

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>

Diagnóstico de la Diarrea Aguda

* M. Cortesía
* P. Vial
* J. Nataro

RESUMEN

La mayoría de los episodios de diarrea infecciosa no requieren de pruebas de diagnóstico para determinar su etiología y su manejo se circunscribe a una adecuada terapia de rehidratación para prevenir complicaciones. Los pacientes con diarrea severa, con síndrome disentérico, con signos de toxicidad sistémica, con diarrea de más de 3-4 días de duración, con leucocitos en deposiciones; deben ser estudiados, dado que pueden ser beneficiados con tratamiento antimicrobiano específico. Desde el punto de vista epidemiológico el diagnóstico etiológico de diarrea puede ser altamente importante para controlar un brote, determinar los agentes más frecuentes y su sensibilidad a antimicrobianos en una temporada específica y para estudiar la importancia relativa que tienen determinados agentes y su conducta en diferentes comunidades. El clínico debe tener familiaridad con las circunstancias que favorecen la infección y los cuadros clínicos producidos por diferentes agentes, con el objeto de orientar su enfoque diagnóstico. El elevado costo de las pruebas de diagnóstico y el requerimiento de un gran número de recursos técnicos para la identificación de patógenos entéricos, como las sondas de ADN, pueden tener un importante papel en el futuro cercano.

INTRODUCCION

La mayoría de las diarreas infecciosas son procesos autolimitados independientemente que la etiología y requieren poco más que la terapia de rehidratación. Sin embargo, hay ciertos agentes que requieren de tratamiento antimicrobiano para disminuir los síntomas, acortar la duración del proceso infeccioso y disminuir el riesgo de contagio. La habilidad del clínico para identificar la causa de la gastroenteritis es complicada por el permanente surgimiento de nuevos agentes bacterianos, virales y parasitarios que pueden causar infección del tracto gastrointestinal.

En la diarrea de origen bacteriano el diagnóstico etiológico estará basado fundamentalmente en el cultivo de heces, aun cuando el agente causal puede ser sugerido por factores inherentes al huésped (edad, comienzo, características y duración de los síntomas, etc.) y al ambiente (historia reciente de viajes, tipo de comida ingerida, aguas, etc.). La meta del laboratorio clínico microbiológico es el aislamiento e identificación, entre toda la microflora fecal, de aquellas bacterias más probablemente implicadas como agentes de diarrea en cada caso particular. Para el diagnóstico de agentes virales se utilizan principalmente métodos de detección de antígenos o partículas virales (ELISA, radioinmuno-ensayo, microscopio electrónico) y detección de ácidos nucleicos (electroforesis en gel), reservándose el uso de cultivos virales sólo para laboratorios de investigación y estandarización de otros métodos usados.

* Centro de Desarrollo de Vacunas, División de Medicina Interna y División de Pediatría, Universidad de Maryland.

El diagnóstico parasitológico se basa fundamentalmente en la observación directa de las deposiciones con una tinción suave; recientemente se han comenzado a utilizar métodos de detección de antígenos que podrían llegar a ser más sensibles.

ASPECTOS CLINICOS

Las formas de presentación de los cuadros diarreicos tienen una amplia variación. El cuadro clínico *per se*, con pocas excepciones, no es muy útil en la identificación del agente etiológico y sólo proporciona una orientación general del tipo de organismo involucrado. Las manifestaciones clínicas dependen del mecanismo fisiopatológico, por el cual la diarrea es producida. En general, diarreas voluminosas, muy acuosas, que no contienen sangre ni leucocitos, asociadas sólo con signos de deshidratación y fiebre baja, sugieren infección del intestino delgado con un organismo enterotoxigénico, no invasor o bien un agente viral. En contraste, deposiciones frecuentes, en pequeñas cantidades, que contienen leucocitos y sangre, asociados con dolor abdominal, fiebre y deshidratación moderada, sugieren infección del intestino grueso por un organismo invasor.

Uno o más de los siguientes criterios pueden utilizarse para justificar el envío de deposiciones para cultivo, ya que ellos predicen de manera aceptable la presencia de patógenos bacterianos. Clínico: a) presentación con síndrome disentérico, b) cuadro clínico con comienzo agudo, deposiciones frecuentes (>4 al día) y sin vómitos antes del comienzo de la diarrea, c) diarrea de duración mayor de 3-4 días, d) diarrea en un paciente inmunosuprimido o con enfermedad debilitante. De laboratorio: a) presencia de leucocitos fecales (Tabla 1).

En pacientes que presentan una diarrea severa después de ingesta de mariscos o de un tratamiento antibiótico, es conveniente realizar coprocultivos e indicar al laboratorio que además de los habituales deben realizarse cultivos para *Vibrio parahemoliticus* en el primer caso y *C. difficile* en el segundo.

Además de las justificaciones clínicas para el envío de deposiciones para su estudio, deben considerarse también indicaciones epidemiológicas tales como presentación de dos o más casos de diarrea en un jardín infantil, en asilos de ancianos, en una familia, etc. Asimismo, es importante el estudio de pacientes que presentan diarrea intra-

Tabla 1
ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES ASOCIADAS A LEUCOCITOS EN DEPOSICIONES

ENFERMEDAD O AGENTE	FRECUENCIA DE LEUCOCITOS FECALES	TIPO DE LEUCOCITO PREDOMINANTE
Shigellosis	100%	polimorfonuclear
Salmonella (no typhi)	87%	polimorfonuclear
Fiebre tifoidea	100%	mononucleares
Campilobacter jejuni	90%	polimorfonuclear
Yersinia enterocolitica	variable	polimorfonuclear
Vibrio parahemolítica	variable	polimorfonuclear
Clostridium difficile (colitis pseudomembranosa)	100%	polimorfonuclear
Disentería amebiana	100%	mononucleares
Colitis ulcerosa	100%	polimorfonuclear (aprox. 100% eosinófilos)
Diarreas virales	0-10%	
Vibrio cholera	0-10%	
E. coli enterotoxigénica	0-10%	
Giardiasis	0-10%	

Ref.: adaptado de Harris, J.C.; et al. Ann. Intern. Med. 76:699, 1972

hospitalaria. Los médicos de una comunidad deben mantener una permanente vigilancia epidemiológica de tal manera de detectar brotes o epidemias que deban ser estudiados para adoptar las medidas de control necesarias. En áreas en que diarreas de etiología bacteriana son endémicas, en determinadas estaciones del año se recomienda realizar cultivos de un número significativo de niños al comienzo de la estación para determinar los patrones de aislamiento y sensibilidad de los diversos patógenos.

Estos estudios pueden servir de guía para el diagnóstico y tratamiento durante el resto de la temporada.

COLECCION Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

Para el cultivo bacteriológico en envase limpio, de plástico o vidrio es suficiente si la muestra es transportada rápidamente al laboratorio. Para aquellos pacientes pediátricos en que es difícil recolectar una muestra de deposiciones en un envase plástico se sugiere el uso de pañales desechables, usándolos al revés, de manera que la superficie no absorbente esté en contacto con la piel. La muestra puede ser transportada de allí a un envase o ser enviada al laboratorio en el mismo pañal en una bolsa plástica. En caso de que no se disponga de tiempo para obtener una evacuación espontánea, la muestra se puede tomar mediante el uso de hisopado rectal. El hisopo o tórula es introducido a través del esfínter anal, unos 3-4 cms, rotado cuidadosamente y retirado. En pacientes en que se realiza rectoscopia o sigmoidoscopia, este método es utilizado para obtener cultivos directamente de las lesiones observadas. Si se anticipa un retardo en el envío de la muestra (2-3 horas o más) se recomienda el uso del medio de transporte de Cary-Blair o un medio constituido por partes iguales de glicerol (pH 7) y buffer fosfato (0.033 M). Debido a que este último medio no es satisfactorio para el aislamiento de *Vibrio parahemolyticus* o *Campilobacter jejuni*, el medio de Cary-Blair debe ser usado cuando estos organismos son sospechados. Ciertos patógenos, especialmente *Shigella*, no sobreviven al pH ácido que ocurre cuando baja la temperatura de las deposiciones; de aquí la necesidad de evitar retardos en el envío de las muestras o utilizar un medio de transporte al cual se le puede agregar rojo fenol como indicador de pH. Si el medio de transporte

está amarillo cuando es recibido en el laboratorio, significa que el pH es muy bajo y la muestra es insatisfactoria, particularmente para el aislamiento de *Shigella*.

El diagnóstico virológico puede efectuarse utilizando muestras obtenidas en la misma forma, ya sea por hisopado rectal o por obtención directa de deposiciones. En general, las pruebas para detección de virus no se realizan rutinariamente. Por esta razón se recomienda el almacenamiento de la muestra a -20°C o, idealmente, a -70°C . La forma de almacenarla es variable. Se puede congelar la muestra de deposición tal como llega al laboratorio en frascos plásticos. Sin embargo, el ideal es preparar una suspensión al 10% o sea 1 gramo de deposiciones en 9 ml de solución salina con buffer fosfato (pH7). En caso de hisopados rectales, la tórula debe sumergirse en suero salino. Estas suspensiones pueden ser utilizadas directamente para pruebas de detección de antígeno o ácidos nucleicos.

En el caso de sospecharse un brote de gastroenteritis viral que pueda tener significación epidemiológica, es recomendable obtener muestras de suero en fase aguda y convalescente, ésta es la única forma de obtener el diagnóstico de algunos virus que no son cultivables si no se cuenta con prueba de detección de antígenos.

EXAMEN DIRECTO DE DEPOSICIONES

El examen directo de las heces es utilizado para: a) la detección de leucocitos en deposiciones, b) el diagnóstico de quistes o trofozoítos de protozoos y, c) ocasionalmente, mediante tinción de Gram, para la detección de *Campilobacter* o *Vibrios*.

Muchos laboratorios consideran la presencia de leucocitos en las deposiciones como una condición para procesar muestras en pacientes con diarrea sin otras complicaciones. Esta prueba se realiza mediante la mezcla en cantidades iguales de heces y azul de metileno sobre una lámina portaobjeto; se esperan 2-3 minutos, se cubre con un cubreobjeto y se examina con lente de alto aumento (40 ó 100 x), buscando la presencia de leucocitos. Esta prueba es positiva si se observan 2 o más leucocitos por campo. El resultado debe informarse con la cuenta promedio de por lo menos 10 campos.

La tinción de Gram puede ser útil, en manos de microbiólogo experimentado, en caso de infec-

ción entérica por *Campilobacter* o *Vibrio*, donde se pueden observar los bacilos gram negativos en forma de s o de tirabuzón, respectivamente.

El diagnóstico de trofozoítos de protozoos requiere de un observador entrenado. Se recomienda siempre obtener una muestra en 10% formalina para ser enviada a un laboratorio con experiencia. Al mismo tiempo se puede hacer una preparación al fresco mezclando una pequeña cantidad de deposiciones con 2 gotas de solución 0,1% de osina o 1-2% yoduro en un portaobjeto de vidrio; sobre la mezcla se pone un cubreobjeto y se observa al microscopio con lente de baja magnificación (10 x). El diagnóstico de *Criptosporidium* requiere de una tinción especial por lo que la muestra debe ser enviada a un laboratorio especializado.

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO

El procedimiento de rutina es el cultivo de las muestras de heces dirigido a la detección de *Shigella*, *Salmonella* y *Campilobacter*. Algunos laboratorios han agregado el cultivo de *Yersinia* dentro del enfoque diagnóstico inicial. El cultivo primario de otros enteropatógenos dependerá de la ubicación geográfica, la población de pacientes, del requerimiento del médico tratante según su sospecha clínica y de la capacidad del laboratorio. Dado que en los cultivos primarios se aísla *E. coli* en casi el 100% de los pacientes, esta bacteria recibe un enfoque diferente al que nos referimos más adelante.

No se dispone de un medio de cultivo que pueda ser usado para el aislamiento de todas las bacterias a identificar. Por esta razón deben usarse inicialmente por lo menos 3 medios diferentes lo que encarece cada prueba diagnóstica.

Para *Salmonella* y *Shigella* se utiliza inicialmente un medio moderadamente selectivo (medio SS) y un medio altamente selectivo (Mc Conkey o EMB). Estos dos organismos están presentes en las heces en cantidades apreciables sólo durante la fase aguda de la enfermedad diarreica, esto es, los primeros 3 días. En consecuencia, las muestras, para su cultivo, deben ser obtenidas, idealmente, en este período. Si hay crecimiento en cualquiera de los medios mencionados debe realizarse una identificación bioquímica de las bacterias aisladas. Posteriormente, en caso de haberse aislado cepas de *Salmonella* o de *Shigella*, éstas deben identificarse serológicamente. La identi-

cación serológica de *Salmonella* se basa en su antígeno O o somático (serogrupo) y su antígeno H o flagelar (serotipo). Además, los serotipos de *Salmonella* tienen nombres que representan el lugar donde fueron inicialmente aislados o algún otro factor al que estén asociados. La determinación de serotipos es importante por motivos epidemiológicos. Los laboratorios clínicos frecuentemente agrupan estas bacterias utilizando sueros polivalentes disponibles en forma comercial y se designan A, B, C1, C2, D, E, F,G, H. Los serotipos de *Shigella* se determinan tanto por pruebas de aglutinación como por pruebas bioquímicas. Hasta el presente se han identificado 4 subgrupos: a) *S. dysenteriae* tipos 1 al 10; b) *S. flexneri* tipos 1 al 6, c) *S. boydii* tipos 1 al 15, d) *S. sonnei*.

Para la identificación de *Campilobacter* tanto el hisopado rectal como las heces son especímenes satisfactorios para cultivo. La muestra puede ser mantenida a temperatura ambiente, pero su refrigeración prolonga la sobrevivencia del organismo de manera significativa. Como este patógeno es muy sensible al medio seco, los hisopados rectales deben ser puestos inmediatamente en un medio de transporte. Las muestras son inoculadas en medios selectivos los cuales son mantenidos en condiciones microaerofílicas (5- 10% oxígeno, 3-10% de dióxido de carbono) a 42° C. Si se obtiene crecimiento y las bacterias tienen la morfología característica al observarse con tinción de gram modificada, se procede a pruebas bioquímicas confirmatorias.

Yersinia enterocolitica, *Vibrio colera* y otros *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas* requieren de medios selectivos y condiciones de incubación especiales.

E. coli representa parte de la flora normal. Sin embargo, numerosos organismos de este género pueden ser patógenos entéricos (*E. coli* enteropatógena, enterotoxigénica, enteroinvasiva, enterohemorrágica y enteroadherente-agregante). En general, no se pueden diferenciar unas de otras por medio de la morfología de las colonias o pruebas bioquímicas. Su identificación requiere de costosas pruebas diagnósticas (serotipificación, identificación de toxinas en cultivo de tejidos, inoculación en conjuntiva de cobayo) que generalmente se justifican por razones de investigación, epidemiológicas o severidad de la diarrea de un paciente en particular. Es posible que el diagnóstico se simplifique mediante el uso de sondas de DNA que han demostrado ser altamente

sensibles y específicas. Desde el punto de vista clínico creemos que la identificación de *E. coli* enterohemorrágica tiene especial importancia dada su asociación con síndrome hemolítico urémico y púrpura trombótica trombocitopénico.

En el caso de pacientes con diarrea asociada a antibióticos debe solicitarse la identificación de *Clostridium difficile*. Este organismo se encuentra normalmente, en un porcentaje no despreciable, en recién nacidos y lactantes y en un bajo porcentaje de adultos sanos. Por este motivo, al cultivo de esta bacteria no se le da un valor definitivo y se prefiere la determinación directa de la producción de sus toxinas A y B en cultivo de tejido. Esta determinación también puede realizarse mediante contraelectroforesis y ELISA. En estos casos debe tenerse presente que no sólo *C. difficile* puede causar colitis pseudomembranosa y el enfoque diagnóstico debe incluir enteropatógenos y bacterias productoras de enterotoxinas.

Es muy importante que el informe que sale del laboratorio clínico sea exacto y refleje el trabajo que se ha realizado. Si la muestra de heces ha sido sólo procesada para *Salmonella*, *Shigella* y *Campylobacter*, el reporte debe decir: "no se aisló *Salmonella*, *Shigella* o *Campylobacter*" y evitar el uso de términos vagos o ambiguos como "no enteropatógenos aislados". También se recomienda que el laboratorio especifique los organismos que se trataron de aislar. El laboratorio clínico debe emitir informes preliminares de la prueba de detección de leucocitos y, cuando sea posible, la identificación presuntiva de los gérmenes. El informe final puede demorarse entre 48 horas a 1 semana, dependiendo del organismo y tipo de estudios realizados.

DIAGNOSTICO VIROLOGICO

La necesidad de estudios diagnósticos en pacientes con diarrea de origen viral generalmente no está dado por la severidad de los síntomas como por las implicancias epidemiológicas (diarrea intrahospitalaria, brotes en salas de recién nacidos y jardines infantiles, brotes intrafamiliares o en comunidades cerradas). Sin embargo, dado que las infecciones por rotavirus pueden inducir importante deshidratación y las infecciones por adenovirus entérico pueden ser inusualmente prolongadas, es importante para el clínico contar con la posibilidad de su identificación.

Numerosos métodos han sido utilizados para identificación de rotavirus, difiriendo en eficien-

cia y facilidad de realización. Inicialmente se utilizó el examen directo de deposiciones en microscopio electrónico. Este se usa habitualmente en laboratorios de investigación pero no es práctico en laboratorios clínicos. Si bien se dispone de pruebas de contraelectroforesis y radioinmuno ensayo para la detección de antígenos de rotavirus, el método que se usa con mayor regularidad es ELISA. Este método es sensible y específico aunque existen importantes diferencias entre las pruebas comerciales disponibles. ELISA tiene la ventaja de que el resultado se expresa en la aparición de una coloración en el tubo donde se realiza la reacción, lo que hace fácil su lectura a ojo desnudo. Para determinaciones más precisas de la concentración de antígeno presente, se requiere la utilización de un espectrofotómetro adaptado para placas de ELISA con el que se miden variaciones en la intensidad del color. Si bien la prueba no es complicada, su manejo requiere cuidadosa estandarización y apropiados controles positivos y negativos. Un método alternativo a ELISA, que ha sido utilizado con éxito en Chile, es la electroforesis del ARN viral en gel de poliacrilamida. Esta técnica tiene una sensibilidad similar a ELISA. Las muestras de deposiciones son tratadas químicamente para obtener la precipitación y rotura del virus, liberando su contenido de ARN. Las muestras así obtenidas son realizadas por electroforesis en gel. Este método permite un análisis de la epidemiología del virus en comunidades, ya que los 11 segmentos del ARN de cada virus tienen un característico patrón de migración, permitiendo detectar similitudes y diferencias entre virus aislados en diferentes pacientes o diferentes episodios de diarrea. Al mismo tiempo este método permite la identificación de pararotavirus que no es detectado por ELISA en uso para rotavirus. La serotipificación de rotavirus se realiza en laboratorios de investigación mediante la técnica de ELISA.

Recientemente se ha logrado producir rotavirus en cultivos de tejido mediante adición de tripsina al medio, pero esta técnica no es de uso rutinario en la práctica clínica.

El diagnóstico serológico de este virus incluye reacciones de fijación de complemento, inhibición de la hemoaglutinación, neutralización, inmunofluorescencia, etc. pero en general tienen un valor limitado en el diagnóstico de infección actual.

Para el diagnóstico de adenovirus entérico, desde hace algunos meses se está utilizando ELI-

SA, que detecta específicamente adenovirus de serotipo 40 y 41. Este no se dispone aún en forma comercial y está circunscrito a laboratorios de investigación.

La investigación de virus Norwalk y similares se realiza mediante inmunoelectromicroscopía, o por determinación de alza de anticuerpos en muestras de suero agudo y convalescente. Recientemente se han diseñado pruebas de radioinmunoensayo y ELISA para detección de antígeno pero su uso está restringido a unos pocos laboratorios de referencia en los Estados Unidos.

DIAGNOSTICO PARASITOLOGICO

Nos hemos referido ya a la observación directa de las deposiciones para detección de quistes y trofozoítos de protozoos. La sensibilidad de la detección de éstos en heces puede ser incrementada significativamente por medio de técnicas de concentración de la muestra. Recientemente se ha comenzado a usar ELISA y contrainmunolectroforesis para la detección de antígenos específicos. La obtención de muestra de jugo duodenal puede ser de gran utilidad en el diagnóstico de *Giardia lamblia*.

SONDA (*) DE ADN EN EL DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO

Las sondas de ADN han significado un avance importante en la identificación de microorganismos. Nos detendremos aquí en los principios en que se basa esta técnica y sus posibles aplicaciones.

El ADN de bacterias, parásitos y algunos virus está compuesto de dos cadenas complementarias que forman una doble hélice. Mediante procesos físicos o bioquímicos, relativamente simples de reproducir, estas dos cadenas complementarias pueden ser separadas (denaturación). Estas cadenas denaturadas pueden volver a formar una do-

ble cadena si se les somete a las condiciones adecuadas en presencia de enzimas que catalizan esta función. Para que esto ocurra, las cadenas de ADN no requieren ser de una misma fuente. La única condición es que tengan cadenas complementarias. Al proceso de volver a formar doble cadenas, a partir de cadenas simples complementarias, se les llama hibridización. Los fenómenos de denaturación e hibridización han sido utilizados como técnicas de laboratorio en el desarrollo de sondas de ADN que permitan el reconocimiento de algunas secuencias de ADN que son específicas de un grupo de bacterias.

Lo que se llama sonda de ADN es un pequeño fragmento de ADN de cadena simple que representa una secuencia presente sólo en un grupo de bacterias. Si se pone en contacto con ADN denaturado de diversos grupos de bacterias, ésta se hibridizará sólo con el ADN de las bacterias que tienen una cadena complementaria, o sea, aquéllas del grupo a identificar. Para poder detectar la reacción de hibridización la sonda debe estar marcada ya sea con un elemento radioactivo o una enzima. Las sondas de ADN generalmente representan un gen o un fragmento de un gen que codifica una característica particular de un microorganismo. Por ejemplo, *E. coli* enteropatógena tiene la propiedad de adherirse en una forma característica a las células intestinales. Si bien las estructuras proteicas que median este proceso no han sido aún identificadas, sí lo han sido los genes de que depende esta función. Estos genes pueden ser aislados y usarse como sondas de ADN para reconocer *E. coli* enteropatógenas.

En términos prácticos esta técnica requiere los siguientes pasos: a) obtener un fragmento de ADN que caracterice al microorganismo (sonda); b) "inmovilizar" el ADN de las muestras problema en una superficie en que se pueda poner en contacto con la sonda; c) hibridización de la sonda de ADN con las muestras problemas y, d) identificación de las muestras positivas mediante detección de radioactividad o producción de color.

La identificación de sondas de ADN adecuadas corresponde a laboratorios de genética molecular. Una vez obtenido un fragmento que sea sensible y específico para un tipo de microorganismo, se describe el proceso mediante el cual puede obtenerse para que éste sea usado en diferentes laboratorios. Este fragmento debe marcarse ya sea con un elemento radioactivo o con un sistema enzimático. Los marcadores más comunes

(*) El término "sonda", si bien no es muy adecuado, ha sido castigado con el uso en la terminología médica en castellano. Es traducción del término inglés "probe". Si bien la palabra "sonda" figura como una de las posibles traducciones, es usada en el diccionario, creemos, como una acepción de "sonar" (radar). Eventualmente los "probes" de ADN podrían describirse como sonares o radares que buscan las secuencias homólogas dentro de una inmensidad de moléculas presentes en una muestra biológica.

son radionucleótidos y recientemente se ha comenzado a usar el sistema biotina-avidina (no radioactivo).

Las muestras problemas pueden ser de diferentes tipos: ADN purificado, colonias bacterianas procedentes de cultivos, fluidos corporales (deposiciones, líquido pleural, líquido obtenido de abscesos, biopsias, etc). La inmovilización del ADN presente en estas muestras se realiza en una matriz (papel de nitrocelulosa, papel filtro u hojas de nylon). Para ponerlo en términos gráficos, si la muestra son colonias bacterianas, éstas se trasladan de la placa de cultivo con un aplicador (tórula) y se "mancha" la matriz con una pequeña cantidad de ellas. Lo mismo puede hacerse con deposiciones. En estos casos de muestras en que el ADN está en el interior de células (bacterias), éstas deben ser lisadas por medio de incubación de la matriz en soluciones con altas concentraciones de sales. Posteriormente, el ADN debe ser denaturado (separando cadenas dobles a cadenas simples), lo que puede realizarse mediante exposición de la matriz a altas temperaturas. De esta forma, lisis celular y denaturación se realizan *in situ* (en la matriz). En este punto, el ADN presente en las muestras está expuesto en forma de cadenas simples y podrá hacer de molde para la sonda de ADN si ésta tiene una secuencia complementaria. La hibridación se realiza en presencia de enzimas que catalizan la formación de cadenas dobles y soluciones de sales adecuadas. La presencia de cadenas dobles formadas por la sonda de ADN y las muestras de ADN inmovilizadas en la matriz, puede ser revelada mediante autoradiografía en caso de sondas radioactivas o mediante

la adición de un sustrato que produzca coloración en caso de sondas no radioactivas.

Las sondas de ADN ya han demostrado ser importantes en estudios epidemiológicos de microorganismos en el laboratorio microbiológico. Estas permiten identificar genes que codifican propiedades de virulencia específica y han generado nuevos conocimientos en las características genéticas, patogénicas y epidemiológicas en múltiples patógenos.

BIBLIOGRAFIA

1. Sack, R.B.; Tilton, R.C.; Weissfeld, A.S.: Laboratory diagnosis of bacterial diarrhea. In: *Cumitech*. 12, Ed. Rubin, S.J.; Washington D.C., American Society for Microbiology, 1980.
Detallada recopilación de métodos diagnósticos para identificación de patógenos entéricos.
2. Radetsky, M.: Laboratory evaluation of acute diarrhea. *Ped. Infect. Dis.* 5(2), 1986.
Orientación diagnóstica y de laboratorio para pacientes ambulatorios con diarrea aguda.
3. De Witt, T.G.; Humphrey, K.F.; McCarthy, P.: Clinical predictors of acute bacterial diarrhea in young children. *Pediatrics* 76:551-556, 1985.
Análisis de los indicadores que sugieren la necesidad de estudios de laboratorio en pacientes con diarrea aguda.
4. Adkins, H.J.: Increased recovery of enteric pathogens by use of both stool and rectal swab specimens. *J. Clin. Microbiol.* 9:214-219, 1979.
Describe técnicas para la obtención de muestras y los factores de que depende su eficacia.

