

ARCHIVO HISTÓRICO



El presente artículo corresponde a un archivo originalmente publicado en el **Boletín de la Escuela de Medicina**, actualmente incluido en el historial de **Ars Medica Revista de ciencias médicas**. El contenido del presente artículo, no necesariamente representa la actual línea editorial. Para mayor información visitar el siguiente

vínculo: <http://www.arsmedica.cl/index.php/MED/about/submissions#authorGuidelines>



Vol. 26 No. 3, 1997 [ver índice]

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA

Diagnóstico de las enfermedades infecciosas.

Dr. Francisco Montiel Avendaño
Profesor Adjunto
UDA Laboratorios Clínicos
Pontificia Universidad Católica de Chile

Dra. Ana María Guzmán Durán
Instructor Asociado
UDA Laboratorios Clínicos
Pontificia Universidad Católica de Chile

Para establecer el diagnóstico y el tratamiento en los pacientes con enfermedades infecciosas, el médico requiere del apoyo del Laboratorio de Microbiología. La estrecha colaboración entre los médicos tratantes y el Laboratorio es imprescindible para obtener el máximo beneficio para los pacientes.

El diagnóstico etiológico de la enfermedad infecciosa se establece desde el momento en que se aísla e identifica el agente causante. En algunas oportunidades no es posible este aislamiento, por lo que el diagnóstico debe establecerse mediante otros parámetros, como son aumento del título de anticuerpos, o bien el hallazgo de antígenos, componentes celulares o un producto metabólico específico del microorganismo. El aislamiento y la identificación de bacterias y virus necesitan de la cooperación del médico tratante, quien debe familiarizarse con los conceptos generales para la obtención y transporte de las muestras clínicas.

Recolección transporte de muestras

Los resultados que se obtienen en el Laboratorio de Microbiología dependen en gran medida de la calidad y condiciones de transporte de la muestra obtenida; es por esto que las recomendaciones más abajo explicitadas deben tenerse presentes y cumplirse cabalmente durante la recolección, manipulación y transporte de las muestras.

1. Las muestras deben obtenerse preferentemente antes de comenzar la terapia con antibióticos o bien antes de introducir cualquier modificación al tratamiento con antimicrobianos.
2. La muestra obtenida no debe presentar contaminación con flora habitual, o ésta debe ser la mínima posible.
3. Los sistemas de recolección deben ser apropiados al tipo y volumen de la muestra que se desea obtener. El material usado debe ser estéril y libre de material residual, como detergentes o desinfectantes.
4. La muestra debe llegar al Laboratorio en un mínimo de tiempo. De existir demora entre la toma de la muestra y su procesamiento, el transporte debe hacerse en los medios de transporte proporcionados por el laboratorio.
5. Las muestras deben ser identificadas con una etiqueta adherida al envase, y los datos anotados deben coincidir exactamente con los de la solicitud de examen.
6. Deben incluirse aquellos datos del paciente que permitan al laboratorio elegir el mejor procedimiento para el aislamiento de patógenos, tales como edad, hipótesis diagnóstica, tratamientos concomitantes (especialmente antibióticos) enfermedades concomitantes, etcétera.

El Laboratorio de Microbiología presta apoyo al clínico a través de:

1. Información adecuada y actualizada para la toma de muestras.
2. Detección e identificación de los patógenos aislados.
3. Determinación de la sensibilidad de estos microorganismos.
4. Apoyo a los epidemiólogos y encargados de la vigilancia de infecciones nosocomiales en la identificación y seguimiento de las cepas causantes de las infecciones intrahospitalarias.

En comparación con los otros campos del laboratorio, el de Microbiología ha tenido un avance más lento en el desarrollo de medios específicos y rápidos para el diagnóstico de los agentes etiológicos de las enfermedades infecciosas.

Para indicar una terapia adecuada en base a la sensibilidad a los antibióticos es indispensable identificar, en forma rápida y correcta el agente causal de la infección. Las herramientas diagnósticas más empleadas, siguen siendo la observación directa, con o sin tinción y las técnicas de cultivo. Considerando que estos últimos suelen demorar algunos días, se ha logrado acelerar su informe en la detección de microorganismos procedentes de los hemocultivos y en el cultivo de los Mycobacterium. Estos métodos han sido complementados y perfeccionados con la introducción de técnicas computacionales, que han permitido la recuperación de las bacterias en tiempos reducidos (ver artículo sobre hemocultivos en esta monografía).

Observación microscópica

Observación directa sin tinción o preparación al fresco

Se puede obtener información rápida a través de la observación microscópica de la muestra sin teñir, para la búsqueda de hongos, bacterias y parásitos. La muestra se suspende en suero fisiológico, en solución de KOH, o bien en tinta china.

La suspensión en suero fisiológico permite demostrar la presencia de Trichomonas Treponemas. Para estos últimos, además, se recomienda la observación en campo oscuro.

La suspensión en KOH se utiliza preferentemente en la identificación de hongos. La muestra clínica (expectoración, raspado de piel o de tejidos) es mezclada con la solución de KOH al 10%, dejándola actuar por 1-15 minutos (se puede calentar suavemente, para acelerar la digestión de los tejidos).

La suspensión en tinta china se usa para la visualización de Cryptococcus neoformans. Una vez centrifugado el líquido cefalorraquídeo (LCR), se coloca sobre una lámina portaobjetos y se mezcla con una gota de tinta china diluida. La cápsula mucoide que envuelve a la levadura aparece como un halo claro que la rodea. Es importante observar levaduras en yemación para asegurar el diagnóstico. La observación debe hacerse entre lámina y laminilla, usando un objetivo de 40X.

Observación directa con tinción

Tinción de Gram. La diferente coloración que adquieren las bacterias Grampositivas se basa en el menor contenido lípidos de la pared celular y en la reducida permeabilidad a los solventes de estos microorganismos, en comparación con los gramnegativos. Las bacterias grampositivas se tiñen violeta por la retención del complejo cristal violeta genciana/yodo, mientras que las gramnegativas no retienen el complejo y se tiñen rojas al usar la contratinción de safranina.

La tinción de Gram ayuda a determinar rápidamente las características morfológicas, por lo que es útil en la indicación de los antibióticos. Esta tinción también permite establecer si el material enviado al laboratorio para su cultivo posee la calidad adecuada. Por ejemplo, es inadecuada una muestra de expectoración en que se observan abundantes células epiteliales, lo que indica que está constituida principalmente por saliva y no secreción del tracto respiratorio. La presencia de polimorfos nucleares (PMN) puede indicar infección. Los hongos levaduriformes se observan formando pseudomicelios cuando hay invasión y no sólo colonización.

Tinción de Giemsa y Wright. Es útil en el diagnóstico de algunos parásitos como malaria y babesiosis. En las lesiones producidas por virus Herpes simplex y virus varicela-zoster, se observan células gigantes multinucleadas, propias de las lesiones virales, lo que permite distinguirlas de las lesiones piodérmicas bacterianas.

Tinción argéntica (Gomori metenamina de plata, Dieterle). Es una técnica difícil de efectuar, reservada a los laboratorios especializados, útil en la detección de *Pneumocystis carinii*, *Legionella*, *Treponema*, hongos, rickettsias, y microorganismos asociados a la enfermedad por arañazo de gato.

Tinción ácido periódico de Schiff (PAS). Permite la detección de hongos en muestras de tejido.

Tinción con anaranjado de acridina. Utiliza un fluorocromo que tiñe el ácido desoxirribonucleico (ADN). Es más sensible que la tinción de Gram, ya que aún las bacterias dañadas por los antibióticos pueden ser visualizadas. Requiere de microscopio de fluorescencia.

Tinción con azul de metileno. Es usada en la búsqueda de leucocitos fecales, permitiendo una buena tinción de los núcleos de estas células. Se visualizan en las infecciones intestinales invasoras de la pared del tubo digestivo, como las producidas por *Escherichia coli* enteroinvasora, *Shigella*, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y enterocolitis asociada a antibióticos.

Cultivos

Hemocultivo. La indicación más empleada de los hemocultivos es la sospecha de una bacteremia. Ver artículo específico en esta monografía.

Urocultivo. Destinado a la investigación de la infección urinaria. Ver "Infección urinaria: Diagnóstico y Tratamiento" en esta monografía.

Coprocultivo. Se usa de preferencia en la búsqueda de patógenos intestinales productores de enterocolitis aguda. La muestra se obtiene directamente de la deposición recientemente emitida o bien de un hisopado rectal. Debe usarse un medio de transporte adecuado (Cary-Blair) si ésta no va a ser procesada de inmediato.

La selección de los medios de cultivo, así como el procedimiento de aislamiento a seguir, dependen del agente etiológico que se esté investigando. Si no se explicita otra situación, rutinariamente, la búsqueda se concentra en los patógenos habituales como *Salmonella* y *Shigella*. En los casos especiales, debe indicarse si se sospecha *Escherichia Coli* enteropatógena, enteroinvasora, enterotoxigénica, enterohemorrágica, o entero agregante; *Campylobacter SPP.*, *Vibrio cholera*, *Yersinia enterocolitica*, etcétera.

Cultivo de *Mycobacterium spp.* Util en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar paucibacilar y especialmente en las formas extrapulmonares. Actualmente está indicado, además del cultivo en medio sólido, el cultivo en medios líquidos, disminuyendo así los tiempos de desarrollo. En nuestro laboratorio utilizamos el sistema MB/Bact semiautomizado para todo tipo de muestras, excepto sangre.

Cultivo de hongos. La búsqueda puede ser de hongos levaduriformes o miceliados. Es importante conocer hacia cuál de ellos se inclina la sospecha, dado que los tiempos de incubación son diferentes. Los hongos levaduriformes se incuban por plazos que oscilan entre 5 y 7 días, en cambio los filamentos deben ser incubados por plazos más largos, de 20 hasta 30 días.

Cultivo anaerobio. Algunas bacterias de importancia clínica son anaeróbicas, difíciles de cultivar y oxígeno lábiles, por lo que en su recolección y transporte deben usarse envases especiales que contengan una atmósfera reducida, es decir, con un bajo potencial de oxidoreducción. Es de extraordinaria importancia que la muestra sea procesada de inmediato.

La muestra en lo posible debe ser obtenida por aspiración. Las tórulas no son adecuadas, por la desecación y exposición al oxígeno ambiental. Deberá evitarse la contaminación con flora residente, ya que en ella están ampliamente representadas las bacterias anaeróbicas.

Los sitios anatómicos adecuados para la obtención de muestras para estudio de anaerobios son líquidos orgánicos estériles (Líquido pleural, sangre, bilis, líquido peritoneal, líquido sinovial, (LCR), muestras quirúrgicas obtenidas de sitios estériles (Contenido de abscesos, aspirado de heridas profundas) y muestras de biopsias obtenidas en forma aséptica (Transcutánea pulmonar, aspiración vesical suprapúbica, líquido de culdocentesis, etcétera).

Es importante tener presente que a toda muestra procesada para la búsqueda de anaerobios, debe efectuársele una tinción de Gram. Dado que los cultivos son demorosos en entregar

resultados, el Gram puede proporcionar una buena información temprana, útil para iniciar tratamiento y, al mismo tiempo, verifica la concordancia con los resultados de los cultivos.

Catéteres intravenosos. Los catéteres intravenosos son cultivados cualitativa o semicuantitativamente, dependiendo de las técnicas usadas en los laboratorios. La técnica de cultivo semicuantitativo (Maki) , consiste en hacer rodar el extremo del catéter sobre la superficie de una placa de medio cultivo, e informar el número de colonias que se desarrollan en ésta. La presencia de 15 o más colonias se correlaciona con inspección.

Falta de desarrollo en el cultivo

La falta de desarrollo de un cultivo puede deberse a:

1. **Diagnóstico incorrecto.** La inspección es debida a microorganismos no cultivables en los medios habituales, como virus, rickettsias, mycoplasmas y chlamydias.
2. **Interpretación errada de la tinción de Gram.** Se interpreta como microorganismos la presencia de artefactos en la preparación.
3. **Muestra inadecuada.** La muestra clínica no es representativa del material propio del sitio de la infección.
4. **Transporte inadecuado o prolongado.** Si esto sucede, algunos microorganismos pueden no ser viables al momento de llegar al laboratorio. Esto ocurre con anaerobios, estreptococos, Neisseria. Si el transporte es prolongado, puede haber sobre crecimiento de flora residente que oculte la presencia de patógenos, lo que pueden haber estado en menor número.
5. **Terapia con antibióticos.** Aunque sea una dosis única, ésta muchas veces es suficiente para inhibir o retardar el crecimiento bacteriano.
6. **Metodología de cultivo inadecuada.** Se requiere de técnicas especiales para el cultivo de determinados patógenos, como el caso de anaerobios, micobacterias, hongos y ciertas bacterias exigentes en cuanto a sus nutrientes y/o condiciones de vida. Por esto, el laboratorio debe conocer cuál es la sospecha diagnóstica, para tener la oportunidad de cultivar al agente etiológico.

Técnicas inmunológicas

El diagnóstico rápido de las enfermedades infecciosas se ve facilitado por el empleo de técnicas inmunológicas abreviadas. Ninguna de ellas es tan específica o sensible como el cultivo, por lo que este último debe ser considerado el "estándar de oro" frente a cualquier comparación.

Las técnicas inmunológicas pueden estar orientadas a la búsqueda de anticuerpos o de antígenos. Las destinadas a la búsqueda de anticuerpos necesitan del tiempo necesario para que se produzca un alza significativa del título de anticuerpos. Los antígenos en cambio, pueden ser detectados desde el comienzo de la enfermedad. Constituye una ventaja el que aún durante el tratamiento con antibióticos, los antígenos sean detectables.

Entre las enfermedades infecciosas diagnosticadas por exámenes serológicos están sífilis, rubéola, leptospirosis toxoplasmosis, mononucleosis infecciosa, etcétera.

Existen diferentes exámenes que permiten su titulación, entre los que se cuentan aglutinación, precipitación, fijación del complemento, hemaglutinación, neutralización, inmunofluorescencia, ensayo inmunoenzimático, radioinmunoensayo, etcétera.

Los exámenes serológicos se usan en la determinación del grado de inmunidad que posee un sujeto para el diagnóstico de infección aguda.

Diagnóstico del estado inmune. Es de interés verificar el estado inmune del sujeto. Una situación de este tipo, por ejemplo, es determinar el grado de inmunidad frente a rubéola en una mujer en edad fértil.

Diagnóstico de infección aguda. El diagnóstico de infección aguda se establece comparando los títulos de dos sueros pareados, uno obtenido en la fase aguda y otro en la fase de convalecencia, o 14 días después de la primera muestra. El suero de fase aguda debe obtenerse tan temprano como sea posible en el transcurso de la enfermedad. El suero de la fase convalescente debe extraerse no antes de 10 días de comenzada la enfermedad, de preferencia 2-4 semanas después.

Sueros pareados. Cuando se usan sueros pareados, la conversión de seronegativo a seropositivo o un aumento de 4 veces o más del título de anticuerpos obtenido inicialmente es indicador de infección reciente. Sería altamente recomendable que en todo paciente hospitalizado con un estado febril no diagnosticado, se guarde una muestra de suero congelado, para su uso en eventuales estudios serológicos. Para que las pruebas serológicas pareadas tengan validez ambas muestras de suero (fase aguda y fase de convalecencia) deben procesarse simultáneamente.

Muestra única de suero (fase aguda). Una muestra única de suero también puede ser útil para el diagnóstico. Los anticuerpos tipo Igm aparecen tempranamente durante la infección primaria y persisten por varias semanas. Por lo tanto la presencia de anticuerpos Igm es indicadora de infección reciente.

DetECCIÓN DE ANTÍGENOS

Son pruebas destinadas a la detección de antígenos en las muestras clínicas. Estas reacciones inmunológicas no dependen de la presencia de microorganismo viables, sino que sólo de sus antígenos, por lo que pueden ser usadas aun en sujetos que estén recibiendo antibióticos. Estos exámenes son de gran apoyo al diagnóstico por su rapidez, pero no sustituyen a los cultivos, a la tinción de Gram ni a otras técnicas de diagnóstico. Entre las técnicas más usadas está la aglutinación mediante partículas de látex recubiertas con anticuerpos específicos, que pueden utilizarse para demostrar en forma rápida la presencia de antígenos bacterianos y fúngicos.

En el diagnóstico de cryptococosis, por ejemplo, se usan partículas de látex recubiertas con anticuerpos antipolisacárido de la cápsula del *Cryptococcus neoformans*, que provocan una aglutinación visible cuando está presente en el LCR o en el suero del paciente. En casos de meningitis, se puede detectar en el LCR la presencia de antígenos de *Haemophilus influenzae* (tipo b; *Streptococcus pneumoniae* (omnitipo); *Neisseria meningitidis* (tipos A, B, C, W e Y) y de *Streptococcus beta hemolítico grupo B*.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA). Esta técnica detecta una amplia variedad de agentes infecciosos. Se deja interactuar el suero del paciente, en el que se encuentra el antígeno, con un anticuerpo específico, luego se extrae el anticuerpo no ligado sobrante y se agrega una inmunoglobulina anti-humana conjugada con una enzima específica (fosfatasa alcalina, peroxidasa). Finalmente se agrega un sustrato para la enzima. La enzima ligada al complejo actúa sobre el sustrato, produciendo cambio de color, el que puede leerse a simple vista o mediante un espectrofotómetro, permitiendo su cuantificación. El color que se produce es proporcional a la cantidad de anticuerpo específico que se fija al antígeno. El método se utiliza en la detección de virus sincial respiratorio, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, rotavirus, adenovirus, virus hepatitis, virus varicela-zóster, etcétera.

Inmunofluorescencia directa (IFD). Usa un anticuerpo marcado con isotiocianato de fluoresceína, que permite la identificación de antígenos bacterianos o virales en las muestras clínicas. Se usa en la detección de virus respiratorios (influenza, parainfluenza, adenovirus, virus sincial respiratorio), virus herpes, sarampión y parotiditis, así como en bacterias como *Bordetella pertussis*, *Rickettsia rickettsia* y *Chlamydia trachomatis*. Es una técnica muy sensible, que requiere de sueros de muy buena calidad y de personal adiestrado.

Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Usa el suero del paciente para investigar anticuerpos. Este suero es incubado en presencia de un antígeno específico. Para la visualización del completo resultante, se utiliza un anticuerpo anti-globulina humana, marcado con isotiocianato de fluoresceína.

Sensibilidad In Vitro a antibióticos

Sólo haremos un resumen de este tema, puesto que éste se trata en profundidad en otro artículo de esta monografía. Se emplean dos grupos de técnicas en la determinación de sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos.

Técnica de difusión. Se basa en la difusión del antibiótico a partir de un disco de papel impregnado con una cantidad determinada de antibiótico. Esta técnica, basada en el método de Kirby-Bauer, es un método suficiente para la determinación de la sensibilidad de las bacterias de crecimiento rápido. Los discos con el antibiótico son colocados sobre una placa de agar Mueller-Hinton, previamente sembrada con un inóculo estándar del microorganismo a estudiar. Las placas, después de ser incubadas por 18 horas, presentan zonas de inhibición bacteriana alrededor de cada disco que contiene un antibiótico activo frente al microorganismo. El diámetro de la zona en inhibición determina si existe sensibilidad o resistencia.

Técnica de dilución. El antibiótico es diluido sucesivamente a la mitad, ya sea en medio líquido o sólido. Luego se procede a inocular el microorganismo en concentración adecuada en cada una de las diluciones efectuadas.

Esta técnica permite establecer la concentración inhibitoria mínima (CIM) para cada microorganismo analizado, valor que está dado por la concentración de antibiótico presente en el último tubo que no presenta desarrollo.

La determinación de sensibilidad por difusión es habitualmente suficiente como indicador de la sensibilidad de un microorganismo, sin embargo en ciertas situaciones se recomienda la determinación de CIM por dilución.

Estas situaciones pueden resumirse en la endocarditis bacteriana, septicemia y meningitis bacteriana (ver en artículo "Interpretación de los estudios de susceptibilidad antimicrobiana")

Técnicas rápidas de determinación de resistencia. Existen dos técnicas usadas en la determinación rápida de resistencia a antibióticos. Una de ellas es la detección de betalactamasas, que permite establecer la presencia de penicilinas o cefalosporinas, enzimas que inactivan a los antibióticos betalactámicos. Otra técnica que puede emplearse es la detección de resistencia al cloramfenicol, mediante la acetiltransferasa, enzima que altera la estructura del cloramfenicol, inactivándolo.

Monitoreo de la terapia antibiótica. Una forma de prever la respuesta de la infección a los antibióticos, consiste en determinar el poder bactericida del suero, conocido también como test Schlichter . Para esto se necesitan la cepa causante de la infección y el suero del paciente en período peak y valle de la concentración plasmática. El suero del paciente es puesto en contacto con la cepa, en diluciones sucesivas a la mitad, determinándose la dilución máxima capaz de inhibir o destruir el microorganismo. Se utiliza en la endocarditis bacteriana, en la cual se necesita de una actividad bacteriana para la erradicación del agente etiológico. Se considera eficaz el poder bactericida del suero en los casos en que es capaz de inhibir el desarrollo del microorganismo en diluciones entre 1:32 y 1:64, según se trata de concentraciones valle o peak. Es una técnica poco usada, por no existir una estandarización adecuada entre los diferentes laboratorios.

Niveles séricos de antibióticos. En el manejo de los pacientes críticos, es importante establecer los niveles séricos de algunos antibióticos, especialmente de aquellos con estrecho margen terapéutico, como es el caso de los aminoglucósidos, o en los con toxicidad proporcional a la concentración sérica, como son la vancomicina, el cloramfenicol y el cotrimoxazol. La toxicidad puede prevenirse al mantener los niveles séricos de estos antibióticos por debajo del umbral establecido.

Tecnología del ADN recombinante

Frente a la presión de contar con un diagnóstico precoz y acertado del agente etiológico, durante los últimos años se han introducido técnicas de punta, derivadas fundamentalmente de la biología molecular.

En este último tiempo se ha producido un ambiente de excitación en la comunidad microbiológica, debido al uso de las denominadas "sondas de ácidos nucleicos". Estas sondas permitirían a los microbiólogos identificar a aquellos patógenos difíciles de cultivar, hacerlo en forma rápida y con un alto grado de especificidad y efectuarlo directamente de las muestras clínicas.

Con las técnicas de hibridización es posible detectar cantidades mínimas de ADN. Para el infectólogo esto significa la posibilidad de diagnosticar microorganismo en forma específica, cuando el aislamiento es imposible, poco sensible, impracticable, demanda un trabajo exagerado o no es costo afectivo. Las técnicas de hibridización son capaces de detectar el equivalente a 0,1 pg de ADN. También sería capaz de detectar infecciones latentes o abortivas. En situaciones que la multiplicación viral es mínima o no se produce, las técnicas de hibridización son más sensibles que el aislamiento viral directo para determinar la presencia del virus.

Esta tecnología puede utilizarse con ventaja en la caracterización de aquellos microorganismos responsables de un brote epidémico, precisando en esa forma su pertenencia a una misma cepa. Permite determinar la resistencia a los antibióticos de microorganismos tales como Salmonellas, así como también define la epidemiología de las infecciones.

Otro ejemplo lo constituyen los fingerprints del ADN tratado con endonucleasas de restricción, que son una poderosa herramienta para la identificación de microorganismos en las infecciones nosocomiales.

El desarrollo más relevante en el campo de la vía molecular es la Reacción de polimerasa en cadena (Polymerase Chain Reaction, PCR). Es un método rápido que permite sintetizar millones de copias de una secuencia discreta de ADN o de ARN. La PCR fue descrita en el año 1985 por Saki y otros colaboradores. Su técnica ha sido perfeccionada en los últimos años, haciéndose popular en muchas áreas de la investigación médica y biológica, como también en el diagnóstico clínico. Es un método in vitro elegante y simple de amplificación en pocas horas, por un factor de 100.000 a 1.000.000, de la secuencia de un ADN blanco.

La reacción consiste de tres pasos que constituyen un ciclo:

1. Desnaturalización por el calor del ADN de doble hebra, (separación de las dos hebras).
2. Unión de "amplímeros" específicos a las secuencias complementarias (o casi complementarias) del ADN.
3. Acción de la ADN que extiende las secuencias del ADN.

La amplificación por PCR requiere de dos oligonucleótidos sintéticos, "primers", del ADN blanco con la secuencia deseada, de cuatro deoxirribonucleótidos y de ADN polimerasa. En el primer paso, la desnaturalización por calor del ADN blanco deja dos hebras simples de ADN que actúan como molde. En el segundo paso, los primers, que poseen las secuencias complementarias de una u otra hebra del molde de ADN, se unen al sitio que flanquea la región a ser amplificada. Al final del primer ciclo, la extensión en direcciones opuestas de los dos primers unidos, producida por la polimerasa en el tercer paso, produce hebras complementarias de un segmento de secuencia deseada, delimitadas por los primers en el ADN blanco. El número de amplificaciones de secuencias de ADN blanco producidas por PCR se duplica después de cada ciclo.

El uso de una ADN polimerasa termoestable (polimerasa Taq, del *Thermus aquaticus*) obvia la necesidad de agregar enzima después de cada ciclo, simplificando el procedimiento, permitiendo su automatización. El número de secuencias del ADN blanco aumenta aproximadamente 10^8 a 10^9 veces después de 30 ciclos.

Se requieren cantidades mínimas de ADN para comenzar la reacción (1 picogramo, que es el material genético equivalente a 1 bacteria). Se puede decir que una sola copia de la secuencia de ADN genómico humano puede ser amplificado a partir de una muestra de menos de 50 ng de ADN.

La tecnología de PCR está encontrando muchas aplicaciones, tanto en el diagnóstico como en la investigación.

Tiene un gran campo de aplicación en la detección de mutaciones responsables de las alteraciones genéticas. Se usará corrientemente en microbiología para la identificación de patógenos virales bacterianos, y se empleará para examinar la función y regulación de genes en la investigación del cáncer. Actualmente, en nuestro laboratorio de Microbiología se está usando técnica de PCR en la búsqueda de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras pulmonares.

Referencias escogidas

1. Shulman ST, Phair JP, and Sommers HM, *The Biologic and Clinical Basis of Infectious Disease*. 4a ed., Philadelphia. W.B. Saunders Company 1992.
2. Reese RE, Douglas RG.A. *Practical Approach to Infectious Diseases*. 2a ed., Little, Brown and Company, Boston, 1986.
3. Pickering LK, DuPont HL. *Infectious Diseases of Children and Adults*. Addison-Wesley Publishing Company Inc., Menlo Park. 1986: 48-63.
4. Murray PR., Baron EJ, Pfaller MA, et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 6a ed., American Society for Microbiology, Washington DC, 1995.
5. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. *Diagnostic Microbiology*. 9a ed., The CV Mosby Company, St. Louis. 1994.
6. Koneman Ew, Allen SD, Janda WM, et al. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4a ed., Lippincott Company. 1992.
7. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, et al. *Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method*. *Am J Clin Pathol* 1966; 45:493-496.

8. Hesse M, Kaye D. Principles of Selection and Use of Antibacterial Agents. *Infect Dis Clin North Am* 1989; 3: 479-489.
9. Montiel F, Kaltwasser G. El Diagnóstico Microbiológico, Su Futuro . *Rev Ch Infecto* 1990; 7:137-143.
10. Kaltwasser , García S, Salinas A, et al. Use of Enzymatic Amplification in the Diagnostic of Extrapulmonary Mycobacterium tuberculosis. Comunicación XXXII ICAAC. (Octubre 1992, Anaheim, California, USA).