

Papel del laboratorio en el diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas

Nora Guarín, M.D. – CIDEIM, Colombia

"Hay 3 pasos para el tratamiento: diagnóstico, diagnóstico y diagnóstico" (William Osler, 1849-1919).

Las enfermedades infecciosas son la principal causa de muerte en el mundo. Hay una creciente aparición de infecciones emergentes y reemergentes, entendidas como patologías cuya incidencia se ha incrementado en los últimos 20 años o amenaza con incrementarse en el futuro próximo, incluyendo agentes infecciosos nuevos, patógenos reemergentes y organismos que están desarrollando resistencia antimicrobiana. Así mismo, hay enfermedades ya reconocidas, en las cuales ahora se identifica un agente etiológico infeccioso, como la úlcera péptica asociada con *Helicobacter pylori*. También se conoce la relación entre algunas enfermedades malignas y la presencia de agentes infecciosos como el carcinoma de cérvix y el virus del papiloma humano o carcinoma hepatocelular y hepatitis B. Probablemente muchas otras enfermedades crónicas tengan una etiología infecciosa y otras que fueron de curso letal, como el SIDA, se están constituyendo a su vez en enfermedades crónicas, debido a la intervención terapéutica. Todo lo anterior demuestra que la infectología es un área de la medicina rápidamente cambiante.

En consecuencia, se impone la necesidad de desarrollar nuestra capacidad para detectar, responder, hacer seguimiento y controlar estas enfermedades. El objetivo del laboratorio clínico y de patología en las enfermedades infecciosas es brindar apoyo al clínico en los siguientes aspectos:

- Confirmar o rechazar un diagnóstico
- Proporcionar guías en el manejo del paciente
- Establecer pronóstico
- Detectar enfermedad mediante hallazgos específicos o pruebas de tamizaje
- Ayudar en el seguimiento terapéutico de los pacientes.

Antes de ordenar un examen, el clínico debe saber qué utilidad le prestará el resultado: cuál es la sensibilidad del método, la especificidad y el valor predictivo esperado de acuerdo con la prevalencia de la enfermedad. Debe recordarse que con una prevalencia de cero, el valor predictivo de la prueba será también de cero. Con estas mismas consideraciones, se debe tener claro el orden a seguir en la solicitud de los exámenes; en nuestro laboratorio, por ejemplo, la sensibilidad del frotis para diagnóstico de leishmaniasis es de 80% y la del cultivo de 73%, por tanto, no es adecuado comenzar la exploración diagnóstica con la reacción de Montenegro, que en áreas de alta prevalencia es positiva en gran parte de la población que nunca ha tenido la enfermedad.

Para ser exitosos en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, como en cualquier otra área del laboratorio, es fundamental tener en cuenta 3 etapas:

-Fase preanalítica:

nunca será excesivo el énfasis en la necesidad de los datos clínicos completos del paciente, incluyendo los aspectos demográficos. Debe recordarse que en enfermedades infecciosas suele haber casos de difícil diagnóstico en los cuales deben considerarse varios agentes etiológicos. La preparación del paciente requiere que se le suministre información completa, condiciones especiales como ayuno, aseo, etc.

La recolección de una muestra óptima requiere una estrecha comunicación con el laboratorio: uso de recipientes estériles y además nuevos si se trata de pruebas moleculares, escogencia del tipo y momento adecuado según el germen buscado y el estadio de la enfermedad: en general, la fase aguda para enfermedades virales y, cuando se trata de bacterias, antes de iniciar los antimicrobianos. Es muy importante el volumen mínimo de la muestra para no obtener falsos negativos (PCR para M. Tuberculosis en muestras paucibacilares, por ejemplo, se beneficia de volúmenes grandes y muestras repetidas); si la muestra es escasa debe definirse cuál de los exámenes es prioritario. El transporte de los especímenes debe hacerse bajo condiciones específicas; por ejemplo, el aumento de la temperatura puede favorecer el sobrecrecimiento de contaminantes y disminuir la recuperación de los microorganismos en cultivos. Otras muestras, por el contrario, deben transportarse a temperatura ambiente. La recepción, conservación y procesamiento inicial de la muestra debe hacerse de estricto acuerdo con los protocolos establecidos.

-Fase analítica:

el laboratorio debe producir resultados confiables, basándose en la disposición de personal altamente calificado a nivel técnico y científico en las áreas de microbiología, patología y biología molecular, materiales y reactivos de excelente calidad, equipos adecuados, modernos, bien calibrados y con mantenimiento preventivo programado, protocolos y manuales de procedimiento propios del laboratorio, estandarizados y aún validados en condiciones locales, cuando fuere necesario.

-Fase postanalítica:

el laboratorio debe emitir informes completos, con valores de referencia y toda la información necesaria para su adecuada interpretación. Los resultados deben darse en el menor tiempo posible para prestar la mejor ayuda al paciente. Debe haber disposición del director y demás personal del laboratorio para la comunicación y discusión de los resultados con el médico tratante.

Todo este proceso, del comienzo al final, debe estar regido y controlado por los debidos procedimientos externos e internos de control de calidad.

El patólogo quirúrgico en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas

El patólogo representa un importante papel en el reconocimiento de los agentes infecciosos:

- Puede dar una respuesta que salve la vida mediante un rápido diagnóstico morfológico.
- Ayuda a excluir infecciones en cuadros clínicos confusos
- Proporciona guía microbiológica para buscar agentes causales y establece el significado patogénico de un aislado de cultivo.
- Puede hacer diagnóstico cuando no se tiene material en fresco o no se han hecho cultivos o éstos son repetidamente negativos
- Confirma un diagnóstico cuando la morfología es el único elemento disponible en enfermedades cuyo agente etiológico no se puede cultivar (M. leprae, virus del papiloma)
- Facilita al clínico el manejo del paciente.
- Identifica nuevos patrones de enfermedad y detecta infecciones emergentes.

El material de biopsias parafinizado (para algunas técnicas especiales, el material fresco preferencialmente), provee una importante fuente de información mediante el análisis morfológico macroscópico, coloraciones convencionales y especiales para microorganismos, coloraciones inmunofluorescentes, demostración de microorganismos por inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales o policlonales (virus, por ejemplo, sin cuerpos de inclusión), hibridización in situ y PCR. El procedimiento a seguir por el patólogo debe ser secuencial y sistemático limitando el número de microorganismos a descartar, e idealmente debe hacer correlación con los resultados de los métodos serológicos, cultivos y exámenes directos realizados en las muestras clínicas convencionales.

Patología Molecular

Es una disciplina definida como la aplicación al laboratorio y la clínica de la tecnología de ácidos nucleicos para diagnosticar, hacer seguimiento de enfermedades y evaluar condiciones de los individuos no asociadas con enfermedad. Uno de los campos más promisorios se encuentra en el diagnóstico y seguimiento de las enfermedades infecciosas, permitiendo, además, hacer epidemiología molecular y control de infecciones hospitalarias. La aplicación al diagnóstico de las enfermedades infecciosas va entrando en la rutina del laboratorio y su aplicación debe regirse por las limitaciones de los métodos convencionales y menos costosos más bien que por la simple tendencia a la aplicación de técnicas novedosas y sofisticadas. Las exigencias en infraestructura, costos de reactivos, entrenamiento de personal y control de calidad dificultan la realización de estas pruebas en muchos laboratorios en el mundo entero y lo más práctico sigue siendo la remisión de las muestras a laboratorios especializados donde se maneje como un procedimiento de rutina. Algunas de las técnicas más utilizadas son las siguientes:

- **Técnicas de Hibridización:**

Técnicas como Southern blot, Northern blot y Dot blot son muy útiles para la identificación directa y sirven también en la detección de productos amplificados. La hibridación in situ permite, además, la localización del patógeno en el tejido y en la célula portadora. La principal desventaja de estos métodos, usados sin amplificación previa, es que para la detección requieren una mayor cantidad del ácido nucleico blanco en la muestra. El PCR in situ seguido de hibridación ha mejorado la aplicación de ésta metodología en tejidos a nivel de investigación.

- **Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR y RT-PCR):**

La utilidad de la PCR, desarrollado en 1983, ha aumentado progresivamente debido a su exquisita sensibilidad y a la posibilidad de detectar DNA o RNA en diferentes muestras clínicas, en cantidades muy limitadas. La eficacia de otros métodos moleculares sigue evaluándose frente a esta técnica como estándar de oro. Sus principales aplicaciones son la detección rápida de secuencias de ácidos nucleicos microbianos presentes en pequeñas cantidades, agentes difíciles de cultivar o no cultivables, patógenos altamente peligrosos, infecciones latentes y seguimiento de pacientes mediante la cuantificación de virus circulante (carga viral) en pacientes con SIDA, o HCV, tipificación de cepas, detección de determinantes asociados a virulencia o a resistencia, clasificación filogenética de microorganismos y estudios experimentales de patogénesis.

Las principales desventajas son debidas a su muy alta sensibilidad y puede dar falsos positivos por contaminación cruzada entre muestras o por amplicones. También presenta dificultades en algunos casos para diferenciar enfermedad activa de una infección anterior y, por tanto, para estudios de seguimiento.

- **Reacción en Cadena de la Ligasa (LCR):**

El DNA blanco se hibridiza a fragmentos de oligonucleótidos adyacentes que se unen mediante una ligasa. El desarrollo de pruebas comerciales es promisorio especialmente para *Listeria monocitogenes*, *Micobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*.

- **Amplificación Mediada por Transcripción:**

Un fragmento de RNA se marca con una sonda que promueve la síntesis de un cDNA por transcripción reversa. El RNA se degrada y el DNA copiado se duplica; múltiples copias de RNA se transcriben a partir de ese DNA y el proceso vuelve a ocurrir cíclicamente. Si el blanco es rRNA (del cual hay miles de copias por bacteria) la sensibilidad del método es muy superior. La detección final se hace por quimioluminiscencia.

- **Branched DNA:**

Amplifica la señal derivada de una reacción de hibridización, utilizando sondas marcadas y haciendo la detección final por quimioluminiscencia. Es un método altamente sensible y con menores posibilidades de contaminación que el PCR, muy utilizado para determinar carga viral.

- **NASBA (nucleic acid sequence based amplification):**

Es un método de amplificación isotérmica multienzimático de RNA, que simula el ciclo retroviral. El producto final es RNA y se detecta por electroquimioluminiscencia. Se utiliza con muy buenos resultados para determinación de carga viral.

Los métodos moleculares han tardado en ser incorporados a la rutina del diagnóstico de enfermedades infecciosas debido a la alta variabilidad dentro de los laboratorios. Cada vez está más clara la necesidad de introducir estandarización y automatización de estas pruebas, controles positivos, negativos y de inhibición suficientes y adecuada validación de la prueba antes de ser utilizada con fines diagnósticos. El control de los equipos, con una calibración adecuada es indispensable, así como los tests de proficiencia o controles externos realizados por laboratorios de referencia. Las pruebas moleculares utilizan reactivos cuya estabilidad por largos períodos de tiempo es difícil, pero la comparación de resultados con laboratorios pares refuerza la confianza en los resultados.