

Procedimientos modernos para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas

FERNANDO MONTOYA

Se hace una revisión somera de algunos procedimientos para la comprobación de las enfermedades infecciosas, con énfasis en los avances más recientes en inmunodiagnóstico; se alude también a las pruebas de manchas o bandas y a la hibridación con sondas genéticas; en cada caso se consideran algunos aspectos técnicos, las ventajas y limitaciones de las pruebas y su sensibilidad y especificidad.

PALABRAS CLAVE
ENFERMEDADES INFECCIOSAS
INMUNODIAGNOSTICO
HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS

INTRODUCCION

El diagnóstico en infectología se fundamenta en la detección de los microorganismos mediante exámenes directos y cultivos, que son los métodos convencionales de caracterización, o en procedimientos alternos como el inmunodiagnóstico y las técnicas más recientes de hibridación de

los ácidos nucleicos. A pesar de los avances en este terreno, los métodos clásicos no han sido superados; así, para señalar algunos casos específicos, en el diagnóstico de las parasitosis intestinales y las dermatomicosis el examen directo es insustituible y en el de la esporotricosis el cultivo es el elemento primordial.

Los grandes avances en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas se han dado por los adelantos en los procedimientos de aislamiento, purificación y caracterización de moléculas complejas. Es el caso de la posibilidad de realizar fraccionamientos antigénicos para detectar porciones o segmentos característicos de determinado microorganismo, sin tener que recurrir a su visualización o cultivo. Igualmente ha sido importante poder clasificar la respuesta inmunológica del huésped de acuerdo a la clase de inmunoglobulina que fabrica cuando entra en contacto con el microorganismo: la IgM como marcador de fase aguda y la IgG como marcador de contacto previo. Por último la biología molecular ha

DR. FERNANDO MONTOYA, Profesor Titular, Depto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

permitido manipular *in vitro* los ácidos nucleicos facilitando la caracterización de secuencias específicas para cada especie o género microbiano, mediante moléculas complementarias o **sondas genéticas (pruebas de hibridación)** o ha permitido la replicación *in vitro* de los ácidos nucleicos aumentando el número de moléculas disponibles, lo que facilita su caracterización. Este último proceso de amplificación molecular se conoce como la **reacción de polimerasa en cadena o PCR** de su nombre en inglés.

Los métodos modernos de diagnóstico se caracterizan por su alta sensibilidad que permite detectar, en ocasiones, cantidades ínfimas al nivel de fentogramos; también por su marcada especificidad.

INMUNODIAGNOSTICO

Mediante la reacción inmune clásica se determina la presencia de antígenos o anticuerpos. Si se quiere detectar un antígeno específico se debe tener como elemento conocido el anticuerpo correspondiente y viceversa. De acuerdo a la naturaleza física de cada uno de los reactantes, particulada o soluble, se tienen los diferentes tipos de inmunoensayo: precipitación, aglutinación, con marcadores, etc. En la actualidad se emplean mucho las técnicas de aglutinación para reactantes particulados y las de marcadores para reactantes solubles. Durante muchos años se han utilizado en estos ensayos anticuerpos policlonales que permiten obtener una alta sensibilidad diagnóstica pero tienen limitaciones en la especificidad. Hoy se recurre, a pesar de su mayor costo, a anticuerpos monoclonales que incrementan la especificidad pero con pérdida de sensibilidad. Se ha iniciado el uso de mezclas de anticuerpos monoclonales que incluyen especificidades para los determinantes antigénicos más comunes; con ellos se logran niveles muy altos de sensibilidad y especificidad.

AGLUTINACION

Estas reacciones se utilizan mucho en los laboratorios clínicos de rutina porque son sencillas, económicas y de resultados rápidos. Utilizan partículas naturales o sintéticas para fijar en su superficie los antígenos o los anticuerpos. Las partículas naturales pueden ser bacterias como el *Staphylococcus aureus* que, gracias a la proteína A de su superficie, fija moléculas de IgG a través del fragmento FC. Las

reacciones que utilizan esta partícula se denominan de **coaglutinación**. Se emplean para detectar antígenos solubles específicos para el anticuerpo fijo en la superficie de las partículas estafilocócicas. También se han utilizado otras bacterias o parásitos para detectar anticuerpos séricos específicos contra diferentes componentes de su superficie. Es el caso de las pruebas de Widal y de Bang para el diagnóstico de la fiebre tifoidea y de la brucelosis, respectivamente. Se han utilizado igualmente los glóbulos rojos como superficie de soporte de anticuerpos o antígenos: se habla entonces de **hemaglutinación**.

Las partículas sintéticas conocidas como **Inmunoesferas** son las más utilizadas en los laboratorios clínicos generales; las hay plásticas y de gelatina. Las primeras se conocen popularmente con el nombre de **partículas de látex** y las hay de diferente composición: polietileno, polivinilo, poliácroléina y poliestireno; las últimas son las más comúnmente utilizadas. Para mejorar la visualización se puede variar el tamaño de las partículas desde 0.1 hasta 3 μm . También se pueden usar partículas de diferente color (amarillas, azules, blancas) para obtener mayor contraste. Se han producido, además, los llamados **látex activados** que presentan en su superficie radicales químicos libres (carboxilo, amino, aldehído, etc.) mediante los cuales fijan covalentemente antígenos o anticuerpos. Se mejora así la estabilidad del reactivo y se magnifica su poder diagnóstico.

Una ventaja adicional de las técnicas de aglutinación es poder realizarlas con muestras provenientes de cualquier especie animal, a diferencia de las técnicas con marcadores que requieren conjugados específicos para cada especie.

Un uso muy importante de estas pruebas en infectología es la detección de polisacáridos capsulares de gérmenes productores de meningitis, tanto en el líquido cefalorraquídeo como en el suero y la orina, y aunque el paciente esté o haya estado recibiendo drogas antibacterianas.

Clásicamente las técnicas de aglutinación se han realizado en lámina con resultados rápidos, confiables y realizables en cualquier sitio ya que la lectura es a simple vista. Sin embargo se pueden hacer modificaciones a la técnica con el fin de ahorrar reactivo (utilizar platos de micropozos) o mejorar su sensibilidad diagnóstica (hacer la lectura de la turbidez mediante nefelómetros o lectores láser). La sensibilidad de los procedimientos de lectura ocular varía

entre microgramos y nanogramos mientras que, con instrumentos, se puede llegar al nivel de fentogramos, similar al de muchas de las técnicas con marcadores.

PRUEBAS CON MARCADORES

Se incluyen en este grupo los procedimientos que utilizan marcadores sobre el antígeno o el anticuerpo. Son clásicas las técnicas de **inmunofluorescencia (IF)**, las de **radioinmunoanálisis (RIA)** y los **ensayos inmunoenzimáticos (ELISA)**. Mucho más recientes son las pruebas de quimioluminiscencia (QL). Las pruebas con marcadores tienen altas la sensibilidad y la especificidad pero son más laboriosas y costosas que las de aglutinación y sus reactivos son menos estables; además, hay que recolectar varias muestras y por lo tanto sus resultados no son tan rápidos. Se pueden realizar no sólo en líquidos corporales, como las de aglutinación, sino también directamente sobre cortes de tejidos o sobre muestras para exámenes directos. Permiten detectar las clases de inmunoglobulinas presentes en los líquidos o en los tejidos para definir la fase evolutiva de la infección (IgM, fase aguda; IgG, infección pasada). A diferencia de las pruebas de aglutinación, si no se recurre a conjugados específicos no se pueden realizar las de marcadores sobre los líquidos o tejidos de cualquier especie animal.

En los ensayos de IF se han utilizado rutinariamente como marcadores fluorocromos derivados de la fluoresceína o de la rodamina, especialmente cuando las lecturas se dejan al ojo humano. Para obviar la subjetividad de éste se han introducido nuevos fluorocromos, que han permitido la lectura instrumental y la automatización. Se trata de las **ficobiliproteínas** empleadas corrientemente en citometría de flujo (FACS), procedimiento de amplia utilización en el laboratorio clínico moderno de los países más desarrollados y en centros de investigación de avanzada. Los quelatos de europio, disponibles en nuestro medio, han facilitado el diagnóstico de emergencia de diferentes entidades, infecciosas o no; permiten resultados cuantitativos y son altamente estables después de su preparación. Por último, ciertos derivados cumarínicos extraídos de algas marinas, se están utilizando en ensayos de fluorescencia en leishmaniosis.

Los RIA son los procedimientos de referencia para estandarizar las diferentes pruebas con marcadores.

En nuestro medio se los ha utilizado principalmente en los análisis hormonales. En infectología su uso ha sido limitado, especialmente por el costo de los equipos y la labilidad de los marcadores, generalmente isótopos del yodo. La radiactividad se mide en los contadores de centelleo líquido (para la radiación beta) y sólido (para la radiación gamma). Los últimos son los más usados en los laboratorios clínicos, especialmente en las determinaciones de hormonas, ya mencionadas.

La técnica de **ELISA** utiliza enzimas como marcadores para los antígenos o los anticuerpos. Las enzimas más utilizadas en estas pruebas han sido la peroxidasa y la fosfatasa alcalina. El sustrato más usado para la peroxidasa ha sido el luminol y para la fosfatasa el fosfato de luciferina. Por la interacción enzima sustrato se genera una reacción de color detectable por simple observación o mediante algún aparato. Se trata de procedimientos elaborados, que incluyen diversos elementos entre antígenos, anticuerpos, enzimas, conjugados, sustratos y tubos o placas de reacción (fase sólida), además de una serie de pasos muy bien cronometrados, con temperaturas de incubación estrictamente seleccionadas y varios lavados intercalados, todo ello fundamental para la buena marcha de la reacción; por lo mismo se requiere una persona perfectamente entrenada que realice con regularidad la técnica, para evitar el sinnúmero de errores a que está sujeta.

Existen diversos protocolos para mejorar la sensibilidad y la especificidad diagnósticas de los ensayos inmunoenzimáticos. Los más conocidos se pueden agrupar en **sánduche, inhibición e inmunocaptura**. La modalidad más utilizada es la tipo sánduche que utiliza el antígeno, fijo al estado sólido, como sistema de captura de los anticuerpos del paciente. Esta es la técnica más simple y económica pero tiene limitaciones de sensibilidad y especificidad cuando se la utiliza para determinar IgM específica; en efecto: por la competencia con IgG puede dar lugar a falsos negativos y por la presencia de factor reumatoideo sérico de tipo IgM a falsos positivos. Es muy importante tener en cuenta esta última situación en el estudio de niños con infección perinatal crónica (TORCH) dado que hasta en 90% de los casos de este síndrome se presenta factor reumatoideo sérico; por ello hay que ser muy cautos en la interpretación de un resultado positivo para una IgM específica, obtenido por este sistema. Esta limitación en los

sistemas de sánduche para determinar IgM específica se ha obviado separando previamente las IgM del paciente por sistemas cromatográficos. Uno muy conocido, llamado **Isolab**, utiliza proteína G estreptocócica como sistema de captura de los anticuerpos, ya que es específica para el fragmento FC de las IgG, deja libre las IgM y con esta fracción libre se determina la IgM específica, sin las limitaciones de sensibilidad y especificidad, ya anotadas. Un sistema alternativo para obviar los problemas de sensibilidad y especificidad de las técnicas de sánduche es el método de **inmuncaptura** que utiliza IgG específica anti IgM, fija al estado sólido, como sistema de captura de las IgM del paciente. También se puede usar para detectar una cualquiera de las demás clases de inmunoglobulinas. Es un proceso más elaborado y por lo tanto existen menos proveedores.

No se aludirá en detalle a los sistemas de **inhibición**; su característica primordial es la alta sensibilidad por lo que son muy utilizados para detectar antígenos en los líquidos corporales. Así mismo se han desarrollado sistemas de amplificación a base de **avidina** y **biotina** que permiten detectar los antígenos o mínúsculas cantidades de anticuerpos. Igualmente, con el fin de incrementar la sensibilidad diagnóstica de las pruebas de ELISA se han cambiado los sustratos corrientes por otros que tienen la capacidad de emitir fotones cuando reaccionan con la enzima respectiva. La formación del complejo inmune no se detecta por un cambio de color sino por la emisión de luz detectable mediante lectores de fotones. Estas pruebas de ELISA modificadas se denominan ensayos de **quimioluminiscencia (QL)** que son, en el momento actual, los procedimientos de mayor sensibilidad.

OTROS PROCEDIMIENTOS

Existe una serie de métodos diagnósticos que reúnen características de varias de las técnicas mencionadas: tal es el caso de los denominados **Blotting** o **pruebas de manchas o bandas**. Inicialmente se hace una separación electroforética de las proteínas o los ácidos nucleicos que se van a investigar. Luego se transfieren las moléculas del soporte coloidal, donde se hizo la separación, a uno sólido (papel u otro medio rígido). Después, si se trata de proteínas, se hace la caracterización mediante ELISA o RIA con anticuerpos monoclonales o policlonales. Estos **Blotting** de proteínas se conocen como **Western Blot**.

Para el diagnóstico del síndrome de inmunodeficiencia humana se ha desarrollado un sistema de **Western Blotting** que se considera el método de referencia para confirmar la infección. Estas técnicas son costosas, laboriosas y en general limitadas a laboratorios de investigación, pero han permitido desarrollar otras más simples realizables en cualquier laboratorio. Es el caso de las pruebas de ELISA denominadas **Dot Spot** o de **manchas puntuales**, en las cuales se depositan los antígenos o los anticuerpos sobre tirillas de papel, para buscar la correspondiente contraparte.

Si se trata de ácidos nucleicos y el sistema de transferencia y caracterización es para DNA el método se llama **Southern Blot**; si es para el RNA se denomina **Northern Blot**. Antes de realizar la electroforesis y la transferencia de los ácidos nucleicos es indispensable hidrolizarlos mediante enzimas de restricción. La identificación de secuencias específicas se realiza por medio de **hibridación** con sondas conocidas. Estos sistemas para identificar ácidos nucleicos son bastante complejos, muy costosos y de uso limitado al campo investigativo; sin embargo, han permitido elaborar métodos de hibridación más simples y rápidos como los denominados **Dot Blot** o **hibridación in situ**: la muestra del paciente se aplica directamente sobre el soporte de papel, sin hidrólisis ni electroforesis previas. El papel recibe una serie de tratamientos y se procede luego a la hibridación con la sonda específica. Esta técnica ha sido usada ampliamente en el terreno de la virología. Los métodos de hibridación disponibles comercialmente en la actualidad para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, detectan preferiblemente RNA ribosómico para incrementar la sensibilidad diagnóstica; con ellos se pueden obtener resultados en menos de dos horas. Están disponibles para *Mycoplasma*, hepatitis, *Chlamydia*, *Campylobacter*, etc. Los métodos de hibridación tienen los inconvenientes del costo y del uso de radioisótopos como marcadores; se están desarrollando sistemas enzimáticos, acoplando a las sondas diagnósticas enzimas como la peroxidasa o la fosfatasa alcalina y revelando los resultados mediante sustratos que cambian de color, como en una prueba de ELISA corriente o mediante la emisión de luz, como en las pruebas de QL, ya señaladas. Finalmente, el desarrollo de la **reacción de polimerasa en cadena (PCR)** como sistema de amplificación genética que permite detec-

tar una sola molécula de DNA, abre un futuro promisorio en el diagnóstico de las enfermedades humanas y brindará al médico una herramienta de exquisita fidelidad para la evaluación de sus pacientes.

SUMMARY

MODERN PROCEDURES FOR THE DIAGNOSIS OF INFECTIOUS DISEASES

This is a brief review of some modern diagnostic procedures for infectious diseases; various tests for the immune diagnosis as well as blotting tests and nucleic acid

hybridization methods are included; in each case technical aspects, advantages, limitations, sensitivity and specificity are considered.

BIBLIOGRAFIA

1. GARCIA M. Hibridación de ácidos nucleicos: fundamentos y aplicaciones. *Bol Of Sanit Panam* 1990; 109: 244-257.
2. BRONSTEIN I, KRICKA L. Clinical applications of luminescent assays for enzymes and enzyme labels. *J Clin Lab Analysis* 1989; 3: 316-322.
3. PROFFITT M. "Blotting" techniques for the diagnosis of infectious diseases. *Clinical Microbiology Newsletter* 1990; 12: 121-124.