomatis</i>			
Estudio de portadores asintomáticos	<i>N. gonorrhoeae</i>	Ex.uretral		Recoger también Exudado faríngeo
	<i>C. trachomatis</i>	Ex.endocervical		Exudado rectal
				Recoger también orina

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las enfermedades de transmisión sexual	Fecha: PNT-TDA-01	
		Edición 01	Página 4 de 4

11. RESPONSABILIDADES

El personal técnico de la sección será el responsable de revisar las solicitudes estudiando la idoneidad de la muestra remitida con la determinación solicitada, del tratamiento de las muestras, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados en función de los resultados de los controles. El facultativo responsable de la sección, además de la supervisión de las tareas citadas, será responsable de mantener al día los procedimientos, de la interpretación de los resultados e informe de los mismos.

El personal debe conocer las ventajas y limitaciones de las técnicas empleadas, así como su fundamento y el funcionamiento de los aparatos utilizados. Además debe trabajar en condiciones de máxima seguridad personal y ambiental, realizando una adecuada segregación de los residuos.

12. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO Y LIMITACIONES

Las técnicas de detección de antígeno para el diagnóstico de las ETS, están actualmente superadas, en términos de sensibilidad y especificidad, por las técnicas de biología molecular, especialmente para la búsqueda de portadores en muestras de fácil recogida como es la orina.

De todos modos la disponibilidad de técnicas rápidas para realizar las determinaciones y control/es pertinentes para muestras individuales, permite, incluso a pesar de su limitada sensibilidad y la baja prevalencia de algunas ETS, el diagnóstico etiológico y su tratamiento específico en la primera visita.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Chavez M, Vargas J, Pueyo I, Valverde A, Serrano MC, Claro R, Martín-Mazuelos E. Incidence of genitourinary infection caused by *Chlamydia trachomatis* in a STD center calculated by direct antigen detection. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2000; 18:392-395.
2. Donders GG, van Gerven V, de Wet HG, van Straten AM, de Boer F. Rapid antigen test for *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* are not accurate for screening women with disturbed vaginal lactobacillary flora. *Scand J Infect Dis* 1996; 28:559-562.
3. Schachter J. DFA, EIA, PCR, LCR and other technologies: what test should be used for diagnosis of chlamydia infection?. *Immunol Invest* 1997; 26:157-161.
4. Warford A, Chernesky M, Peterson EM 1999. Cumitech 19^a, Laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. Coordinating ed., C.A. Gleaves. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-TDA-02
TÉCNICAS RÁPIDAS DE DIAGNOSTICO DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del HospitalLa información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las infecciones respiratorias	Fecha: PNT-TDA-02	
		Edición 01	Página 2 de 7

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este procedimiento es el de definir las técnicas rápidas de detección de antígeno que existen para el diagnóstico etiológico de las infecciones respiratorias. Se describe qué tipo de muestras son las más adecuadas en función de los microorganismos que se pretende detectar y en función de la técnica que se plantee utilizar.

2. FUNDAMENTO

En el transcurso de un proceso infeccioso de las vías respiratorias es posible detectar antígenos del agente responsable en muestras procedentes del foco de infección (moco nasal, exudado faríngeo, moco nasofaríngeo, esputo, líquido pleural, lavado broncoalveolar, material obtenido por punción aspirativa, etc.).

En la infección bacteriana también es posible detectar antígenos en el suero por el que circulan y en la orina por la que se eliminan. Aunque en principio pueda sorprender, la orina constituye un mejor reservorio de antígenos bacterianos que el suero. La circulación de antígeno en sangre no siempre es óptima, existe formación de inmunocomplejos y secuestro por el sistema retículo-endotelial, de forma que determinados antígenos pueden eliminarse rápidamente. Por otra parte, la orina es una muestra fácil de obtener y en cantidad suficiente como para que permita concentrar los antígenos presentes en la misma.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA.

- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Joergensen JH, and Tenover FC, ed. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. American Society for Microbiology, 2003. Washington, DC.

- Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. 2004. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Procedimientos en Microbiología Clínica. Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. 1a. C. Sánchez y C. Guerrero. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2003.

4. TIPOS DE MUESTRA

En la **tabla 1** se indican las muestras de elección para la detección de cada microorganismo y las técnicas por las que se pueden detectar.

4.1. RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA.

En el procedimiento SEIMC de Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. 1a. (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2003) se indican las directrices principales de la recogida y conservación de las muestras (PNT-RTP-01).

4.2. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

Tratamiento de muestras de orina para la detección de antígeno neumocócico y de Legionella

1. Hervir durante 5 minutos y dejar atemperar después las orinas.
2. Centrifugar 15 minutos a 3.000 rpm.
3. Concentrar 2'5-10 ml del sobrenadante por ultrafiltración selectiva 25 veces.
4. Trabajar con orina concentrada. En caso de muestra insuficiente para realizar la concentración de orina, se puede realizar con orina directa.

Tabla 1.

Microorganismo	Muestra	Técnica
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Exudado faríngeo	ICT
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Orina	CIE, ICT
	Muestra respiratoria	LA
	Líquido pleural	CIE, ICT, LA
<i>Legionella pneumophila</i>	Orina	EIA, ICT
	Muestra respiratoria	IFD
	Líquido pleural	EIA, ICT
<i>Haemophilus influenzae</i>	Muestra respiratoria	LA
	Líquido pleural	LA
<i>Virus gripe A y B</i>	Moco nasofaríngeo	IFI, ICT, EIA
	Exudados faríngeo y nasal	IFI, ICT, EIA
<i>Virus respiratorio sincitial</i>	Moco nasofaríngeo	IFD, IFI, ICT, EIA
	Exudados faríngeo y nasal	IFD, IFI, ICT, EIA
<i>Metaneumovirus</i>	Moco nasofaríngeo	IFI
<i>Virus parainfluenza 1,2,3</i>	Moco nasofaríngeo	IFI
<i>Adenovirus</i>	Moco nasofaríngeo	IFI, ICT
	Exudados faríngeo y nasal	IFI, ICT

CEI: contraelectroforesis; ICT: Inmunocromatografía; IFD: Inmunofluorescencia directa; IFI: Inmunofluorescencia indirecta; EIA: Enzimoimmunoensayo; LA: Aglutinación por partículas de látex.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las infecciones respiratorias	Fecha: PNT-TDA-02	
		Edición 01	Página 3 de 7

La concentración de la orina por ultrafiltración selectiva puede realizarse de forma pasiva o por centrifugación. En ambos casos los resultados son equiparables. Sin embargo el método basado en centrifugación es significativamente más rápido. La ultrafiltración selectiva pasiva consiste en una celda donde se introduce la muestra de orina, que en contacto con un material absorbente mediante una membrana de permeabilidad selectiva permite el paso de agua y solutos de bajo peso molecular, concentrándose progresivamente el antígeno al disminuir el volumen de líquido.

En la concentración por centrifugación el dispositivo combina una membrana de ultrafiltración de baja adsorción en una carcasa vertical acoplada a un tubo de centrifugación. El agua y solutos de bajo peso molecular atraviesan la membrana como consecuencia de la fuerza centrífuga, concentrándose progresivamente el antígeno en la carcasa vertical.

Tratamiento de muestras de líquido pleural para la detección de antígeno neumocócico, de Legionella y de Haemophilus influenzae

1. Diluir 1:4 el líquido con tampón EDTA 0,1 M.
2. Hervir la mezcla durante 5 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente (18-25°C)
3. Agitar vigorosamente durante 5 segundos
4. Centrifugar a 1400 g durante 15 minutos
5. Trabajar con el sobrenadante.

Tratamiento de muestras respiratorias para la detección de antígeno de Legionella

1. Tomar la parte más viscosa del esputo o del broncoaspirado, el sedimento del lavado broncoalveolar o del catéter telescópico.
2. Realizar una extensión sobre un portaobjetos.
3. Dejar secar al aire y fijar inicialmente a la llama.
4. Fijar la extensión también con formalina al 10% durante 10 minutos en cámara húmeda.
5. Lavar con agua destilada y dejar secar.

Tratamiento de muestras respiratorias para la detección de antígeno neumocócico y de Haemophilus influenzae

Esputo o Broncoaspirado (BAS)

1. Mezclar a partes iguales la muestra con ditiotreititol (Sputasol).
2. Agitar con vórtex durante 30 segundos.
3. Calentar a 100°C durante 5 minutos.
4. Centrifugar durante 15 minutos a 2.000g y descartar el sobrenadante.

Lavado broncoalveolar (BAL)

1. Calentar aproximadamente 1 ml del BAL a 100°C durante 5 minutos.
2. Centrifugar durante 15 minutos a 2.000g y descartar el sobrenadante.

Catéter telescópico

1. Agitar con vórtex en el suero fisiológico o tampón fosfato en el que viene introducido el catéter telescópico.

2. Calentar 0'5 ml de la suspensión a 100°C durante 5 minutos.

Biopsia o punción pulmonar

1. Homogeneizar la muestra con mortero.
2. Calentar 0'5 ml a 100°C durante 5 minutos.

Tratamiento de las muestras respiratorias para la detección de virus respiratorios

Exudado faríngeo y exudado nasal

1. Poner 1 ml de suero fisiológico dentro de un tubo estéril.
2. Introducir el escobillón y agitar de manera que la muestra clínica recogida quede resuspendida en el medio.

Lavado broncoalveolar y moco nasofaríngeo

1. Homogeneizar la muestra agitándola vigorosamente durante cinco segundos.

5. REACTIVOS.

Contrainmunolectroforesis

1. Omnisérum® (Statens Seruminstitut. Dinamarca)
2. Agarosa type II: Medium EEO.
3. Ácido dietil barbitúrico.
4. Barbitol sódico.
5. Brillant-Blue R250.
6. Ácido acético.

Preparación de reactivos:

- 1.- Agarosa (Disolver a 90°C. Conservar a 6°C).

- Agarosa Type II: Medium EEO 4 g

- Tampón Veronal (pH= 8,6) 400 ml

- 2.- Tampón Veronal (pH= 8,6).

- Ácido dietil-barbitúrico 1,55 g

- Barbitol sódico 8,55 g

- Lactato cálcico-5 H₂O 0,4 g

- Azida sódica 0,5 g

- Agua destilada 1 L

Agitar bien hasta disolver bien los ingredientes. Ajustar el pH a 8,6. Guardar a 6°C.

- 3.- Colorante Coomasie Brillant-Blue (conservación a temperatura ambiente).

- Brillant-Blue R 250 2 g

- Etanol 96% 180 ml

- Ácido acético 40 ml

- Agua destilada 180 ml

- 4.- Decolorante Coomasie (conservación a temperatura ambiente).

- Etanol 96% 250 ml

- Ácido acético 83 ml

- Agua destilada 667 ml

Aglutinación de partículas de látex.

1. Ditiotreititol (Sputasol®)

Preparación del reactivo:

Reconstituir el vial de Sputasol® con 5 ml de agua destilada estéril. Diluir 1 ml de suspensión de Sputasol en 19 ml. de agua destilada estéril. Se ha de utilizar la solución de trabajo en las 24 horas siguientes a la preparación. Conservación a 6°C. La solución madre

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las infecciones respiratorias	Fecha: PNT-TDA-02	
		Edición 01	Página 4 de 7

de Sputasol se puede utilizar durante 1 semana. Conservación a 6°C.

- Los reactivos específicos incluidos en los equipos comercializados.

Inmunofluorescencia

- Formol (40%)
- Acetona y PBS
- Los reactivos específicos incluidos en los equipos comercializados.

Inmunocromatografía (ICT) y enzoinmunoensayo (EIA)

- EDTA.
- Los reactivos específicos incluidos en los equipos comercializados.

6. TÉCNICAS DISPONIBLES

Las técnicas disponibles para la detección de cada microorganismo se han enumerado en la tabla 1. Excepto la contraelectroforesis para la detección de *S. pneumoniae*, todas las técnicas están debidamente estandarizadas y disponibles comercialmente.

Técnicas de detección de antígeno de Streptococcus pyogenes

Las técnicas utilizadas para la detección de antígeno de *S. pyogenes* a partir de muestras directas de faringe, son fundamentalmente técnicas de aglutinación facilitada, enzoinmunoensayos e inmunocromatografías. Estas técnicas han demostrado ser técnicas rápidas, sensibles y específicas. En general, las muestras deben tratarse química o enzimáticamente para liberar el antígeno presente en la muestra. La sensibilidad depende del reactivo empleado y de la carga bacteriana. De forma que ante resultados negativos es necesario realizar cultivos.

Técnicas de detección de antígenos para el diagnóstico etiológico de la neumonía neumocócica

La técnica inmunológica utilizada tradicionalmente para la detección de antígeno polisacárido capsular (PCA) en orina ha sido la contraelectroforesis (CIE). La CIE es una técnica útil para la detección de antígeno neumocócico en orina.

La CIE no está ampliamente implantada dado que es una técnica laboriosa que para una máxima rentabilidad requiere utilizar orina concentrada y de una difusión pasiva de las placas de agarosa a 4°C durante 18 h y tinción específica con azul brillante de Coomasie.

Se ha comercializado una técnica de inmunocromatografía de membrana (ICT) para la detección de polisacárido C (PnC) de *S. pneumoniae* en muestras de orina. El PnC es un antígeno común de todos los serotipos neumocócicos.

La ICT ha demostrado ser una técnica muy sensible y específica, siendo muy útil en el diagnóstico de la neumonía neumocócica, especialmente en los casos

no bacteriémicos siendo una alternativa real y más eficaz que la CIE. Las técnicas de detección de antígeno se muestran como una herramienta útil en el diagnóstico de la neumonía neumocócica no bacteriémica. Sin embargo, la ICT es mucho más rápida que la CIE, proporcionando resultados en 15 minutos, es menos compleja y requiere un menor equipamiento. Otra ventaja adicional de la ICT sobre la CIE es que permite detectar por igual todos los serotipos, incluidos los serotipos 7 y 14, que no son detectables por CIE en las condiciones habitualmente utilizadas. Además la CIE emplea un omnisérum policlonal contra los 84 serotipos neumocócicos. En función del serotipo la inmunoreactividad de los PCA varía significativamente, lo que influye en la representación de los anticuerpos específicos y comporta diferencias importantes entre lotes de omnisérum, repercutiendo directamente en la sensibilidad y homogeneidad de los resultados de la técnica. Además existe un rápido *turnover* para determinados antígenos capsulares que dificulta su detección. Por otra parte, también ha de señalarse la diferente identidad inmunológica del antígeno presente en la orina respecto al nativo, probablemente debido a una parcial metabolización.

En conclusión, la sensibilidad y especificidad de la ICT para detectar antígeno de *S. pneumoniae* en orina se ha mostrado muy útil en el diagnóstico rápido de la neumonía neumocócica, especialmente en la no bacteriémica, que no se diagnostica etiológicamente en la gran mayoría de casos.

Técnicas de detección de antígenos para el diagnóstico etiológico de la neumonía por Legionella

Las técnicas de detección de antígenos solubles de *Legionella* en orina se han mostrado extraordinariamente útiles para el diagnóstico rápido de la legionelosis. La primera técnica disponible comercialmente que demostró ser una técnica útil, sensible y específica, fue el radioinmunoensayo (RIA). En la actualidad existen fundamentalmente tres técnicas de EIA disponibles comercialmente, todas ellas presentan una excelente especificidad y sensibilidad, especialmente cuando se emplea orina concentrada.

Actualmente, se dispone también de una técnica de ICT rápida que aporta resultados en 15 minutos de forma individualizada y que no requiere de equipamiento especial. Los resultados obtenidos mediante esta técnica de ICT son absolutamente equiparables con los de las técnicas de EIA en sensibilidad y especificidad. Es una técnica más rápida y es técnicamente menos compleja que las técnicas de EIA.

La ICT es especialmente útil para pequeños laboratorios sin los equipos adecuados y con un número reducido de muestras. También puede ser útil como complemento del EIA para determinaciones urgentes. Las técnicas de EIA son una buena opción

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las infecciones respiratorias	Fecha: PNT-TDA-02	
		Edición 01	Página 5 de 7

para laboratorios con equipamiento adecuado y un número considerable de determinaciones.

Técnicas de detección rápidas de antígeno de Haemophilus influenzae

Las técnicas empleadas son de aglutinación de látex y de coaglutinación. Son técnicas que permiten obtener resultados rápidos pero cuya sensibilidad no es muy elevada.

Técnicas de detección de antígenos de virus respiratorios

La técnica de referencia para la detección de antígenos víricos en muestras respiratorias es la inmunofluorescencia ya sea directa o indirecta. En la actualidad existen para el virus respiratorio sincitial y para los virus gripales A y B técnicas de EIA y de ICT. Así mismo para detectar antígeno de adenovirus existen técnicas de ICT comercializadas. Los resultados obtenidos mediante ICT son absolutamente equiparables con los de las técnicas de EIA en sensibilidad y especificidad. Sin embargo la sensibilidad de estas técnicas con respecto a la inmunofluorescencia es menor. Para la detección de los antígenos víricos mediante estas técnicas y debido al pequeño tamaño de los virus se requieren células intactas que en caso de estar infectadas permitan la observación de acúmulos intracelulares que indican la presencia de los antígenos víricos.

7. APARATOS Y MATERIAL

El equipamiento necesario para la realización de las técnicas descritas, incluyendo el tratamiento de las muestras, es el siguiente:

- Agitador orbital
- Centrífuga
- Baño María
- Vórtex
- Alimentador de electroforesis
- Lector de placas
- Lavador de placas
- Pipetas automáticas
- Microscopio de fluorescencia
- Portaobjetos para inmunofluorescencia
- Estufa de 37°C
- Cámara húmeda
- Cubetas de tinción
- Cubreobjetos

8. PROCEDIMIENTO

No se detallan los procedimientos concretos de realización de las técnicas siguientes: técnicas de aglutinación, inmunofluorescencia, inmunocromatografía y enzimoimmunoensayos, ya que al realizarse en todos los casos mediante procedimientos comercializados se encuentran debidamente descritos en la documentación de cada equipo comercial. En cambio, para la realización de la técnica de contraelectroforesis al ser una técnica no comercializada se recomienda seguir el siguiente protocolo estandarizado: Anhalt JP, Kenny

GE, Rytel MW. 1978. Detection of microbial antigens by counterimmunoelectrophoresis. Cumitech 8. Washington, CD. American Society for Microbiology.

9. CONTROL DE CALIDAD.

Siguiendo las Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica (CCI-SEIMC) realizado por el grupo colaborador GEGMIC, para los reactivos comerciales, debe solicitarse al fabricante que disponga de un Sistema de Calidad reconocido y que facilite al laboratorio los datos relativos al control de cada lote de reactivo. La mayoría de técnicas comerciales incluyen actualmente controles positivo y/o negativo para realizar bien a la vez que cada una de las determinaciones bien cada vez que se realice un grupo de ellas, en función del sistema de presentación. Cada centro debe también considerar la conveniencia de participar en programas externos de control de calidad.

Contraelectroforesis: En cada serie se incluye un control positivo correspondiente a un extracto antigénico obtenido de una cepa de referencia de *S. pneumoniae* mediante el siguiente procedimiento: hervir 5-10 ml de una suspensión con una densidad del 0,5 de la escala de McFarland de una cepa de referencia de *S. pneumoniae* durante 5 minutos. Centrifugar a 3000 rpm durante 15 minutos y realizar alícuotas del sobrenadante de 1 ml.

También se realizarán en todas las técnicas controles de calidad internos empleando muestras propias de resultado ya conocido. La participación en controles de calidad externos es recomendable para asegurar la calidad de nuestros resultados. Por ejemplo, "European Working Group for Legionella infection" organiza un control de calidad para la detección de antígeno *Legionella* en orina.

10. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Contraelectroforesis

Se considera que la detección de antígeno es positiva cuando se observa claramente la presencia de una banda de precipitación entre el pocillo de la muestra y el Omnisérum®. Si aparece una banda entre el pocillo del tampón veronal y el pocillo del control o de cualquier muestra, se considera que el resultado no es válido.

Técnicas de aglutinación

Una muestra es positiva si se produce una aglutinación clara de las partículas visible macroscópicamente entre el reactivo y la muestra y entre el reactivo y el control positivo.

Inmunofluorescencia

Se considera positiva una determinación cuando se visualizan claramente bacilos fluorescentes al examinar las preparaciones al microscopio de fluorescencia. En el caso de los virus respiratorios se considera una determinación positiva cuando se

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las infecciones respiratorias	Fecha: PNT-TDA-02	
		Edición 01	Página 6 de 7

observa la presencia de acúmulos fluorescentes en la distribución celular característica para el antígeno vírico estudiado. Las técnicas de inmunofluorescencia al utilizar un colorante de contraste permiten la evaluación de la muestra al poder observar en el momento de la lectura si existe el número de células (bacterianas o del epitelio respiratorio) necesario para que la prueba se acepte como válida. En caso de no cumplir este requisito el resultado debe informarse como no concluyente ya que la ausencia de un número mínimo de células nos indica que la obtención de la muestra ha sido inadecuada.

Enzimoimmunoensayo

Se consideran positivas aquellas muestras con un valor de absorbancia tantas veces superior al del control negativo como indique el fabricante en cada caso.

Inmunocromatografía

Una determinación se considera positiva cuando se obtiene una banda coloreada en la línea control (donde se fija el conjugado) y también en la línea de reacción (donde se fija el antígeno); y negativo cuando únicamente se obtiene una banda en la línea control.

11. RESPONSABILIDADES.

El personal técnico de la sección será el responsable de revisar las solicitudes estudiando la idoneidad de la muestra remitida con la determinación solicitada, del tratamiento de las muestras, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados en función de los resultados de los controles. El facultativo responsable de la sección, además de la supervisión de las tareas citadas, será responsable de mantener al día los procedimientos, de la validación final de los resultados, su interpretación y el informe de los mismos.

El personal de la sección de detección de antígenos debe conocer las ventajas y limitaciones de las técnicas rápidas, así como el fundamento de todas las técnicas y del funcionamiento de los aparatos. Además debe trabajar en condiciones de máxima seguridad personal y ambiental, realizando una adecuada segregación de los residuos.

12. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO Y LIMITACIONES.

Detección de antígeno neumocócico mediante contrainmunolectroforesis

La CIE emplea un omnisérum policlonal frente a los 84 serotipos neumocócicos. En función del serotipo la inmunoreactividad de los PCA varía significativamente, lo que influye en la representación de los anticuerpos específicos y comporta diferencias importantes entre lotes de Omnisérum[®], repercutiendo directamente en la sensibilidad y homogeneidad de los resultados de la técnica. Además en las condiciones en que se realiza

normalmente la CIE los serotipos 7 y 14 no son detectables.

Detección de antígeno neumocócico mediante inmunocromatografía

Las limitaciones que plantea la utilización de la detección de antígeno neumocócico en orina mediante ICT y que debemos tener en cuenta para una óptima interpretación y de los resultados de la técnica son los siguientes:

La antigenuria es detectable desde el inicio de los síntomas y hasta un mes más tarde, siendo en algunos casos mayor el tiempo de excreción de antígeno.

Por otro lado, resultados preliminares indican que la ICT permite detectar antígeno neumocócico en orina en los casos de exacerbación por sobreinfección neumocócica en bronquíticos crónicos, pero también es posible detectar antígeno en pacientes bronquíticos estables. Además, la técnica de ICT detecta antígeno en orina de niños sanos portadores orofaríngeos de neumococo, especialmente en niños menores de 2 años.

Detección de antígeno de Legionella mediante inmunocromatografía y enzimoimmunoensayo

Todas las técnicas descritas detectan con una gran sensibilidad el antígeno de *L. pneumophila* serogrupo 1, siendo además capaces de detectar "in vitro" antígeno soluble de todos los serogrupos de *L. pneumophila*. El único EIA que según su fabricante tiene capacidad para detectar todos los serogrupos de *L. pneumophila* y así como otras especies de *Legionella*, no garantiza igual sensibilidad para todos los serogrupos y especies. La capacidad de detectar antígeno de otros serogrupos está en función de las características propias de cada antígeno: capacidad de pasar a la orina, cantidad excretada e inmunogenicidad. Antígenos de otros serogrupos de *L. pneumophila* pueden no ser excretados por la orina. Un antígeno puede ser excluido de pasar a través de las paredes de los capilares glomerulares en función de su tamaño y de su carga, no estando, en consecuencia presente en orina.

La detección de antígeno de *L. pneumophila* es detectable desde el inicio de la sintomatología y en algunos casos hasta muchos meses después.

Detección rápida de Legionella mediante inmunofluorescencia

La sensibilidad de la tinción de inmunofluorescencia directa de muestras respiratorias es sólo del 25-50%. La tinción detecta bacilos de la especie *L. pneumophila*, pero no de otras especies de *Legionella*. Además puede presentar reacciones cruzadas con otros microorganismos. Las técnicas de inmunofluorescencia que emplean anticuerpos monoclonales, en comparación con los policlonales, presentan un menor ruido de fondo, así como menos reacciones cruzadas.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las infecciones respiratorias	Fecha: PNT-TDA-02	
		Edición 01	Página 7 de 7

Detección de antígeno neumocócico mediante técnicas de aglutinación

Para obtener óptimos resultados en muestras de esputo es necesario que la muestra sea de buena calidad. Además la técnica puede tener reacciones cruzadas con otros microorganismos.

Detección de antígeno de Haemophilus influenzae mediante técnicas de aglutinación

El principal inconveniente radica en que la técnica detecta la presencia de *Haemophilus* capsulados, siendo los no capsulados los principales responsables de las infecciones respiratorias.

Detección de antígenos de virus respiratorios mediante la técnica de inmunofluorescencia

Para la obtención de resultados las muestras deben ser de calidad, es decir, deben observarse como mínimo 25 células ciliadas en toda la preparación. Además es imprescindible el entrenamiento previo del personal para la lectura.

Detección de antígenos de virus respiratorios mediante técnicas de enzimoimmunoensayo y de inmunocromatografía

Estas técnicas más sencillas y de más fácil interpretación que la inmunofluorescencia tienen como principal inconveniente una menor sensibilidad.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Biso AL, Gerber MA, Gwaltney JM, Kaplan EL, Schwart RH. Diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: a practice guideline. Clin Infect Dis 1997; 25:574-583
2. Coonrod JD. Urine as an antigen reservoir for diagnosis of infectious diseases. Am J Med 1983; 75(1B):85-92
3. Domínguez J, Galí N, Blanco S, Pedroso P, Prat C, Matas L, Ausina V. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen by a rapid immunochromatographic assay in urine samples. Chest 2001; 119:243-249.
4. Domínguez JA, Matas L, Manterola JM, Blavia R, Sopena N, Padilla E, Giménez M, Sabrià M, Morera J, Ausina V. Comparison of radioimmunoassay and enzyme immunoassay kits for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples. Journal of Clinical Microbiology 1997; 35:1627-1629
5. Minnich LL, Smith TF, Ray CG. Cumitech 24. Rapid Detection of Viruses by Immunofluorescence. Coordinating ed., S. Specter. American Society for Microbiology, 1988. Washington, D.C.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las infecciones bacterianas del sistema nervioso central	Fecha: PNT-TDA-03	
		Edición 01	Página 2 de 5

1. PROPÓSITO Y ALCANCE.

El propósito del procedimiento es el de definir las técnicas rápidas de detección de antígeno para el diagnóstico etiológico de las infecciones bacterianas del sistema nervioso central (SNC). Se describen el tipo de muestra más adecuado y las características fundamentales de las técnicas a utilizar.

2. FUNDAMENTO.

En el transcurso de un proceso infeccioso del sistema nervioso central es posible detectar antígenos del agente responsable, tanto en muestras procedentes del foco de infección (LCR) como en muestras de orina por donde se eliminan.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA.

- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Joergensen JH, Tenenbaum BC, Tenenbaum BC, eds. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. American Society for Microbiology, 2003. Washington, DC.
- Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2ª edición. 2004. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Procedimientos en Microbiología Clínica. Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. 1a. C. Sánchez y C. Guerrero. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2003.

4. TIPOS DE MUESTRA.

En la **tabla 1** se indican las muestras de elección para la detección de cada microorganismo y las técnicas por las que se pueden detectar. Las muestras que pueden estudiarse son LCR y orina. La orina es fácil de obtener y posee una concentración de antígenos bacterianos 10-50 veces superior a la detectada en suero. A pesar de sus ventajas, la muestra más adecuada para la detección de antígenos en el diagnóstico de meningitis es el LCR ya que se debe confirmar en esta muestra. Además un resultado positivo de detección de antígeno en orina pueden deberse a colonizaciones bacterianas o a infecciones invasoras diferentes a la meningitis.

4.1. RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA.

En el procedimiento en Microbiología Clínica. Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. 1a (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2003) se indican las directrices principales de la recogida y conservación de las muestras (PNT-RTP-01).

4.2. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

Tratamiento de muestras de orina

1. Hervir durante 5 minutos y dejar atemperar después la orina.
2. Centrifugar 15 minutos a 3.000 rpm.
3. Concentrar 2,5-10 ml del sobrenadante por ultrafiltración selectiva 25 veces.
4. Trabajar con orina concentrada. En caso de muestra insuficiente para realizar la concentración de orina, se puede realizar con orina directa.

Tratamiento de muestras de líquido cefalorraquídeo

Hervir 5 minutos y dejar atemperar después el LCR. Centrifugar 15 minutos a 3.000 rpm.

Trabajar con el sobrenadante.

Si se emplean técnicas comerciales deben seguirse las recomendaciones del fabricante.

5. REACTIVOS.

Contrainmunolectroforesis
Antisueros específicos.

Para las técnicas de aglutinación de partículas de látex, coaglutinación, Enzimoimmunoensayo e Inmunocromatografía

Los reactivos específicos incluidos en los equipos comercializados.

6. TÉCNICAS DISPONIBLES.

Las técnicas disponibles para la detección de cada microorganismo se han enumerado en la tabla 1. Excepto la contrainmunolectroforesis todas las técnicas están debidamente estandarizadas y disponibles comercialmente.

Existen varios métodos rápidos de detección de antígenos bacterianos desarrollados con el propósito de incrementar el porcentaje diagnóstico de las infecciones bacterianas del SNC, sobre todo en los enfermos que han recibido tratamiento antibiótico

Tabla 1

Microorganismo	Muestra	Técnica
<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Haemophilus influenzae</i>	Líquido cefalorraquídeo Orina	Contrainmunolectroforesis (CIE) Aglutinación por partículas de látex (LA) Coaglutinación (CoA) Enzimoimmunoensayo (EIA) Inmunocromatografía (ICT)

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las infecciones bacterianas del sistema nervioso central	Fecha: PNT-TDA-03	
		Edición 01	Página 3 de 5

empírico previo, y así facilitar el tratamiento adecuado de los pacientes. Estas pruebas utilizan anticuerpos frente al antígeno polisacárido capsular de los patógenos bacterianos meníngeos como *H. influenzae* tipo B, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* serogrupos A, C, Y y W135, *E. coli* K1 y *S. agalactiae*.

Se dispone de métodos de contrainmuno-electroforesis (CIE), coaglutinación (CoA), aglutinación por látex (LA) y enzimo-inmunoanálisis (EIA). La sensibilidad de estos métodos depende del tipo de microorganismo patógeno causante de la meningitis. El método de CIE es de uso infrecuente ya que requiere un especial equipamiento, un antisuero conservado con un estricto control de calidad y una gran experiencia técnica para obtener resultados óptimos de sensibilidad y especificidad. Además la CIE es un método laborioso y lento de realizar cuando se compara con los métodos de LA y CoA, que son fáciles y rápidos y no requieren equipamientos especiales. El método de aglutinación por látex reemplazó a la CIE y a la CoA y es el método más utilizado, es fácil de realizar, no requiere un equipamiento especial, es rápido y los resultados pueden estar disponibles en ≤ 15 minutos.

Técnicas rápidas de detección de antígeno de *N. meningitidis*

La mayoría de los equipos comerciales para la investigación de antígeno de este microorganismo no incluyen la detección de *N. meningitidis* del serogrupo B debido al limitado poder inmunógeno de este polisacárido. La prueba de aglutinación por látex que detecta el antígeno polisacárido de los serogrupos A, C, Y y W135, presenta una sensibilidad que varía según diversos autores del 50% al 93%. Algunos autores han intentado mejorar la sensibilidad de la aglutinación con látex mediante la utilización de un aparato comercial de ultrasonidos (Inmunosonic. Electro-Medical Supplies. Greenham Ltd.UK.) que intensifica la inmunoaglutinación de la prueba de látex. Este método además de ser rápido (aproximadamente 30 minutos) y barato, presenta una sensibilidad casi cinco veces mayor que la prueba de aglutinación por látex sin ninguna modificación.

Técnicas rápidas de detección de antígeno de *H. influenzae*

Los métodos rápidos de detección de antígeno para este microorganismo se desarrollaron durante una época en la cual la infección por *H. influenzae* tipo b era relativamente común, detectándose una sensibilidad de la prueba de aglutinación por látex para este microorganismo del 78% al 100%. La introducción en el calendario vacunal infantil de la vacuna conjugada ha dado lugar a una considerable disminución de la incidencia de esta infección y por lo tanto debe replantearse la utilidad de esta detección de antígeno. Otra consecuencia de la vacunación frente a *H. influenzae* tipo b ha sido la

detección mediante técnica de aglutinación por látex de resultados falsos positivos debido a la presencia en orina o LCR de antígeno de este microorganismo después de la vacunación. La mayoría de los niños vacunados con la vacuna polisacárida presentan en orina un resultado de aglutinación por látex positivo durante los cuatro primeros días después de la vacunación y algunos hasta después de más de una semana. La excreción urinaria del antígeno de *H. influenzae* es todavía más marcada cuando se utiliza la vacuna conjugada. La mayoría de los niños presentan en orina un resultado de aglutinación por látex positivo durante dos semanas después de la vacunación y de ellos en el 41% el resultado es todavía positivo a los 30 días. La colonización nasofaríngea por *H. influenzae* puede dar lugar también a la excreción urinaria del antígeno.

Técnicas rápidas de detección de antígeno de *S. pneumoniae*

La prueba de aglutinación por látex para la detección de este microorganismo presenta una sensibilidad que varía según diversos autores del 67% al 100%. Cuando se comparan la sensibilidad y especificidad de la contrainmuno-electroforesis, la prueba de aglutinación mediante partículas de látex (Wellcogen LA test kits. Murex Diagnostics Ltd, England) y la coaglutinación (Phadebact CoA test kit. Boule Diagnostics, Sweden) en la detección de antígeno de *S. pneumoniae* en un total de 95 LCR de pacientes con sospecha de meningitis, la prueba LA resulta el más sensible (86,6%) seguido de la CoA (73,0%) y de la CIE (66,6%). La CIE, no obstante, es el método que presenta una mejor especificidad (93,7%) en comparación con la prueba LA (91,0%) y la CoA (90,0%).

También se puede utilizar en orina y LCR una nueva prueba de detección de antígeno muy sensible y específico. Se trata de una prueba rápida de inmunocromatografía de membrana (Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* Urinary Antigen Test, Binax, Portland, ME, USA) utilizado en el diagnóstico de la neumonía neumocócica. Mediante este método, en algunos estudios la sensibilidad y especificidad es del 100% en la detección de antígeno de neumococo en muestras de LCR y de orina de pacientes adultos con sospecha de meningitis bacteriana. En otros, al comparar esta prueba (Binax NOW) de detección de antígeno de *S. pneumoniae*, en muestras de LCR y orina con el cultivo del LCR la sensibilidad y especificidad de la técnica realizada en LCR es del 95,4% y del 100% respectivamente y la sensibilidad cuando se realiza en orina es del 57,1%.

Técnicas de detección de antígeno de *S. agalactiae* y *E. coli*

La aglutinación de látex, para la detección de este microorganismo, presenta una sensibilidad que varía, según diversos autores, del 69% al 100%.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las infecciones bacterianas del sistema nervioso central	Fecha: PNT-TDA-03	
		Edición 01	Página 4 de 5

7. APARATOS Y MATERIAL.

El equipamiento necesario para la realización de las técnicas descritas, incluyendo el tratamiento de las muestras, es el siguiente:

- Agitador orbital
- Centrífuga
- Baño María
- Vórtex
- Alimentador de electroforesis
- Pipetas automáticas
- Estufa de 37°C
- Cámara húmeda
- Lector de placas de EIA
- Lavador automático de placas de EIA

8. PROCEDIMIENTO.

Los procedimientos concretos de realización de las técnicas siguientes: Técnicas de aglutinación, enzoinmunoensayo e inmunocromatografía, al realizarse en todos los casos mediante procedimientos comercializados, no se detallan, ya que se encuentran debidamente descritos en la documentación de cada equipo comercial. En cambio, para la realización de la técnica de contraelectroforesis, al ser una técnica no comercializada se recomienda seguir el siguiente protocolo estandarizado: Anhalt JP, Kenny GE, Rytel MW. 1978. Detection of microbial antigens by counterimmunoelectrophoresis. Cumitech 8. Washington, CD. American Society for Microbiology.

9. CONTROL DE CALIDAD.

Siguiendo las Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica (CCI-SEIMC) realizado por el grupo colaborador GEGMIC, para los reactivos comerciales, debe solicitarse al fabricante que disponga de un Sistema de Calidad reconocido y que facilite al laboratorio los datos relativos al control de cada lote de reactivo. La mayoría de técnicas comerciales incluyen actualmente controles positivo y/o negativo para realizar bien a la vez que cada una de las determinaciones bien cada vez que se realice un grupo de ellas, en función del sistema de presentación. Cada centro debe también considerar la conveniencia de participar en programas externos de control de calidad. También se realizarán en todas las técnicas controles de calidad internos empleando muestras propias de resultado ya conocido. La participación en controles de calidad externos es recomendable para asegurar la calidad de nuestros resultados.

10. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

Contraelectroforesis

Se considera que la detección de antígeno es positiva cuando se observa claramente la presencia de una banda de precipitación entre el pocillo de la muestra y el de los anticuerpos específicos. Si aparece una banda entre el pocillo del tampón y el

pocillo del control o de cualquier muestra, se considera que el resultado no es válido.

Técnicas de aglutinación

Una muestra es positiva si se produce una aglutinación clara de las partículas visible macroscópicamente entre el reactivo y la muestra y entre el reactivo y el control positivo.

Enzoinmunoensayo

Se consideran positivas aquellas muestras con un valor de absorbancia tantas veces superior al del control negativo como indique el fabricante en cada caso.

Inmunocromatografía

Una determinación se considera positiva cuando se obtiene una banda coloreada en la línea control (donde se fija el conjugado) y también en la línea de reacción (donde se fija el antígeno); y negativa cuando únicamente se obtiene una banda en la línea control.

11. RESPONSABILIDADES.

El personal técnico de la sección será el responsable de revisar las solicitudes estudiando la idoneidad de la muestra remitida con la determinación solicitada, del tratamiento de las muestras, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados en función de los resultados de los controles. El facultativo responsable de la sección, además de la supervisión de las tareas citadas, será responsable de mantener al día los procedimientos, de la validación final de los resultados, su interpretación y el informe de los mismos. El personal de la sección de detección de antígenos debe conocer las ventajas y limitaciones de las técnicas rápidas, así como el fundamento de todas las técnicas y del funcionamiento de los aparatos. Además debe trabajar en condiciones de máxima seguridad personal y ambiental, realizando una adecuada segregación de los residuos.

12. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO Y LIMITACIONES.

La sensibilidad de los métodos de detección de antígeno bacteriano en el LCR varía del 50% al 100% dependiendo de las pruebas utilizadas y de los microorganismos estudiados.

No son recomendables los métodos de aglutinación por látex que detectan un panel de antígenos de varios microorganismos, es mejor la investigación de cada microorganismo por separado. En un estudio realizado por Perkins y cols mediante aglutinación por látex en 1268 muestras (786 orinas, 478 LCR, 3 líquidos pleurales y 1 líquido sinovial) para el estudio de antígenos de *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. meningitidis* serogrupos A, B, C, Y, W135 y *E. coli* K1 se detectaron un 54% de resultados falsos positivos, un 38% de verdaderos positivos y un 7% de resultados indeterminados.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las infecciones bacterianas del sistema nervioso central	Fecha: PNT-TDA-03	
		Edición 01	Página 5 de 5

La falta de especificidad de la técnica de aglutinación por látex (resultados falsos positivos) se debe fundamentalmente a la presencia de un proceso infeccioso diferente o a la contaminación de las muestras por microorganismos que presentan una reacción cruzada con los anticuerpos correspondientes a los cuatro microorganismos (*S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *N. meningitidis*) que constituyen el panel que corrientemente se estudia mediante esta técnica.

Los métodos de detección de antígeno no detectan solamente los antígenos excretados sino también los microorganismos vivos por lo que la colonización no puede diferenciarse de la infección. Las bacterias cuando contaminan las muestras de orina y están presentes en cantidades de $5,7 \times 10^4$ pueden dar lugar a resultados de detección de antígeno positivos, incluso, pocos microorganismos son capaces de ocasionar estos mismos resultados, si se conserva la muestra a temperatura ambiente durante 8-10 horas antes de realizarse la determinación. En las muestras obtenidas de forma no estéril, la flora microbiana de contaminación es una causa frecuente de resultados falsos positivos. La presencia de la microbiota de contaminación en la orina es particularmente problemática en neonatos en los cuales se recoge esta muestra mediante bolsa adhesiva colocada en el periné. Pueden ser problemáticos los resultados positivos de la prueba de látex en el diagnóstico del *S. agalactiae*, *N. meningitidis* y *E. coli* K1 en neonatos sin claras evidencias de enfermedad. En niños sin bacteriemia, la colonización bacteriana es la principal causa de los resultados positivos de la prueba de látex para detectar *S. agalactiae*, por lo que en neonatos, el estudio de la orina recogida mediante bolsa adhesiva se debe considerar como una prueba de *screening* de colonización más que de infección.

Para evitar al máximo estos resultados falsos positivos, la orina y todas las demás muestras deben someterse a un calentamiento a 100° C durante 5 minutos antes de la realización de la prueba. Pueden dar lugar también a resultados falsos positivos los artefactos introducidos durante la preparación de la muestra como la filtración con polisulfona.

Recientemente se ha puesto en duda el uso de forma rutinaria en el laboratorio de la prueba de aglutinación por látex para el diagnóstico etiológico de la meningitis bacteriana. Debido a que su uso raramente contribuye a modificar la decisión del tratamiento antimicrobiano y a la presencia de resultados falsos positivos el "Practice Guideline Committee for Bacterial Meningitis" no recomienda su uso rutinario como diagnóstico rápido de las meningitis bacterianas. Se recomienda sólo el uso de la prueba de aglutinación por látex en los pacientes que hayan recibido tratamiento antibiótico previo, que presenten un LCR con un recuento celular y pruebas bioquímicas alteradas, con tinción de Gram negativa y en los que los cultivos del LCR y de la sangre

permanezcan negativos a las 48 horas de su realización.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Ingram DL, Pearson AW, Occhiuti AR. Detection of bacterial antigens in body fluids with the wellcogen *Haemophilus influenzae* b, *Streptococcus pneumoniae*, and *Neisseria meningitidis* (ACYW135) Latex Agglutination Tests. J Clin Microbiol 1983; 18: 1119-1121.
2. Rai GP, Zachariah K, Sharma R, Phadke S, Belapurkar KM. Development of a sandwich dot-enzyme linked immunosorbent assay for *Streptococcus pneumoniae* antigen detection in cerebrospinal fluid. Comp Immun Microbiol Infect Dis 2004; 27: 217-223.
3. Rai GP, Zachariah K, Sharma R, Phadke S, Belapurkar KM. Pneumococcal antigen detection in cerebrospinal fluid: a comparative study on counter immunoelectrophoresis, latex agglutination and coagglutination. Comp Immun Microbiol Infect Dis 2003; 26: 261-267.
4. Samra Z, Shmueli H, Nahum E, Pagáis D, Ben-Ari J. Use of the NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in cerebrospinal fluid for rapid diagnosis of pneumococcal meningitis. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 45:237-240.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las gastroenteritis	Fecha: PNT-TDA-04	
		Edición 01	Página 2 de 6

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este procedimiento es el de definir qué técnicas rápidas de detección de antígeno existen para el diagnóstico etiológico de las gastroenteritis. Se describe la forma de recoger las muestras y su almacenamiento, así como las características fundamentales de las técnicas disponibles.

2. FUNDAMENTO

En el transcurso de una gastroenteritis es posible detectar antígenos del agente responsable en las muestras de heces, permitiendo de este modo obtener un diagnóstico etiológico rápido.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Joergensen JH, and Tenover FC, ed. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. American Society for Microbiology, 2003. Washington, DC.
- Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2ª edición. 2004. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Procedimientos en Microbiología Clínica. Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. 1 a. C. Sánchez y C. Guerrero. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2003.

4. TIPOS DE MUESTRA

4.1. RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS DE HECES PARA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS.

En el procedimiento en Microbiología Clínica. Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. 1 a. (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2003) se indican las directrices principales de la recogida y conservación de las muestras (PNT-RTP-01).

En líneas generales, las muestras de heces deben recogerse durante la fase aguda de la infección, preferentemente durante los 3-5 primeros días de la enfermedad. Las muestras recogidas ocho días o más tras la aparición de los síntomas, pueden no contener suficiente antígeno para efectuar la detección.

Es necesario un mínimo de un gramo de heces, que deben transportarse en un recipiente limpio y seco preferiblemente de plástico, bien cerrado. Deben desecharse las muestras de heces mezcladas con orina. Tampoco son adecuadas para la detección de antígeno las heces conservadas en formol al 10%, en SAF o en PVA. Las muestras de heces no deben recogerse en recipientes que contengan suero animal, iones metálicos, agentes oxidantes o detergentes.

No deben admitirse escobillones de frotis rectales ya que la cantidad de heces que puede haber en ellos es insuficiente para realizar las técnicas de detección de antígeno. Una vez emitidas, las heces frescas

pueden conservarse hasta dos horas a temperatura ambiente, durante dos días refrigeradas a 4°C y pasado este tiempo deben congelarse a -20°C o preferentemente a -70°C. Una muestra descongelada no debe volver a congelarse, por lo que es recomendable preparar alícuotas.

4.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE HECES.

Deben seguirse las recomendaciones del fabricante.

5. REACTIVOS

Aglutinación de partículas de látex, EIA e ICT

Los reactivos específicos incluidos en los equipos comercializados.

6. TÉCNICAS DISPONIBLES

Todas las técnicas disponibles están debidamente estandarizadas y disponibles comercialmente.

Técnicas de detección de antígeno de Escherichia coli O157:H7

Existen métodos de EIA para la detección del antígeno O157 directamente en las heces que tienen buena sensibilidad y especificidad. Los ECVT presentan varios factores de virulencia y entre ellos se encuentran las verotoxinas que son potentes citotoxinas de naturaleza proteica que destruyen las células Vero y están relacionadas estructural e inmunológicamente con la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1. Existen dos tipos de verotoxinas VT1 (o SLT-I) y VT2 (o SLT-II). Disponemos de técnicas comerciales de EIA para la detección de los dos tipos de toxinas directamente en las heces que tienen buena sensibilidad y especificidad. Se ha comprobado que los valores de sensibilidad y especificidad de estos métodos comerciales de EIA son mejores cuando la detección de los dos tipos de toxinas se realiza en heces después de un enriquecimiento en caldo. También hay disponible una técnica rápida de ICT.

Técnicas de detección de antígeno de Staphylococcus aureus

Existen pocos métodos comerciales de detección de antígeno para realizar este diagnóstico. Uno de ellos (SET-RPLA. OXOID) detecta las enterotoxinas A, B, C y D mediante la técnica de aglutinación pasiva inversa por látex. Esta técnica puede utilizarse en alimentos, heces y en aislamientos de *S. aureus* a partir de un medio de cultivo para determinar si son cepas toxigénicas. La prueba se lleva a cabo en placas de microtitulación con pocillos en "V". Se hacen diluciones de la muestra a estudiar, se añade un volumen de la suspensión de látex apropiada a cada pocillo y se mezcla el contenido. Si las enterotoxinas están presentes tendrá lugar la aglutinación y se formará una capa difusa lechosa sobre la base del pocillo. Si por el contrario, las enterotoxinas están ausentes, se observará un punto blanco compacto en la base del pocillo. Los

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las gastroenteritis	Fecha: PNT-TDA-04	
		Edición 01	Página 3 de 6

resultados obtenidos son semi-cuantitativos y se valoran de una a tres cruces. El tiempo de incubación de la técnica es de 24 horas.

Existe también otro método de detección de antígeno (Staphylococcal enterotoxin visual immunoassay. Tecra) mediante una técnica de EIA para la detección de enterotoxinas en alimentos, heces y en aislamientos de *S. aureus* para detectar su toxigenicidad. El tiempo de incubación de esta técnica es de unas 4 horas.

Técnicas de detección de antígeno de *Bacillus cereus*

Existen pocos métodos comerciales de detección de antígeno para realizar este diagnóstico. Uno de ellos (BCET-RPLA. OXOID) sirve para la detección de la enterotoxina que produce diarrea mediante la técnica de aglutinación pasiva reversa por látex. Esta técnica puede utilizarse en alimentos, heces y aislamientos de *B. cereus* a partir de un medio de cultivo para determinar su toxigenicidad.

Existe también otro método de detección de antígeno (*Bacillus diarrhoeal enterotoxin visual immunoassay. Tecra*) para la detección de la enterotoxina que produce diarrea en alimentos, heces y en aislados de *B. cereus* para detectar su toxigenicidad, mediante técnica de EIA. El tiempo de incubación de esta técnica es de unas 5 horas.

Técnicas de detección de antígeno de *Clostridium perfringens*

El diagnóstico de la intoxicación alimentaria por *C. perfringens* puede hacerse mediante el cultivo cuantitativo de las muestras de heces. La presencia de una cifra superior a 10^6 UFC por gramo de heces es sugestivo de intoxicación alimentaria por *C. perfringens*. No obstante, estos valores también pueden detectarse en personas asintomáticas. Es mejor realizar cultivos cuantitativos de muestras de los alimentos implicados que son sugestivos cuando muestran valores de aislamiento superiores a 10^6 UFC por gramo de alimento.

El método diagnóstico más adecuado es la detección de la enterotoxina en las heces, que puede realizarse mediante un cultivo tisular en células Vero con anticuerpos neutralizantes para inhibir los efectos citopáticos o mediante técnicas de detección de antígeno del tipo de EIA o aglutinación pasiva reversa por látex. La enterotoxina de *C. perfringens* es muy estable lo que permite la conservación de las muestras durante periodos prolongados de tiempo hasta su estudio.

Existe un método de detección de antígeno comercializado (PET-RPLA. OXOID) que detecta la enterotoxina producida por *C. perfringens* tipo A mediante la técnica de aglutinación pasiva reversa por látex. Esta técnica puede utilizarse en heces y aislamientos de *C. perfringens* a partir de medio de cultivo para determinar si son toxigénicos. Los límites de detección de la toxina mediante esta técnica se sitúan entre 2-4 ng por gramo de muestra. La técnica

de aglutinación pasiva reversa por látex se correlaciona bien con la detección mediante PCR del gen de la enterotoxina, es más sensible y reproducible que los estudios de citotoxicidad celular y resulta más simple que otras técnicas de EIA.

Técnicas de detección de antígeno de *Clostridium difficile*

Existe una gran variedad de métodos de detección de antígeno para realizar el diagnóstico de la infección por *C. difficile*, y en su selección hay que tener presente que el diagnóstico de esta infección ha de ser lo más rápido posible para iniciar el tratamiento antibiótico al paciente e implantar las medidas adecuadas de control de la infección nosocomial. Además, para un óptimo diagnóstico bacteriológico sólo deben procesarse heces líquidas y recién recogidas debido a la rápida desaparición de la actividad de la citotoxina. Si no se pueden analizar durante las dos primeras horas de su evacuación, las heces deben congelarse a -20°C hasta su estudio. Las muestras pueden congelarse y descongelarse hasta dos veces, pero es preferible realizar alícuotas.

Detección de antígeno no específico. Consiste en la detección de la glutamato dehidrogenasa (GHD), enzima producida por todas las cepas de *C. difficile* (toxigénicas o no), mediante un test de aglutinación con partículas de látex. Este método presenta valores de especificidad del 98-99%, mientras que los valores de sensibilidad entre el 47-67% no son aceptables para realizar el diagnóstico de la infección/colonización por *C. difficile*. Existe una técnica comercial que detecta simultáneamente el antígeno GHD y la toxina A, pero la sensibilidad del test es mayor para la detección del enzima que para la detección de la toxina, por lo que, en muchas ocasiones, los resultados positivos corresponden a la detección de cepas de *C. difficile* no toxigénicas que con relativa frecuencia se encuentran en las heces. Por este motivo los resultados positivos de este test requieren la posterior realización de otras pruebas, como la de citotoxicidad o de EIA para detectar las toxinas A y B, que permitan confirmar dichos resultados.

Detección de toxinas. La detección de las toxinas A y/o B puede realizarse mediante pruebas de citotoxicidad o mediante técnicas de EIA.

Test de citotoxicidad. Esta considerado por muchos autores como el método estándar por su gran sensibilidad y especificidad para la detección de la toxina B en las heces. Este método se basa en la inoculación de una suspensión de un filtrado de heces en un cultivo celular y en la observación del efecto citopático que se produce a las 24-48 horas y que consiste en un redondeamiento de las células de las líneas que se utilizan (Vero, Hep2, fibroblastos, CHO y HeLa). La confirmación del resultado se obtiene mediante la repetición de la prueba con la adición de un antisuero específico frente a las toxinas de *C. difficile* o frente a las de *C. sordellii* que son antigénicamente idénticas. A pesar de la buena

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las gastroenteritis	Fecha: PNT-TDA-04	
		Edición 01	Página 4 de 6

sensibilidad y especificidad del test, este método puede presentar algunos inconvenientes. En el 2% de los casos se han detectado efectos citopáticos inespecíficos que no son neutralizados con el antisuero. Pero, sobre todo, no es un test rápido, es laborioso, no está bien estandarizado y requiere la disponibilidad de la antitoxina y el mantenimiento de los cultivos celulares de los que no disponen la mayoría de los laboratorios. Debe emplearse como prueba confirmatoria, pero no parece útil en los laboratorios convencionales.

Técnicas de EIA. En los últimos diez años se han desarrollado muchos ensayos de EIA comerciales que incluyen pruebas de EIA convencionales y de membrana para la detección de la toxina A, la B o ambas. La mayoría de los EIA convencionales utilizan anticuerpos monoclonales antitoxina A para la detección exclusiva de dicha toxina y se presentan como tests manuales excepto uno, (VIDAS system, bioMérieux-Vitek) que está automatizado. Son muy específicos, pero algo menos sensibles que el test de citotoxicidad. Hay que tener presente que estos tests no detectan los casos de infección por *C. difficile* producidos por algunas cepas productoras de toxina B y no productoras de toxina A. Para solventar este problema es aconsejable utilizar técnicas de EIA que detecten ambas toxinas A y B. Estos tests tienen una buena sensibilidad y especificidad comparados con el test de citotoxicidad. Muy recientemente se ha desarrollado un EIA de flujo horizontal para detectar las toxinas A y B de *C. difficile* (Immuno Card Toxinas A y B, Meridian, Bioscience, Europe). Este test tiene una buena sensibilidad y especificidad, es rápido ya que el resultado puede obtenerse a los 15 minutos y permite realizar, también, la determinación de la producción de toxina de la cepa aislada en un cultivo en medio de CCFA.

El método óptimo para realizar el diagnóstico de la infección por *C. difficile* es realizar simultáneamente la detección de toxinas mediante EIA y el cultivo de heces en CCFA. En los casos en los que el resultado de la detección de toxinas sea negativo y se aislen colonias de *C. difficile* hay que realizar la determinación de la toxigenicidad de la cepa aislada mediante el test de citotoxicidad o mediante EIA. Este último método como ya se ha comentado es el más rápido, no obstante, no todos los kits de EIA permiten realizar esta determinación. El cultivo y la determinación *in vitro* de la producción de toxina de la cepa aislada pueden incrementar el resultado positivo en el diagnóstico de la infección por *C. difficile* en un 10%.

Técnicas de detección de antígeno de Campylobacter

El ProSpect *Campylobacter* Microplate Assay es un EIA en fase sólida para la detección cualitativa del antígeno específico de *Campylobacter* en muestras fecales y en cultivos fecales realizados en caldo de enriquecimiento. Este antígeno es un antígeno de superficie compartido por *C. jejuni* y *C. coli*. No se

han encontrado reacciones cruzadas con otras bacterias enteropatógenas.

Comparada con el cultivo, es una prueba rápida y de fácil realización que en aproximadamente dos horas puede ofrecer resultados. El inconveniente de este método es que si el resultado es positivo y no se ha realizado simultáneamente el cultivo, no se dispondrá de la cepa para el estudio de sensibilidad antimicrobiana. En los cultivos para el aislamiento de este microorganismo, aun en medios selectivos, suele haber sobrecrecimiento de la microbiota fecal y dar resultados falsos negativos. Este método es menos sensible que el cultivo pero su alta especificidad hace muy infrecuente la obtención de resultados falsos positivos. Ante un resultado negativo y una alta sospecha clínica de infección por *Campylobacter* debe realizarse el cultivo.

Técnicas de detección de antígeno de Rotavirus

Existe un gran número de técnicas comerciales para la detección en las heces de antígeno de rotavirus del grupo A. Existen técnicas de EIA, de aglutinación y de ICT.

Técnicas de EIA. Se realiza una detección cualitativa de antígeno de rotavirus en heces mediante un EIA. Estas técnicas aportan cierta información sobre la cantidad de antígeno viral excretado por las heces en comparación con las otras técnicas antigénicas en las que el resultado sólo es cualitativo.

Técnica de EIA de membrana. Es un método cualitativo, rápido y fácil de realizar que se presenta en tests individualizados. Para su realización se requiere un equipamiento mínimo y el resultado, que se lee visualmente, se obtiene en menos de 30 minutos. Es un método muy adecuado para laboratorios de hospitales pequeños con un número escaso o esporádico de investigaciones de rotavirus en heces. Existe algún EIA de membrana que detecta a la vez rotavirus y adenovirus entéricos en heces.

Técnicas de aglutinación de partículas de látex. Es un test rápido, cuyos resultados pueden obtenerse en menos de 30 minutos y además es fácil de realizar. Requiere poco equipamiento y el kit comercial incluye todos los reactivos necesarios para su realización. Una desventaja importante de estos tests es que son menos sensibles que los EIA. Existen tests comerciales de aglutinación por látex que detectan a la vez rotavirus y adenovirus en heces.

Técnicas de ICT. Recientemente se han comercializado técnicas inmunocromatográficas cualitativas para la detección de antígeno de rotavirus sólo o de rotavirus y adenovirus entéricos en las heces.

Técnicas de detección de antígeno de Adenovirus.

Adenovirus no es un agente etiológico de la diarrea infantil tan importante como rotavirus y por esta razón, se han desarrollado menos pruebas

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las gastroenteritis	Fecha: PNT-TDA-04	
		Edición 01	Página 5 de 6

comerciales de detección de antígeno y además muchos laboratorios no realizan el diagnóstico de estos virus de forma rutinaria. Existen métodos tipo específicos que detectan sólo los serotipos 40 y 41 y otros métodos grupo específicos que detectan todos los adenovirus. Existen métodos de aglutinación con partículas de látex, EIA e ICT. Estas técnicas, como se ha comentado, permiten detectar simultáneamente adenovirus y rotavirus, lo que aumenta la frecuencia de investigación de adenovirus en heces.

Técnicas de detección de antígeno de Astrovirus.

Los astrovirus pertenecientes a la familia Astroviridae, son virus sin envoltura con un ARN monocatenario de polaridad positiva, pequeños de 28-41 nm y con apariencia de estrella al microscopio electrónico. Existen ocho (1-8) serotipos diferentes de estos virus, pero existe una reacción cruzada antigénica entre ellos y se ha detectado un anticuerpo grupo específico denominado MAb8E7 que reconoce a los ocho serotipos humanos.

En 1990 se diseñó uno de los primeros EIA para la detección de astrovirus. Este EIA se basaba en la utilización del anticuerpo MAb8E7 el cual reconoce un epítipo común a todos los serotipos. Actualmente en Europa se dispone de un kit comercial de EIA amplificado (Amplified IDEIA™ Astrovirus, DAKO Cytomation, Cambridgeshire, United Kingdom) que es específico para la detección de astrovirus humanos en heces. Los pocillos de la placa están revestidos por un anticuerpo policlonal específico de género. La presencia de antígeno se revela mediante un anticuerpo monoclonal específico de género, conjugado con dextrano y que incorpora múltiples moléculas de enzima que amplifica la señal. Existe también, otro kit disponible comercialmente de EIA (Prospect Astrovirus EZ Microplate Assay. Alexon-Trend, Inc) para la detección de antígeno de astrovirus cuyas características son muy parecidas al citado Amplified IDEIA Astrovirus de DAKO.

Técnicas de detección de antígeno de Norovirus.

Se ha comercializado un EIA (IDEIA NLV, Dako Cytomation, United Kingdom) que detecta los dos genogrupos de norovirus mediante dos anticuerpos monoclonales específicos para cada uno de ellos. La presentación incluye dos placas una para cada genogrupo. Estos pocillos están recubiertos por un anticuerpo monoclonal específico anti-genogrupo I y anti-genogrupo II. La suspensión de heces que se añade a los pocillos, se incuba simultáneamente con otro anticuerpo policlonal específico conjugado, para cada uno de los dos genogrupos.

7. APARATOS Y MATERIAL

El equipamiento necesario para la realización de las técnicas descritas, incluyendo el tratamiento de las muestras, es el siguiente:

- Agitador orbital
- Centrífuga

- Baño María
- Vórtex
- Alimentador de electroforesis
- Pipetas automáticas
- Estufa de 37°C
- Cámara húmeda
- Lector de placas de EIA
- Lavador automático de placas de EIA

8. PROCEDIMIENTO

Los procedimientos concretos de realización de las técnicas de aglutinación, enzoinmunoensayo e inmunocromatografía, al realizarse en todos los casos mediante procedimientos comercializados no se detallan ya que se encuentran debidamente descritos en la documentación de cada equipo comercial.

9. CONTROL DE CALIDAD

Siguiendo las Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica (CCI-SEIMC) realizado por el grupo colaborador GEGMIC, para los reactivos comerciales, debe solicitarse al fabricante que disponga de un Sistema de Calidad reconocido y que facilite al laboratorio los datos relativos al control de cada lote de reactivo. La mayoría de técnicas comerciales incluyen actualmente controles positivo y/o negativo para realizar bien a la vez que cada una de las determinaciones bien cada vez que se realice un grupo de ellas, en función del sistema de presentación. Cada centro debe también considerar la conveniencia de participar en programas externos de control de calidad. También se realizarán en todas las técnicas controles de calidad internos empleando muestras propias de resultado ya conocido. La participación en controles de calidad externos es recomendable para asegurar la calidad de nuestros resultados.

10. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Técnicas de aglutinación

Una muestra es positiva si se produce una aglutinación clara de las partículas visible macroscópicamente entre el reactivo y la muestra y entre el reactivo y el control positivo.

Enzoinmunoensayo

Se consideran positivas aquellas muestras con un valor de absorbancia tantas veces superior al del control negativo como indique el fabricante en cada caso.

Inmunocromatografía

Una determinación se considera positiva cuando se obtiene una banda coloreada en la línea control (donde se fija el conjugado) y también en la línea de reacción (donde se fija el antígeno); y negativo cuando únicamente se obtiene una banda en la línea control.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las gastroenteritis	Fecha: PNT-TDA-04	
		Edición 01	Página 6 de 6

11. RESPONSABILIDADES

El personal técnico de la sección será el responsable de revisar las solicitudes estudiando la idoneidad de la muestra remitida con la determinación solicitada, del tratamiento de las muestras, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados en función de los resultados de los controles. El facultativo responsable de la sección, además de la supervisión de las tareas citadas, será responsable de mantener al día los procedimientos, de la validación final de los resultados, su interpretación y el informe de los mismos.

El personal de la sección de detección de antígenos debe conocer las ventajas y limitaciones de las técnicas rápidas, así como el fundamento de todas las técnicas y del funcionamiento de los aparatos. Además debe trabajar en condiciones de máxima seguridad personal y ambiental, realizando una adecuada segregación de los residuos.

12. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO Y LIMITACIONES

Detección de antígeno de Campylobacter.

Según diferentes estudios, la detección de antígeno por EIA presenta una sensibilidad entre el 89% y el 96% y una especificidad de 98%- 99% al compararla con el cultivo de heces para el aislamiento de este microorganismo. Los valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) oscilan entre 78%-80% y 99% respectivamente.

Detección de antígeno de Rotavirus.

En la evaluación de tres técnicas diferentes de detección de antígeno: EIA, ICT y aglutinación de partículas de látex, para la detección de rotavirus en heces en niños con gastroenteritis se han obtenido los siguientes valores: a) para la técnica de EIA, sensibilidad de 96%, especificidad de 99%, VPP de 98% y VPN de 98%; b) para la técnica de aglutinación, sensibilidad de 68%, especificidad de 99%, VPP de 96% y VPN de 88%; c) para la ICT, sensibilidad de 98%, especificidad de 96%, VPP de 92% y VPN de 99%.

Las técnicas de EIA convencionales se consideran los métodos de referencia por su alta sensibilidad y especificidad, además permiten la realización de muchas determinaciones simultáneas. No obstante el tiempo de realización de la técnica es largo y se requiere un equipamiento específico. Como se observa, la especificidad de las técnicas de aglutinación de partículas de látex es buena pero su sensibilidad es baja. Su sensibilidad es adecuada, sólo cuando se estudian muestras de heces que corresponden a un periodo inicial de la enfermedad, momento en el que se excretan gran cantidad de partículas víricas por las heces. En función de los resultados, su bajo coste y la simplicidad y rapidez de realización, puede considerarse a la ICT como una buena técnica para uso rutinario en los laboratorios donde se realiza la investigación de rotavirus en heces. Otra ventaja de esta técnica es que además, como ya

se indicó, permite realizar también, al mismo tiempo, la investigación de adenovirus entéricos en las heces.

Detección de antígeno de Astrovirus.

En algunos estudios, cuando se compara la detección de antígeno de astrovirus por EIA con el cultivo celular y la RT-PCR, la sensibilidad de la técnica de EIA es del 100% y la especificidad del 99%. Otros trabajos, por el contrario, presentan peores resultados para el EIA al comparar esta técnica con la RT-PCR. La RT-PCR es más sensible que algún EIA y que el cultivo celular en el diagnóstico de la infección por astrovirus.

Detección de antígeno de Norovirus.

En un reciente trabajo se han comparado dos técnicas de EIA, el SRSV (II)-AD (Denka Seiken Co, Tokio, Japan) y el IDEIA NLV (Dako Cytomation, United Kingdom) con la RT-PCR en el diagnóstico de norovirus humanos en heces. El kit de Denka presentó una alta sensibilidad, superior al 70% y una especificidad de solo el 69%. El kit de Dako presentó una baja sensibilidad, inferior al 30% y una alta especificidad (100%). Este kit, como ya se ha comentado, es capaz de discriminar entre los genogrupos I y II, pero no es capaz de detectar algunos de los subgrupos más frecuentes, por lo que puede dar lugar a resultados falsos negativos. Debería mejorarse su sensibilidad mediante la inclusión adicional de anticuerpos específicos frente a estos subgrupos no detectados. El kit de Denka presenta muchas reacciones inespecíficas con sustancias presentes en las heces y también reacciona con los sapovirus humanos, por lo que da lugar a resultados falsos positivos. Este último kit puede utilizarse como *screening* de muestras de heces para hacer el diagnóstico de norovirus, pero los resultados positivos deben confirmarse mediante la técnica de RT-PCR. La técnica de RT-PCR es más sensible que el IDEIA NLV (Dako) en la detección del antígeno de norovirus humanos.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Burton-MacLeod JA, Kane EM, Beard RS, Hadley LA, Glass RI, Ando T. Evaluation and comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of antigenically diverse human noroviruses in stool samples. *J Clin Microbiol* 2004;42:2587-2595.
- Cubitt WD, Mitchell DK, Carter MJ, Willcocks MM, Holzel H. Application of electronmicroscopy, enzyme immunoassay, and RT-PCR to monitor an outbreak of astrovirus type 1 in a paediatric bone marrow transplant unit. *J Med Virol* 1999;57:313-321.
- Dediste A, Vandenberg O, Vlaes L, Ebraert A, Douat N, Bahwere P, Butzler JP. Evaluation of the ProSpecT Microplate Assay for detection of *Campylobacter*: a routine laboratory perspective. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:1085-1090.
- Park CH, Vandel MN, and Hixon DL. Rapid immunoassay for detection of *Escherichia coli* O157 directly from stool antigens. *J Clin Microbiol* 1996;34:988-990.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las parasitosis	Fecha: PNT-TDA-05	
		Edición 01	Página 2 de 6

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito del procedimiento es el de definir qué técnicas rápidas de detección de antígeno estandarizadas existen para el diagnóstico etiológico de algunas de las infecciones parasitarias (*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Leishmania*, *Plasmodium* y *Wuchereria bancrofti*). Se describe qué muestras son las más adecuadas en función de los parásitos que se desea detectar y en función de la técnica que se plantea utilizar. Existen pruebas de detección de antígeno para otras parasitosis; pero no están comercializadas (*Taenia*, *Trypanosoma*, *Strongyloides*) o bien no se dispone de trabajos publicados sobre ellas.

2. FUNDAMENTO

En las infecciones gastrointestinales del tubo digestivo, se pueden detectar antígenos del parásito responsable en las heces o bien en muestras recogidas por endoscopia. En las parasitosis hemotisulares la detección de antígeno se realiza fundamentalmente en la sangre, sin embargo también es posible en algún caso detectar antígeno en orina, como sucede en el diagnóstico de la leishmaniasis.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Joergensen JH, and Tenover FC, ed. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. American Society for Microbiology, 2003. Washington, DC.
- Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2ª edición. 2004. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Procedimientos en Microbiología Clínica. Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. 1 a. C. Sánchez y C. Guerrero. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2003.

- Ausina V, Sabrià M, Irrutia de Diego A et al. Enfermedades Infecciosas. En: Rozman C. Medicina Interna Farreras-Rozman. 15ª edición, Elsevier, Madrid 2004.

4. TIPOS DE MUESTRA

En la **tabla 1** se indica el tipo de muestras de elección para la detección de cada parásito y las técnicas por los que éstos se pueden detectar.

4.1. RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

En el procedimiento en Microbiología Clínica. Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. 1 A. (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2003) se indican las directrices principales de la recogida y conservación de las muestras (PNT-RTP-01).

Consideraciones adicionales

Sangre:

- Algunos de los estudios se pueden efectuar de sangre obtenida de una punción digital de forma inmediata *in situ* (*Plasmodium*, *Wuchereria*).
- Si se envía la sangre al laboratorio, en algunas ocasiones se debe usar anticoagulante (EDTA o heparina) y en otras no. Se deben seguir las instrucciones del fabricante.
- En la prueba de Og4C3 ELISA de *Wuchereria bancrofti* puede conservarse la sangre obtenida por punción digital (Nobuto-type 1, Advantec, Tokio) en un papel de filtro y enviarlo al laboratorio. El procedimiento es el siguiente:
 1. Se realiza una punción digital Se absorbe la sangre en un papel de filtro. Se calcula que se absorben 100 µL de sangre, que serían 40µL de suero.

Tabla 1

Microorganismo	Muestra	Técnica
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	Heces, pus (abscesos)	EIA ICT (combinando con <i>Giardia</i> y <i>Cryptosporidium</i>)
<i>Giardia lamblia</i>	Heces	IFD, EIA, ICT
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Heces	IFD, EIA, ICT
<i>Leishmania</i>	Orina	LA
<i>Plasmodium</i>	Sangre	ICT
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Sangre	ICT

ICT: Inmunocromatografía; IFD: inmunofluorescencia directa; EIA: Enzimoimmunoensayo; LA: Aglutinación por partículas de látex.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las parasitosis	Fecha: PNT-TDA-05	
		Edición 01	Página 3 de 6

2. Los autores que han usado esta técnica refieren que se puede guardar la muestra en la nevera (4°C) durante meses y se pueden enviar por correo ordinario, sin pérdida significativa de reactividad; aunque no suministran ninguna evidencia de ello.

- En las pruebas de detección de antígeno de *Wuchereria bancrofti* no es necesario recoger la muestra por la noche (esencial en la mayor parte de zonas geográficas si se desea realizar el diagnóstico por examen microscópico directo).

Heces:

En general, se deben enviar al laboratorio sin medio de transporte. Se ha comprobado que algunas de las pruebas se pueden realizar sobre muestra fijada. En algunos casos, se puede conservar la muestra a -20°C.

4.2. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

Deben seguirse las instrucciones suministradas por el fabricante.

5. REACTIVOS

Los reactivos específicos incluidos en los equipos comercializados.

6. TÉCNICAS DISPONIBLES.

Técnicas de detección de antígeno de *Entamoeba histolytica*

Existen pruebas que no distinguen *E. histolytica* de *E. dispar* (*Entamoeba*®, TechLab; ProSpecT®, Alexon) y pruebas que sí (*E. histolytica* test®, TechLab, Merlin Optimum S test®, Merlin Diagnostika), todas ellas de enzimoimmunoensayo. *Entamoeba* test y *E. histolytica* test se basan en la detección de epítomos de la lectina de *Entamoeba*. Esta última se basa en la detección de un epítomo específico presente sólo en la de *E. histolytica* y es capaz de diferenciarla de *E. dispar*.

Técnicas de detección de antígeno de Giardia lamblia

Existen pruebas de inmunofluorescencia directa (Merifluor®, Meridian), inmunoensayo (entre otros: Melotest Giardiasis®, ProSpecT Giardia®, Giardia CELISA®, DSL-Giardia®) e inmunocromatografía (ImmunoCard STAT!®, Meridian).

Técnicas de detección de antígeno de Cryptosporidium parvum

Existen pruebas de inmunofluorescencia directa (Merifluor®, Meridian; Monofluo®, Bio-Rad; Crypto-Cel IF, Cellabs), inmunoensayo (ProSpecT®, Alexon; Premier®; Techlab *Cryptosporidium*®, IDEIA *Cryptosporidium*®, Dako; Color Vue®, Seradyn; *Cryptosporidium* Antigen Detection Microwell ELISA, LMD, Ridascreen *Cryptosporidium* ELISA, Quadrachem) e inmunocromatografía (Crypto-Strip, Coris BioConcept).

Pruebas combinadas en heces

Merifluor *Cryptosporidium/Giardia*®, Meridian: prueba de inmunofluorescencia directa para *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*.

ImmunoCard STAT! *Cryptosporidium/Giardia*, Meridian: prueba de inmunocromatografía para la detección de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*.

Triage®: prueba de inmunocromatografía para detección de *E. histolytica/dispar*, *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*.

ColorPac®, BD: prueba de inmunocromatografía para detección de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*

ProSpecT *Giardia/Cryptosporidium*, Alexon: prueba de enzimoimmunoensayo para *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*.

Técnicas de detección de antígeno de Plasmodium

OptiMAL®, Flow: prueba de inmunocromatografía que detecta la infección causada por todas las especies de *Plasmodium* y, además, específicamente, la causada por *Plasmodium falciparum*. Se basa en la detección de diferentes isoenzimas de lactato-deshidrogenasa producidas por *Plasmodium*.

ICT Malaria P.f/P.v® (Binax), ParaSight® (BD), Paracheck-Pf® (AMRAD), Makromed (Makro Medical), BIO P.F. (VEDA LAB), Malaria Rapid (Vision Biotech), ParaHIT f (Span Diagnostics) son pruebas de inmunocromatografía que detectan una proteína rica en histidina. En la prueba ICT Malaria P.f/P.v (Binax) hay dos anticuerpos, uno detecta específicamente la proteína de *P. falciparum* y la otra detecta las proteínas de todas las especies de *Plasmodium* patógenas para la humana. Las demás solamente detectan *P. falciparum*.

Técnicas de detección de antígeno de Leishmania

Existe como método rápido de detección de antígeno una técnica de aglutinación de partículas de látex en orina para detección de antígeno de *Leishmania* en muestras de orina (*Katex*. Kalon Biological Ltd.UK). El método se ha mostrado útil en el diagnóstico de la leishmaniasis. La técnica ha demostrado una correlación elevada en pacientes diagnosticados con sida diagnosticados de leishmaniasis visceral por examen microscópico y cultivo.

Técnicas de detección de antígeno de Wuchereria bancrofti

ICT, Binax: prueba de inmunocromatografía que se puede realizar en sangre total (punción digital) o en suero. Emplea anticuerpos monoclonales y policlonales que reconocen antígenos de *W. bancrofti*. El correspondiente al anticuerpo monoclonal no ha sido caracterizado. Antes se comercializó por AMRAD.

Og4C3-ELISA, TropBio: prueba de EIA en doble sandwich que se realiza en suero. Emplea un anticuerpo monoclonal contra *Onchocerca gibsoni*. Los

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las parasitosis	Fecha: PNT-TDA-05	
		Edición 01	Página 4 de 6

antígenos detectados se encuentran, principalmente, en las formas adultas.

7. APARATOS Y MATERIAL

El equipamiento necesario para la realización de las técnicas descritas, incluyendo el tratamiento de las muestras, es el siguiente:

- Lector de placas de microtitulación.
- Sistema de lavado (automático o manual).
- Microscopio de fluorescencia.
- Centrífuga.
- Vórtex.
- Baño María.

8. PROCEDIMIENTO

Los procedimientos de realización de las técnicas no se detallan, ya que se encuentran debidamente descritos en la documentación de cada equipo comercial.

9. CONTROL DE CALIDAD

Siguiendo las recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica (CCI-SEIMC) realizado por el grupo colaborador GEGMIC, para los reactivos comerciales, debe solicitarse al fabricante que disponga de un Sistema de Calidad reconocido y que facilite al laboratorio los datos relativos al control de cada lote de reactivo. La mayoría de técnicas comerciales incluyen actualmente controles positivo y/o negativo para realizar bien a la vez que cada una de las determinaciones bien cada vez que se realice un grupo de ellas, en función del sistema de presentación. Cada centro debe también considerar la conveniencia de participar en programas externos de control de calidad.

10. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Enzimoimmunoensayo

Se consideran positivas aquellas muestras con un valor de absorbancia tantas veces superior al del control negativo como indique el fabricante en cada caso.

La prueba de *W. bancrofti* permite la cuantificación del resultado, dato que puede resultar útil desde el punto de vista clínico, especialmente cuando se vaya adquiriendo más experiencia con esta prueba.

Inmunocromatografía

Una determinación se considera positiva cuando se obtiene una banda coloreada en la línea control (donde se fija el conjugado) y también en la línea de reacción (donde se fija el antígeno); y negativo cuando únicamente se obtiene una banda en la línea control. La interpretación de los resultados depende de la técnica utilizada.

En la prueba OptiMAL® para diagnóstico de la malaria hay dos bandas que pueden ser positivas, una específica de *P. falciparum* y la otra dirigida contra las cuatro especies de *Plasmodium*. Si solamente es positiva esta última, existe infección por *P. vivax*, *P.*

ovale o *P. malariae*. Si son positivas las dos, existen dos posibilidades:

- Banda de *P. falciparum* más intensa que la otra: infección por *P. falciparum* solamente
- Banda de *P. falciparum* más tenue que la otra: infección mixta por *P. falciparum*.

En la prueba ICT Malaria P.f/P.v®:

- La positividad de la banda en *P. falciparum* indica infección por éste.
- La positividad de las dos bandas, la correspondiente a *P. falciparum* y la dirigida a todas las especies de *Plasmodium* indica una infección por *P. falciparum* o una infección mixta por *P. falciparum* y otra especie.
- La positividad únicamente de la banda correspondiente a todas las especies indica una infección por una o varias de ellas y excluye la de *P. falciparum*.

Técnicas de aglutinación

Una muestra es positiva si se produce una aglutinación clara de las partículas visible macroscópicamente entre el reactivo y la muestra y entre el reactivo y el control positivo.

11. RESPONSABILIDADES

El personal técnico de la sección será el responsable de revisar las solicitudes estudiando la idoneidad de la muestra remitida con la determinación solicitada, del tratamiento de las muestras, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados en función de los resultados de los controles. El facultativo responsable de la sección, además de la supervisión de las tareas citadas, será responsable de mantener al día los procedimientos, de la validación final de los resultados, su interpretación y el informe de los mismos.

El personal de la sección de detección de antígenos debe conocer las ventajas y limitaciones de las técnicas rápidas, así como el fundamento de todas las técnicas y del funcionamiento de los aparatos. Además debe trabajar en condiciones de máxima seguridad personal y ambiental, realizando una adecuada segregación de los residuos.

12. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO Y LIMITACIONES

Amebiasis

Los trabajos publicados indican que las pruebas de detección de antígeno son más sensibles que el examen microscópico de heces para la detección de *Entamoeba*. En áreas de baja endemia, el valor predictivo positivo de infección por *E. histolytica* de estas pruebas es muy bajo y, la mayoría de veces, los resultados positivos indican colonización por *E. dispar*. Por ello, y debido a la frecuencia de la colonización por la especie no patógena *E. dispar*, es imprescindible confrontar los resultados positivos con la clínica del paciente, para evitar diagnósticos erróneos y tratamientos innecesarios. Otra estrategia consistiría en usar una de las pruebas específicas de *E.*

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las parasitosis	Fecha: PNT-TDA-05	
		Edición 01	Página 5 de 6

histolytica, que tienen una sensibilidad comparable y una especificidad de especie muy superior (del orden del 93%), y comparable a la obtenida por el cultivo o por PCR. Hay autores que desautorizan usar el examen microscópico directo de las heces para el diagnóstico de la amebiasis por ser un método poco sensible, incapaz de diferenciar entre *E. histolytica* y *E. dispar* y sujeto a dar resultados falsos positivos. La OMS recomienda que lo óptimo es usar un método de diagnóstico de *E. histolytica*, y que si se utiliza un método que no diferencie *E. histolytica* de *E. dispar* sólo debería administrarse tratamiento si hubiera otras razones que hicieran sospechar infección (alto título de anticuerpos, o antecedentes epidemiológicos de contacto con un enfermo diagnosticado o brote epidémico). Se ha registrado reacción cruzada con *E. dispar* en la prueba de detección de antígeno basada en anticuerpos frente a un antígeno rico en serina presente solamente en *E. histolytica* (Merlin®), no así con la basada en la detección específica de lectina de *E. histolytica* (*E. histolytica* test®, TechLab).

Giardiasis

La prueba de inmunofluorescencia directa permite visualizar el parásito y se considera la prueba de referencia. Además, son más sensibles que el examen microscópico convencional. Las de inmunoensayo permiten una lectura objetiva y la realización de múltiples pruebas a la vez. A veces hay problemas de interpretación con la inmunocromatografía, cuando aparecen bandas tenues.

La sensibilidad de los métodos de EIA e ICT es menor que la IFD, especialmente en muestras que contienen poca cantidad de parásito. Por esta razón, hay autores que desaconsejan su uso como prueba de cribado o como método único de diagnóstico, especialmente en poblaciones con baja prevalencia de la infección. Existen trabajos que sugieren que sería preciso, también con estos métodos, examinar más de una muestra, antes de descartar definitivamente el diagnóstico.

Criptosporidiasis

Las pruebas de detección de antígeno en la criptosporidiasis tienen una gran sensibilidad y especificidad, especialmente las de inmunofluorescencia directa, que permiten la visualización del parásito y que se consideran la prueba de referencia.

Pruebas combinadas en heces

Las pruebas combinadas en heces suelen tener las ventajas e inconvenientes de las mismas realizadas por separado. En general, la detección de *Giardia* y *Cryptosporidium* es excelente, con una sensibilidad muy alta y una especificidad cercana al 100%. Los falsos negativos suelen ocurrir en muestras que contienen una pequeña cantidad de parásito. Por otra parte, las que detectan *Entamoeba* no distinguen entre la especie *E. histolytica* y *E. dispar*, hecho que debe ser reflejado en el informe y tenido en cuenta por el

clínico a la hora de valorar los resultados positivos. Las pruebas de detección de antígeno combinadas no pueden sustituir completamente el examen microscópico rutinario, porque es necesario para diagnosticar la mayoría de las otras especies de parásitos.

Triage®: no distingue entre *E. histolytica* y *E. dispar*. Está diseñada para sustituir el examen microscópico en heces pero solamente detecta *E. histolytica/dispar*, *G. lamblia* y *C. parvum*.

Paludismo

Es posible que la inmunocromatografía sea la única forma de diagnosticar pacientes de malaria que han empezado a automedicarse, cuando el examen microscópico y la PCR ya son negativos. Hay pruebas que detectan todas las especies de *Plasmodium* (OptiMAL y ICT P.f/P.v) y otras que sólo sirven para *P. falciparum*. Debe conocerse la especie endémica en la zona de qué se trate en cada caso para escoger correctamente la prueba a utilizar y para interpretar adecuadamente los resultados. Es conveniente informarse en la bibliografía de la sensibilidad y especificidad de cada una de las pruebas en cada caso.

La prueba OptiMAL, usada en zonas en las que se conoce la especie endémica, puede utilizarse para su diagnóstico. Por ejemplo, en lugares donde se encuentra *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax* únicamente, se puede establecer el diagnóstico de cada una de las dos especies y de las infecciones mixtas. Se considera que cuando la banda de *P. falciparum* es más tenue que la dirigida contra todas las especies de *Plasmodium* existe una infección mixta. La explicación sería que en las demás especies, al existir todos los estadios de maduración en sangre periférica, habría más lactato deshidrogenasa que en las infecciones únicamente por *P. falciparum*, en las que solamente existen parásitos en los estadios de trofozoito joven y gametocito.

La prueba ICT P.f/P.v se basa en dos tipos de anticuerpos, unos específicos de *P. falciparum* y otros dirigidos contra epítopos de la proteína rica en histidina presente en todas las especies patógenas para el hombre. Sin embargo, solamente se han podido realizar estudios para el diagnóstico de la infección por *P. falciparum* y *P. vivax*. No se tiene suficiente experiencia para *P. ovale* y *P. malariae*, aunque parece lógico que estas infecciones puedan ser diagnosticadas con este kit. El mismo fabricante ha nombrado la prueba P.f/P.v; es decir, como si únicamente diagnosticara *P. falciparum* y *P. vivax*, aunque en las instrucciones señala que puede utilizarse para todas las especies. Futuros trabajos deben dilucidar este punto.

Se considera que las pruebas de PCR son las más sensibles y específicas y son las de referencia. Las pruebas de detección de antígeno son menos sensibles que el examen microscópico de una muestra de sangre periférica realizada por personal entrenado, especialmente en parasitemias leves y en infecciones

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las parasitosis	Fecha: PNT-TDA-05	
		Edición 01	Página 6 de 6

por *P. vivax* (en comparación a *P. falciparum*. Respecto a otras especies no se dispone de suficiente información). Ocasionalmente, pueden aparecer falsos negativos en parasitemias intensas.

Es necesario el examen microscópico de sangre periférica para poder distinguir los trofozoitos y los gametocitos y para estimar la parasitemia, elementos necesarios para el pronóstico y seguimiento. Estas pruebas no detectan los casos de *Plasmodium falciparum* en que solamente se encuentran gametocitos en la sangre periférica. Las de detección de la proteína rica en histidina persisten positivas unos 7-14 días después de iniciado el tratamiento y, en consecuencia, no se pueden utilizar para un control de la efectividad inmediata del mismo. Ello no ocurre con la prueba OptiMAL, que detecta el enzima lactato deshidrogenasa. Existen falsos positivos en pacientes con factor reumatoide en todas las pruebas. Hay pruebas que sólo detectan las infecciones por *P. falciparum* (por ejemplo, ParaSight[®], Paracheck Pf)

Leishmania

La aglutinación de partículas de látex para detección de antígeno de *Leishmania* en muestras de orina es una técnica sensible y específica, de fácil interpretación, barata y reproducible. Sin embargo, el antígeno de *Leishmania* puede detectarse durante largos periodos de tiempo después del diagnóstico, por lo que la técnica no parece ser de utilidad en la monitorización clínica del tratamiento.

W. bancrofti

Es difícil estimar la sensibilidad y la especificidad de los métodos de detección de antígeno, debido a la abundancia de infecciones subclínicas y a la ausencia de un *gold-standard*. De todas formas, parece que estos métodos son bastante más sensibles que la técnicas de observación microscópica. Se han dado diversas explicaciones para comprender por qué en muchos casos se detecta antigenemia sin microfilaremia, especialmente en jóvenes de menos de 25 años:

- Infección incipiente. El nivel de antigenemia suele ser bajo.
- Infección causada por adultos machos sin presencia de hembras. El nivel de antigenemia también es bajo.
- Supresión inmune de las microfilarias. Se da en pacientes de más de 35 años con antigenemia alta.
- Post-tratamiento. La antigenemia puede persistir durante 42 meses.

En todo caso, está indicado seguir la evolución de los pacientes con antigenemia sin microfilaremia. Otras ventajas de las pruebas de detección de antígeno son su sencillez (ICT) y que se pueden almacenar las muestras en la nevera para una posterior determinación, si se usa la técnica de recogida de muestra en papel de filtro o si se conserva el suero a -70°C. La prueba ICT es cualitativa y el EIA es cuantitativo.

No permiten el seguimiento de la infección, ya que se puede detectar antígeno en los pacientes hasta dos años después de un tratamiento satisfactorio. Se ha informado de la aparición de falsos positivos en la prueba de inmunocromatografía comercializada por Binax si la lectura se realiza más allá de los 10 minutos que marca el fabricante.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Aldeen WE, Carroll K, Robison A et al. Comparison of Nine Commercially Available Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of *Giardia lamblia* in Fecal Specimens. J Clin Microbiol 1998, 36:1338-1340.
2. Braga C, Dourado MI, Ximenes RAA et al. Field Evaluation of the Whole Blood Immunochromatographic test for rapid bancroftian filariasis diagnosis in the northeast of Brazil. Rev Inst Med trop S. Paulo 2003, 45:125-129.
3. Coleman RE, Maneechai N, Rachaphaew N. Field evaluation of the ICT Malaria PF/PV immunochromatographic test for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. Am J Trop Med Hyg 2002, 66:379-383.
4. Haque R, Ali IKM, Akther S et al. Comparison of PCR, Isoenzyme Analysis, and Antigen Detection for Diagnosis of *Entamoeba histolytica* Infection. J Clin Microbiol 1998, 36:449-452.
5. Johnston SP, Ballard MM, Beach MJ et al. Evaluation of Three Commercial Assays for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* Organisms in Fecal Specimens. J Clin Microbiol 2004, 41:623-626.
6. Rosenblatt JE y Sloan LM. Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of *Cryptosporidium* spp. in Stool Specimens. J Clin Microbiol 1993, 31:1468-1471.
7. Sharp SE, Suarez CA, Duran Y et al. Evaluation of the Triage Micro Parasite Panel for Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* in Patient Stool Specimens. J Clin Microbiol 2001, 39:332-334.
8. Soto Tarazona A, Solari Zerpa L, Mendoza Requena D et al. Evaluation of the Rapid Diagnostic Test OptiMAL for Diagnosis of Malaria due to *Plasmodium vivax*. Braz J Infect Dis 2004, 8:151-155.
9. Vilaplana C., Blanco S, Domínguez J, Giménez M, Tural C, Muñoz C, and Ausina V. Non invasive diagnosis of visceral leishmaniasis by a latex antigen detection test in urine samples. J Clin Microbiol. 2004; 4:1853-1854.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT- TDA-06
TÉCNICAS RÁPIDAS DE DIAGNOSTICO DE LAS INFECCIONES POR HERPESVIRUS

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del HospitalLa información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las infecciones por herpesvirus	Fecha: PNT-TDA-06	
		Edición 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este procedimiento es el de definir qué técnicas rápidas de detección de antígeno existen para el diagnóstico de las infecciones causadas por herpesvirus. Se describe qué muestras son las más adecuadas en función del herpesvirus que se desea detectar y en función de la técnica que se plantea utilizar.

2. FUNDAMENTO

Los herpesvirus que infectan al hombre son ocho: herpesvirus 1 y 2 (herpes simple 1 y 2), herpesvirus 3 (virus varicela-zóster), herpesvirus 4 (virus Epstein-Barr), herpesvirus 5 (citomegalovirus), herpesvirus 6, 7 y 8. Todos ellos pertenecen a la misma familia y comparten una característica biológica común que es la capacidad de establecer un estado de latencia tras la primoinfección, sin embargo presentan características genómicas y antigénicas diferentes. En la actualidad existen comercializadas técnicas para la detección de antígenos de los herpesvirus 1, 2, 3 y 5. Los herpesvirus 1, 2 y 3 afectan principalmente a la piel y las mucosas, en esta localización las células infectadas son fácilmente aseptables para su recogida y en ellas se puede detectar la presencia de los antígenos víricos. En otras localizaciones de la infección, por ejemplo el sistema nervioso central, habitualmente no se puede disponer de muestra por lo que las técnicas de detección de antígeno aunque están descritas no se utilizan de forma rutinaria. La detección de antígeno de herpesvirus 5 como técnica diagnóstica sólo se ha podido desarrollar para su utilización en rutina en muestra de sangre periférica.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover JC, Tenover FC, eds. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. American Society for Microbiology, 2003. Washington, DC.
- Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2ª edición. 2004. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Procedimientos en Microbiología Clínica. Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. 1 a. C. Sánchez y

C. Guerrero. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2003.

- Procedimientos en microbiología clínica. Diagnóstico de laboratorio de las infecciones por herpesvirus. 8a. 2005.

4. TIPOS DE MUESTRA

En la **tabla 1** se indican las muestras de elección para la detección de cada herpesvirus y las técnicas por los que se pueden detectar.

4.1. RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA.

Líquido vesicular

Limpiar bien la zona con alcohol de 70°C

Pinchar la vesícula con una aguja y jeringa de insulina y aspirar el contenido

Obtener más muestra frotando la base de la lesión con un escobillón

Frotis o exudado (mucosas: oral, nasal, rectal y genital)

Se recoge el material celular de la base de la lesión frotando con un escobillón

Escobillón conjuntival

Pasar el escobillón por la conjuntiva

Raspado corneal (muestra obtenida por el oftalmólogo)

Utilizar un anestésico tópico

Obtener la muestra con una espátula estéril fina

Depositar las células obtenidas en un tubo con medio de cultivo celular.

Muestras obtenidas por biopsia o necropsia (cerebro, esófago, estómago, intestino, pulmón)

Obtener estérilmente la muestra

Colocar en un recipiente con suero fisiológico estéril de manera que quede completamente cubierto

Sangre (para detección de herpesvirus 5)

Recogida en un tubo con heparina de litio o con EDTA.

Todas las muestras deben conservarse a 4°C hasta su procesamiento.

4.2. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

Líquidos vesiculares

Poner el líquido obtenido con la jeringa en un tubo estéril que contenga 1 mL de suero fisiológico.

Tabla 1

Microorganismo	Muestra	Técnica
<i>Herpesvirus 1</i>	Líquido vesicular	IFD, IFI
	Exudados de piel y mucosas	IFD, IFI
	Muestras de tejidos	IFD, IFI
<i>Herpesvirus 2</i>	Líquido vesicular	IFD, IFI
	Exudados de piel y mucosas	IFD, IFI
	Muestras de tejidos	IFD, IFI
<i>Herpesvirus 3</i>	Exudados cutáneos	IFD, IFI
	Muestras de tejidos	IFD, IFI
<i>Herpesvirus 5</i>	Sangre	IFI

IFD: Inmunofluorescencia directa; IFI: Inmunofluorescencia indirecta.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las infecciones por herpesvirus	Fecha: PNT-TDA-06	
		Edición 01	Página 3 de 4

Exudados de lesiones mucosas (oral, nasal, rectal y genital), exudados de faringe, conjuntiva y raspados corneales y exudados de lesiones cutáneas (vesículas)

Poner dentro de un tubo 1-2 mL de suero fisiológico estéril.

Introducir el escobillón y agitar de manera que el material quede suspendido en el medio

Biopsias y necropsias

Homogeneizar añadiendo suero fisiológico estéril en cantidad suficiente para una suspensión al 10% (10 partes material en 90 partes de suero fisiológico).

5. REACTIVOS

Inmunofluorescencia

1. PBS
2. Los reactivos específicos incluidos en los equipos comercializados.
3. Acetona
4. Fijador de sacarosa-formol (para la antigenemia)
5. Líquido de montaje

6. TÉCNICAS DISPONIBLES

Las técnicas disponibles para la detección de cada herpesvirus se han enumerado en la tabla 1. Todas las técnicas están debidamente estandarizadas y disponibles comercialmente.

7. APARATOS Y MATERIAL

El equipamiento necesario para la realización de las técnicas descritas, incluyendo el tratamiento de las muestras, es el siguiente:

- Centrífuga
- Vórtex
- Pipetas automáticas
- Citocentrífuga
- Microscopio de fluorescencia

8. PROCEDIMIENTO

Los procedimientos concretos de las técnicas inmunofluorescencia, al realizarse mediante reactivos comercializados, no se detallan, ya que se encuentran debidamente descritos en la documentación de cada equipo comercial. Para el estudio de la antigenemia de herpesvirus 5 la mayoría de los protocolos incluidos en los equipos de reactivos detallan el procesamiento a seguir con las muestras de sangre.

9. CONTROL DE CALIDAD.

Siguiendo las Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica (CCI-SEIMC) realizado por el grupo colaborador GEGMIC, para los reactivos comerciales, debe solicitarse al fabricante que disponga de un Sistema de Calidad reconocido y que facilite al laboratorio los datos relativos al control de cada lote de reactivo. La mayoría de técnicas comerciales incluyen actualmente controles positivo y/o negativo para realizar bien a la vez que cada una de las determinaciones o cada vez que se realice un grupo

de ellas, en función del sistema de presentación. Cada centro debe también considerar la conveniencia de participar en programas externos de control de calidad.

10. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La presencia del virus se caracteriza por un color verde brillante, fluorescente en el núcleo de la célula, en ocasiones también en el citoplasma, que contrasta con el color rojo de las células no infectadas al examinar las preparaciones al microscopio de fluorescencia.

En la prueba de la antigenemia una muestra debe considerarse positiva cuando se puede observar fluorescencia en los núcleos de los leucocitos. En ocasiones se acompaña de fluorescencia en el citoplasma pero nunca ésta aislada. Debe tenerse en cuenta que durante el procesamiento de las muestras pueden perderse leucocitos ya sean positivos o no, por lo que se recomienda realizar dos preparaciones de la muestra y la obtención de la media de células positivas, expresando el resultado final como el número de células positivas por el número de células en la preparación, éste debe ser como mínimo de 50.000. No se dispone de un valor universal a partir del que pueda asegurarse la enfermedad por herpesvirus 5, si bien muchos estudios cifran entre 2 y 200 células infectadas por 100.000 leucocitos.

11. RESPONSABILIDADES

El personal técnico de la sección será el responsable de revisar las solicitudes estudiando la idoneidad de la muestra remitida con la determinación solicitada, del tratamiento de las muestras, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados en función de los resultados de los controles. El facultativo responsable de la sección, además de la supervisión de las tareas citadas, será responsable de mantener al día los procedimientos, de la validación final de los resultados, su interpretación y el informe de los mismos.

El personal debe conocer las ventajas y limitaciones de las técnicas empleadas, así como su fundamento y el funcionamiento de los aparatos utilizados. Además debe trabajar en condiciones de máxima seguridad personal y ambiental, realizando una adecuada segregación de los residuos.

12. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO Y LIMITACIONES

La detección de los antígenos víricos en las muestras tomadas de las lesiones mucocutáneas causadas por HHV1, 2 y 3 mediante la utilización de anticuerpos monoclonales específicos, para cada uno de estos virus, marcados con fluoresceína ha demostrado ser una técnica igual o más sensible que el aislamiento vírico. En el caso del HHV-3 ha sido propuesto como el método diagnóstico de elección.

La detección de la proteína pp65 de HHV-5 en los leucocitos de sangre periférica es indicativa de infección diseminada. Esta técnica llamada prueba de

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las infecciones por herpesvirus	Fecha: PNT-TDA-06	
		Edición 01	Página 4 de 4

la antigenemia ha demostrado una sensibilidad superior al 95% y una especificidad del 98% en el diagnóstico de la infección activa. Además la antigenemia suele positivizarse previamente a la aparición de la sintomatología de forma que la cuantificación de las células pp65 positivas constituye un buen marcador de predicción de desarrollo de enfermedad. Esta técnica se utiliza para la el seguimiento de pacientes con riesgo de desarrollar la enfermedad por HHV-5 con el fin de poder instaurar un tratamiento específico anticipado y para la evaluación de la respuesta al tratamiento.

La calidad de la muestra es de la máxima importancia para la obtención de resultados fiables. Una muestra con un número de células inferior a 25 debe informarse como no adecuada para la detección de antígenos.

La principal limitación de las técnicas de inmunofluorescencia es la necesidad de formación requerida por el personal para poder efectuar la lectura y la interpretación de los resultados.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Rabella García N, Labeaga Puchaes R, Margall Coscojuela N, Sánchez López I. Inmunofluorescencia directa para el diagnóstico de las infecciones mucocutáneas causadas por virus herpes simple. Med Clin (Barc) 1994;102:637.
2. Barraquer P, Rabella N, Labeaga R, Mercader M, Prats G. Diagnóstico de las infecciones causadas por el virus varicela zoster. Enferm Infecc Microbiol Clin 1996;14:277-278.
3. Rabella N, Pérez JL, Pumarola T. El laboratorio de virología en la infección por citomegalovirus. Posibilidades actuales. Enferm Infecc Microbiol Clin 1997;15 (Supl 2): 69-76.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las micosis invasoras	Fecha: PNT-TDA-07	
		Edición 01	Página 2 de 6

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este procedimiento es el de definir las técnicas rápidas de detección de antígeno que existen para el diagnóstico etiológico de la aspergilosis invasora, la candidiasis sistémica, la criptococosis y la neumonía por *Pneumocystis jiroveci*. Se describe qué muestras son las más adecuadas en función de los microorganismos que se deseen detectar y en función de la técnica que se plantee utilizar.

2. FUNDAMENTO

En las micosis invasoras se pueden encontrar fragmentos antigénicos del hongo causante de la infección en los líquidos orgánicos y en la sangre del paciente. Generalmente son de la pared o de la cápsula y se detectan por una reacción antígeno-anticuerpo. Los métodos basados en anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de proporcionar resultados reproducibles. Aunque también presentes en la orina, los métodos disponibles dan resultados contradictorios en este tipo de muestra.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Joergensen JH, and Tenover FC, eds. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. American Society for Microbiology, 2003. Washington, DC.
- Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2ª edición. 2004. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Procedimientos en Microbiología Clínica. Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. 1a. C. Sánchez y C. Guerrero. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2003.

4. TIPOS DE MUESTRA

En la **tabla 1** se indican las muestras de elección para la detección de cada microorganismo y las técnicas por las que se pueden detectar.

4.1. RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA.

En el procedimiento en Microbiología Clínica. Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología. 1 a. (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2003) se indican las directrices principales de la recogida y conservación de las muestras (PNT-RTP-01).

4.2. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

Tratamiento de muestras de suero en la detección de antígenos de *Aspergillus* y *Candida*

- La muestra de suero se trata por calentamiento al baño maría con una solución de EDTA para disociar el antígeno de los inmunocomplejos circulantes.
- Posteriormente, centrifugar 3 minutos a 10.000g y se utilizar el sobrenadante.

Tratamiento de muestras para la detección de antígeno de *Cryptococcus neoformans*

Líquido cefalorraquídeo

- Centrifugar a 1.000g durante 15 minutos. Se puede aprovechar la misma centrifugación que se realiza para el procesamiento convencional de la muestra. El sedimento se procesa para examen microscópico directo y el cultivo y el sobrenadante se separa para la realización de la prueba de detección de antígeno.
- Se puede guardar en nevera 3 días y, si se requiere más tiempo de conservación, a -20°C o añadiendo timerosal hasta lograr una concentración final del 0,01%.
- Calentar la muestra a 100°C durante 5 minutos antes de procesarla.

Suero

- Preparar el suero según procedimiento convencional.
- Se puede guardar en nevera 3 días y, si se requiere más tiempo de conservación, a -20°C o añadiendo timerosal hasta lograr una concentración final del 0,01%.

Tabla 1

Microorganismo	Muestra	Técnica
<i>Aspergillus</i>	Suero	LA, EIA
<i>Candida</i>	Suero	LA, EIA
<i>Cryptococcus</i>	Suero	LA, EIA
	Líquido cefalorraquídeo	LA, EIA
Antígenos fúngicos universales	Suero y líquidos orgánicos	Factor G <i>Tachypleus tridentatus</i>
<i>Pneumocystis jiroveci</i>	Muestra respiratoria	IFI, IFD

EIA: Enzimoimmunoensayo; LA: Aglutinación por partículas de látex.; IFI: Inmunofluorescencia indirecta; IFD: Inmunofluorescencia directa.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las micosis invasoras	Fecha: PNT-TDA-07	
		Edición 01	Página 3 de 6

- Añadir pronasa (50 µL de solución de pronasa a 300 µL de muestra) e incubar a 56°C durante 30 minutos.

Tratamiento de muestras para la detección del componente β-(1→3)-D glucano.

La muestra se trata con los reactivos incluidos en la prueba para inactivar las proteasas que pudieran estar presentes.

Tratamiento de muestras para la detección de antígeno de *Pneumocystis jiroveci*

Se requiere un tratamiento con un agente mucolítico (Sputasol®) para el tratamiento de las muestras más mucosas. A continuación deben seguirse las recomendaciones de cada fabricante.

5. REACTIVOS

Los reactivos específicos están incluidos en los equipos comercializados.

6. TÉCNICAS DISPONIBLES.

Técnicas de detección de antígeno para el diagnóstico de la aspergilosis

Platelia® *Aspergillus* (Bio-rad) es una prueba que detecta galactomanano aspergilar mediante una reacción inmunoenzimática tipo “sandwich” que se realiza en microplaca. Utiliza anticuerpos monoclonales de ratón EB-A2 dirigidos frente al galactomanano de *Aspergillus*. El galactomanano aspergilar tienen una estructura formada por un esqueleto lineal de manosas unidas por enlaces glicosídicos α-(1→2) y α-(1→6), cuya estructura se ramifica mediante enlaces α-(1→2) con polímeros de β-(1→5)-galactofuranosas, con un promedio de cuatro unidades por cada ramificación. Estas últimos componentes son los epítomos reconocidos por anticuerpos específicos. Los anticuerpos monoclonales utilizados están previstos para 1) sensibilizar los pocillos de la microplaca y unirse al antígeno de la muestra y 2) para la detección, con un anticuerpo sensibilizado con peroxidasa. La prueba tiene un umbral de detección establecido en 1 ng de galactomanano por ml de suero. Otras técnicas disponibles en formato de aglutinación de partículas de látex (Pastorex® *Aspergillus* y radioinmunoensayo) tienen una sensibilidad inferior a la técnica de EIA.

Técnicas de detección de antígeno para el diagnóstico de la candidiasis

Cand-Tec® (Ramco Laboratories, Houston, Texas). Es una prueba de aglutinación de partículas de látex. Fue la primera en comercializarse, pero su sensibilidad y especificidad son variables según los trabajos.

Pastorex® *Candida* (Bio-rad). Prueba de detección de manano de la pared de *Candida* mediante un anticuerpo monoclonal que reconoce las especies más frecuentes de *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C.*

parapsilosis, *C. glabrata* y *C. krusei*. Consiste en una aglutinación de partículas de látex.

Platelia® *Candida* (Bio-rad). Usa el mismo anticuerpo monoclonal que la prueba anterior, pero ha incrementado su sensibilidad utilizando una técnica de detección de EIA en doble sandwich.

Técnicas de detección de antígeno para el diagnóstico de la criptococosis

Existen diversas pruebas de aglutinación de partículas de látex disponibles comercialmente: Crypto-La®, IMMY, Pastorex®, Murex® y Calas® (Meridian Diagnostics) y también existe una prueba de EIA (PREMIER EIA®, Meridian Diagnostics)

Técnicas de detección de antígenos fúngicos universales

Fungitec® y Glucatec® son marcas comerciales de una prueba de detección del componente β-(1→3)-D-glucano, propio de la pared de quitina y es, en consecuencia, útil para la mayoría de hongos. Se basa en que el factor G de un lisado de amebocitos de la cacerola de las Molucas (*Tachypleus tridentatus*) es sensible a este componente de la pared fúngica, desencadenando una cascada enzimática.

*Técnicas de detección de antígeno para el diagnóstico de la neumonía por *P. jiroveci**

Existen diversas técnicas disponibles comercialmente para la detección de antígenos específicos de *P. jiroveci* en muestras respiratorias. Hay desarrolladas técnicas de inmunofluorescencia directa e indirecta (Dako Corp., Carpintería Calif. y Chemicon International Inc.).

7. APARATOS Y MATERIAL

El equipamiento necesario para la realización de las técnicas descritas incluyendo el tratamiento de las muestras, es el siguiente:

- Pipetas automáticas para dispensar 50, 100, 300 y 1.000 µL
- Ultracentrífuga 10.000g
- Agitador vórtex
- Baño María 100°C o estufa
- Baño María 37°C o incubador de microplacas
- Lavador de placas de EIA.
- Aparato de lectura para microplacas con filtros 450-620 nm.
- Agitador orbital (100 rpm)

8. PROCEDIMIENTO

Los procedimientos de realización de las técnicas no se detallan, ya que se encuentran debidamente descritos en la documentación de cada equipo comercial.

9. CONTROL DE CALIDAD

Siguiendo las Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica (CCI-SEIMC) realizado por el grupo colaborador

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las micosis invasoras	Fecha: PNT-TDA-07	
		Edición 01	Página 4 de 6

GEGMIC, para los reactivos comerciales, debe solicitarse al fabricante que disponga de un Sistema de Calidad reconocido y que facilite al laboratorio los datos relativos al control de cada lote de reactivo. La mayoría de técnicas comerciales incluyen actualmente controles positivo y/o negativo para realizar bien a la vez que cada una de las determinaciones bien cada vez que se realice un grupo de ellas, en función del sistema de presentación. Cada centro debe también considerar la conveniencia de participar en programas externos de control de calidad.

10. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Detección de antígeno galactomanano de Aspergillus

Los resultados se suministran en forma de índice de densidad óptica respecto al control "valor umbral". Para cada suero se calcula la densidad óptica en relación con la proporcionada por el control valor umbral. Este cálculo permite limitar las variaciones de densidad óptica inter-ensayos e intra-ensayos debidas a las diferentes condiciones de realización de la prueba. El fabricante marca los siguientes criterios para interpretar los resultados:

Índice de densidad óptica > 1,5 ⇒ prueba positiva

1 < Índice de densidad óptica < 1,5 ⇒ prueba dudosa

Índice de densidad óptica < 1 ⇒ prueba negativa

Sin embargo, existen trabajos que sugieren que debería disminuir el criterio para considerar la prueba positiva hasta 1 ó 0,5. En la versión estadounidense de la misma prueba, comercializada recientemente, el punto de corte que recomienda el fabricante ya es de 0,5. Evidentemente, con estos criterios se aumenta la sensibilidad, a costa de una disminución de la especificidad. Por ello sólo deben aplicarse en poblaciones con una alta prevalencia *a priori* de aspergilosis invasora, para disminuir el número de falsos positivos. Es conveniente confirmar todo resultado positivo con una nueva muestra. La prueba es útil para el **diagnóstico** y para el **seguimiento** de la enfermedad aspergilar invasora.

Detección de antígeno de Candida

Se consideran positivos los resultados superiores a 0,5 ng/mL.

Detección de antígeno de Cryptococcus

El resultado se da en forma de título. Si en la detección de antígeno de criptococo en suero y LCR (aglutinación de partículas de látex) se utiliza un test que no incorpora un tratamiento de la muestra con pronasa, se recomienda realizar la prueba en muestra pura y en diluciones sucesivas al 1/10, 1/100, 1/1.000 y 1/10.000. Sirve para el **diagnóstico** de la criptococosis y, si se repite con la misma marca comercial, también sirve para el **seguimiento**. Por ello

se recomienda describir la técnica empleada en el informe de los resultados.

Detección de antígeno de P. jiroveci

Se considera positiva una determinación cuando se visualizan claramente estructuras compatibles con *P. jiroveci* fluorescentes al examinar las preparaciones al microscopio de fluorescencia. Normalmente el fluoróforo empleado en la conjugación del anticuerpo monoclonal ofrece una fluorescencia verde brillante. La tinción muestra un patrón difuso de fluorescencia distribuido alrededor del *cluster* de los microorganismos y a menudo tiñe la matriz en la que los *Pneumocystis* están embebidos.

11. RESPONSABILIDADES

El personal técnico de la sección será el responsable de revisar las solicitudes estudiando la idoneidad de la muestra remitida con la determinación solicitada, del tratamiento de las muestras, de la realización de las técnicas y de la validación de los resultados en función de los resultados de los controles. El facultativo responsable de la sección, además de la supervisión de las tareas citadas, será responsable de mantener al día los procedimientos, de la validación final de los resultados, su interpretación y el informe de los mismos.

El personal de la sección de detección de antígenos debe conocer las ventajas y limitaciones de las técnicas rápidas, así como el fundamento de todas las técnicas y del funcionamiento de los aparatos. Además debe trabajar en condiciones de máxima seguridad personal y ambiental, realizando una adecuada segregación de los residuos.

12. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO Y LIMITACIONES

Detección de antígeno galactomanano de Aspergillus

La presencia de galactomanano en el suero es intermitente. Por lo tanto, un resultado negativo no excluye el diagnóstico. Por otra parte, la precocidad del tratamiento es esencial para mejorar el pronóstico y, en un 65% de los casos, una prueba positiva antecede a la aparición de cualquier signo clínico (rango de 1 a 27 días). Debido a la existencia de falsos positivos, para incrementar la efectividad de la prueba debe realizarse de manera repetida y prospectiva en pacientes con alto riesgo de padecer la enfermedad. Solamente una valoración global, hecha por el equipo asistencial podrá orientar con mayor visos de corrección el manejo de cada paciente. Para el diagnóstico de la aspergilosis invasora se recomienda realizar la prueba de manera repetida en los pacientes de alto riesgo. Actualmente, el criterio más utilizado es de dos veces por semana en este tipo de pacientes.

La prueba es muy sensible. Las esporas de *Aspergillus* están presentes en la atmósfera, especialmente asociadas con el polvo, y pueden

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las micosis invasoras	Fecha: PNT-TDA-07	
		Edición 01	Página 5 de 6

contaminar la muestra o los reactivos, dando lugar a resultados falsamente positivos. Por ello deben extremarse las precauciones de limpieza:

- No trabajar en una habitación donde se cultive *Aspergillus*.
- Limpiar las superficies contaminadas.
- Tapar los tubos.
- No exponer los pocillos al aire más tiempo del estrictamente necesario.
- Utilizar material limpio de polvo.
- Utilizar agua destilada estéril.

El galactomanano es termoestable. Por lo tanto, la esterilización del material no garantiza la ausencia del mismo.

Resultados **falsos positivos**: oscilan entre el 8 y el 14%. Las posibles causas son:

- Colonización masiva del tubo digestivo por *Aspergillus*.
- Infecciones por otros hongos, como *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Candida* que presentan reacción cruzada con el anticuerpo usado en la prueba.
- Bacteriemia por microorganismos con antígenos con reacción cruzada.
- Ingesta de cereales (como la pasta italiana), leche maternizada y otros alimentos que contengan galactomanano en pacientes con lesiones de la mucosa digestiva (mucositis). *Aspergillus* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y las materias primas. Los procesos industriales no destruyen el galactomanano. y éste se puede encontrar en una gran variedad de alimentos, como té, arroz, leche, pimienta e, incluso, en algunos antibióticos (**piperacilina/tazobactam**).
- Tratamiento con ciclofosfamida.
- **Lactantes**. En neonatos el porcentaje de falsos positivos puede llegar a ser del 83%. Al parecer la causa sería la reacción cruzada que se produce por el ácido lipoteicoico de bacterias del género *Bifidobacterium* que colonizan normalmente el tubo digestivo, especialmente en la población que se alimenta de leche, y que pasarían al torrente circulatorio por translocación, en una mucosa naturalmente inmadura.

Resultados **falsos negativos**:

- Lesión encapsulada y poca invasión vascular .
- Lesión con poca cantidad de hongo
- Inmunocomplejos anti-*Aspergillus*.
- El tratamiento del paciente con anfotericina B previo a la recogida de la muestra puede negativizar la prueba.

No está claro que un solo resultado positivo sea significativo. Es conveniente repetirlo en una nueva muestra para su confirmación. La mayoría de trabajos se han realizado en pacientes inmunodeprimidos, principalmente con neutropenia grave y persistente o sometidos a trasplantes de médula ósea o pulmón. Dada la frecuencia de la enfermedad, es difícil disponer de resultados a gran escala y en ciertas situaciones clínicas la experiencia publicada es escasa, particularmente en enfermos

con enfermedades pulmonares crónicas tratados con corticoides y en formas de aspergilosis invasoras no pulmonares.

Esta prueba incluye las especies del género *Aspergillus* y, aunque existen reacciones cruzadas con otros hongos, no es una prueba válida para el diagnóstico de procesos infecciosos similares causados por otras especies, como por ejemplo del género *Scedosporium* (*Scedosporium apiospermum* – *Pseudallescheria boydii* y *Scedosporium prolificans*).

No se conoce la utilidad de la prueba para confirmar el diagnóstico de aspergilosis invasora en pacientes de bajo riesgo con cultivo positivo de muestras potencialmente contaminadas (como el esputo). De todos modos, la lógica sugiere que debe tenerse en cuenta un resultado positivo en un paciente con un cultivo de esputo positivo por *Aspergillus*, que toma altas dosis de corticoides y cuya mucosa intestinal está intacta.

Monitorización: en pacientes diagnosticados de aspergilosis invasora, una disminución del índice se relaciona con un mejor pronóstico. En cambio, su mantenimiento indica peor pronóstico.

Detección de antígeno de Candida

Los trabajos realizados hasta el momento no han obtenido tan buenos resultados como en la prueba para *Aspergillus*. Es posible que su uso en combinación con la detección de anticuerpos circulantes incremente la sensibilidad y especificidad.

Detección de antígeno de Cryptococcus

Existen pocos problemas en esta excelente prueba para el diagnóstico y seguimiento de la criptococosis. Los puntos que deben tenerse en cuenta son los siguientes:

Causas de **falsos positivos**:

- Infección diseminada por *Trichosporon beigellii*.
- Sepsis por *Capnocytophaga canimorsus*.
- Agar. Hay que tener precaución de separar la muestra de LCR que se usa para sembrar medios de cultivo de la usada para la prueba de detección de antígeno. Si se centrifuga previamente y se usa el sobrenadante, esta causa de falso positivo desaparece.

- Factor reumatoide. Se elimina si se usa el tratamiento con pronasa.

Causas de **falsos negativos**:

- Fenómeno similar al de prozona, que se corrige diluyendo la muestra a 1/10, 1/100, 1/1.000 y 1/10.000.
- Infección causada por una cepa productora de baja cantidad de polisacárido capsular.

El uso de pronasa, además de eliminar muchos falsos positivos y falsos negativos, facilita valorar el título de la reacción.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Técnicas rápidas de diagnóstico de las micosis invasoras	Fecha: PNT-TDA-07	
		Edición 01	Página 6 de 6

Técnicas de detección de antígenos fúngicos universales

Las proteasas presentes en la muestra pueden interferir con la prueba. Debe utilizarse vidrio libre de endotoxina y de glucano (presente en el polvo, a causa de la presencia de sustancias de procedencia fúngica).

Resultados falsos positivos:

- endotoxina o glucano presente en los materiales.
- hemodiálisis (la celulosa de la membrana es la responsable).
- gasas de esponja utilizadas en procedimientos quirúrgicos.
- tratamiento con albúmina o gamma-globulina.

Las infecciones por *Cryptococcus neoformans* y por zigomicetos no se detectan mediante esta prueba.

Detección de antígenos de P. jiroveci

Se dispone de técnicas de inmunofluorescencia directa e indirecta, que emplean anticuerpos monoclonales específicos frente a una familia de glicoproteínas de superficie que incluye tanto epítomos específicos de *P. jiroveci* como también epítomos comunes de género. Dependiendo del anticuerpo monoclonal empleado la tinción puede permitirnos ver la forma quística únicamente o todas las formas del microorganismo. Como las formas trofozoitas son más numerosas que las quísticas, las técnicas que emplean anticuerpos monoclonales frente a todas las formas del organismo son más sensibles. Hay que destacar que técnicas de inmunofluorescencia directa pueden no reaccionar sobre muestras fijadas a los portaobjetos con etanol. Es recomendable fijar con acetona o siguiendo las recomendaciones del fabricante

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E et al. β -D-Glucan as a Diagnostic Adjunct for Invasive Fungal Infections: Validation, Cutoff Development, and Performance in Patients with Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. Clin Infect Dis 2004; 39:199-205.
2. Sendid B, Tabouret M, Poirot JL et al. New Enzyme Immunoassays for Sensitive Detection of Circulating *Candida albicans* Mannan and Antimannan Antibodies: Useful Combined Test for Diagnosis of Systemic Candidiasis. J Clin Microbiol 1999; 37:1510-1517.
3. Taner DC, Weinstein MP, Fedorciw B et al. Comparison of Commercial kits for Detection of Cryptococcal Antigen. J Clin Microbiol 1994; 32:1680-1684.
4. Verweij PE, Stynen D, Rijs AJMM et al. Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Compared with Pastorex Latex Agglutination Test for Diagnosing Invasive Aspergillosis in Immunocompromised Patients. J Clin Microbiol 1995; 33:1912-1914.
5. Wu T, Koo SY. Comparison of Three Commercial Cryptococcal Latex Kits for Detection of Cryptococcal Antigen. J Clin Microbiol 1983; 18:1127-1130.
6. Yeo SF y Wong B. Current status of Nonculture Methods for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. Clin Microbiol Rev 2002; 15:465-484.