

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

30.

Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales

2 0 0 8

Coordinador: Jordi Vila Estape

Autores: Miriam Álvarez Martínez
Javier Buesa Gómez
Javier Castillo García
Jordi Vila Estape



ISBN-978-84-612-7852-7

INDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1. Introducción

2. Consideraciones clínicas

3. Recogida de muestras

4. Diagnóstico microbiológico de los diversos microorganismos causantes de infección gastrointestinal

4.1. Bacterias

- 4.1.1. *E. coli* diarreagénicas
- 4.1.2. *Shigella* spp.
- 4.1.3. *Salmonella* spp.
- 4.1.4. *Campylobacter* spp.
- 4.1.5. *Yersinia* spp.
- 4.1.6. *Bacillus cereus*
- 4.1.7. *Staphylococcus aureus*
- 4.1.8. *Clostridium perfringens*
- 4.1.9. *Vibrio* spp.
- 4.1.10. *Aeromonas* mesófilas
- 4.1.11. *Plesiomonas shigelloides*
- 4.1.12. *Clostridium difficile*

4.2. Virus

- 4.2.1. Aislamiento de virus en cultivos celulares
- 4.2.2. Microscopía electrónica
- 4.2.3. Técnicas de detección de antígenos víricos
- 4.2.4. Rotavirus
 - 4.2.4.1 Detección de antígenos de rotavirus
 - 4.2.4.2 Métodos moleculares
- 4.2.5. Norovirus
 - 4.2.5.1 Detección de antígenos de norovirus
 - 4.2.5.2 Métodos moleculares
- 4.2.6. Adenovirus
 - 4.2.6.1 Detección de antígenos de adenovirus
 - 4.2.6.2 Métodos moleculares
- 4.2.7. Astrovirus
 - 4.2.7.1 Detección de antígenos de astrovirus
 - 4.2.7.2 Métodos moleculares
- 4.2.8. Sapovirus
- 4.2.9. Interpretación e información de los resultados

4.3. Parásitos

- 4.3.1 Examen macroscópico
- 4.3.2 Examen microscópico
 - 4.3.2.1 Examen en fresco
 - 4.3.2.2 Técnicas de concentración
 - 4.3.2.3 Tinciones específicas
 - 4.3.2.4 Determinación de tamaños con el microscopio
- 4.3.3. Protozoos
 - 4.3.3.1 Amebas
 - 4.3.3.2 Flagelados
 - 4.3.3.3 Ciliados
 - 4.3.3.4 Coccidios
 - 4.3.3.5 Microsporidios
- 4.3.4 Helmintos
 - 4.3.4.1 Nematodos intestinales
 - 4.3.4.2 Nematodos tisulares
 - 4.3.4.3 Cestodos
 - 4.3.4.4 Trematodos

5. Bibliografía

ÍNDICE DE LOS DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. PNT-GE-01. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales bacterianas
2. PNT-GE-02. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales víricas
3. PNT-GE-03. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales parasitarias

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades

Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

30. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES GASTROINTESTINALES. 2008

Coordinador: Jordi Vila Estape

**Autores: Miriam Álvarez Martínez
Javier Buesa Gómez
Javier Castillo García
Jordi Vila Estape**

1. INTRODUCCION

Las infecciones agudas del tracto gastrointestinal figuran entre las enfermedades infecciosas más frecuentes, superadas sólo por las infecciones del tracto respiratorio. Aunque muchas veces se trata de un ligero contratiempo en los adultos sanos, un desequilibrio electrolítico puede provocar una deshidratación en las personas muy enfermas y en niños y ancianos. A nivel mundial, las infecciones gastrointestinales siguen siendo una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad entre los lactantes y los niños. Se ha estimado que en Asia, África y Latinoamérica, dependiendo de factores socioeconómicos y nutricionales, la probabilidad de que un niño muera antes de los 5 años por estas causas puede llegar al 50%. Las epidemias de diarrea en lactantes, niños y adultos son generalmente causadas por microorganismos presentes en el agua o en los alimentos contaminados habitualmente por heces que presentan microorganismos patógenos. Las infecciones también se pueden transmitir de persona a persona por contacto directo o a través de fómites.

2. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

Las manifestaciones clínicas más destacadas de las gastroenteritis son fiebre, vómitos, dolor abdominal y diarrea moderada a intensa. La diarrea es un dato central y su presencia y naturaleza constituyen la base para la clasificación de las infecciones gastrointestinales en dos síndromes: diarrea acuosa o secretora y diarrea invasiva o disentería.

Diarrea acuosa o secretora. La forma más común de gastroenteritis se caracteriza por evacuaciones intestinales frecuentes, más o menos líquidas, denominadas diarrea. La diarrea está provocada por mecanismos patogénicos que atacan el intestino delgado proximal, porción del intestino en la que se produce más del 90% de la absorción fisiológica de fluidos. La forma más pura de diarrea acuosa es la producida por bacterias secretoras de enterotoxinas, como por ejemplo *Vibrio cholerae* o *Escherichia coli* enterotoxigénica (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los síndromes gastrointestinales infecciosos más importantes

Microorganismo ^a clínico	Síndrome	Mecanismo patogénico (Factores de virulencia)
ECET	Diarrea acuosa	Fimbrias, toxinas termolábil (TL) y termoestable (TE)
ECEP	Diarrea acuosa	Adherencia – acortamiento microvellosidades
ECEI	Disentería	Plásmido (genes codifican proteínas de invasión)
ECEH	Diarrea acuosa Colitis hemorrágica (síndrome urémico-hemolítico)	Fimbrias, citotoxinas (VT-1 o VT-2)
ECEA	Diarrea acuosa	Fimbria, enterotoxina (EAST-1) ¿otras toxinas?
<i>Shigella</i>	Diarrea acuosa/disentería	Plásmido de invasión, citotoxinas (VT-1 o VT-2)*
<i>Salmonella</i>	Diarrea acuosa o disentería	Invasión, enterotoxinas (similar TL de ECET)
<i>Campylobacter</i>	Diarrea acuosa o disentería	Invasión, enterotoxinas (similar TE de ECET)
<i>Y. enterocolitica</i>	Diarrea acuosa o disentería	Invasión, enterotoxinas (similar TE de ECET)
<i>V. cholerae</i>	Diarrea acuosa	Fimbrias, toxina termolábil (TL)
<i>C. difficile</i>	Diarrea acuosa	Citotoxina
Rotavirus	Diarrea acuosa	Destrucción mucosa
<i>Giardia lamblia</i>	Diarrea acuosa	Irritación mucosa
<i>Entamoeba histolytica</i>	Disentería	Invasión mucosa

^a ECET: *E. coli* enterotoxigénica; ECEP: *E. coli* enteropatógena; ECEI: *E. coli* enteroinvasiva; ECEH: *E. coli* enterohemorrágica; ECEA: *E. coli* enteroagregativa.

* Sólo presenta las citotoxinas la especie *S. dysenteriae*

Diarrea invasiva o disentería. La disentería comienza con evacuaciones intestinales frecuentes, pero las heces son de menor volumen que en la diarrea acuosa y contienen sangre, moco y pus. La fiebre, el dolor abdominal y el tenesmo son síntomas habituales. En la disentería, la patología se centra en el colon. Los microorganismos (Tabla 1) que causan disentería pueden provocar cambios inflamatorios y

destructivos en la mucosa del colon, por invasión directa o mediante la producción de citotoxinas. Este daño es responsable del pus y la sangre observados en las heces, pero no origina una pérdida importante de fluido, debido a que la capacidad de absorción y secreción del colon es mucho menor que la del intestino delgado. Los síntomas y los signos pueden variar de modo significativo de unos pacientes a

otros, e incluso, en momentos distintos durante la evolución de la misma enfermedad. Por ejemplo las infecciones por *Shigella* pasan con frecuencia por un estadio inicial breve de diarrea acuosa antes de localizarse en el colon y ocasionar una disentería.

Ante la sospecha de un cuadro de gastroenteritis debe hacerse una detallada historia clínica y un correcto estudio microbiológico. Los antecedentes epidemiológicos (edad, historia reciente de viajes, fundamentalmente a países subtropicales y tropicales, aparición esporádica o como parte de un brote, tipo de alimento sospechoso, periodo de incubación), la existencia de factores predisponentes (inmunosupresión), la presencia de signos y síntomas clínicos (fiebre, dolor abdominal, náuseas y

vómitos) y el tipo de diarrea (acuosa o disenterica) pueden orientar acerca del microorganismo implicado. No obstante, el diagnóstico definitivo solo se puede obtener mediante pruebas de laboratorio.

Diarrea del viajero. Las personas que viajan desde países desarrollados a otros en vías de desarrollo, pueden experimentar una gastroenteritis durante el viaje o al regreso al país de origen. La ingestión de alimentos crudos o poco cocinados o bien el agua contaminada es la fuente más probable de infección. Los microorganismos que con mayor frecuencia causan diarrea del viajero se mencionan en la Tabla 2. Entre ellos cabe destacar las *E. coli* enterotoxigénicas y enteroagregativas.

Tabla 2. Etiología de las gastroenteritis en diversos grupos de población

Microorganismo	Niños (0-5 años) Países desarrollados	Niños (0-5 años) Países en vías de desarrollo	Adultos	DV*
Bacterias				
<i>E. coli</i>	ND	37%	ND	42%**
<i>Shigella spp.</i>	<1%	10%	<1%	10%
<i>Salmonella spp.</i>	25%	1,5%	60%	3%
<i>Campylobacter spp.</i>	40%	3%	5%	2%
<i>Y. enterocolitica</i>	2%	<1%	2%	2%
<i>Aeromonas spp.</i>	7%	1%	6%	2%
Virus				
Rotavirus	44%	24%	ND	1%
Parásitos				
<i>G. lamblia</i>	35%	10%	ND	10%
<i>E. histolytica</i>	<1%	3%	5%	7%

* DV = Diarrea del viajero.

** *E. coli* diarreagénicas: *E. coli* enterotoxigénica (16%), *E. coli* enteroagregativa (13%), *E. coli* enteropatógena (4%), *E. coli* enteroinvasiva (3%) y *E. coli* verotoxigénica (1%)

ND = No determinado.

Toxiinfección alimentaria. En la mayoría de las infecciones gastrointestinales participan alimentos como vehículos de transmisión. Sin embargo, el término intoxicación alimentaria suele reservarse para los casos en los que puede incriminarse en su génesis a una sola comida. Esta situación se plantea de modo típico cuando se desarrollan al mismo tiempo múltiples casos de idéntico síndrome gastrointestinal, entre personas que sólo tienen en común haber compartido una comida en alguna reunión social o en un restaurante determinado.

Diarrea relacionada con el hospital. El medio ambiente hospitalario no debe permitir la diseminación de los agentes habituales de infección intestinal endémica. Cuando se produce tal infección, en general puede atribuirse a un empleado que

continúa trabajando mientras está enfermo o bien es portador sano o a comidas contaminadas, preparadas en el propio hospital o bien fuera del hospital y que entran en éste a través de familiares o amigos del paciente. Dos casos especiales de diarrea asociada con el hospital son las causadas por *E. coli* enteropatógenas en lactantes y por *Clostridium difficile* en pacientes con tratamiento antibiótico. *C. difficile* es la causa más importante de diarrea nosocomial, por ello en algunos laboratorios se utiliza como criterio el no realizar un coprocultivo en pacientes que han desarrollado diarrea después de tres días de estar ingresados en el hospital. En este caso el único microorganismo que se investiga es *C. difficile* toxigénico.

3. RECOGIDA DE MUESTRAS

La toma de muestra fecales y su transporte al laboratorio de microbiología se ha comentado en detalle en el número 1a de los Procedimientos en Microbiología Clínica de la SEIMC. Brevemente, las muestras para cultivo se deben recoger lo antes posible en el curso de la enfermedad, siendo poco aconsejable recogerlas con escobillón. Se deben recoger en un frasco estéril de boca ancha y tapón a rosca y enviarlas en el medio de transporte adecuado. Si se desea investigar parásitos, se recogerán tres muestras en tres días distintos (no en el mismo día) e igualmente se incluirán en un frasco estéril con el correspondiente medio de transporte (ver procedimiento 1a de los Procedimientos en Microbiología).

4. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LOS DIVERSOS MICROORGANISMOS CAUSANTES DE INFECCIÓN GASTROINTESTINAL

Durante los últimos 20 años se han logrado grandes avances en el conocimiento de las infecciones gastrointestinales. Los microorganismos incluidos en la tabla 1 producen hoy en día el 60-80% de los casos, aunque en muchos laboratorios no se dispone de métodos diagnósticos apropiados para todos ellos. La participación de los distintos microorganismos difiere de unas áreas geográficas a otras y también depende del grupo de población estudiado (Tabla 2). En cuanto al predominio estacional hay mayor incidencia de gastroenteritis vírica en otoño-invierno mientras que las bacterias afectan preferentemente en primavera-verano. En países tropicales este comportamiento estacional también se observa, con una mayor prevalencia de gastroenteritis por rotavirus en la época seca que en la época de lluvias.

4.1. BACTERIAS

4.1.1. *Escherichia coli* diarreagénicas. Actualmente se aceptan cinco grupos de *E. coli* como causantes de gastroenteritis: 1) ***E. coli* enterotoxigénica (ECET)** cuyas cepas pueden ser productoras de una o ambas toxinas, la toxina termolábil (TL), codificada en los genes *lt* y la toxina termoestable (TE), codificada en el gen *st*. Ambas toxinas producen una elevada secreción de electrolitos y agua a través de la activación de la adenilato ciclasa y la guanilato ciclasa del enterocito, respectivamente. Este grupo es causa frecuente de diarrea del viajero y de diarrea en niños con edad inferior a 5 años en países en vías de desarrollo; 2) ***E. coli* enteropatógena (ECEP)**, este grupo se adhiere al epitelio intestinal ocasionando un acortamiento de las microvellosidades. El locus LEE, que codifica una serie de proteínas asociados con la adherencia y destrucción de las microvellosidades, se encuentra localizado en una isla de patogenicidad; 3) ***E. coli* enterohemorrágica (ECEH)** también llamada verotoxigénica pues puede producir dos citotoxinas denominadas toxinas *Shiga-like* (Stx1 y Stx2), shigatoxinas o verotoxinas. Los cuadros clínicos que produce van desde una infección asintomática a diarrea acuosa o colitis hemorrágica, que a veces se acompaña de un síndrome urémico-hemolítico; 4) ***E. coli* enteroinvasiva (ECEI)**, los cuales son capaces de invadir la mucosa intestinal; y 5) ***E. coli* enteroagregativa (ECEA)** que es también una causa frecuente de diarrea del viajero y de diarrea crónica en países en vías de desarrollo. El mecanismo de acción de este último grupo de *E. coli* diarreagénicas no se conoce en detalle aunque se ha descrito que un elevado porcentaje de cepas poseen un plásmido (CVD432) en el que se localiza el gen *aat* que codifica una proteína transportadora y se utiliza para detectar ECEA por PCR (Tabla 3).

Tabla 3. Cebadores utilizados para la amplificación de diversos factores de virulencia de *E. coli* diarreagénicas

Gen	Factor de virulencia	Secuencia cebadores	Tamaño amplicon (pb)
aat	Proteína transportadora	5' CTGGCGAAAGACTGTATCAT 3' 5' AATGTATAGAAATCCGCTGTT 3'	629
lt	Toxina termolábil	5' TCTCTATGTGCATACGGAGC 3' 5' CCATACTAGTTGCCGCAAT 3'	322
st	Toxina termoestable	5' TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG 3' 5' CTTGACTCTTCAAAGAGAAAATTAC 3'	147
sxt-1	Verotoxina-1	5' GAAGAGTCGTGGGATTACG 3' 5' AGCGATGCAGCTATTAATAA 3'	130
sxt-2	Verotoxina-2	5' TTAACCACACCCACGGCAGT 3' 3' GCTCTGGATGCATCTCTGGGT 3'	346

El diagnóstico microbiológico de los procesos enterocolíticos causados por los diferentes grupos de *E. coli* diarreagénicas se ve complicado por el hecho de que esta especie es un componente fundamental de la microbiota intestinal del ser humano. El agar MacConkey se incorpora normalmente en los coprocultivos y se puede utilizar para el aislamiento de *E. coli*. Una vez identificado como *E. coli* se pueden detectar los diversos patotipos de *E. coli* diarreagénicas mediante la detección de los genes que codifican los diversos factores de virulencia (Tabla 3). Sin embargo, la identificación de estos tipos de *E. coli* queda fuera de la práctica rutinaria de la mayoría de laboratorios, aunque en aquellos con un elevado número de pacientes con diarrea del viajero es aconsejable su implementación.

El principal serotipo de *E. coli* enterohemorrágico es el O157:H7; este serotipo posee la peculiaridad de no fermentar el D-sorbitol por lo que se puede utilizar el agar MacConkey-sorbitol, que es una modificación de este medio que incorpora este azúcar en lugar de lactosa, para la identificación presuntiva de dicho serotipo. Una vez identificadas como *E. coli* las colonias no fermentadoras del sorbitol, se procede a aglutinar con anticuerpos específicos para O157. Los protocolos para la detección rutinaria de *E. coli* enterohemorrágica varían enormemente. Basándose en la baja incidencia de la gastroenteritis por este tipo de *E. coli* algunos laboratorios no realizan cultivos rutinarios y otros los realizan cuando el clínico lo solicita. Algunos laboratorios realizan cultivo en MacConkey-sorbitol sólo cuando las heces son sanguinolentas, pues este patotipo de *E. coli* puede ocasionar una colitis hemorrágica.

La diarrea moderada ocasionada por ECET o ECEA es normalmente autolimitada. Sin embargo, se ha comprobado que cuando la diarrea es más grave o prolongada la utilización de fluoroquinolonas como ciprofloxacino o norfloxacino disminuye la sintomatología. En los casos de diarrea del viajero en pacientes que han viajado a India se debe pensar en utilizar una alternativa a las fluoroquinolonas pues en los últimos años el nivel de resistencia a estos agentes antibacterianos en cepas de ECET y ECEA de este país ha aumentado considerablemente. Una posible alternativa es el uso de rifaximina, un agente antibacteriano no absorbible que posee una buena actividad frente a ECET y ECEA.

4.1.2. *Shigella* spp. El género *Shigella* está constituido por bacilos Gram-negativos inmóviles, no capsulados que no fermentan la lactosa y son fermentadores de la glucosa con producción de ácido pero no de gas. Este género posee cuatro especies y cada especie varios serotipos: *Shigella dysenteriae* (serogrupo A, trece serotipos), *Shigella flexneri* (serogrupo B, seis serotipos), *Shigella boydii* (serogrupo C, 18 serotipos) y *Shigella sonnei* (serogrupo D, un serotipo). Los únicos huéspedes naturales de *Shigella* son el humano y algunas especies de primates. Son altamente transmisibles con una dosis infecciosa muy baja, del orden de 200 microorganismos. La transmisión tiene lugar a través de alimentos contaminados con heces, por las

manos, fómites o incluso por las moscas. *S. flexneri* es el aislamiento más común en muchas partes del mundo, pero *S. sonnei* predomina en América del Norte y en Europa.

El examen de leucocitos en heces resulta de ayuda pues las shigellas ocasionan una diarrea disintérica por invasión de las células del colon. Los cultivos deben realizarse con muestras de las partes fecales con moco, pus o sangre. Las colonias típicas de *Shigella* en agar MacConkey son transparentes ya que no fermentan la lactosa. Las heces se pueden inocular en medios de cultivo moderadamente selectivos, como el Hektoen o el agar XLD (xilosa-lisina-deoxicolato). Esta bacteria forma colonias verdes transparentes en agar Hektoen (no hay fermentación de la lactosa ni producción de ácido sulfhídrico) y colonias transparentes en agar XLD (no fermentación de xilosa ni modificación de la lisina). En tubos de agar triple azúcar-hierro (TSI) o Kligler, produce una superficie alcalina (no fermentación de la lactosa), un fondo ácido (fermentación de la glucosa) y no hay producción de gas ni ácido sulfhídrico. Aunque se puede utilizar el agar Salmonella-Shigella, este no se recomienda por el bajo rendimiento para aislar *S. sonnei*. Ante la sospecha de una shigella se recomienda en primer lugar una identificación bioquímica presuntiva con TSI o Kligler y LIA (Agar lisina-hierro), a continuación se puede realizar una identificación serológica mediante la aglutinación con antisueros específicos.

El tratamiento de la gastroenteritis aguda por *Shigella* incluye la valoración del grado de deshidratación. Se ha demostrado que la hidratación oral ha sido de ayuda para rehidratar a niños con diarrea invasiva. La administración de un antibiótico apropiado acorta la enfermedad, elimina más rápidamente la shigella de las heces y disminuye las complicaciones potencialmente graves. Debido a los elevados niveles de resistencia a la ampicilina y al trimetoprim-sulfametoxazol observados en los últimos años se ha sugerido como alternativa el tratamiento con una fluoroquinolona o una cefalosporina de tercera generación. Sin embargo, y al igual que se ha descrito para *E. coli* enterotoxigenica y *E. coli* enteroagregativa, se aíslan cepas de *Shigella* resistentes a fluoroquinolonas causantes de diarrea del viajero en individuos que han viajado a la India.

4.1.3. *Salmonella* spp. El género *Salmonella* está formado por un grupo muy heterogéneo de bacterias que colonizan el intestino de numerosas especies animales y del hombre. Este género está constituido por bacilos Gram-negativos, aerobios o anaerobios facultativos, móviles (flagelos peritricos), fermentan la glucosa, maltosa y manitol, pero no la lactosa ni la sacarosa. Poseen antígeno somático (O), antígeno flagelar (H) y pueden tener antígeno de virulencia (Vi), este último es un polisacárido termolábil localizado en la cápsula. El sistema de clasificación más comúnmente utilizado agrupa a *Salmonella* por especies, subespecies y serotipos. Mientras que *Salmonella typhi* y *Salmonella choleraesuis* tienen un serotipo, *Salmonella enterica* tiene más de 2.300

serotipos diferentes. En el esquema de Kaufmann-White, varios serotipos de *Salmonella* se clasifican dentro de diferentes serogrupos. Los serogrupos están basados en un antígeno mayor y uno o más antígenos somáticos menores. Recientemente, se ha desarrollado un esquema de clasificación, que se basa en las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos. Se han identificado seis genogrupos, sin embargo, casi todos los serotipos importantes como causa de patología infecciosa en humanos pertenecen al subgrupo 1. Los otros subgrupos están constituidos por serotipos aislados normalmente del ambiente o de animales de sangre fría. Los serotipos causantes de enteritis varían según la localización geográfica, siendo los más frecuentes en nuestra área Enteritidis y Typhimurium. La nomenclatura recomendada para las salmonelas comporta escribir el nombre de la especie en cursiva seguido del serotipo en redonda y con su primera inicial en mayúscula (por ejemplo: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium).

La transmisión se efectúa por consumo de alimentos de origen animal contaminados, fundamentalmente aves, huevos, ganado vacuno y cerdos, o a partir de portadores asintomáticos que manipulan y contaminan alimentos o, más raramente, de persona a persona, sobre todo en guarderías y hospitales. La infección se localiza en el íleon y colon, por penetración de las células epiteliales y migración hasta la lámina propia, lo que da lugar a una respuesta inflamatoria. La infección es muchas veces autolimitada aunque en algunos casos puede acompañarse de bacteriemia transitoria, sobre todo en lactantes y ancianos.

El diagnóstico etiológico sólo se puede efectuar con seguridad mediante coprocultivo. Se utilizan medios selectivos diferenciales y medios de enriquecimiento. La utilización de medios líquidos de enriquecimiento como el caldo de selenito es fundamental cuando se trata de estudiar portadores asintomáticos, ya que en estos casos suele eliminarse sólo una baja concentración de salmonelas en heces. Sin embargo, en algunos laboratorios el caldo de selenito, debido a su toxicidad ha sido reemplazado por el caldo de Rappaport. Los caldos enriquecidos son también recomendables en cuadros de gastroenteritis agudas con objeto de inhibir la flora fecal competitiva, aunque el elevado número de salmonelas presente en las heces en estos casos no los hace indispensables. El aislamiento de salmonelas se puede realizar en medios poco selectivos como el agar MacConkey o en medios de cultivo con selectividad media como el agar Salmonella-Shigella o agar Hektoen. Todos los medios se incuban en aerobiosis a 37°C. Los medios sólidos deben examinarse a las 24 y 48 horas y el caldo de enriquecimiento se resiembró a las 24 horas en los medios sólidos mencionados anteriormente. La identificación bioquímica se debe complementar con la aglutinación mediante antisueros polivalentes.

En las formas no complicadas de gastroenteritis por *Salmonella* el tratamiento antibiótico no parece

acortar los síntomas ni reduce el estado de portador. Sin embargo, debido al riesgo de complicaciones, se indica tratamiento antibiótico en los recién nacidos, en pacientes de edad avanzada, inmunodeprimidos y portadores de prótesis vasculares o valvulares. Se detectan de modo creciente cepas multirresistentes a los antibióticos, con diversos patrones de resistencia según el área geográfica estudiada. En nuestra experiencia, aunque ha tenido lugar un incremento progresivo en la resistencia al ácido nalidíxico, todos los aislamientos siguen siendo sensibles a fluoroquinolonas aplicando los puntos de corte y criterios de interpretación del CLSI, sin embargo, en estos casos se deben considerar resistentes a todas las fluoroquinolonas. No obstante, los antibióticos de elección siguen siendo ciprofloxacino o cotrimoxazol.

4.1.4. *Campylobacter* spp. El género *Campylobacter* se compone de bacilos Gram-negativos pequeños, ondulados que son móviles por la presencia de un flagelo polar. Todas las especies son oxidasa positiva. La mayoría de las especies son microaerófilas y ligeramente termófilas, pues crecen con mayor facilidad a 42°C que a 37°C. En la actualidad se han definido varios grupos en base a las secuencias del ARNr 16S. El grupo I se denomina *Campylobacterias* verdaderas. En el grupo IA se incluyen las especies termófilas enteropatógenas: 1) *Campylobacter jejuni*, con dos subespecies: la subespecie *jejuni*, que es la principal causante de gastroenteritis y la subespecie *doylei*; 2) *Campylobacter coli*; 3) *Campylobacter laridis* y 4) *Campylobacter upsaliensis*. *Campylobacter upsaliensis* es, posiblemente, una causa importante de gastroenteritis en el ser humano, sin embargo, la verdadera incidencia de la enfermedad producida por esta especie se subestima con los métodos convencionales de cultivo. Entre los factores de virulencia se han descrito flagelos, adhesinas, proteínas de invasión, citotoxinas y enterotoxinas.

El síndrome más común ocasionado por las especies de *Campylobacter* es la enteritis, con un periodo de incubación de tres a cinco días, heces líquidas abundantes y vómitos, deshidratación, fiebre y dolor abdominal. Si bien *Campylobacter* no es una causa frecuente de diarrea del viajero (Tabla 2), se presenta con una elevada prevalencia como causa de enteritis en el Sudeste Asiático. Se halla ampliamente distribuido en el tubo digestivo de diversos animales, en especial en las aves. La infección en el hombre se encuentra diseminada en todos los países.

El diagnóstico se realiza por la identificación del agente etiológico en las heces del paciente. Se puede hacer una identificación presuntiva mediante la visualización del movimiento rápido del microorganismo en microscopía de campo oscuro o en contraste de fases. Los medios de cultivo propios para esta bacteria deben contener sangre o carbón con el fin de eliminar los radicales tóxicos de oxígeno y, entre otros, incluyen: medio de Butzler, medio de Skirrow y medio de Campy BAP, en todos ellos se adicionan antibióticos para restringir el crecimiento de la microbiota intestinal. Los cultivos se deben

incubar en una atmósfera microaerofílica y una temperatura de incubación de 42°C. Necesitan para crecer un periodo de incubación comprendido entre 48 y 72 horas. La identificación preliminar de las cepas se basa en la tinción de Gram de las colonias crecidas en medios selectivos, observándose la morfología sinusoide y la prueba de la oxidasa. Además *C. jejuni*, la especie más frecuentemente aislada, es hipurato positiva, por lo que la realización de esta prueba permite diferenciar esta especie del resto.

La gastroenteritis por *Campylobacter* es típicamente una infección autolimitada que se trata mediante la reposición de los líquidos y electrolitos que se han perdido. El tratamiento antibiótico se puede utilizar en los pacientes con infecciones graves o con sintomatología prolongada. *Campylobacter* es sensible a una amplia variedad de agentes antibacterianos. Eritromicina es el antibiótico de elección para el tratamiento de las enteritis. La resistencia a las fluoroquinolonas en los últimos años ha aumentado de una manera drástica por lo que actualmente estos agentes antibacterianos son menos eficaces.

4.1.5. *Yersinia* spp. El género *Yersinia*, compuesto por cocobacilos Gram-negativos no esporulados, incluye 15 especies con 3 subespecies. De entre ellas, destacan tres especies invasivas capaces de resistir la respuesta inmune y producir patología humana: *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Yersinia enterocolitica*. *Y. enterocolitica* está ampliamente distribuida en la naturaleza y posee numerosos reservorios animales, siendo el cerdo la fuente de infección más importante de las cepas patógenas para el hombre. Puede causar gastroenteritis aguda, enterocolitis, linfadenitis mesentérica y/o ileitis terminal, septicemia y cuadros reactivos como artritis, eritema nodoso y síndrome de Reiter. En 2005 la incidencia de yersiniosis en la Unión Europea fue de 2,25 casos por 100.000 habitantes, con tasas más altas en los países nórdicos. En España se declararon 327 casos (0,76/100.000 habitantes). Aunque sin una clara estacionalidad se producen más casos en verano y comienzo del otoño, siendo los menores de cinco años el grupo que registra mayor incidencia.

El diagnóstico microbiológico puede realizarse mediante cultivo de muestras representativas del cuadro clínico del paciente. Esta especie crece en los medios escasa y moderadamente selectivos para enterobacterias como el agar MacConkey y el agar Salmonella-Shigella, en los que forma colonias transparentes, en agar entérico de Hektoen las colonias son de color salmón porque fermenta la sacarosa y en agar xilosa-lisina-desoxicolato forma colonias amarillas por fermentar la xilosa. Al crecer más lentamente que el resto de las enterobacterias a 37°C las colonias son muy pequeñas y pueden pasar desapercibidas. Para mejorar su recuperación se usan medios selectivos y diferenciales, como el agar CIN que incorpora cefsulodina, irgasan, novobiocina y manitol. Los métodos de enriquecimiento no son rentables para el diagnóstico

de la diarrea, ya que no incrementan significativamente la recuperación de fenotipos patógenos de *Y. enterocolitica*. Se pueden usar para el diagnóstico de adenitis mesentérica o ileitis terminal y, con bajo rendimiento, para el diagnóstico de cuadros reactivos. En estos casos se puede usar tampón fosfato salino (PBS) 0,15M a pH 7,4, incubando a 4°C durante períodos prolongados de tiempo (14-21 días), realizando subcultivos semanales.

Esta especie es heterogénea y compleja, de modo que alberga fenotipos con capacidad patógena junto a otros carentes de determinantes de patogenicidad. Por ello no todas las cepas aisladas poseen significación clínica, lo que hace recomendable estudiar marcadores epidemiológicos (serotipado, biotipado, fagotipado) que ayuden a caracterizar el aislado y su pertenencia, o no, a fenotipos patógenos. El serotipado es sencillo y parece ser un buen marcador de virulencia. Aunque existen más de 60 serogrupos, la mayoría de las cepas patógenas humanas pertenecen a los serogrupos O:1, 2a, 3, O:3, O:5, 27, O:8 y O:9. En nuestro país hay un claro predominio del serogrupo O:3. La clasificación en biogrupos (1A, 1B, 2, 3, 4, 5) es un método más lento y laborioso. Las cepas virulentas portan el plásmido denominado pYV (*plasmid for yersinia virulence*), que contiene tres genes *yadA*, *yop* y *ysc* que intervienen en su patogenia. Los genes *inv* (invasión) y *ail* (*attachment invasion locus*) son necesarios para la adherencia y la invasión. Los serogrupos O:3 y O:9 sintetizan dos β-lactamasas cromosómicas que confieren resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación. El serogrupo O:8 suele ser sensible a ampicilina.

4.1.6. *Bacillus cereus*. *Bacillus cereus* tiene reservorio telúrico, se encuentra en la materia orgánica en descomposición, en la tierra, los vegetales y el agua. Está integrado por bacilos aerobios o anaerobios facultativos formadores de esporas que pueden contaminar los alimentos crudos o cocidos y elaborados. Se multiplica entre 10°C y 48°C, de modo que si los alimentos contaminados se mantienen a temperatura ambiente se pueden multiplicar los microorganismos, produciendo y liberando toxinas que ocasionan brotes de toxiinfección alimentaria. Existen dos tipos de enterotoxinas producidas por *B. cereus*, las enterotoxinas termolábiles que provocan diarrea (síndrome diarreico) y las toxinas eméticas, que son termoestables (síndrome emético). Debido a la levedad del cuadro y a que la detección microbiológica de esta bacteria no se realiza rutinariamente en pacientes con diarrea, la incidencia real podría ser superior a la estimada.

En medios no selectivos o enriquecidos, como agar sangre, esta especie forma colonias beta-hemolíticas, grandes y planas, con apariencia de vidrio esmerilado. En los casos de toxiinfección alimentaria la presencia de microbiota polimicrobiana en las muestras (heces, vómitos, alimentos) hace aconsejable el empleo de medios selectivos y

diferenciales como manitol-polimixina-yema de huevo. La polimixina B actúa como agente selectivo, el carácter diferencial lo confiere la actividad lecitinasa de *B. cereus* sobre la yema de huevo y su incapacidad para catabolizar el manitol. Los medios se incuban a 37°C durante 48 horas. El enriquecimiento previo en caldo de soja triptona con polimixina impide el cultivo cuantitativo.

El diagnóstico de certeza de toxiinfección por *B. cereus* debe hacerse mediante la detección de toxina en los alimentos y/o en las heces. Hay métodos comerciales para detectar la enterotoxina que produce diarrea mediante aglutinación pasiva inversa por látex o por ensayo inmunoquímico. Estas técnicas pueden aplicarse en alimentos, en heces y a aislamientos de *B. cereus* a partir de cultivo para determinar su toxigenicidad.

4.1.7. *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* suele producir brotes de toxiinfección alimentaria por mecanismo toxigénico. Este microorganismo produce una gran variedad de sustancias extracelulares y toxinas. Algunas tienen una acción enzimática mientras que otras, como las enterotoxinas y las toxinas del shock tóxico, son potentes inductores de citocinas que actúan como superantígenos bacterianos. Alrededor del 50% de los aislamientos de *S. aureus* producen enterotoxinas que pertenecen a cinco tipos serológicos distintos (A, B, C, D y E), subdividiéndose el tipo C en tres subtipos (C1, C2 y C3). Estas enterotoxinas son polipéptidos de entre 20 y 30 kDa, termoestables y resistentes a las enzimas digestivas, se producen en los alimentos y se ingieren preformadas. Por ello, aparecen de forma brusca vómitos y diarrea, tras un período de incubación muy corto (1-6 horas). Como ocurre con otras toxiinfecciones, su incidencia parece estar subestimada debido al carácter leve y autolimitado del proceso y a la falta de confirmación microbiológica en la mayoría de los casos.

La etiología se confirma mediante la detección de enterotoxinas en los alimentos sospechosos. Hay métodos comerciales de detección de antígeno para realizar este diagnóstico. Uno de ellos detecta las enterotoxinas A, B, C y D mediante aglutinación pasiva inversa con partículas de látex y otro mediante ensayo inmunoquímico. Ambas técnicas pueden utilizarse en alimentos, heces y en aislamientos de *S. aureus* a partir de cultivo para determinar si son cepas toxigénicas.

4.1.8. *Clostridium perfringens*. *Clostridium perfringens* produce cuatro toxinas diferentes (alfa, beta, epsilon e iota) y sus cepas se distribuyen en cinco tipos (A-E) según el tipo de toxina que produzcan. *C. perfringens* tipo C puede producir enteritis necrotizante del intestino delgado por acción de la toxina beta, que es sensible a tripsina, de modo que solo se produce clínica si hay déficit de este enzima. *C. perfringens* produce sobre todo toxiinfecciones alimentarias que casi siempre se asocian con consumo de alimentos cárnicos almacenados inadecuadamente. *C. perfringens* tipo A produce una enterotoxina termolábil citotóxica que

induce un cuadro leve y autolimitado de diarrea secretora con dolor abdominal. Las esporas, que contaminan los alimentos, germinan cuando se calientan y las formas vegetativas se multiplican a temperatura ambiente hasta alcanzar la dosis infectante, más de 10^6 unidades formadoras de colonias por gramo (ufc/gr) de alimento. En el intestino delgado los microorganismos ingeridos esporulan y liberan la enterotoxina que se une a un receptor de membrana induciendo una alteración de la permeabilidad dependiente del ión calcio que produce la salida de metabolitos e iones de bajo peso molecular.

El diagnóstico de la toxiinfección alimentaria por *C. perfringens* puede hacerse mediante cultivo cuantitativo de heces de los pacientes. Recuentos superiores a 10^6 ufc por gramo de heces sugieren esta etiología, pero valores similares también pueden detectarse en personas asintomáticas. Por ello es preferible realizar cultivos cuantitativos de muestras de los alimentos implicados. En este caso también se consideran positivos recuentos superiores a 10^6 ufc por gramo de alimento. No obstante, el método diagnóstico más seguro es la detección de enterotoxina en heces, que puede realizarse en cultivo tisular de células Vero con anticuerpos neutralizantes para inhibir los efectos citopáticos o mediante técnicas de detección de antígeno, como ensayo inmunoquímico o aglutinación pasiva inversa con látex. Esta última técnica puede realizarse con heces y con aislamientos de *C. perfringens* para determinar si son toxigénicos. La enterotoxina de *C. perfringens* es muy estable lo que permite la conservación de las muestras durante períodos prolongados de tiempo hasta su estudio. No se aconseja la detección parcial o total del gen de la enterotoxina en aislados de *C. perfringens* mediante PCR o sondas marcadas ya que su presencia no implica la capacidad de producir la enterotoxina durante la esporulación en un ambiente similar al intestinal, condición imprescindible para producir la enfermedad.

4.1.9. *Vibrio* spp. El género *Vibrio* está constituido por bacilos Gram-negativos ligeramente curvados, aerobios y anaerobios facultativos, móviles, catalasa y oxidasa positivos, que fermentan la glucosa y son sensibles al compuesto vibriostático O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropilpteridina). Forman parte del medio ambiente hídrico, marino y fluvial, regulando su proliferación la temperatura y el grado de salinidad. El género *Vibrio* contiene 84 especies de las que al menos doce son patógenas para el hombre o han sido aisladas de muestras clínicas. Aunque la mayoría se asocian a infecciones gastrointestinales, también pueden producir patología extraintestinal, sobre todo bacteriemia, otitis, conjuntivitis e infecciones de piel y tejidos blandos. La gastroenteritis causada por vibrios puede ser de tipo cólico o no cólico. La forma epidémica de cólera, causada por *Vibrio cholerae* serogrupos O:1 y O:139, cursa con vómitos y diarrea líquida secretora muy abundante, con pérdida rápida de agua y electrolitos que causa una profunda

deshidratación. La forma no colérica, producida por otros serogrupos de *V. cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio hollisae* y *Vibrio fluvialis*, principalmente, cursa con diarrea acuosa autolimitada, náuseas, vómitos y dolor abdominal, sin la gravedad ni el carácter epidémico del cólera.

Se designan colectivamente con el nombre *V. cholerae* no O:1, no-O:139 a los microorganismos análogos a las cepas epidémicas pero que no aglutinan con los antisueros O:1 ni O:139, reciben también el apelativo de cepas no epidémicas y anteriormente se han denominado vibrios no aglutinables (NAG) y vibrios no coléricos (VNC). Se han asociado a la producción de casos aislados y pequeños brotes de diarrea. De distribución prácticamente mundial, su prevalencia es baja, al menos en países desarrollados. El mecanismo de transmisión más importante son los mariscos contaminados que se consumen crudos. En los brotes estudiados no se han demostrado infecciones secundarias o transmisión interhumana.

V. parahaemolyticus es un vibrio marino halófilo ligado a la producción de toxiinfecciones alimentarias. Aunque su distribución parece mundial, el mayor número de casos se produce en zonas costeras y países que por sus hábitos culinarios o dietéticos incluyen pescado crudo o crustáceos como parte importante de su alimentación. En España es reciente la descripción de toxiinfecciones alimentarias de esta etiología.

La tolerancia al pH alcalino y un crecimiento rápido en la superficie de los medios líquidos, propician el uso para el aislamiento de *V. cholerae* y otras especies de caldos de enriquecimiento, como el agua de peptona alcalina (pH 8,5). Se incuba a 37°C durante un máximo de 6-8 horas para evitar la pérdida de selectividad y el sobrecrecimiento saprófito. La incubación a 42°C incrementa significativamente la recuperación de *V. cholerae*, con menor grado de contaminación fecal. La mayoría de las especies pueden crecer en los medios poco selectivos utilizados para el aislamiento de enteropatógenos, como el agar de MacConkey, sin embargo, el sobrecrecimiento de la microbiota comensal puede dificultar la detección de las colonias de vibrios por lo que es recomendable el empleo del agar selectivo TCBS (tiosulfato-citrato sales biliares-sacarosa), que además facilita el aislamiento de *V. cholerae*, ya que en 18 horas a 37°C forma colonias amarillas al utilizar la sacarosa. La identificación bioquímica de *V. cholerae* se debe complementar con la aglutinación in porta con antisueros específicos de los serogrupos O:1 y O:139. El serogrupo O:1 se puede serotipar posteriormente como Inaba u Ogawa con los antisueros específicos de serotipo. La diferencia entre los biotipos clásico y eltor de *V. cholerae* se realiza con pruebas bioquímicas. Dado que *V. cholerae* O:1 y O:139 tienen idénticos genes *ctx*, ambos microorganismos pueden identificarse rápidamente por técnicas de hibridación de colonias con sondas de ADN. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa se emplea para detectar

secuencias del gen *ctx*. No obstante, estas técnicas y otras de tipado intraespecífico o de producción de toxina colérica pueden realizarse en laboratorios de referencia tras declarar el caso a la autoridad sanitaria. En situación de brote epidémico de cólera todos los casos de diarrea deben controlarse bacteriológicamente para conocer con exactitud el número de casos y optimizar el uso de los recursos, dirigiendo de un modo eficiente la aplicación de las medidas de control.

La mayor parte de las especies son sensibles a tetraciclinas, aminoglucósidos, cloranfenicol, ácido nalidíxico y fluoroquinolonas. *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. damsela* y *V. furnisii* son resistentes a ampicilina y a cefalosporinas de primera generación.

4.1.10. *Aeromonas mesófilas*. El grupo de las *Aeromonas* mesófilas incluye las especies que pueden crecer a 37°C. Su hábitat normal lo constituyen los ambientes acuáticos con escasa o baja salinidad. Los alimentos pueden ser otro vehículo de transmisión importante. La clasificación del género en especies es particularmente compleja. A la dificultad para establecer la correcta posición taxonómica de algunas especies, se une que a un mismo fenotipo le correspondan genotipos distintos. Actualmente se acepta la existencia de 23 especies, alguna de las cuales posee además distintas subespecies o biovariedades que, con fines prácticos, se incluyen en tres grandes grupos: *Aeromonas hydrophila* complex, *Aeromonas caviae* complex y *Aeromonas sobria* complex. No obstante, solo cuatro fenoespecies se aíslan con una frecuencia significativa a partir de heces: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *Aeromonas veronii* biovar *sobria* y *Aeromonas trola*.

Las especies incluidas en el grupo de las *Aeromonas* mesófilas suelen crecer bien en los medios de cultivo poco selectivos o enriquecidos utilizados de forma rutinaria (agar McConkey, agar sangre). Resulta más compleja su recuperación de muestras contaminadas o con una importante microbiota acompañante, como las heces. En general, las *Aeromonas* crecen en los medios utilizados para el aislamiento de otros enteropatógenos (agar MacConkey y Hektoen), si bien su morfología coliforme y el carácter lactosa positivo de hasta un 30% de las cepas, plantean una dificultad añadida para distinguir las de otras bacterias aisladas en muestras fecales. Los medios selectivos más utilizados para el aislamiento de *Aeromonas* de heces son el agar sangre con ampicilina (ASA-10 µg/ml de ampicilina) y el agar CIN (agar cefsulodina-irgasan-novobiocina). El primero se incuba a 37°C durante 18-24 horas y permite realizar la detección de la actividad oxidasa directamente de las colonias y observar la actividad β-hemolítica; sin embargo, no es un medio excesivamente selectivo. Además impide la recuperación de *A. trola*, que es sensible a ampicilina. Una buena alternativa es el medio CIN, descrito inicialmente para el aislamiento de *Y. enterocolitica* de heces, pero en el que crecen

ambos géneros bacterianos (*Yersinia* y *Aeromonas*). Este medio en su fórmula original permite el crecimiento de la mayoría de las especies y, en algunos estudios, consigue un incremento del 35% en las tasas de aislamiento. La utilidad de los caldos de enriquecimiento para el aislamiento de *Aeromonas* de heces es una cuestión controvertida. Se ha comprobado que el empleo de agua peptonada como caldo de enriquecimiento tan solo contribuye en un porcentaje no superior al 1% a la tasa final de aislamientos. Esto hace pensar que los pacientes con diarrea por *Aeromonas* eliminan gran cantidad de microorganismos en sus heces, lo que permite su fácil detección en los medios de siembra directa, sin que se precise del enriquecimiento de las muestras.

Como hemos comentado, la identificación bioquímica de las especies de *Aeromonas* es muy compleja, lo que hace difícil conseguir un protocolo con pocas pruebas, que sea de fácil realización y que garantice una identificación correcta. Con el fin de identificar todas las especies del género de forma rápida y fiable se ha diseñado un método molecular basado en el análisis de los patrones de RFLP del gen ARNr 16S, obtenidos tras digerir el gen con distintas endonucleasas, que permite identificar las especies aisladas con mayor frecuencia en muestras clínicas. Son prácticamente resistentes a la ampicilina (excepto *A. trota*), carboxipenicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación. Suelen ser sensibles a acilureidopenicilinas, cefalosporinas de tercera generación, aminoglicósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, cotrimoxazol y fluoroquinolonas.

La enteropatogenicidad de *Aeromonas* spp. es aún controvertida. Se reconocen conjuntos subespecíficos de cepas que albergan un grupo particular de genes codificadores de enterotoxinas y otros determinantes de patogenicidad y que son enteropatógenos, si bien la investigación rutinaria de estos caracteres es inabordable en microbiología clínica. Para no prejuzgar la autoría de la diarrea en los pacientes en que se aísla de las heces este grupo de microorganismos podría incluirse en el informe una nota o comentario en los siguientes términos: "Las cepas de *Aeromonas* spp. se han relacionado con la producción de diarrea, aunque puede haber cepas que no se comportan como enteropatógenas".

4.1.11. *Plesiomonas shigelloides*. Estos microorganismos son bacilos Gram-negativos, móviles, indolígenos y fermentan glucosa e inositol. Se clasifican dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, a pesar de ser citocromo oxidasa positivo. Tiene una amplia distribución y se aíslan en el agua, el suelo y algunos animales (sobre todo peces y mariscos). Han sido implicados en brotes de gastroenteritis asociados al consumo de ostras y pescado crudo y se han descrito casos de diarrea esporádica, preferentemente en adultos, sin ninguna asociación epidemiológica. Además puede producir infecciones extraintestinales, como sepsis y meningitis, de elevada mortalidad, afectando generalmente a

pacientes con enfermedades de base. *Plesiomonas shigelloides* no forma parte de la microbiota normal del hombre, por ello, su aislamiento en heces de pacientes con diarrea, en ausencia de otro enteropatógeno, debería considerarse significativo, informando su probable responsabilidad en el proceso infeccioso.

P. shigelloides crece en la mayoría de los medios de cultivo poco selectivos utilizados para el aislamiento de enteropatógenos, como el agar MacConkey. Se han diseñado algunos medios selectivos y diferenciales que favorecen su detección en las heces, como el inositol-verde brillante-sales biliares; sin embargo, no se aconseja su utilización rutinaria dada su escasa incidencia. Aunque crece en caldos de enriquecimiento como agua peptonada alcalina y caldo tetracionato, estos medios líquidos sólo se recomiendan para muestras no humanas, como alimentos. Son resistentes a ampicilina mientras que suelen ser sensibles a la mayoría de los antibióticos utilizados habitualmente para otros enteropatógenos.

4.1.12. *Clostridium difficile*. *Clostridium difficile* es un bacilo Gram-positivo anaerobio y esporulado que puede causar desde diarrea leve hasta cuadros graves de colitis pseudomembranosa. Para llevar a cabo su acción patógena ha de producirse una reducción de la flora comensal habitual del intestino, lo que permite un mayor crecimiento de *C. difficile*, y la producción de las toxinas A (TcdA) y B (TcdB) que median su capacidad lesiva. TcdB es una potente citotoxina, mientras que TcdA es una enterotoxina, clave en la patogenia. Probablemente, ambas toxinas actúan de forma sinérgica. En torno a un 20% de los casos de diarrea asociada a antibióticos y casi todos los casos de colitis pseudomembranosa están causados por cepas toxigénicas de *C. difficile*. Las infecciones son más frecuentes en pacientes hospitalizados, de edad avanzada, o inmunodeprimidos, que han recibido tratamiento antibiótico. Puede aislarse también de las heces en un 3% de individuos sanos y hasta en el 80% de niños menores de un año, siendo las manifestaciones clínicas excepcionales en esta población, debido, probablemente, a la ausencia a esta edad en el colon de receptores para las toxinas. Las cepas de *C. difficile* asociadas a enfermedad han de ser toxigénicas y, generalmente, producen ambas toxinas, aunque hay casos de infección por cepas productoras sólo de TcdB, cuya frecuencia es variable según el área estudiada. Desde 1999 se han comunicado varios brotes graves producidos por cepas (TcdA-, TcdB+). La cepa prevalente pertenece, en distintos entornos geográficos, al ribotipo O17, toxinotipo VIII (A-,B+). La resistencia a clindamicina mediada por *erm(B)* es una característica común en estas cepas, que presentan una distribución clonal mundial.

Los procedimientos para el diagnóstico de enfermedad producida por *C. difficile* pueden dividirse en tres categorías: a) pruebas para la detección de sus productos (glutamato deshidrogenasa, ácidos grasos volátiles, toxinas), b)

pruebas para detección de sus genes (ARNr 16S, *tcdA*, *tcdB*) y c) cultivo para aislamiento de cepas toxigénicas.

Los métodos más usados son los que detectan las toxinas a partir de heces diarreicas recientes mediante ensayos de citotoxicidad, cultivo toxigénico y/o enzimoimmunoensayo. No se recomienda el análisis de heces sólidas ya que disminuye de modo importante la sensibilidad y, además, existen portadores sanos de *C. difficile* toxigénico. El procedimiento diagnóstico más sensible es el denominado cultivo toxigénico, es decir, el ensayo de citotoxicidad de TcdB en líneas celulares a partir de aislados de *C. difficile* obtenidos por cultivo. Sin embargo, es recomendable realizar a la vez un ensayo de citotoxicidad directa de las heces ya que aumenta la sensibilidad de la técnica en un 5% y, de ser positivo, reduce el tiempo necesario para el diagnóstico. El ensayo de citotoxicidad se basa en la detección del efecto citopático específico de la citotoxina B de *C. difficile* en fibroblastos humanos, células MRC-5 o células K-1 de ovario de hámster chino. El cultivo toxigénico consiste en inocular con un aislado de *C. difficile* en un caldo de enriquecimiento, como caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI), incubarlo en anaerobiosis a 37°C durante 24 horas, filtrar el cultivo con un filtro de membrana, diluir el filtrado, añadir la dilución al cultivo celular elegido e incubar éste a 37°C, haciendo lecturas a las 24 y 48 horas. La especificidad del efecto citopático se comprueba realizando el mismo ensayo en paralelo en un cultivo celular que contenga la antitoxina de TcdB. En el ensayo de citotoxicidad directa se parte de un filtrado de la muestra de heces que se procesa de forma idéntica. Aunque considerado como el método de referencia, es lento, laborioso, no está bien estandarizado y requiere disponer de antitoxina y mantener los cultivos celulares. Puede emplearse como prueba confirmatoria, pero no es asequible para los laboratorios convencionales.

El cultivo de las heces puede realizarse en medios selectivos como el agar fructosa-cicloserina-cefoxitina (CCFA) o el agar yema de huevo-cicloserina-cefoxitina (CCEY), o bien, en medios no selectivos, como el agar sangre para anaerobios, con un pretratamiento de las heces con alcohol absoluto durante 30-60 minutos o mediante choque térmico a 80°C durante 10 minutos. Tras 24-48 horas de incubación en anaerobiosis, las colonias son no hemolíticas, mates, planas, grandes e irregulares, de color amarillento a grisáceo, su estructura interna recuerda un mosaico de cristales, huelen a cuadra debido a la producción de p-cresol y muestran fluorescencia bajo luz UV. Aunque el cultivo es muy sensible, es poco específico ya que pueden crecer cepas no toxigénicas de *C. difficile* y otros clostridios.

La detección del ARNr 16S de *C. difficile* tiene el inconveniente de que también es positiva con cepas no toxigénicas. La PCR en tiempo real para los genes *tcdA* y *tcdB* es más rápida que los ensayos de citotoxicidad y detectaría portadores asintomáticos.

Disponemos también de varios enzimoimmunoensayos comerciales para la detección de TcdA, TcdB o ambas, que incluyen pruebas de EIA convencionales y de membrana. La principal ventaja de estos últimos es la rapidez ya que se obtienen resultados en 15-30 minutos. Estos test tienen una buena sensibilidad y especificidad comparados con el test de citotoxicidad. Las muestras de heces para detectar toxinas se deben procesar lo antes posible o almacenarlas a 2-8°C durante un máximo de 3 días o a -80°C. La toxina se degrada a temperatura ambiente y puede llegar a ser indetectable transcurridas más de 2 horas de su recogida.

El procedimiento óptimo para realizar el diagnóstico de la infección por *C. difficile* es realizar simultáneamente la detección de toxinas en heces mediante EIA y el cultivo 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. El cultivo y la investigación de la producción de toxina del aislado incrementa el resultado positivo de infección por *C. difficile* en torno a un 10%, mejorando la seguridad y la fiabilidad del diagnóstico.

A comienzos de los años 2000 se detecta la propagación en hospitales de Estados Unidos y Canadá de una cepa hipervirulenta de *C. difficile*, ribotipo O27 y toxinotipo III, que es resistente a fluoroquinolonas, produce la toxina binaria CDT y tiene una delección parcial del gen regulador *tcdC* que incrementa notablemente la producción de las toxinas A y B, y con ello, la gravedad, la mortalidad, las complicaciones y el riesgo de recaídas. Esta cepa se ha detectado ya en diversos países europeos por lo que parece conveniente incorporar su detección al esquema diagnóstico, lo que puede concretarse en cultivar las heces, al menos las muestras que han sido positivas para la investigación de toxinas, y conservar las cepas de aislados toxigénicos para su tipado y caracterización posterior.

4.2. VIRUS

El diagnóstico de las infecciones víricas intestinales se basa en métodos directos, consistentes en la detección en la muestra de heces del paciente de partículas víricas, antígenos o ácidos nucleicos del virus implicado en la etiología del cuadro de gastroenteritis. Los métodos serológicos tienen utilidad en estudios de seroprevalencia o de análisis de la respuesta inmunitaria, como en el estudio de seroconversión en niños vacunados frente a rotavirus. En la tabla 4 se indica una relación de diversas técnicas comercializadas para el diagnóstico de infecciones producidas por virus entéricos.

Tabla 4. Relación de técnicas comercializadas para el diagnóstico de infecciones por virus entéricos

Técnicas de inmunocromatografía para rotavirus / adenovirus

Combi-Strip (Coris Bioconcept)
GastroVir-Strip (Coris Bioconcept)
Biorapid Rota/Adeno (Biokit)
Simple Rota-Adeno (Operón)
Combo-Strip (Real)
Rotascreen® Dipstick (Microgen Bioproducts)
Diarlex Rota-Adeno (Orion Diagnóstica)
VIKIA Rota-Adeno (bioMérieux)
RIDA® Quick Rotavirus/Adenovirus Combi (r-Biopharm)
Rotavirus CerTest – sólo rotavirus
Rota-Strip (Coris Bioconcept) – sólo rotavirus

EIA rotavirus

IDEIA® Rotavirus (Oxoid)
Premier™ Rotaclone® (Meridian Bioscience)
Pathfinder Rotavirus EIA (Bio-Rad)
RIDASCREEN Rotavirus R-Biopharm
VIDAS Rotavirus (BioMérieux)
Rotascreen® EIA, (Microgen Bioproducts)

EIA de membrana

ImmunoCard Stat! Rotavirus (Meridian Bioscience)
ImmunoCard Stat! Adenovirus (Meridian Bioscience)

Aglutinación con látex

Slide Adenokit-Slide Rotakit (bioMérieux)
Rotagen (Biokit)
Adenogen (BioKit)
Rotascreen® Latex (Microgen Bioproducts)
Diarlex Rota-Adeno (Orion Diagnóstica)
Pastorex Rotavirus (Bio-Rad)

Técnicas de inmunocromatografía para astrovirus

Astrovirus CerTest Biotec

EIA astrovirus

IDEIA® Astrovirus (Oxoid)

EIA norovirus

RIDASCREEN® Norovirus (R-Biopharm)
IDEIA® Norovirus (Oxoid)

EIA adenovirus

Adenovirus RIDASCREEN (R-Biopharm, UK)
Premier Adenoclone – Types 40/41 EIA (Meridian Bioscience)

La causa más frecuente de gastroenteritis víricas la constituyen los rotavirus del grupo A, principales agentes etiológicos de gastroenteritis infantiles. Otros virus productores de estas infecciones son los astrovirus, adenovirus entéricos, calicivirus (norovirus y sapovirus), además de otros agentes con una prevalencia menor o desconocida, como coronavirus, torovirus, picobirnavirus, kobuvirus (virus Aichi), bocavirus, etc.

4.2.1. Aislamiento de virus en cultivos celulares.

Los virus entéricos resultan difíciles de aislar en cultivos celulares, pudiéndose sólo lograr el cultivo de algunos de ellos. Algunas cepas clínicas de rotavirus del grupo A se pueden cultivar en líneas celulares continuas de riñón de mono MA104, en células LLC-MK2 o en células Caco-2 de adenocarcinoma de colon. Los astrovirus pueden también cultivarse en células Caco-2, si bien con frecuencia es necesario realizar pases ciegos. En ambos casos es recomendable suplementar el medio de cultivo celular con tripsina (1 a 10 µg/ml). Otros virus entéricos (norovirus, sapovirus, picobirnavirus) no se han logrado replicar *in vitro* de forma estable, a pesar de los numerosos intentos realizados, o lo hacen con dificultad (adenovirus entéricos serotipos 40 y 41 en fibroblastos de pulmón Graham 293). Por todo ello, en general el aislamiento en cultivo no es un procedimiento aplicable al diagnóstico de rutina de las gastroenteritis víricas.

4.2.2. Microscopía electrónica. La microscopía electrónica (M.E.) de transmisión, así como la inmunomicroscopía electrónica (I.M.E.), continúa siendo una técnica de gran valor en el diagnóstico de las infecciones víricas intestinales, principalmente porque permite detectar cualquier tipo de partículas víricas presentes en la muestra, sin necesidad de recurrir al empleo de "sondas específicas" (anticuerpos, cebadores, etc.). Es una técnica rápida que no requiere un procesamiento complejo de la muestra; sus limitaciones más importantes son la necesidad de disponer de un microscopio electrónico, de personal experimentado y la relativa baja sensibilidad de las técnicas de tinción negativa habitualmente empleadas, ya que se considera que se requiere la presencia de más 10⁶ partículas víricas por gramo de muestra para que puedan ser visualizadas al microscopio electrónico. Aunque muchos virus entéricos se excretan en las heces en el curso de la infección en cantidades de 10¹¹-10¹² partículas víricas por gramo, se recomienda concentrar la muestra para observarla al microscopio electrónico. La muestra de heces se resuspende al 10-20% en tampón fosfato salino y posteriormente se clarifica por centrifugación a 3.000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se somete a ultracentrifugación a 50.000 rpm durante 90 minutos, o como alternativa se precipitan las partículas víricas con sulfato amónico (30% p/v) a 4°C durante 1 hora y posterior centrifugación a 15.000 rpm durante 15 minutos. El sedimento obtenido se deposita sobre una rejilla de cobre de microscopía electrónica (400-mesh) recubierta con una membrana de Formvar carbonada, donde se lava con PBS y se tiñe con una solución al 2% de ácido fosfotúngstico a pH 6,3.

Las rejillas se observan a 60 kV a 20.000-50.000 aumentos. La identificación de las partículas víricas se realiza atendiendo a las características morfológicas (tamaño, simetría, contorno, estructuras internas, etc.), resultando fácil la identificación de rotavirus y adenovirus, y algo más compleja la de astrovirus y calicivirus (sapovirus y norovirus). Es

posible la identificación de otros virus implicados en la producción de gastroenteritis, como coronavirus, torovirus, etc., así como otros virus presentes en las heces (enterovirus, bacteriófagos, etc.).

4.2.3. Técnicas de detección de antígenos víricos. Los métodos más asequibles y rápidos, y a la vez suficientemente sensibles y específicos en el diagnóstico de las infecciones víricas intestinales son los **métodos inmunológicos** que permiten la detección de antígenos víricos en las heces. Estos son los métodos más empleados por la mayoría de los laboratorios. En la actualidad se dispone de métodos de inmunocromatografía, técnicas de enzimoanálisis (EIA) convencional, técnicas de EIA de membrana y técnicas de aglutinación de partículas de látex para distintos virus entéricos. La mayoría de los métodos inmunológicos comercializados para diagnóstico de virus entéricos se han desarrollado para detectar antígenos de rotavirus, principalmente la proteína VP6 de la cápside, y utilizan anticuerpos monoclonales y/o policlonales.

4.2.4. Rotavirus

4.2.4.1. Detección de antígenos de rotavirus. Existe una amplia variedad de inmunoensayos comercializados para la detección de antígenos de rotavirus del grupo A en las heces, la mayoría de ellos con valores de sensibilidad y especificidad superiores al 90%. En una evaluación de las tres técnicas más habituales de detección de antígeno de rotavirus, EIA, ICG y aglutinación de partículas de látex, recogida en el Procedimiento número 19 de los Procedimientos en Microbiología de la SEIMC (2005) se establece: 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 ICG, 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. Sin embargo, el tiempo de realización de la técnica es más largo y se requiere un equipamiento específico (espectrofotómetro). Debido a que la rapidez en el diagnóstico es de gran valor en las gastroenteritis víricas, es recomendable recurrir a un método rápido como la ICG, un EIA de membrana o la aglutinación de partículas de látex. No obstante, dado que en ocasiones la especificidad de estas técnicas no es elevada, las muestras positivas deberían ser confirmadas con un ELISA de captura o una técnica de RT-PCR.

Técnicas de inmunocromatografía. Actualmente existen comercializadas numerosas técnicas inmunocromatográficas para la detección de antígeno de rotavirus sólo o frecuentemente en combinación con la detección de antígenos de adenovirus en las heces (Tabla 4). La prueba se realiza mediante un dispositivo que contiene un pocillo para dispensar la muestra, donde se mezcla

con un conjugado constituido por microesferas de poliestireno de diferentes colores unidas respectivamente a anticuerpos monoclonales anti-rotavirus y anti-adenovirus, una zona de prueba con una membrana de cromatografía con un anticuerpo monoclonal anti-rotavirus y un anticuerpo monoclonal anti-adenovirus fijados, y una zona de control con un anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón. En la membrana aparecerán unas bandas coloreadas indicando si la prueba es positiva o negativa y cuál es el antígeno detectado. Como limitación a la especificidad de estas técnicas inmunocromatográficas, se ha observado que en algunos casos la presencia de sangre en las heces puede originar resultados falsos positivos.

Técnicas de EIA. Los enzimoimmunoensayos realizan la detección cualitativa de antígeno de rotavirus en heces. Estas técnicas pueden ser consideradas semi-cuantitativas, ya que aportan cierta información sobre la cantidad de antígeno vírico excretado por las heces en comparación con las otras técnicas antigénicas en las que el resultado sólo es cualitativo.

Técnicas de EIA de membrana. Son métodos cualitativos, rápidos y fáciles de realizar que se presentan en pruebas individualizadas. Para su realización se requiere un equipamiento mínimo y el resultado, que se lee visualmente, se obtiene en menos de 30 minutos.

4.2.4.2. Métodos moleculares. Es necesario extraer previamente los ácidos nucleicos de la muestra para proceder a la reacción de transcripción inversa (en caso de virus con genoma ARN) y a la PCR. Las técnicas de extracción de ácidos nucleicos de las heces más aconsejables son la extracción con silica e isotiocianato de guanidinio, el uso del reactivo Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante, el empleo de silica magnética aplicando el sistema NucliSens EasyMAG (BioMérieux), o el uso del kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) para detección de virus con genoma de ARN. Para estudio por PCR de virus ADN (por ejemplo, adenovirus) es eficaz el kit QIAamp DNA stool Mini Kit (Qiagen). El empleo de sistemas automatizados de extracción de ácidos nucleicos (como MagNa Pure LC de Roche Diagnostics) es una excelente opción.

Las técnicas moleculares de transcripción inversa seguida de PCR convencional (RT-PCR) se han generalizado como métodos de detección de rotavirus en heces, en otras muestras clínicas (suero, LCR) y en muestras ambientales utilizando cebadores específicos de los segmentos génicos que codifican las proteínas VP6, VP7 y VP4. Se trata de métodos "in house" (caseros) que requieren la visualización de los productos amplificados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y que posteriormente permiten además la identificación de los genotipos detectados mediante la realización de reacciones de PCR multiplex semi-anidadas y/o por secuenciación de los amplicones. Estas técnicas mejoran la sensibilidad de los métodos inmunoenzimáticos, aunque no proporcionan

información cuantitativa. En los últimos años se han desarrollado instrumentos y técnicas de PCR a tiempo real que detectan y cuantifican la concentración de virus en la muestra. Además todo el análisis se realiza en un solo tubo y se reduce el tiempo necesario para disponer de los resultados.

4.2.5. Norovirus. Los norovirus son la principal causa de gastroenteritis no bacteriana en individuos de todas las edades y constituyen la causa más frecuente de brotes de gastroenteritis aguda, a menudo asociados al consumo de agua y alimentos contaminados o en instituciones como residencias de ancianos, colegios, hospitales, hoteles, etc. Se puede establecer un diagnóstico presuntivo cuando se cumplen los siguientes criterios: periodo de incubación de 24 a 48 horas, duración de los síntomas de 12 a 60 horas, vómitos en más del 50% de los casos, coprocultivos negativos, y/o existencia de casos secundarios (criterios de Kaplan).

4.2.5.1. Detección de antígenos de norovirus. Existen dos métodos de enzimoimmunoanálisis (EIA) comercializados para el diagnóstico de norovirus: IDEIA® Norovirus (Oxoid, Thermo Fisher Scientific) y RIDASCREEN® Norovirus (R-Biopharm). En una evaluación reciente de ambos métodos, considerando la RT-PCR la técnica de referencia, se ha determinado que la sensibilidad de IDEIA Norovirus y de RIDASCREEN Norovirus es del 58,9% y del 43,8%, respectivamente, y la especificidad del 93,9% y del 96,3%, respectivamente. El ensayo IDEIA Norovirus muestra una reactividad más amplia, detectando una mayor variedad de genotipos que el RIDASCREEN. En todos los casos se recomienda confirmar los resultados del EIA por RT-PCR. La escasa sensibilidad de los métodos EIA hace que sean poco eficaces en el diagnóstico de casos esporádicos de gastroenteritis, pero sí tienen aplicación en el estudio de brotes epidémicos de los que se disponga un número amplio de muestras (al menos 5-10) procedentes de individuos afectados.

Hasta el momento no se han comercializado en nuestro país métodos rápidos de detección de antígeno de norovirus.

4.2.5.2. Métodos moleculares. El diagnóstico de las infecciones por norovirus se realiza principalmente por RT-PCR, que se considera actualmente el método de referencia. Se han descrito muy diversos pares de cebadores (*primers*) para amplificar secuencias diana, generalmente del gen de la ARN polimerasa vírica, aunque también del gen de la cápside. La posterior secuenciación de los amplificados obtenidos permite identificar el genogrupo (I o II) y el genotipo de la cepa de norovirus detectada (GI.1 a GI.8 y GII.1 a GII.17). Un método rápido de identificación de secuencias de norovirus se puede encontrar en la página web de la red europea de virus transmitidos por alimentos (Foodborne Viruses in Europe Network, FBVE):

<https://hypocrates.rivm.nl/bnwww/Divine-Event/index.html>

El empleo de la RT-PCR a tiempo real cuantitativa se ha generalizado últimamente en laboratorios que procesan elevados números de muestras.

4.2.6. Adenovirus. Los adenovirus entéricos pertenecen al subgrupo F, serotipos 40 y 41, y se asocian con casos de diarrea en niños, generalmente menores de 3 años, pacientes inmunocomprometidos y trasplantados de médula ósea. Respecto a los adenovirus “no entéricos”, aunque descritos ocasionalmente como agentes causales de diarrea, no existen pruebas concluyentes que demuestren su enteropatogenicidad.

4.2.6.1. *Detección de antígeno de adenovirus (género / Adenovirus 40 y 41).* El diagnóstico habitualmente se realiza por métodos de inmunocromatografía, aglutinación de partículas de látex, y EIA (Tabla 4).

Es importante distinguir si el método que se utiliza detecta antígeno de género (antígeno común de hexón) o antígenos específicos de los serotipos 40 y 41, pues sólo en este último caso el diagnóstico será atribuible a estos adenovirus entéricos.

4.2.6.2. *Métodos moleculares.* Se puede realizar PCR con oligonucleótidos específicos, tanto PCR convencional como a tiempo real. Otros métodos de caracterización de adenovirus entéricos son el análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLPs), la hibridación en *dot-blot*, y la secuenciación de los productos amplificados.

4.2.7. Astrovirus. Los astrovirus humanos, con 8 serotipos establecidos por inmunomicroscopía electrónica, ensayos de neutralización y EIAs tipo-específicos, se consideran la segunda o la tercera causa de diarrea vírica en niños pequeños.

4.2.7.1. *Detección de antígenos de astrovirus.* Desde hace años se dispone de un EIA comercializado (IDEIA® Astrovirus, Oxioid) basado en anticuerpos monoclonales y policlonales frente a antígenos conservados de la cápside vírica, con una sensibilidad (91%) y una especificidad (98%) similares a las de la inmunomicroscopía electrónica. En 1995 se desarrolló un EIA para tipificar astrovirus en muestras humanas (TYPE-EIA), basado en anticuerpos monoclonales frente a los distintos serotipos para capturar los antígenos y un anticuerpo monoclonal reactivo de grupo (8E7) como anticuerpo detector.

4.2.7.2. *Métodos moleculares.* Se han desarrollado distintos métodos de RT-PCR para diagnosticar infecciones por astrovirus. Para aumentar la sensibilidad de la RT-PCR se ha combinado el aislamiento en cultivo celular con la RT-PCR, con buenos resultados. Existen también comercializados métodos de RT-PCR para diagnóstico de calicivirus y astrovirus (Argene).

4.2.8. Sapovirus. Los sapovirus, género de la familia *Caliciviridae*, infectan a niños y adultos y pueden producir brotes epidémicos de gastroenteritis. El prototipo de este género es el virus Sapporo y se han descrito 5 genogrupos.

Hasta el momento no existen métodos inmunológicos comercializados para el diagnóstico

de las infecciones por sapovirus, por lo que el diagnóstico debe realizarse por técnicas de RT-PCR con cebadores específicos de sapovirus o con cebadores comunes a norovirus y sapovirus. Existe un par de cebadores (p289 y p290) que detectan simultáneamente rotavirus, norovirus y sapovirus en muestras clínicas. Los genotipos de las cepas se determinan habitualmente por secuenciación de regiones amplificadas del gen de la ARN polimerasa y del gen de la cápside.

4.2.9. Interpretación e información de los resultados. La interpretación de los resultados de los métodos inmunológicos para detección de antígenos deberá hacerse siguiendo las indicaciones del fabricante del procedimiento (punto de corte de los métodos de EIA, etc.). Todos los resultados positivos deberán en principio informarse como indicativos de la presencia del virus detectado en la muestra, a no ser que deban confirmarse por un método con mayor especificidad. Los resultados obtenidos con técnicas consideradas de cribado (inmunocromatografía, látex) deberían ser confirmados por un EIA de captura o por una técnica molecular.

En condiciones óptimas, los resultados de las técnicas de PCR deberían confirmarse por hibridación con sondas específicas (Southern blot) o por secuenciación de los amplificados.

Existen infecciones por virus entéricos clínicamente sintomáticas y asintomáticas, por lo que es posible la detección de un virus patógeno intestinal en ausencia de sintomatología. Es también factible el aislamiento de más de un virus distinto, pues son posibles las infecciones mixtas, sobre todo como consecuencia de una transmisión hídrica o por alimentos contaminados de la infección. En estos casos también son posibles las infecciones mixtas por patógenos bacterianos y víricos.

En los brotes epidémicos se considera necesario demostrar la presencia del mismo agente en al menos un 50% de las muestras analizadas para poder atribuirle la etiología del brote.

4.3. PARÁSITOS

Las parasitosis intestinales son una causa frecuente de trastornos gastrointestinales. Tanto los protozoos (amebas, flagelados, ciliados, coccidios y microsporidios), como los helmintos (nematodos, cestodos y trematodos) pueden provocar un cuadro infeccioso que afecte al tubo digestivo. La principal manifestación es el síndrome diarreico, que puede ir acompañado de fiebre, náuseas, vómitos, dolor abdominal y malabsorción intestinal.

Su diagnóstico se realizará fundamentalmente con la determinación de la presencia de protozoos, larvas o huevos de helmintos en las heces. En las heces, los protozoos suelen encontrarse en la fase de quiste y de trofozoíto. Los helmintos aparecen habitualmente en forma de huevos y de larvas, aunque a veces también pueden observarse gusanos adultos enteros o en segmentos. Por lo general, las tenias adultas y sus segmentos resultan visibles a simple vista, pero los huevos, las larvas, los trofozoítos y los quistes

sólo pueden verse al microscopio. La observación de esas estructuras requiere la preparación adecuada de la muestra. Para ello, primero se realizará un examen macroscópico, seguido de un cuidadoso examen microscópico.

Cada parásito o grupo de parásitos, según su estadio, puede requerir una técnica diagnóstica determinada. Los métodos empleados con más frecuencia se basan en la observación microscópica, mediante examen en fresco, examen tras concentración, o mediante técnicas de tinción.

Como regla general se recomienda hacer el estudio parasitológico, en tres muestras seriadas de heces, en pacientes con diarrea prolongada (más de 4 días de duración) en los que no se detecten otros enteropatógenos. Los datos clínico-epidemiológicos del paciente (edad, estado inmunológico, procedencia, o antecedente de un viaje a zona endémica, e ingestión de determinados alimentos) nos darán una orientación diagnóstica. En el caso de brotes de diarrea en colectivos como guarderías, sospecharemos *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium*. Si el paciente está inmunocomprometido (fundamentalmente pacientes con SIDA), buscaremos *Cryptosporidium* spp, *Isospora* spp, *Enterocitoozon bienusi* y *Giardia lamblia*. En personas procedentes de países con parasitosis endémicas, se debe sospechar *Entamoeba histolytica* y la presencia de helmintos. Determinados helmintos, se asocian a situaciones muy características. Suele ser frecuente que en pacientes procedentes de zonas endémicas, como de África subsahariana, se diagnostique una parasitación múltiple por nematodos intestinales. En la zona del área mediterránea es frecuente la presencia de *Strongyloides stercoralis*. Si existe el antecedente de baños en lagos, se debe pensar en *Schistosoma* spp. Si el paciente proviene del Sudeste asiático o China, se debe sospechar *Opistorchis*, *Clonorchis*, *Paragonimus*, *Fasciolopsis* o *Metagonimus*. La presencia de *Fasciola*, en nuestro país, es más frecuente en Galicia y se asocia a la ingesta de berros. *Giardia lamblia* y *Enterobius vermicularis* suelen provocar episodios en familiares y en contactos próximos al paciente. Si existen antecedentes de contacto con animales, se puede sospechar, *Isospora* spp, *Sarcocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., *Balantidium coli*, y las helmintiasis. *Trichinella spiralis* se asocia a brotes epidémicos de diarrea, simulando una intoxicación alimentaria. En gastritis de aparición brusca, y con antecedentes de ingestión de pescado crudo, se debe pensar en la posibilidad de *Anisakis*.

4.3.1. Examen macroscópico. Hasta su recepción en el laboratorio, las muestras se deben conservar adecuadamente. Si el transporte se demora, es conveniente mantenerlas refrigeradas en nevera o añadir alguna sustancia que impida la acción bacteriana y conserve los parásitos en condiciones idóneas para su correcta identificación. Se puede utilizar formol diluido en agua (al 5 ó 10%, según la consistencia fecal), o merthiolatiodoformalina (MIF).

Tan pronto como se reciban las heces en el laboratorio se debe observar su consistencia (grado de humedad) y anotar en el recipiente una de las letras: F (formada), B (blanda), S (suelta), A (acuosa). También es importante ver si presentan mucosidad o sangre. La consistencia o grado de humedad servirá de orientación para saber si es más probable encontrar trofozoítos o quistes. Si se reciben varias muestras al mismo tiempo, hay que examinar primero las que contengan sangre o moco, y a continuación las muestras líquidas. Estas muestras son las que con mayor probabilidad contienen trofozoítos amebianos, que mueren al poco tiempo de la excreción, por lo que deben examinarse en la primera hora que sigue a ésta. Los trofozoítos se mantienen si las heces se incorporan en un medio de transporte-fijación adecuado con formalina. Las heces formadas pueden examinarse en cualquier momento del día, pero no deben dejarse de un día para otro, ya que los quistes pueden desintegrarse.

4.3.2. Examen microscópico

4.3.2.1. Examen en fresco. Es la técnica más sencilla y fácil para examinar las heces; este método debe aplicarse en todos los laboratorios de nivel periférico. Para la preparación en fresco pueden utilizarse la solución salina, solución yodada y azul de metileno. Se realiza homogeneizando la muestra fecal en un portaobjetos con las soluciones anteriores tamponado a pH ácido. A continuación se coloca el cubreobjetos y se procede a la observación por microscopía óptica. Se recomienda seleccionar aquellas partes de la muestra que presenten restos de sangre, moco o pus. El examen debe ser exhaustivo, comenzando por un ángulo del cubreobjetos, desplazando el campo del microscopio hasta el otro extremo, y continuando el movimiento en zig-zag hasta completar toda la superficie. Primero se debe realizar un examen a 100 aumentos, y a continuación a 400 aumentos.

- La preparación con solución salina se usa en el examen microscópico preliminar de las heces. Se utiliza primordialmente para observar los huevos y larvas de gusanos, los trofozoítos y los quistes. También puede revelar la presencia de eritrocitos, leucocitos y residuos no patógenos.
- La preparación con solución yodada se utiliza principalmente para teñir el glucógeno y los núcleos de los quistes, si existen. En general, con esta preparación pueden identificarse los quistes.
- La preparación con azul de metileno debe hacerse cada vez que se observen trofozoítos amebianos en una preparación salina, o cuando se sospeche su presencia. El azul de metileno tiñe los trofozoítos amebianos, pero no los quistes amebianos, ni los trofozoítos ni los quistes de flagelados. Esta coloración sólo debe usarse para las muestras frescas sin conservantes, no se usa en las muestras tratadas con conservantes, en las que los organismos han muerto.

4.3.2.2. *Técnicas de concentración.* Las técnicas de concentración de las heces se realizan cuando la muestra tiene pocos microorganismos, y es posible que no se detecten parásitos en el examen en fresco. Así pues, siempre que sea posible, debe concentrarse la muestra y es lo recomendable en nuestro medio. Los huevos y larvas de gusanos, y los quistes de protozoos, pueden recuperarse por concentración, pero los trofozoítos de protozoos no se verán ya que el procedimiento suele destruirlos. Por ese motivo es imprescindible el examen en fresco como fase inicial del estudio microscópico.

Existen dos métodos de concentración:

- Concentración por sedimentación, consiste en homogeneizar las heces en una solución de formalina. Esta emulsión se filtra y se añade éter. A continuación se centrifuga de forma que los quistes de protozoos y los huevos de helmintos se sedimentan en el fondo del tubo.
- Concentración por flotación, se basa en una diferencia de densidades entre el parásito y la solución en la que se emulsionan las heces (se utilizan soluciones de alta densidad como sulfato de zinc al 33% en agua destilada). En este caso, los parásitos se quedan en el sobrenadante. El inconveniente de esta técnica radica en que los quistes protozoarios pueden experimentar alteraciones debido tanto a la aparición de corrientes osmóticas a través de la membrana quística, como a la agresión que puede producir en la cubierta alguna de las sustancias empleadas.

4.3.2.3. *Tinciones específicas.* El diagnóstico de los coccidios y de los microsporidios requiere la utilización de tinciones específicas. Para los coccidios se utiliza una modificación de la tinción de Ziehl-Neelsen, denominada tinción de Kinyoun. Debido a que las paredes de los quistes de los coccidios tienen características de ácido-alcohol resistencia, esta tinción permite demostrar su presencia. Adquieren un color rosa-rojizo que destaca sobre el azul del fondo. Para la observación de los microsporidios se utiliza la tinción tricrómica de Weber, que permite penetrar la membrana de las esporas dándoles un color rosado. Para el diagnóstico de microsporidios también se utiliza la microscopía electrónica.

Para ambas tinciones, puede utilizarse muestra directa o el concentrado de heces. Se prepara una fina extensión en un portaobjetos, se tiñe, y se observa al microscopio a 400 y 1000 aumentos.

4.3.2.4. *Determinación de tamaños con el microscopio.* La identificación de los parásitos requiere conocer su tamaño. Para ello se utiliza un micrómetro ocular. Es un ocular con una escala graduada, que se inserta en el microscopio y nos permite medir el tamaño, en micrómetros.

4.3.3. **Protozoos.** Constituyen el grupo de parásitos más a menudo asociado a diarrea, incluye las amebas, flagelados, ciliados, coccidios y microsporidios.

4.3.3.1. *Amebas (Phylum Sarcodinia)*

Dentro del grupo, ***Entamoeba histolytica*** es el principal patógeno. Provoca disentería amebiana (diarrea con sangre y ulceración de la mucosa) y es una posible causa de diarrea del viajero. Debe hacerse el diagnóstico diferencial con la diarrea por *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli* enteroinvasivo y enterohemorrágico. El examen de sangre oculta en heces es siempre positivo. El examen microscópico de trofozoítos y quistes sólo es positivo en un tercio de los casos. En el examen en fresco de una muestra reciente, los trofozoítos (12-40 µm) aparecen de color verdoso, refringentes y móviles; pueden contener eritrocitos en su interior. Los quistes miden de 10 a 15 µm y tienen menos de 5 núcleos. El método diagnóstico de referencia es el cultivo. Existen métodos diagnósticos comerciales que determinan antígenos específicos de *E. histolytica*. Morfológicamente es indistinguible de ***Entamoeba dispar***, que no es patógena. Sólo se diferenciarán haciendo una determinación de isoenzimas. Otros métodos diagnósticos de *E. histolytica* son la PCR, que determina la subunidad pequeña de ARNr, y la serología, que es muy sensible (90-100%), pero poco específica, ya que permanece positiva durante largo tiempo, sin permitir diferenciar la infección reciente de la antigua.

Existen otras amebas, que son parásitos comensales no patógenos, que deben diferenciarse microscópicamente de *E. histolytica*. Su presencia en heces determina una exposición fecal-oral. Estas amebas son ***Entamoeba coli***, cuyos quistes son de mayor tamaño (> 15 µm) y con más núcleos (5-8); ***Entamoeba hartmanni***, más pequeña, con quistes de 10 µm, con 4 núcleos, y trofozoítos menores de 12 µm; ***Endolimax nana***, la más pequeña, con quistes de 6-10 µm y 4 núcleos, y trofozoítos de 8-12 µm; ***Iodamoeba butschlii***, con quistes uninucleares (9-14 µm) y una gran masa densa de glucógeno que se tiñe con el yodo.

Blastocystis hominis es un protozoo anaerobio localizado en ciego e intestino grueso. Es variable en morfología (vacuolada, amebiforme, granular o quística) y en tamaño (5-40 µm). Recuerda por estas características a los quistes amebianos, pero difiere de ellos en su organización interna. Su modo de transmisión probablemente es oral-fecal. Su patogenicidad es discutida, produce síntomas gastrointestinales (diarrea, dolor abdominal, náuseas y vómitos) y síntomas sistémicos (anorexia, malestar general). No está justificado el tratamiento antibiótico cuando se observa su presencia en heces.

4.3.3.2. *Flagelados (Phylum Mastigophora).* El principal representante de este grupo es ***Giardia lamblia***. Los quistes ovoides (8-14 µm) son la forma infectiva, los trofozoítos (9-21 µm) son piriformes, surgen por la rotura del quiste en el duodeno, y afecta fundamentalmente a niños. Provoca un cuadro de diarrea con moco, malabsorción y esteatorrea. El diagnóstico se realiza por demostración microscópica del parásito en heces y en aspirado duodenal. Existen diferentes pruebas inmunológicas para su diagnóstico, como la

determinación de antígenos en heces, con una sensibilidad y especificidad cercanas al 100%, la inmunocromatografía, y la inmunofluorescencia indirecta, que además son útiles para el cribado en población infantil y para confirmar la curación.

En este grupo también se incluye ***Dientamoeba fragilis***, hoy incluida dentro del grupo de los flagelados, y antes clasificada como ameba. Sólo presenta forma de trofozoíto de 5-12 µm, con 1 ó 2 núcleos, y no tiene estadio de quiste. Su transmisión no está clara, tal vez sea fecal-oral a partir de huevos de nematodos intestinales como los oxiuros. Su papel como agente causal de diarrea es controvertido.

Existen otros flagelados, no patógenos, como ***Chilomastix mesnili***, que presenta quistes (6-10 µm) en forma de limón y ***Trichomonas hominis***, que sólo presenta forma de trofozoíto (5-15 µm).

4.3.3.3. *Ciliados (Phylum Ciliophora)*.

Balantidium coli, único miembro de los ciliados que es patógeno para el ser humano, es el protozoo de mayor tamaño. Produce una enfermedad similar a la amebiasis, ya que elabora sustancias proteolíticas y citotóxicas que median en la invasión tisular y en la formación de úlceras intestinales. Se transmite por la ingestión de quistes infecciosos que, al romperse en el intestino grueso, liberan trofozoítos cubiertos de cilios pilosos que ayudan a su movilidad. Los quistes son pequeños (40-60 µm), con la pared refringente, y los trofozoítos son muy grandes (50-200 µm). Su diagnóstico microscópico en fresco es sencillo por su gran tamaño. Los factores de riesgo para adquirir la infección son tener contacto con cerdos, y condiciones higiénicas deficientes. El hombre es un hospedador accidental.

4.3.3.4. *Coccidios (Phylum Apicomplexa)*. Afectan fundamentalmente a pacientes inmunodeprimidos provocando un cuadro de diarrea crónica y severa difícil de combatir.

Entre ellos, ***Isospora belli*** se contrae al ingerir agua o alimentos contaminados con esporoquistes maduros procedentes de residuos humanos. La transmisión persona-persona es difícil porque los quistes necesitan pasar 24-48h en el medio ambiente para producir esporas y convertirse en infecciosos. Se desarrollan en el epitelio intestinal, provocando lesiones tisulares y una infección autolimitada. Se diagnostica mediante observación microscópica de ooquistes ovoides (25 µm), que se tiñen de un color rosa-rojizo con tinción ácido-alcohol modificada o tinción de Kinyoun.

En el caso de ***Cryptosporidium parvum***, la forma infecciosa es un ooquiste de pared gruesa (3-6 µm) que una vez ingerido por el hospedador, se exquista en el intestino delgado y libera cuatro esporozoítos, que penetran en la porción apical de los enterocitos, donde tienen lugar la fase reproductiva que dará lugar a los ooquistes infecciosos. La diarrea por ***Cryptosporidium*** se observa como forma endémica en niños de países con escasos recursos, como diarrea del viajero, como diarrea prolongada en pacientes inmunodeprimidos, sobre todo en pacientes con SIDA, y como brotes epidémicos

ocasionados por aguas contaminadas en países desarrollados. Su diagnóstico se realiza mediante la demostración microscópica de los ooquistes en un concentrado de heces, y con la tinción de Kinyoun que les da un color rosa-rojo.

Cyclospora cayetanensis se transmite principalmente a partir de agua contaminada, que a su vez puede contaminar alimentos, y hay descritos brotes por ingestión de frambuesas. Los esporoquistes (8-10 µm) requieren un periodo de esporulación en el ambiente antes de convertirse en infecciosos, por lo que no es fácil la transmisión persona a persona. Es resistente a la cloración. Produce un cuadro de diarrea acuosa acompañada de enteropatía generalizada con náuseas, vómitos, dolor abdominal, pérdida de peso y fiebre, principalmente durante la estación lluviosa en las regiones tropicales. Afecta especialmente a niños, viajeros y pacientes con SIDA. Al igual que los otros coccidios, se diagnostica mediante la demostración en heces de esporoquistes con la tinción de Kinyoun.

La infección por ***Sarcocystis*** es una coccidiosis zoonótica, que se produce por ingestión de carne de cerdo o bovino con bradizoítos, que evolucionan en el intestino delgado a esporoquistes (15 x 8 µm), con 4 esporozoítos en su interior, y a ooquistes (155 x 20 µm). Aunque la mayoría de las infecciones son asintomáticas, la sarcocistosis intestinal puede manifestarse en forma de una enteritis necrosante o eosinofílica segmentaria que requiere resección intestinal. El diagnóstico se hace mediante la observación de los ooquistes ácido-alcohol resistentes en las heces.

4.3.3.5. *Microsporidios (Phylum Microsporidia)*. Son parásitos intracelulares obligados. Se reproducen mediante pequeñas esporas de 1- 2,5 µm que se adquieren por ingesta o por vía respiratoria. Hay seis especies que afectan al hombre, pero las más frecuentes son ***Enterocytozoon bienewisi*** y ***Encephalitozoon intestinalis***. Provocan una diarrea acuosa crónica en pacientes con SIDA. El diagnóstico es microscópico, demostrando la presencia de las esporas en las heces con la tinción tricrómica de Weber, que les da un color rosa-rojizo.

4.3.4. **Helminetos**. Existen tres grupos de helmintos de importancia médica: nematodos (gusanos redondos), cestodos (gusanos en cinta) y trematodos (o duelas). Las fases que normalmente se detectan con las técnicas de diagnóstico son los huevos y las larvas. Con menor frecuencia, pueden verse gusanos adultos como en el caso de ***Ascaris*** y ***Enterobius***. El diagnóstico de algunos cestodos se basa en la observación de las proglótides o segmentos. No obstante, en la mayoría de las infecciones por gusanos, el diagnóstico se hace con la identificación microscoscópica de sus huevos.

Las características para la **identificación de los huevos** son las siguientes:

1. Tamaño. Se miden la longitud y la anchura, que se encuentran por lo general dentro de límites específicos.
2. Forma. Característica de cada especie.

3. Fase del desarrollo en las heces. En algunas especies, los huevos constan de una sola célula; en otros, pueden tener varias; y en otras especies ya están embrionados (es decir, contienen una larva) cuando se eliminan por las heces.
4. Grosor de la cubierta del huevo. Ciertas especies, como *Ascaris*, tienen una cubierta gruesa; otras, como los anquilostomas, la tienen más fina.
5. Color. Algunos huevos son incoloros, por ejemplo, los de anquilostomas y *Enterobius*; mientras que otros son amarillos o marrones (*Ascaris*, *Trichuris*).
6. Presencia de ciertas características como opérculos (tapas), espículas, tapones, ganchos o cubiertas exteriores mamiladas.

Identificación de larvas: las larvas que se observan en las muestras fecales suelen ser larvas rhabditiformes (primera fase) de *Strongyloides stercoralis*. No obstante, si la muestra fecal tiene más de 12 horas, las larvas pueden convertirse en larvas filariformes (fase infectiva), que deben distinguirse de las larvas de anquilostomas que eclosionan en las heces a las 12-24 horas. La aparición de las larvas filariformes de *S. stercoralis* pueden indicar una hiperinfección sistémica.

En las preparaciones con yodo, el primordio genital resulta más visible. El yodo mata las larvas y facilita la observación de sus características. Es preciso utilizar una lente de gran aumento en seco para ver estas estructuras.

- Si se observa una larva con una cavidad bucal corta y un primordio genital prominente, se trata de una larva de *Strongyloides*.
- Si se observa una larva con una cavidad bucal larga y no se aprecia el primordio genital, se trata de una larva de *Ancylostoma*.

4.3.4.1. Nematodos intestinales

***Ascaris lumbricoides*.** La infección se adquiere por ingestión de huevos a partir de agua o alimentos contaminados. Provoca una clínica gastrointestinal leve, debida a la presencia de los gusanos adultos, de hasta 40 cm, en el intestino. El diagnóstico se realiza determinando la presencia de huevos (50-60 μm), en heces, que típicamente tienen una gruesa cubierta, mamelonada, si son maduros, y un color amarillo-marrónáceo. Con menor frecuencia, pueden verse gusanos adultos en las heces.

***Enterobius vermicularis* (oxiuros).** Es el más común de los helmintos en nuestro medio, afecta fundamentalmente a niños. La infección se adquiere por ingestión de huevos, la transmisión es persona a persona, es muy frecuente la autoinfección mano-boca. Las hembras del gusano adulto ponen huevos (50-60 μm), translúcidos, en los márgenes anales, provocando prurito nocturno y bruxismo. La aparición del gusano adulto en las heces del niño puede ser el primer signo de alarma. El diagnóstico se realiza demostrando la presencia de huevos en área perianal, mediante el test del celo o cinta de Graham (se pega en los márgenes anales una tira de cinta transparente engomada, se retira, se coloca sobre

un portaobjetos y se observa al microscopio a 400 aumentos). Es rara la presencia de huevos en las heces.

***Strongyloides stercoralis*.** La infección se adquiere cuando las larvas filariformes (350-600 μm) penetran a través de la piel que está en contacto con aguas estancadas o barro. Por el torrente circulatorio las larvas alcanzan varios órganos; en el intestino evolucionan a gusanos adultos que ponen huevos, y eclosionan dando lugar a larvas rhabditiformes (200-300 μm). El cuadro gastrointestinal es muy variado, desde diarrea alternada con estreñimiento, a manifestaciones más graves que predisponen a una enterocolitis bacteriana e íleo paralítico. El diagnóstico se realiza mediante la demostración de larvas rhabditiformes en heces.

***Trichuris trichiura* (tricocéfalo).** La infección se adquiere por ingestión de agua o alimentos contaminados con sus huevos (50 μm), con forma de barril o limón, y tapones polares. En el intestino se desarrolla el gusano adulto que tiene en forma de látigo. Afecta fundamentalmente a niños, en casos severos de hiperinfección puede provocar prolapso rectal. El diagnóstico se realiza determinando la presencia de los huevos, en las heces del paciente, o en los márgenes anales mediante la cinta de Graham.

***Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* (Uncinarias).** La infección se adquiere cuando las larvas filariformes penetran la piel en contacto con aguas estancadas o barro, emigran por el torrente circulatorio alcanzando los pulmones, posteriormente son deglutidas y alcanzan el intestino. Allí los gusanos adultos ponen huevos ovalados (60 μm), de fina cutícula, indistinguibles entre las dos especies, que se eliminarán con las heces, siendo la forma diagnóstica. Provocan diarrea, dolor abdominal y anemia.

***Anisakis*.** La infección se contrae por ingestión de larvas del parásito presentes en pescado crudo. Las larvas penetran en la mucosa gástrica e intestinal y dan lugar a gusanos adultos (2- 2,5 cm). Provocan dolor abdominal, náuseas, vómitos y diarrea. El diagnóstico se realiza por la historia de ingestión de pescado crudo, y se confirma con la visualización del gusano obtenido por gastroscopia, cirugía o hallado en el vómito del paciente.

***Capillaria philippinensis*.** Es autóctona del Sudeste asiático. Se adquiere por la ingestión de pescado de agua dulce que contenga sus larvas. Provoca dolor abdominal con diarrea, náuseas y vómitos. Se diagnostica mediante la presencia de sus huevos (45 x 20 μm) en heces.

4.3.4.2. Nematodos tisulares

***Trichinella spiralis*.** Es un nematodo tisular, pero su maduración en las paredes del duodeno y yeyuno produce náuseas, vómitos, dolor abdominal cólico, y diarrea, comenzando 24 horas después del inicio de la infección, hasta 5 días más tarde. Se diagnostica identificando larvas enquistadas en biopsia muscular.

***Gnathostoma*.** Se adquiere por ingestión de pescado crudo de agua dulce o anfibios. Provoca dolor en epigastrio, fiebre y vómitos, por la migración

de las larvas en la cavidad abdominal. Se diagnostica por la historia de ingesta de pescado, y con el hallazgo del gusano adulto en el tubo digestivo.

4.3.4.3. Cestodos

Taenia solium y Taenia saginata. La infección se adquiere por ingesta de cisticercos viables presentes en la carne del cerdo (*T. solium*) o de vaca (*T. saginata*), cruda o poco cocinada. En el intestino el escólex se evagina y se adhiere, convirtiéndose en tenia adulta en semanas. Provocan diarrea, dolor abdominal, estreñimiento, o diarrea, y prurito anal. El diagnóstico se realiza mediante la presencia en heces de huevos, o de proglótides (o segmentos) del gusano adulto. Los huevos (35-45 µm) de ambas especies son indistinguibles, presentan estriaciones radiales y tres ganchos en su interior. También es posible diagnosticarlos en los márgenes anales mediante la cinta de Graham. Para diferenciar las dos especies se utilizan las proglótides grávidas, *T. solium* presenta menor número de ramas uterinas (7-13), que *T. saginata* (15-20).

Hymenolepis nana. Afecta fundamentalmente a niños. La infección se transmite por ingesta de huevos (30-50 µm) a través de agua o alimentos contaminados, que el intestino darán lugar a un gusano adulto (10-60 cm), que se adherirá a la mucosa del íleon. Provocan diarrea con heces pastosas y moco, y dolor abdominal. El diagnóstico se hace demostrando la presencia de los huevos esféricos en las heces.

Hymenolepis diminuta. La infección en el hombre es poco frecuente. Se diagnostica mediante el hallazgo de sus huevos (70 µm) en heces, que son de mayor tamaño que los de *H. nana*.

Diphyllobotrium latum. Su infección se adquiere por ingesta de pescado poco cocinado. Provoca dolor abdominal y diarrea. Se diagnostica con la presencia de sus huevos (70 x 50 µm) en las heces.

4.3.4.4. Trematodos

Schistosoma mansoni, Schistosoma intercalatum y Schistosoma japonicum producen diarrea por causa tóxica, asociada a náuseas y vómitos, durante el periodo de maduración de los gusanos adultos en los sinusoides hepáticos. La infección se adquiere cuando las cercarias, presentes en aguas contaminadas, penetran en la piel. Estas se transformarán en esquistosómulas y más tarde en gusanos adultos. La puesta de huevos en la pared intestinal provoca una diarrea difusa o disentería. Su diagnóstico se realiza mediante la presencia de huevos en heces. Los huevos de *S. mansoni* (140 x 60 µm) presentan una espícula lateral prominente, los de *S. intercalatum* (175 x 60 µm) tienen una espícula terminal y los de *S. japonicum* son de menor tamaño (80 x 60 µm) y presentan una espícula lateral menos evidente. El diagnóstico de **S. haematobium** (150 x 60 µm) se hace en orina, es muy poco frecuente ver huevos en heces, pero pueden encontrarse como un hallazgo casual.

Existen otros trematodos, que se adquieren por vía oral, a través de agua o alimentos contaminados, y cuyos huevos pueden aparecer en las heces,

aunque la clínica que producen no sea predominantemente gastrointestinal. **Paragonimus**, se transmite por ingesta de cangrejos. **Opisthorchis, Clonorchis, Metagonimus y Heterophyes**, se adquieren por ingesta de pescado, marisco o caracoles contaminados. **Fasciola y Fasciolopsis** se transmiten por ingesta de plantas acuáticas de ríos y lagos. **Dicrocoelium dendriticum** se adquiere a partir de la ingesta de hormigas. El hallazgo de los huevos en heces de todos estos trematodos es diagnóstico de infección.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. J Clin Microbiol 2001; 39: 498-505.
2. Buesa J, Colomina J, Raga J, Villanueva A, Prat J. Evaluation of reverse transcription and polymerase chain reaction (RT/PCR) for the detection of rotaviruses: applications of the assay. Research in Virology 1996; 147: 353-361.
3. Craig P, Ito A. Intestinal cestodes. Curr Opin Infect Dis 2007; 20: 524-532.
4. Europe Centre for Disease Prevention and Control. The First European Communicable Disease Epidemiological Report. Stockholm, 7 June 2007.
5. Gadea I, Soriano F. *Yersinia enterocolitica*: aspectos prácticos. Control Calidad SEIMC (http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/yersinia.htm)
6. García Bermejo IM. Diagnóstico de las infecciones humanas causadas por especies halófilas del género Vibrio. Control de calidad SEIMC (http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/vibrio.htm)
7. Gray JJ, Kohli E, Ruggeri FM, Vennema H, Sanchez-Fauquier A, Schreier E, Gallimore CI, Iturriza-Gomara M, Giraudon H, Pothier P, Di Bartolo I, Inglesse N, de Bruin E, van der Veer B, Moreno S, Montero V, de Llano MC, Hohne M, Diedrich SM. European multicenter evaluation of commercial enzyme immunoassays for detecting norovirus antigen in fecal samples. Clin Vaccine Immunol 2007; 14: 1349-1355.
8. John DT, Petri WA. Markell and Vague's Medical Parasitology. 9th edition, 2006. Saunders editions, St. Louis, Missouri.
9. Kageyama T, Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N., Katayama, K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. J Clin Microbiol 2003; 41: 1548-1557.
10. Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. Clin Microbiol Infect 2006; 12 (Suppl 6): 2-18
11. López Brea M, Sanz JC, Usera M, Reina, J, Cardeñoso L, Vasallo F. Gastroenteritis bacterianas, víricas, parasitarias y toxi-infecciones alimentarias, Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 1^a edición. 1994. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>
12. Ludert JE, Alcalá AC, Liprandi F. Primer pair p289-p290, designed to detect both noroviruses and sapoviruses by reverse transcription-PCR, also detects rotaviruses by cross-reactivity. J Clin Microbiol 2004; 42: 835-836.

13. Manson's Tropical Diseases. 20th edition. 1996. Gordon C Cook editor. Saunders editions, London, UK.
14. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 2003.
15. Okhuysen PC. Traveler's Diarrhea Due to Intestinal Protozoa. Clin Infect Dis 2001; 33: 110-114.
16. Organización Mundial de la Salud. Métodos Básicos de Laboratorio en Parasitología Médica. 1992. Disponible en <http://www.who.org>
17. Pang XL, Lee B, Boroumand N, Leblanc B, Preiksaitis JK, Ip CCY. Increased detection of rotavirus using a real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. J Med Virol 2004; 72: 496-501.
18. Salavert Lleti M, Bartolomé Comas RM. Infecciones por Vibrio y Aeromonas. Tratado SEIMC de Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica. Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S (Coordinadores). Médica Panamericana, Madrid. 2005.
19. Vila J, Jimenez de Anta MT. Diarrea del viajero. Med Integral. 1998; 31: 258-263.
20. Vinjé J, Vennema H, Maunula L, von Bonsdorff C-H, Hoehne M, Schreier E, Richards A, Green J, Brown D, Beard SS, Monroe SS, de Bruin E, Svensson L, Koopmans M. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of Noroviruses. J Clin Microbiol 2003; 41: 1423-1433.
21. Von Graevenitz A. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. Infection 2007; 35: 59-64.

DOCUMENTO TÉCNICO

**PNT-GE-01
DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES GASTROINTESTINALES
BACTERIANAS**

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 Hospital/Centro..... La 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.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales bacterianas	PNT-GE-01	
		Edición N° 01	Página 2 de 8

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este procedimiento es el de definir las técnicas microbiológicas aplicables al diagnóstico etiológico de las infecciones gastrointestinales causadas por bacterias. Se describe la forma de recoger las muestras y su almacenamiento, así como el procesamiento de las mismas mediante técnicas apropiadas para la detección e identificación del agente bacteriano causal y/o sus antígenos o toxinas a partir de productos patológicos apropiados, principalmente heces.

2. FUNDAMENTO

La detección de agentes enteropatógenos bacterianos se basa en la capacidad de crecimiento de los mismos tras el cultivo de las muestras en medios diferenciales y selectivos, con o sin enriquecimiento previo, y con atmósferas y temperaturas de incubación variables. Asimismo, también se pueden detectar sus antígenos, toxinas o genes que codifican la producción de toxinas mediante técnicas moleculares o de aglutinación.

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.

- Loza E (Coordinador), Alomar P, Bernal A, Harto A, Pérez JL, Picazo JJ, Sarazá LL. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. Procedimientos en Microbiología n° 10, 1ª edición. SEIMC, 2000. Disponible en:

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Sánchez C (Coordinador), Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología n° 1 a, 2ª edición. SEIMC. 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

4. MUESTRAS

Recogida y conservación de las muestras de heces para el diagnóstico de infecciones bacterianas

En el Procedimiento en Microbiología, "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología n° 1 a, 2ª edición. SEIMC (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 contener cantidades insuficientes de antígeno para que puedan detectarse.

Es necesario un mínimo de un gramo de heces, que deben transportarse en un recipiente limpio y seco de boca ancha preferiblemente de plástico, bien cerrado. Si el transporte y cultivo se van a demorar más de 4 horas, que suele ser lo habitual en los laboratorios de microbiología, las muestras deben enviarse en medio de transporte de Cary-Blair, excepto en el caso de sospecha de diarrea por *Clostridium difficile*, en el que se deben enviar en un frasco limpio y seco. Si no se van a procesar inmediatamente, deben conservarse refrigeradas a 4°C. Deben desecharse las muestras de heces mezcladas con orina. Tampoco son adecuadas para cultivo o 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. Los escobillones rectales pueden utilizarse para cultivo pero son inapropiados para la detección de antígenos. El análisis de dos o tres muestras de distintos días puede incrementar la probabilidad de identificar el agente causal. 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.

5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

5.1. REACTIVOS

Azul de metileno

Colorantes para tinción de Gram

Tiras de oxidasa

Agua oxigenada para catalasa

Hipurato

Ninhidrina

Antisuero anti O157:H7 (*E. coli*)

Antisueros anti-O1 y anti-O139 (*Vibrio*)

5.2. MEDIOS DE CULTIVO

De los diferentes medios de cultivo indicados a continuación, se utilizarán los indicados en el apartado 7 de este documento en función de los microorganismos que se investiguen:

Agar MacConkey

Agar EMB (Levine)

Agar Hektoen

Agar XLD

Agar SS

Agar Rambach

Agar sulfito de bismuto

Agar verde brillante

Caldo selenito

Caldo tetracionato

Caldo Vassiliadis-Rappaport

Agar Skirrow o similar para *Campylobacter*

Agar MacConkey-sorbitol

Agar CIN

Agua de peptona

PBS

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales bacterianas	PNT-GE-01	
		Edición N° 01	Página 3 de 8

Agar TSI inclinado
 Agar Kligler inclinado
 Agar sangre com 10 µg/ml de ampicilina
 Medio de Ryan con 5 µg/ml de ampicilina
 Agar con sales biliares, inositol y verde brillante
 Agua de peptona alcalina
 Agar nutriente alcalino
 Agar TCBS

5.3. 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 reactivos y de medios de cultivo. 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.

6. APARATOS Y MATERIALES

El equipamiento necesario para la realización de las técnicas que se describen a continuación, incluyendo el tratamiento de las muestras, es el siguiente:

Vórtex
 Estufas de 37°C y 42°C
 Nevera y congelador
 Microscopio
 Asas desechables
 Pipetas Pasteur
 Portas
 Cubres
 Jarras GasPak
 Sobres generadores de microaerofilia
 Guantes
 Papel de filtro
 Clorogel y lejía

7. PROCESAMIENTO

7.1. TÉCNICAS DISPONIBLES

7.1.1. Examen microscópico. El examen microscópico es laborioso y poco específico por lo que sólo se efectuará bajo petición en casos de sospecha de enteritis invasiva.

La tinción con azul de metileno se utiliza para la observación de leucocitos. Se mezcla una pequeña cantidad de heces con dos gotas de azul de metileno sobre un porta, se coloca un cubreobjetos y tras esperar un minuto se examina al microscopio a bajo aumento (40X).

La tinción de Gram se puede usar para orientar el diagnóstico mediante la observación de microorganismos de morfología diferenciable, aunque tiene muy baja sensibilidad y especificidad. Se hace una extensión muy fina de las heces en un porta con una gota de solución salina estéril, que tras

secar y teñir, se examina al microscopio con el objetivo de inmersión (100X).

7.1.2. Coprocultivo. Es el método de elección para el diagnóstico de las infecciones bacterianas intestinales.

Para procesar eficazmente la muestra se realizará un examen macroscópico a fin de seleccionar para el inóculo aquella porción de la muestra de aspecto patológico por la eventual presencia de sangre, moco o pus. Si las heces son de consistencia líquida o se han enviado en medio de transporte, la muestra se siembra directamente con ayuda del asa o pipeta Pasteur. Si las heces son formes se selecciona una porción adecuada, del tamaño aproximado de un guisante, y se emulsiona en solución salina estéril para homogeneizar el inóculo y facilitar su siembra.

Los medios sólidos se siembran por agotamiento. Los medios líquidos se siembran abundantemente (1 ml de heces líquidas o 1 gr de heces formes).

Los medios de cultivo se seleccionarán en función de los microorganismos que deseemos investigar (sospecha clínica, circunstancias epidemiológicas, viajes, controles de tratamiento, portadores,...). Siempre hay que investigar la presencia de los bacilos Gram-negativos enteropatógenos de distribución universal. Con este fin se utilizarán diferentes medios de cultivo. Entre ellos figuran los medios sólidos de aislamiento, que en función de su selectividad para las enterobacterias enteropatógenas se clasifican en tres categorías:

- Escasamente selectivos: inhiben el desarrollo de los microorganismos Gram-positivos, pero permiten el desarrollo de enterobacterias y otros bacilos Gram-negativos. Incluyen agar MacConkey y agar EMB (Levine).
- Moderadamente selectivos: inhiben el desarrollo de los Gram-positivos y también de numerosos "coliformes" lo que facilita la recuperación fundamentalmente de *Salmonella* y *Shigella*, si bien de forma menos constante pueden permitir la recuperación de otros bacilos Gram-negativos enteropatógenos. Los más usados son el agar entérico de Hektoen, agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD), agar Salmonella-Shigella (SS) y agar de Rambach.
- Altamente selectivos: diseñados específicamente para el aislamiento de salmonelas gastroenteríticas tienen un uso más restringido en los laboratorios de Microbiología Clínica. Pertenecen a este grupo el agar sulfito de bismuto (Wilson-Blair) y el, agar verde brillante.

Todos los medios enumerados son diferenciales además de selectivos, lo que facilita la selección de las colonias sospechosas de pertenecer a especies enteropatógenas.

Para el coprocultivo de rutina debe seleccionarse al menos un medio de aislamiento de las dos primeras categorías enumeradas. De esta forma se incrementan las posibilidades de recuperar el o los agentes causales a la vez que se previene la

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales bacterianas	PNT-GE-01	
		Edición N° 01	Página 4 de 8

posibilidad de perder algún enteropatógeno que sea sensible a los inhibidores que pueda incorporar un medio determinado. Como ya se ha señalado, la categoría de los medios altamente selectivos para enterobacterias es poco rentable para el diagnóstico de las infecciones intestinales dado su limitado espectro.

Además de los medios sólidos, debe inocularse también un medio líquido de enriquecimiento con el propósito de incrementar la recuperación de enteropatógenos que se hallan en escasa proporción en la muestra. Entre los de esta categoría figuran los medios de Selenito F, Tetrionato y Vassiliadis-Rappaport. Estos están diseñados específicamente para la recuperación de *Salmonella*, aunque pueden permitir también la recuperación de *Shigella* y en menor medida de *Yersinia*. El caldo GN (Gram Negativos) es adecuado para la recuperación de *Salmonella* y *Shigella*, pero su escasa selectividad y la obligación de resembrarlo después de solo 4 a 6 horas de incubación limitan su utilidad práctica. Los medios de enriquecimiento, tras incubación a 37°C durante 18 horas, se resembrarán en medios sólidos (selectivos y moderadamente selectivos) para poder aislar los microorganismos investigados.

Con el fin de obtener el máximo rendimiento con una razonable utilización de los recursos y teniendo presente que la introducción de uno o varios medios en un protocolo de uso asistencial rutinario incrementa considerablemente el coste, es razonable combinar diferentes medios moderadamente selectivos en las fases de aislamiento directo y de aislamiento tras enriquecimiento. Así puede seleccionarse un medio escasamente selectivo como agar MacConkey y un medio moderadamente selectivo como agar entérico de Hektoen que es el menos inhibidor de la categoría para *Shigella* y altamente diferencial al incluir lactosa, sacarosa y salicina. Para el aislamiento tras enriquecimiento se puede usar un medio moderadamente selectivo diferente al usado en el aislamiento directo, como el agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato que también es muy diferencial o el agar Salmonella-Shigella.

Como se desprende de lo anteriormente expuesto los medios utilizados fueron inicialmente diseñados para la recuperación de *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella*, si bien algunos pueden colateralmente ser de utilidad para el aislamiento de otros patógenos intestinales como *Yersinia*, *Plesiomonas*, *Aeromonas* e, incluso, *Vibrio*. En función de la prevalencia de estos agentes en la etiología de la diarrea infecciosa resulta necesario definir la conveniencia o no de incluir medios específicos que garanticen su recuperación. No es coste-efectivo intentar la identificación de todos los posibles agentes bacterianos de gastroenteritis. Este planteamiento obliga a diseñar una estrategia de utilidad en la práctica asistencial que puede variar de unas zonas a otras en función de criterios epidemiológicos.

7.1.3. Aislamiento de *Campylobacter* spp. Varias especies del género se han relacionado con la producción de diarrea: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter upsaliensis* y *Campylobacter lariidis*, además de otros microorganismos relacionados (*Arcobacter butzleri*).

La tinción de las heces con azul de metileno puede revelar la presencia de leucocitos y bacilos finos Gram-negativos incurvados o espirilares. Este examen directo es rápido, pero no es sensible ni específico, por tanto, siempre ha de realizarse cultivo. Se trata de microorganismos exigentes para su cultivo que sólo se desarrollan en atmósfera de microaerofilia y que pueden tardar hasta 48 horas en formar colonias claramente visibles. Estas características biológicas exigen la utilización de un procedimiento específico para su investigación.

La investigación de *Campylobacter* spp. en heces debe realizarse rutinariamente, ya que actualmente es una de las causas bacterianas más frecuentes de diarrea en nuestro medio. Pueden utilizarse medios enriquecidos con sangre (Medios de Skirrow, Butzler, Preston) o adicionados de carbón activado (CCDA, que contiene desoxicolato y cefoperazona) que favorecen el crecimiento de estas especies capnofílicas. Los medios suelen hacerse selectivos mediante la adición de diferentes antimicrobianos. Como norma general se deben incubar a 42°C, con lo que el proceso se hace más selectivo, pero en tal caso sólo se podrán aislar las especies termofílicas (*C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*), que aunque son las más frecuentes, no son las únicas capaces de producir patología humana. Cuando se desee ampliar el espectro de especies a cultivar la incubación ha de hacerse a 37°C. La incubación se debe mantener durante 48 horas en jarra GasPak con un sobre generador de gas para campylobacterias (microaerofilia). Las colonias tienen un aspecto característico, aunque existen varios fenotipos diferentes. La identificación de género puede confirmarse mediante tinción de Gram, catalasa (+) y oxidasa (+). La hidrólisis del hipurato es una característica de *C. jejuni*.

7.1.4. Recuperación específica de *Escherichia coli* diarreagénicas. La diarrea es la principal causa de infecciones en viajeros a países tropicales o subtropicales. La causa más frecuente de diarrea del viajero son la *E. coli* enterotoxigénica (ECET) y la *E. coli* enteroagregativa (ECEA). El agar MacConkey se incorpora normalmente en los coprocultivos y se puede utilizar para el aislamiento de *E. coli*. Una vez identificado como *E. coli* se pueden detectar los diversos patotipos de *E. coli* diarreagénicas mediante la detección de los genes que codifican los diversos factores de virulencia, en concreto para ECET los genes *lt* y *st*, que codifican las toxinas termolábil y termoestable, respectivamente, y para el ECEA, el gen *aat* que codifica una proteína transportadora y que se localiza en un plásmido (CVD432). Sin embargo, la identificación de estos tipos de *E. coli* queda fuera de la práctica rutinaria de la mayoría de

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales bacterianas	PNT-GE-01	
		Edición Nº 01	Página 5 de 8

laboratorios, aunque en aquellos con un elevado número de pacientes con diarrea del viajero es aconsejable su implementación. Otro patotipo diarreagénico es el *E. coli* enterohemorrágico. El serotipo más frecuente asociado a este patotipo es el O157:H7; este serotipo posee la peculiaridad de no fermentar el D-sorbitol por lo que se puede utilizar el agar MacConkey sorbitol, para la identificación presuntiva de dicho serotipo. Una vez identificadas las colonias no fermentadoras del sorbitol como *E. coli*, se procede a aglutinar con anticuerpos específicos para O157. Los protocolos para la detección rutinaria de *E. coli* enterohemorrágico varían enormemente. Basándose en la baja incidencia de la gastroenteritis por este tipo de *E. coli* algunos laboratorios no realizan cultivos rutinarios, mientras que otros solo los realizan si el clínico lo solicita. Algunos laboratorios realizan cultivo en MacConkey sorbitol sólo cuando las heces son sanguinolentas, pues este patotipo de *E. coli* puede ocasionar una colitis hemorrágica.

7.1.5. Recuperación específica de *Yersinia enterocolitica*. Las infecciones por *Yersinia enterocolitica* son de distribución mundial, si bien parecen existir notables diferencias en la prevalencia de unos países a otros, e incluso de unas zonas a otras dentro del mismo país. España se situaría entre los países con una incidencia baja, de modo que las infecciones clínicamente significativas se detectan en menos del 1-2% de los coprocultivos y casi todos los aislamientos se incluyen en el biotipo 4 y el serogrupo O:3.

Y. enterocolitica puede aislarse de las heces hasta 1 a 2 meses después de la aparición de manifestaciones clínicas intestinales o extraintestinales. Su aislamiento a partir de heces se ve dificultado por la presencia de microorganismos de crecimiento más rápido y abundante, lo que exige la utilización de medios selectivos, siendo el más utilizado el agar CIN (Cefsulodina-Irgasan-Novobiocina) o medio de Schiemann. En este medio las colonias de *Y. enterocolitica*, tras 24 horas de incubación, son convexas y brillantes con el centro rojo y la periferia transparente (en "ojo de buey"). La incubación del medio CIN más de 24 horas no es recomendable porque las colonias ya no muestran su morfología típica y pueden confundirse con las de *C. freundii*. El aislamiento directo permite diagnosticar las infecciones clínicamente significativas y las cepas aisladas pertenecen a fenotipos patógenos, lo que es congruente con la mayor presencia del microorganismo en las heces cuando se está comportando como patógeno. Se ha cuestionado la rentabilidad del uso rutinario de agar CIN en áreas con una incidencia baja de yersiniosis (menos del 1%), sin embargo, el hecho de que este medio permite también el aislamiento de la mayoría de las *Aeromonas* mesófilas y de *Plesiomonas shigelloides*, hace recomendable su incorporación al protocolo habitual de aislamiento de enteropatógenos.

Aprovechando el carácter potencialmente psicrófilo de *Y. enterocolitica*, se ha utilizado el enriquecimiento en frío, a 4°C durante 3 o 4 semanas, en agua de peptona o en PBS para incrementar su recuperación de productos policontaminados. Esta técnica tiene limitaciones que, en la práctica, desaconsejan su uso rutinario en el diagnóstico clínico. De una parte su dilación temporal le resta utilidad clínica pero, sobre todo, se ha comprobado que esta técnica sólo aumenta significativamente la recuperación de cepas ambientales y la detección de portadores sanos. Bioquímicamente, *Y. enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis* se caracterizan por fermentar carbohidratos sin producción de gas, son móviles a 25°C pero no a 37°C, no poseen oxidasa, no descarboxilan la lisina, no desaminan la fenilalanina y no tienen actividad arginina dehidrolasa. *Y. enterocolitica* es ureasa positivo, fermenta sacarosa y celobiosa pero no ramnosa ni melobiosa. Ya que *Y. enterocolitica* fermenta la sacarosa, es preferible utilizar el medio de Kligler, en el que aparecerá alcalina la pendiente del agar, en lugar del TSI para su identificación presuntiva.

Y. pseudotuberculosis deja de eliminarse con las heces coincidiendo con la mejoría clínica, y en los cuadros pseudoapendiculares, que son los más frecuentes, desaparece del tubo digestivo tras invadir los ganglios mesentéricos. A esta dificultad para el diagnóstico hay que sumar que *Y. pseudotuberculosis* crece mal en los medios de aislamiento entéricos que contienen sales biliares. Por tanto el diagnóstico indirecto es el método de mayor aplicación en la clínica.

7.1.6. Recuperación específica de *Aeromonas* y *Plesiomonas*. En tanto no dispongamos de datos fiables acerca de su prevalencia como agentes de diarrea en nuestro medio y de los criterios de patogenidad que han de reunir los aislamientos para considerarlos significativos, parece prematuro investigar específicamente estos géneros con carácter sistemático. No obstante, estos microorganismos crecen en los medios selectivos habituales como el agar MacConkey, si bien las colonias pueden ser lactosa positivas o negativas. Resulta muy práctico aprovechar la selectividad común que ofrece el medio cefsulodina-irgasán-novobiocina (CIN) para incrementar y facilitar la recuperación tanto de *Yersinia* como de *Aeromonas*. Un inconveniente de este medio es la imposibilidad de detectar la presencia de citocromo-oxidasa directamente de las colonias. También conviene tener presente que el medio idóneo para el aislamiento de *Aeromonas* es la forma modificada de la fórmula original, que contiene 4 µg/ml de cefsulodina en vez de 15 µg/ml, ya que la concentración más alta inhibe el crecimiento de algunas cepas. La investigación conjunta de *Y. enterocolitica* y *Aeromonas* en el mismo medio incrementa la rentabilidad de su uso rutinario, sin olvidar que también pueden recuperarse de este

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales bacterianas	PNT-GE-01	
		Edición N° 01	Página 6 de 8

medio algunas especies de *Vibrio* y *Plesiomonas shigelloides*. La capacidad de *Aeromonas* para crecer mejor a temperatura ambiente cuando se utilizan medios selectivos ha llevado a preconizar la incubación del agar CIN a temperatura de 25-30°C. En los casos que requieran su investigación específica o se sospeche su presencia puede ser útil para mejorar la recuperación de *Aeromonas* el agar sangre adicionado de 10 µg/ml de ampicilina o el medio base para *Aeromonas* de Ryan con 5 µg/ml de ampicilina. Estos medios permiten además detectar directamente la producción de citocromo oxiadasa. El enriquecimiento en agua de peptona aumenta el número de aislamientos, pero disminuye la correlación con su significación clínica, de modo que el incremento se produce a costa de identificar casos de colonización transitoria, de significado clínico cuestionable.

El grupo de las aeromonas mesófilas es amplio y heterogéneo. En una misma especie pueden incluirse diferentes grupos de hibridación, que son indistinguibles bioquímicamente, por tanto nuestra capacidad para identificar fenotípicamente las cepas de *Aeromonas* no es suficientemente específica.

La compleja taxonomía de estos microorganismos supone un serio inconveniente para la investigación y la comunicación científica, esta situación explica también que en algunos centros se evite la clasificación en especies y se informen como complejo o grupo *Aeromonas hydrophila* todas las cepas mesófilas. No obstante, la mayoría de las cepas de origen clínico pueden identificarse a nivel de especie mediante pruebas bioquímicas convencionales, no siendo tan útiles para este fin los sistemas comerciales automatizados. Mediante las pruebas de hidrólisis de la esculina, Voges-Proskauer, gas de glucosa, y L-arabinosa se pueden clasificar dentro de los 3 complejos: *A. hydrophila*, *Aeromonas caviae* y *Aeromonas sobria*.

Aunque nuestro conocimiento actual acerca de los determinantes de patogenicidad no permite asegurar de un modo definitivo que los miembros del género *Aeromonas* son enteropatógenos, numerosos estudios aportan suficientes evidencias epidemiológicas, clínicas y patogénicas como para implicar a estos agentes, y particularmente a *A. hydrophila*, *A. caviae* y *Aeromonas veronii* biotipo *sobria*, en la producción de diarrea. A efectos prácticos, puesto que no podemos asegurar que cualquier aislamiento de *Aeromonas* obtenido de heces esté ligado a la producción de patología, las cepas aisladas de heces deberían identificarse a nivel de fenoespecie e informar su presencia, añadiendo un comentario adicional para indicar que estos microorganismos han sido asociados a la producción de gastroenteritis, de modo que el médico pueda valorar el hallazgo microbiológico en función de la clínica que presenta el paciente.

Plesiomonas shigelloides es un microorganismo de vida libre presente en el suelo y el agua que se multiplica a temperaturas superiores a 8°C. El agua y

diferentes alimentos, entre los que predominan los mariscos, se han incriminado en la producción de casos y brotes de diarrea. Para investigar selectivamente la presencia de *Plesiomonas* puede utilizarse el agar con sales biliares, inositol y verde brillante. Aunque crece en los medios entéricos habituales, su presencia puede pasar desapercibida si no se investiga la producción de oxidasa de modo rutinario. Por otra parte, un porcentaje no desdeñable de cepas utilizan la lactosa, lo que puede invitar a que se confundan con coliformes. Los medios selectivos para *Aeromonas* que incorporan ampicilina no son adecuados para *Plesiomonas*. Estos datos, junto a la no utilización habitual de medios selectivos específicos para este microorganismo, pueden influir en la baja incidencia detectada en la mayoría de los estudios.

7.1.7. Recuperación específica de vibrios enteropatógenos. Por la importancia y gravedad de las infecciones que producen, dos especies destacan sobre el resto en patología médica: *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus*. La importancia clínica de las otras especies necesita estudios más amplios que ayuden a definir mejor su prevalencia y epidemiología, aunque su hallazgo en nuestro país parece ser anecdótico. En nuestro medio la investigación específica de *V. cholerae* se limitará a los casos en que pueda estar indicada por motivos epidemiológicos (viajeros procedentes de zonas endémicas). Cuando son previsibles demoras en el procesamiento, las muestras de heces deberían colocarse en medio de transporte de Cary-Blair o en agua de peptona alcalina (pH 8,5), que es un excelente medio de enriquecimiento para los miembros de la familia *Vibrionaceae* y puede ser utilizada también como medio de transporte. La observación microscópica directa, en fresco, con campo oscuro, permite observar vírgulas que se desplazan con rapidez en la misma dirección como "bancos de peces". La inmunofluorescencia también puede proporcionar un diagnóstico presuntivo rápido. El cultivo es obligado para aislar e identificar el agente causal, para ello se utilizan simultáneamente enriquecimiento en agua de peptona alcalina durante 6 a 8 horas a 37°C o a 42°C y medios sólidos: no selectivos, como el agar nutriente alcalino, y selectivos, como el agar TCBS, que contiene tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa. En este medio *V. cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissii* producen colonias amarillas (sacarosa-positivas); el resto de especies se comportan en general como sacarosa-negativas, incluyendo *V. parahaemolyticus*. La aglutinación con antiseros anti-O1 y anti-O139, es suficiente en áreas endémicas para la identificación presuntiva. La identificación definitiva se completa mediante la realización de pruebas bioquímicas y aglutinaciones que permiten establecer el biotipo y el serotipo. Conviene además confirmar la toxigenicidad de la cepa mediante aglutinación-látex y estudiar la sensibilidad *in vitro* frente a diferentes

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales bacterianas	PNT-GE-01	
		Edición N° 01	Página 7 de 8

antimicrobianos ya que no son infrecuentes las cepas resistentes.

V. parahaemolyticus crece bien en agar TCBS y para el enriquecimiento se usa agua de peptona alcalina adicionada de CINa al 3%.

Las especies patógenas del género *Vibrio* pueden crecer en agar McConkey (con excepción de *Vibrio hollisae*) y, salvo *V. vulnificus* y algunas cepas de *Vibrio metschnikovii*, ninguna fermenta la lactosa. Por tanto, las colonias incoloras en este medio deberían ser objeto de una identificación presuntiva, complementando el estudio con la prueba de la oxidasa. Aunque no es un medio idóneo para su recuperación, en el agar CIN también pueden crecer algunos vibrios patógenos y su mayor selectividad propicia un aislamiento más fácil. Los datos disponibles indican una baja incidencia de gastroenteritis por vibrios halófilos en nuestro medio, por lo que no juzgamos necesario incluir sistemáticamente el agar TCBS en el protocolo de coprocultivo. No obstante, si la historia clínica indica que ha existido consumo de marisco o pescados crudos o poco cocidos podría incluirse una placa de agar TCBS.

Salvo *V. cholerae* y *Vibrio mimicus*, las otras especies son halófilas por lo que para su aislamiento requieren la adición de sal a los medios de cultivo e identificación.

7.1.8. Identificación específica de agentes de toxiinfección alimentaria: *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus*. En nuestro medio, las bacterias toxigénicas que causan con mayor frecuencia infección por enterotoxinas vehiculadas por alimentos son *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus*. Las técnicas para la detección de antígeno de estos agentes están recogidas en el documento técnico PNT-TDA-04: Técnicas rápidas de diagnóstico de las gastroenteritis. Procedimientos en Microbiología, número 19: Técnicas rápidas de detección de antígeno, 2ª edición. SEIMC En: <http://www.seimc.org/>.

7.1.9. Identificación específica de *Clostridium difficile*. Las técnicas para detección de antígeno de *C. difficile* y los procedimientos para diagnóstico de diarrea o colitis asociada a *C. difficile* están descritas en los documentos técnicos PNT-TDA-04: Técnicas rápidas de diagnóstico de las gastroenteritis; Procedimientos en Microbiología, número 19: Técnicas rápidas de detección de antígeno, 2ª edición; y PNT-AN-02: Procesamiento de muestras para el diagnóstico de diarrea o colitis asociada a *Clostridium difficile*; Procedimientos en Microbiología, número 16: Bacterias anaerobias, 2ª edición. En: <http://www.seimc.org/>.

8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

En general, se debe informar sobre el patógeno o los patógenos bacterianos encontrados en las muestras remitidas al laboratorio de microbiología, pero antes

es necesario que cada laboratorio informe previamente a los diferentes servicios peticionarios de los enteropatógenos que busca de forma rutinaria en las heces. Si no se encuentra ninguno de los buscados rutinariamente se informará como: "no se aíslan enteropatógenos". En el caso de solicitud específica de algún enteropatógeno no buscado de forma rutinaria se deberá informar específicamente también tanto ante un resultado positivo como negativo.

9. 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 coprocultivos debe conocer las ventajas y limitaciones de las técnicas, así como el fundamento de las técnicas utilizadas y del funcionamiento de los aparatos. Además debe trabajar en condiciones de máxima seguridad personal y ambiental, realizando una adecuada segregación de los residuos.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Si bien hay múltiples microorganismos que pueden causar gastroenteritis, y por tanto existe una gran variedad de medios de cultivo para recuperarlos a partir de heces, en general, en un laboratorio de coprocultivos en nuestro medio, de rutina se recomienda utilizar un agar de cultivo selectivo, uno o dos moderadamente selectivos, un caldo de enriquecimiento, un medio específico para el cultivo de *Campylobacter* y el agar CIN.

En el caso de sospecha de diarrea por *C. difficile*, se deben enviar las heces sin medio de transporte y realizar el cultivo en medio CCFA (cicloserina-cefoxitina-fructosa agar) o similar.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Hay que tener en cuenta que la mayoría de los enteropatógenos son de adquisición extrahospitalaria y producen sintomatología aguda, y por tanto, en pacientes en los que se solicita coprocultivo y que llevan hospitalizados más de 3 días no es probable la recuperación de estas bacterias, y por tanto puede ser inadecuada la solicitud de coprocultivo en estos casos. No ocurre así en el caso de *C. difficile*, que es principalmente de adquisición nosocomial.

El envío al laboratorio de dos o tres muestras de heces aumenta la recuperación de enteropatógenos.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales bacterianas	PNT-GE-01	
		Edición Nº 01	Página 8 de 8

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Domínguez J (Coordinador), Alonso C, Bartolomé R, Domínguez J, Matas L, Rabella N. Técnicas rápidas de detección de antígeno. Procedimientos en Microbiología nº 19, 2ª edición. SEIMC. 2005. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>

2. García Sanchez JE (Coordinador), Alcalá L, Betriu C, García Sanchez JE, Reig M. Bacterias anaerobias. Procedimientos en Microbiología nº 16, 2ª edición. SEIMC. 2004. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>

3. López Brea M (Coordinador), Sanz JC, Usera M, Reina, J, Cardeñoso L, Vasallo F. Gastroenteritis bacterianas, víricas, parasitarias y toxi-infecciones alimentarias, Procedimientos en Microbiología nº 7, 1ª edición. SEIMC. 1994. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>

4. Sánchez C (Coordinador), Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología nº 1 a, 2ª edición. SEIMC. 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-GE-02
DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES GASTROINTESTINALES VÍRICAS

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

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro..... La 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.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales víricas	PNT-GE-02	
		Edición N°01	Página 2 de 5

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este procedimiento es el de definir las técnicas aplicables para establecer el diagnóstico etiológico de las infecciones gastrointestinales víricas. Se describe la forma de recoger las muestras, su transporte y almacenamiento, así como el procesamiento de las mismas mediante las técnicas disponibles que permitan detectar el agente vírico causal a partir de heces.

2. FUNDAMENTO

Las gastroenteritis agudas causadas por virus son frecuentes especialmente en la población infantil, principalmente las causadas por rotavirus y adenovirus. El diagnóstico de estas infecciones se puede realizar mediante técnicas rápidas comercializadas que detectan e identifican antígenos víricos en muestras de heces o bien mediante técnicas moleculares que presentan una mayor sensibilidad y especificidad.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Sánchez C (Coordinador), Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología n° 1 a, 2ª edición. SEIMC. 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>
- Loza E (Coordinador), Alomar P, Bernal A, Harto A, Pérez JL, Picazo JJ, Sarazá LL. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. Procedimientos en Microbiología n° 10, 1ª edición. SEIMC. 2000. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>
- López Brea M (Coordinador), Sanz JC, Usera M, Reina, J, Cardeñoso L, Vasallo F. Gastroenteritis bacterianas, víricas, parasitarias y toxi-infecciones alimentarias. Procedimientos en Microbiología n° 7, 1ª edición. SEIMC. 1994. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>
- Domínguez J (Coordinador), Alonso C, Bartolomé R, Domínguez J, Matas L, Rabella L. Técnicas rápidas de detección de antígeno. Procedimientos en Microbiología n° 19, 2ª edición. SEIMC. 2005. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>
- Cumitech 26. 1989. Laboratory diagnosis of viral infections producing enteritis. American Society for Microbiology. Washington DC.
- Manuales de instrucciones de los sistemas comerciales.

4. MUESTRAS

Recogida y conservación de las muestras para el diagnóstico de virus entéricos

Las muestras a analizar son fundamentalmente heces (2 a 4 g) recogidas en un recipiente limpio y seco, preferentemente de plástico y boca ancha. No se recomienda obtener las muestras mediante escobillones rectales, ya que a menudo es insuficiente el material recogido para el diagnóstico de agentes víricos. Para el estudio de virus entéricos no se

requiere el empleo de medio de transporte de virus. Se pueden recoger las heces directamente del pañal en el caso de lactantes con diarrea. Se recomienda obtener la muestra durante los primeros días tras el comienzo de la sintomatología.

Las muestras de vómitos pueden servir para la detección de norovirus, si bien es una muestra poco utilizada para el diagnóstico.

El envío de las muestras al laboratorio puede realizarse a temperatura ambiente, aunque es recomendable su refrigeración a 4°C. Las heces deben conservarse refrigeradas a 4°C y pasada una semana deben congelarse a -20°C o preferentemente a -70°C. También es posible la conservación de las heces a 4°C cubiertas con una capa de glicerol.

5. REACTIVOS

5.1. REACTIVOS

- Sistemas comercializados de detección rápida de antígenos de rotavirus, adenovirus, astrovirus y norovirus
- Bromuro de etidio (mutágeno y cancerígeno ¡utilizar guantes de nitrilo!)
- Geles de agarosa
- Tampones y reactivos para extracción de ácidos nucleicos
- Enzimas y reactivos de RT-PCR (transcriptasa inversa AMV o M-MLV, RNasin, Taq polimerasa, dNTPs, etc.)
- Agua destilada tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) (tóxico y cancerígeno ¡manéjese con cuidado!)
- Cebadores específicos
- Marcadores de pesos moleculares

5.2. CONTROL DE CALIDAD

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

Siempre que se utilice un sistema comercializado de detección de antígeno se deben incluir el control positivo y el negativo que contiene el kit.

También se deben incluir controles internos en las técnicas de PCR "caseras" para garantizar su correcto funcionamiento y es siempre muy importante incluir controles negativos para excluir posibles contaminaciones.

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

6. APARATOS Y MATERIALES

El equipamiento necesario para la realización de las técnicas descritas es el siguiente:

- Micropipetas y micropipetas multicanal
- Puntas de pipeta estériles (con filtros)
- Estufa de 37°C

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales víricas	PNT-GE-02	
		Edición N°01	Página 3 de 5

- Tubos Eppendorf
- Guantes de látex
- Vortex
- Espectrofotómetro para lectura de placas de ELISA
- Termociclador
- Centrifuga de tubos Eppendorf
- Cubeta de electroforesis
- Transiluminador UV
- Cabina de flujo laminar

7. PROCESAMIENTO

Se deben preparar las suspensiones fecales de la muestra al 10-20% (p/v) en tampón fosfato salino (PBS) o en solución salina balanceada de Earle (SSBE). En los casos en que se vaya a utilizar un método diagnóstico comercial que proporcione un tampón de muestra específico se deberá diluir la muestra en el mismo.

7.1. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE ANTÍGENOS VÍRICOS

Existen numerosos métodos comerciales para la detección de antígenos de rotavirus del grupo A, y un menor número para adenovirus, astrovirus y norovirus, en muestras de heces, que utilizan técnicas de EIA convencional, EIA de membrana, inmunocromatografía (ICG) o aglutinación con látex (ver Tabla 4 del Documento Científico). La selección de un método u otro estará en función del número de muestras procesadas en el laboratorio, de la rapidez en la obtención del resultado, de la sensibilidad y la especificidad de cada técnica, así como de su coste económico. Son especialmente recomendables los métodos de ELISA convencionales que permiten analizar las muestras en pocillos separados en filas o individuales. Recomendamos en todo caso seguir el procedimiento y las instrucciones que proporcionan los fabricantes.

7.1.1. Técnicas de detección de antígeno de rotavirus. Los métodos de EIA convencional y de membrana suelen ser superiores en sensibilidad a los métodos de aglutinación con látex. Los tests de ICG comerciales para detección de antígenos de rotavirus presentan también valores de sensibilidad similares a los de los métodos de EIA, si bien algunos ofrecen una especificidad claramente menor. Se dispone de métodos de ICG que detectan simultáneamente antígenos de rotavirus y de adenovirus en la misma muestra.

Los métodos de EIA se consideran también preferibles para el diagnóstico de rutina de la infección por rotavirus y mejor que los métodos de RT-PCR, a pesar de ser éstos más sensibles, ya que la PCR puede ofrecer resultados positivos para rotavirus en muestras de controles sanos, atribuibles a infecciones asintomáticas.

No obstante, los métodos de RT-PCR son de gran valor para determinar los genotipos G y P de las cepas de rotavirus, analizando los genes de las proteínas VP7 y VP4, respectivamente, mediante técnicas de PCR multiplex semi-anidadas. Además, mediante el

empleo de cebadores específicos de los genes de rotavirus de serogrupos distintos al A (grupos B ó C) es posible la investigación de estos agentes, con una incidencia aparentemente muy baja o desconocida en muchas áreas geográficas.

7.1.2. Técnicas de detección de antígeno de adenovirus. Se pueden emplear métodos comerciales de EIA, de ICG (combinados con la detección de antígeno de rotavirus) y de aglutinación con látex. Es importante distinguir si el método es tipo-específico y detecta sólo los serotipos 40 y 41, o si detecta antígenos comunes a todos los adenovirus. Se deberá seguir el procedimiento descrito por el fabricante y los controles incluidos en el método.

7.1.3. Técnicas de detección de antígeno de astrovirus. Se dispone de métodos de EIA y de ICG para la detección de astrovirus en heces. En estos últimos, el fabricante aporta el tampón de extracción y los dispositivos de reacción que incorporan un control interno de funcionamiento.

7.1.4. Técnicas de detección de antígeno de norovirus. Existen dos métodos de enzimoimmunoanálisis (EIA) comercializados para el diagnóstico de norovirus. Se recomienda confirmar los resultados del EIA por RT-PCR. La escasa sensibilidad de los métodos EIA hace que sean poco eficaces para el diagnóstico de casos esporádicos de gastroenteritis, pero sí tienen aplicación en el estudio de brotes epidémicos en los que se dispone de un número amplio de muestras (al menos de 5 a 10).

7.2. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE VIRUS ENTÉRICOS

Las técnicas moleculares de transcripción inversa seguida de PCR (RT-PCR) pueden aplicarse como métodos de detección de los distintos agentes víricos productores de gastroenteritis, principalmente rotavirus, astrovirus, norovirus y sapovirus, además de adenovirus detectables por PCR.

Para la extracción de los ácidos nucleicos son recomendables la extracción con sílica e isotiocianato de guanidinio, el reactivo Trizol LS (Invitrogen), el empleo de sílica magnética aplicando el sistema NucliSens EasyMAG (BioMérieux), o el uso del kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) para detección de virus con genoma de ARN. Para estudio por PCR de virus ADN (por ejemplo, adenovirus) es eficaz el kit QIAamp DNA stool Mini Kit (Qiagen).

El ARN extraído de las heces se resuspende en agua destilada libre de ARNasas (tratada con dietil pirocarbonato –DEPC-) y con 1 µl de inhibidor de ARNasas (RNasin, Promega). La reacción de transcripción inversa se puede realizar con hexanucleótidos aleatorios (*random primers*) que producirá un ADNc que podrá aplicarse a cualquier reacción de PCR, o bien con uno o dos cebadores específicos, los mismos que se emplearán en la reacción de PCR. También es posible realizar la

reacción de RT-PCR en un solo tubo, utilizando por ejemplo el kit OneStep RT-PCR (Qiagen).

Los cebadores que pueden utilizarse son:

Virus	Cebadores (5'-3')	Tamaño amplicón (pb)
Rotavirus (gen VP6)	VP6-F (<i>sense</i>) GACGGVGCRACTACATGGT VP6-R (<i>antisense</i>) GTCCAATTCATNCCTGGTG	382
Astrovirus	Mon270 (<i>sense</i>) TCAGATGCATTGTCATTGGT Mon269 (<i>antisense</i>) CAACTCAGGAAACAGGGTGT	449
Norovirus	JV12Y (<i>sense</i>) ATACCACTATGATGCAGAYTA JV13I (<i>antisense</i>) TCATCATCACCATAGAAIGAG	327
Sapovirus	p289 (<i>sense</i>) TGACAATGTAATCATCACCAT A p290 (<i>antisense</i>) GATTACTCCAAGTGGGACTCC AC	331
Adenovirus	hex1deg (<i>sense</i>) GCCSCARTGGKWCATCATGC A CATC hex2deg (<i>antisense</i>) CAGCACSCCICGRATGTCAA	301

Los resultados de las reacciones de RT-PCR se analizan por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón Tris-borato-EDTA (TBE) y tinción con bromuro de etidio. En el caso de emplearse los cebadores p289-p290, es posible la detección con ellos de norovirus (amplicón de 319 pb), sapovirus (331 pb) y rotavirus (330 pb), con diferencias tan pequeñas entre los tamaños de los amplificadores que es necesaria su secuenciación para una correcta identificación.

Las reacciones de RT-PCR se realizan extremando las medidas recomendadas para eliminar la posibilidad de contaminaciones cruzadas, con empleo de puntas de pipeta con filtros o micropipetas de desplazamiento positivo, separación física entre las zonas de trabajo pre- y post-PCR, empleo de cabinas de flujo laminar con luz ultravioleta, etc.

8. INTERPRETACION Y EXPRESION DE LOS RESULTADOS

Las técnicas de detección de antígenos (EIA en distintos formatos, ICG, aglutinación de látex) para

virus entéricos se interpretarán en sentido cualitativo en términos de positivo o negativo. En los ensayos de EIA se consideran positivas las muestras con un valor de absorbancia tantas veces superior al del control negativo como indique el fabricante.

Siempre se deben incluir el control positivo y el negativo para validar la técnica.

Las técnicas de RT-PCR convencionales se interpretan mediante la lectura en gel de agarosa de las bandas correspondientes a los amplicones específicos, calculando su tamaño con la ayuda del marcador de pesos moleculares. La confirmación absoluta de la identidad de cada amplicón debe obtenerse mediante secuenciación de los productos de PCR, que además constituye un procedimiento para caracterizar el genotipo de las cepas.

9. RESPONSABILIDADES

El personal técnico cualificado será el responsable 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, de su interpretación y del informe de los mismos.

El personal debe conocer las ventajas y limitaciones de las técnicas, así como el fundamento de las técnicas utilizadas y del funcionamiento de los aparatos. Además debe trabajar en condiciones de máxima seguridad personal y ambiental, realizando una adecuada segregación de los residuos químicos (soluciones con bromuro de etidio, isotiocianato de guanidinio, etc.).

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Cuando se utilizan los sistemas comercializados de detección rápida de antígenos víricos, las muestras deben tomarse preferiblemente antes de pasados 8 días desde la aparición de los síntomas. Una vez transcurrido este tiempo, el número de partículas víricas decrece considerablemente.

La presencia de antígenos de un virus concreto no excluye la posibilidad de presentar otro u otros virus, e incluso otros microorganismos enteropatógenos (bacterias o parásitos).

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Los valores de sensibilidad y de especificidad, así como los valores predictivo positivo y negativo, de cada método de detección de antígenos víricos en muestras de heces dependerá del método escogido y deberá consultarse siempre la información técnica suministrada por el fabricante.

Las técnicas moleculares "caseras" deben siempre estar sujetas a estrictos controles para garantizar su correcto funcionamiento, incluyendo controles positivos y negativos conocidos en cada una de sus etapas: extracción de ácidos nucleicos, transcripción inversa y PCR. La sensibilidad de estos métodos puede ser del orden de 1 a 5 copias de genoma

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales víricas	PNT-GE-02	
		Edición N°01	Página 5 de 5

vírico, por lo que deben extremarse las precauciones para evitar contaminaciones.

Un resultado positivo para un virus determinado es indicativo de la presencia de dicho agente vírico en la muestra, y su interpretación patogénica estará en función de la sintomatología clínica que presente el paciente.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 2001; 39:498-505.
2. Buesa J, Montava R, Abu-Mallouh R, Fos M, Ribes JM, Bartolomé R, Vanaclocha H, Torner N, Domínguez A. Sequential evolution of genotype GII.4 norovirus variants causing gastroenteritis outbreaks from 2001 to 2006 in Eastern Spain. *J Med Virol* 2008; 80:1288-1295.

3. Iturriza-Gómara M, Wong C, Blome S, Desselberger U, Gray J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: Correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J Virol* 2002; 76: 6596-6601.

4. Ludert JE, Alcalá AC, Liprandi F. Primer pair p289-p290, designed to detect both noroviruses and sapoviruses by reverse transcription-PCR, also detects rotaviruses by cross-reactivity. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 835-836.

5. 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.

6. Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, Glass RI, Monroe SS. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 797-801.

7. Vinjé J, Koopmans MP. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *J Infect Dis* 1996; 174: 610-615.

**PNT-GE-03
DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES GASTROINTESTINALES
PARASITARIAS**

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 Hospital/Centro..... La 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.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales parasitarias	PNT-GE-03	
		Edición Nº 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este procedimiento es el de definir las técnicas aplicables para establecer el diagnóstico etiológico de las infecciones gastrointestinales parasitarias. Se describe la forma de recoger las muestras, su almacenamiento, así como el procesamiento de las mismas mediante las técnicas que permitan detectar el agente parasitario causal a partir de productos patológicos apropiados, fundamentalmente heces.

2. FUNDAMENTO

Algunos parásitos humanos se eliminan en las heces (trofozoitos, quistes, huevos o gusanos) y pueden reconocerse e identificarse visualmente si las heces se examinan inmediatamente tras su emisión o si son correctamente conservados en medios de transporte comercializados como el SAF (*sodium acetate-acetic acid-formaline*: tampón aceto-acético formolado compuesto por una solución en agua de formaldehído 1,6%, alcohol isopropílico anhidro 7,45%, ácido acético 2,14%, y acetato sódico 1,53%). Asimismo, existen diferentes técnicas de tinción que permiten ver los diferentes parásitos al microscopio. Los métodos de concentración eliminan una parte del material fecal aumentando las posibilidades de visualizarlos.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Sánchez C (Coordinador), Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología nº 1 a, 2ª edición. SEIMC. 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>
- Loza E (Coordinador). Alomar P, Bernal A, Harto A, Pérez JL, Picazo JJ, Sarazá LL. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. Procedimientos en Microbiología nº 10, 1ª edición. SEIMC. 2000. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>
- López Brea M (Coordinador), Sanz JC, Usera M, Reina, J, Cardeñoso L, Vasallo F. Gastroenteritis bacterianas, víricas, parasitarias y toxi-infecciones alimentarias. Procedimientos en Microbiología nº 7, 1ª edición. SEIMC. 1994. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>
- Organización Mundial de la Salud. Métodos Básicos de Laboratorio en Parasitología Médica. 1992. Disponible en <http://www.who.org>

4. MUESTRAS

Recogida y conservación de las muestras de heces para el diagnóstico de parásitos

En el Procedimiento en Microbiología, "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología nº 1 a, 2ª edición. SEIMC (2003), se indican las directrices principales de la recogida y conservación de las muestras (PNT-RTP-01).

En líneas generales, las muestras deben recogerse preferentemente durante la fase aguda de la infección.

Como norma general se recomienda hacer el estudio parasitológico en tres muestras seriadas de heces. Dichas muestras se pueden recoger en días alternos, una muestra cada día, o si es preciso en muestras del mismo día, siempre que correspondan a deposiciones diferentes.

El exámen de las heces se altera si estas se contaminan con orina o con agua, por lo que es preciso hacer la deposición, evitando dicha contaminación, en un orinal limpio o sobre un papel de periódico. No se deben recoger las muestras de la taza del retrete. Es necesario un mínimo de un gramo de heces, que deben transportarse en un recipiente limpio y seco de boca ancha preferiblemente de plástico, bien cerrado. Si el transporte no es inmediato, se deben mantener en la nevera a 4° C, y preferiblemente añadir alguna sustancia que impida la acción bacteriana y conserve los parásitos en condiciones idóneas para su identificación. Se pueden utilizar sistemas comercializados que incorporan SAF, o bien utilizar formol diluido en agua (al 5 ó 10%, según la consistencia fecal), o mertiolatiodoformalina (MIF). La muestra debe mezclarse vigorosamente con el medio de transporte una vez incluida en el mismo.

5. REACTIVOS

5.1. REACTIVOS

Suero salino fisiológico
Yodina D'Antoni o lugol
Mertiolato
Acetato de etileno
Azul de metileno
Formalina al 10%
Eter etílico
Sulfato de zinc al 33% en agua
Colorantes tinción de Kinyoun: carbolfucsina, ácido nítrico al 30%, alcohol etílico absoluto, azul de metileno.
Colorantes tinción tricrómica de Weber: formaldehído al 10%, Hemo-D, agua destilada, chromotrope 2R, fast-green, ácido fosfotúngstico.

5.2. CONTROL DE CALIDAD

Siguiendo las Recomendaciones generales para el control de calidad interno de 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. 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.

6. APARATOS Y MATERIALES

Guantes de látex
Pipetas Pasteur
Cubreobjetos
Portaobjetos
Aceite de inmersión

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales parasitarias	PNT-GE-03	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

Microscopio

Puente de tinción

Cubetas de Coplin de tinción

Para la técnica de concentración:

Tubos de centrífuga de 10 ml y 2 cm de diámetro

Gradillas de tubos de centrífuga con malla de 1mm

Embudos de plástico

Centrífuga

Reactivos:

Suero salino, lugol, mertiolato, formol.

7. PROCESAMIENTO

7.1. TÉCNICAS DISPONIBLES

7.1.1. Examen macroscópico. Tan pronto como se reciban las heces en el laboratorio se debe observar su consistencia (grado de humedad) y anotar en el recipiente una de las letras: F (formada), B (blanda), S (suelta), A (acuosa). También es importante ver si presentan mucosidad o sangre. La consistencia o grado de humedad servirá de orientación para saber si es más probable encontrar trofozoítos o quistes. Si se reciben varias muestras al mismo tiempo, hay que examinar primero las que contengan sangre o moco, y a continuación las muestras líquidas. Estas muestras son las que con más probabilidad contienen trofozoítos amebianos, que mueren al poco tiempo de la excreción, por lo que deben examinarse en la primera hora que sigue a ésta. Las heces formadas pueden examinarse en cualquier momento del día, pero no deben dejarse de un día para otro, ya que los quistes pueden desintegrarse.

Si se reciben las muestras en medio de transporte se pueden visualizar tanto los trofozoítos como los quistes al microscopio aunque no se examinen inmediatamente tras su recepción. En el examen macroscópico se debe buscar la presencia de gusanos adultos que serán visibles sin la ayuda del microscopio.

7.1.2. Examen microscópico.

a. Examen en fresco. Es la técnica más sencilla y fácil para examinar las heces; este método debe aplicarse en todos los laboratorios de nivel periférico. Para la preparación en fresco pueden utilizarse la solución salina, la solución yodada y el azul de metileno. Se realiza homogeneizando la muestra fecal en un portaobjetos con agua destilada, suero salino, solución de yodo-lugol (yodina d'Antoni) o con azul de metileno tamponado a pH ácido. A continuación se coloca el cubreobjetos y se procede a la observación por microscopía óptica. Se recomienda seleccionar aquellas partes de la muestra que presenten restos de sangre, moco o pus. El examen debe ser exhaustivo, comenzando por un ángulo del cubreobjetos, desplazando el campo del microscopio hasta el otro extremo, y continuando el movimiento en zig-zag hasta completar la observación de toda la superficie. Primero se realiza el examen a 100 aumentos, y a continuación un examen a 400 aumentos.

- La preparación con solución salina se realiza para el examen microscópico preliminar de las heces. Se

utiliza primordialmente para observar los huevos y larvas de gusanos, los trofozoítos y los quistes. También puede revelar la presencia de eritrocitos, leucocitos y residuos no patógenos.

- La preparación con solución yodada se utiliza principalmente para teñir el glucógeno y los núcleos de los quistes, si existen. Por lo general, con esta preparación pueden identificarse los quistes.

- La preparación con azul de metileno debe hacerse cada vez que se observen trofozoítos amebianos en una preparación salina, o cuando se sospeche su presencia. El azul de metileno tiñe los trofozoítos amebianos, pero no los quistes amebianos, ni los trofozoítos ni los quistes de flagelados. Esta coloración sólo debe usarse para las muestras frescas sin conservantes, no se usa en las muestras tratadas con conservantes, en las que los organismos han muerto.

b. Técnicas de concentración. Es recomendable realizar siempre una técnica de concentración de las heces. Estas técnicas permiten con mayor facilidad visualizar los parásitos en muestras con poca cantidad de los mismos y donde no es posible detectarlos en el examen en fresco sin concentración de la muestra. Así pues, siempre que sea posible, debe concentrarse la muestra. Los huevos y larvas de gusanos, y los quistes de protozoos, pueden recuperarse por concentración, pero los trofozoítos de protozoos no se verán ya que el procedimiento suele destruirlos. Por ese motivo es imprescindible el examen en fresco como fase inicial del estudio microscópico. Si la muestra viene conservada en un medio de transporte, es posible visualizar los trofozoítos mediante tinciones específicas (tinción tricrómica).

Existen dos métodos de concentración:

1) Concentración por sedimentación. Consiste en homogeneizar las heces en una solución de formalina. Esta emulsión se filtra y se añade éter etílico. A continuación se centrifuga de forma que los quistes de protozoos y los huevos de helmintos se sedimentan en el fondo del tubo.

2) Concentración por flotación. Se basa en una diferencia de densidades entre el parásito y la solución en la que se emulsionan las heces (se utilizan soluciones de alta densidad como sulfato de zinc al 33% en agua destilada). En este caso, los parásitos se quedan en el sobrenadante. El inconveniente de esta técnica radica en que los quistes protozoarios pueden experimentar alteraciones debido tanto a la aparición de corrientes osmóticas a través de la membrana quística, como a la agresión que puede producir en la cubierta alguna de las sustancias empleadas.

c. Tinciones específicas. El diagnóstico de los coccidios y de los microsporidios requiere la utilización de tinciones específicas. Para los coccidios se utiliza una modificación de la tinción de Ziehl-Neelsen, denominada tinción de Kinyoun. Debido a que las paredes de los quistes de los coccidios tienen características de ácido-alcohol

Servicio de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales parasitarias	PNT-GE-03	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

resistencia, esta tinción permitirá demostrar su presencia. Adquieren un color rosa-rojizo que destaca sobre el azul del fondo. Para la observación de los microsporidios se utiliza la tinción tricrómica de Weber, que permite penetrar la membrana de las esporas dándoles un color rosado. Para el diagnóstico de microsporidios también se utiliza la microscopía electrónica.

Para ambas tinciones, puede utilizarse muestra directa, la muestra mantenida en el medio de transporte o el concentrado de heces. Se prepara una fina extensión en un portaobjetos, se tiñe, y se observa al microscopio a 400 y 1000 aumentos.

8. INTERPRETACION Y EXPRESION DE LOS RESULTADOS

Los protozoos y las larvas y huevos de helmintos se identificarán visualmente, sobre la base de su tamaño y morfología en fresco o tras concentraciones y tinciones específicas. Los organismos identificados se informarán con su correspondiente género y especie siempre que sea posible. Si no se encuentran parásitos en las heces remitidas se indicará este hecho.

9. RESPONSABILIDADES

El personal técnico de la sección será 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 y el informe de los mismos.

El personal de la sección de parasitología debe conocer las ventajas y limitaciones de las técnicas, así como el fundamento de las técnicas utilizadas y del funcionamiento de los aparatos. Además debe trabajar en condiciones de máxima seguridad personal y ambiental, realizando una adecuada separación y eliminación de residuos.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Las causas más frecuentes de error son el no reconocimiento de parásitos presentes en las heces o la identificación como parásitos de elementos no parasitarios presentes en las mismas. El estudio del limitado número de parásitos entéricos humanos y la acumulación de experiencia son las vías fundamentales de evitar estos errores.

El SAF y los líquidos conservadores de parásitos son venenosos y deben mantenerse fuera del alcance de los niños.

Los exámenes de parásitos en heces se deterioran con la presencia de bario, bismuto y laxantes, por lo que se evitarán dichos productos al menos 21 días antes del estudio.

El SAF no garantiza del todo la ausencia de infectividad de las muestras fecales (los huevos de *Ascaris lumbricoides* pueden permanecer viables). Para evitar infecciones accidentales se seguirán las normas generales de seguridad en el laboratorio.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La detección de *Entamoeba histolytica* en ocasiones puede no detectarse con los procedimientos anteriormente mencionados. Para detectar este parásito es recomendable procesar muestras conservadas en alcohol polivinílico-zinc (PVA-Zn) y realizar una tinción tricrómica a partir de este medio. Para descartar la presencia de *Strongyloides stercoralis* es preferible realizar la prueba de Harada-Mori (cultivo-maduración de helmintos fecales) ya que es más sensible, así como el exámen de jugo duodenal obtenido mediante aspiración o mediante un test de la cuerda.

Cuando se busque descartar la presencia de *Enterobius vermicularis* el procedimiento de elección es el test del papel Cell-O.

Siempre hay que tener en cuenta que un resultado negativo no excluye la posibilidad de presencia de enteroparásitos, ya que si la parasitación es muy baja es posible que no haya parásitos en la porción de muestra examinada.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Guerrant RL, Walker D, Weller P. Enfermedades Infecciosas Tropicales. 2002. Ediciones Harcourt.
- Leventhal R, Cheadle R. Medical Parasitology. A Self-Instructional Text. 4th edition, 1996. F. A. Davis Company, Philadelphia.
- Manson's Tropical Diseases. 20th edition. 1996. Gordon C Cook editor. Saunders editions, London, UK.
- Shore García, L. Diagnostic Medical Parasitology. 4th edition. 2007. ASM Press.