

Técnicas microbiológicas en el estudio de las infecciones pulmonares en el paciente con SIDA

A. Ferrer Marcellés e I. Calicó Bosch

Servicio de Microbiología y Parasitología. Ciudad Sanitaria Vall d'Hebron. Universidad Autónoma de Barcelona.

Introducción

Debido a su alta frecuencia y gravedad, las infecciones respiratorias ocupan un lugar importante en la evolución natural de la enfermedad causada por el virus de la inmunodeficiencia humana.

Se calcula que más de la mitad de los pacientes con el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), van a presentar infecciones pulmonares en algún momento de su evolución y estas infecciones han estado frecuentemente presentes de forma latente o patente en estadios anteriores.

Otro rasgo característico de la infección pulmonar en los pacientes con SIDA, es que a menudo se llega a este diagnóstico debido a la presencia de infecciones por gérmenes oportunistas o no oportunistas, que son extraordinariamente más frecuentes en estos pacientes que en otros tipos de inmunodepresión. Además, hay que tener en cuenta que en muchos casos la infección pulmonar será producida por más de un microorganismo.

A pesar de que algunos de los agentes causales podrán ser erradicados con un tratamiento específico, en otros casos no existe un tratamiento efectivo, lo que da lugar a que la evolución sea mortal en más del 50% de los casos. De aquí se deduce la importancia de un correcto diagnóstico microbiológico para la elección, siempre que sea posible, de una antibiótico-terapia adecuada.

Agentes etiológicos de infección pulmonar

En la tabla I se relacionan aproximadamente por orden de frecuencia, los microorganismos aislados más a menudo en el paciente con SIDA¹.

Infecciones bacterianas

En nuestro medio las infecciones por micobacterias ocupan el primer lugar, aislándose *Mycobacterium tuberculosis* en la mayoría de los casos y solamente micobacterias ambientales (*M. avium - intracellulare*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, etc) en algunas ocasiones.

Arch Bronconeumol 1992; 28:72-81

En los pacientes con una inmunodepresión celular como ocurre en el SIDA, la reactivación de la tuberculosis es mucho más frecuente y grave y el porcentaje relativo de formas extrapulmonares y diseminadas es superior¹.

Debido a que también se presenta un déficit de la inmunidad humoral en el SIDA, las infecciones por neumococo, *H. influenzae* y *B. catarrhalis* se dan con relativa frecuencia.

A menudo se produce una prolongada estancia hospitalaria de estos pacientes y por ello también se producen infecciones por microorganismos como estafilococo, enterobacterias o *Pseudomonas sp.*

En cambio, en nuestro país se han descrito pocos casos de neumonía causada por *Nocardia sp* y *Legionella sp* en pacientes con SIDA.

Rhodococcus equi es un cocobacilo grampositivo responsable principalmente de infecciones pulmonares, aunque también puede afectar otros órganos y dar incluso infecciones diseminadas con bacteriemia.

Infecciones fúngicas

La criptococosis puede causar una colonización asintomática de las vías respiratorias, lesiones parenquimatosas asintomáticas y lesiones pulmonares sintomáticas con o sin enfermedad diseminada.

La candidiasis mucosa es un hecho corriente en los pacientes con SIDA. La enfermedad pulmonar resulta relativamente rara, salvo como complicación terminal en pacientes gravemente debilitados. Asimismo, las infecciones por hongos del género *Mucor* y *Aspergillus sp*, suelen verse con poca frecuencia salvo en casos de neutropenia intensa.

La sospecha de infección pulmonar por hongos dimórficos (*H. capsulatum*, *C. immitis*) debería tenerse en cuenta en el caso de existir el antecedente de viajes a zonas endémicas.

Infecciones parasitarias y helmintiasis

P. carinii es un microorganismo cuya taxonomía es muy discutida en la actualidad, por ser considerado por algunos investigadores como un hongo en lugar de



TABLA I
Principales agentes etiológicos de la infección pulmonar en los pacientes afectados de SIDA. Relación aproximada por orden de frecuencia¹

Bacterias	Parásitos y helmintos	Virus
Micobacterias*	<i>Pneumocystis carinii</i> *	Citomegalovirus*
Neumococo*	<i>Toxoplasma gondii</i>	Herpes simple*
<i>Haemophilus influenzae</i> *	<i>Cryptosporidium</i>	Adenovirus
Estafilococo	<i>Strongyloides stercoralis</i>	Virus respiratorio sincitial
<i>Branhamella catarrhalis</i>		Virus parainfluenza
Enterobacterias	Hongos	Virus influenza
<i>Pseudomonas sp</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i> *	Coronavirus
<i>Nocardia sp</i>	<i>Candida sp</i>	Virus de Epstein-Barr
<i>Legionella sp</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Virus de la varicela y zoster
<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Coccidioides immitis</i>	
	<i>Mucor</i>	
	<i>Aspergillus sp</i>	

*Microorganismos que se encuentran con mayor frecuencia.

un parásito. Al margen de todo ello, sigue siendo el agente más frecuente de neumonía en el paciente con SIDA, con una prevalencia entre el 60 y el 80 % según distintos autores. En el 60 % de los casos aparece en estadios precoces de inmunodepresión y da lugar al diagnóstico de SIDA.

Otros agentes etiológicos de neumatía parasitaria son raros. La toxoplasmosis es todavía la más frecuente después de la infección por *P. carinii*, dando un cuadro clínico indistinguible del producido por este microorganismo.

En casos excepcionales se ha aislado *Cryptosporidium* de vías respiratorias, asociándose generalmente la afección pulmonar con su presencia intestinal.

En caso de estancias en una zona endémica habrá que pensar en una posible hiperinfestación por *Strongyloides stercoralis*. La afectación pulmonar consiste en infiltrados bilaterales con un componente hemorrágico que pueden provocar una insuficiencia respiratoria. De hecho, la causa de infiltrados pulmonares suele ser mixta, por intervención directa de las larvas y por la aparición de sobreinfecciones bacterianas¹.

Infecciones víricas

En la patogenia de la infección respiratoria del enfermo de SIDA, se pueden considerar dos grupos de agentes etiológicos: aquellos que después de una primoinfección, quizá lejana en la infancia, quedan en estado latente en el macroorganismo y que en el transcurso de la inmunodepresión celular y a veces también sérica, presentan una reactivación o reinfección por una cepa externa. Este grupo de virus es al parecer el más típico y frecuente en estos pacientes y son miembros de la familia *Herpesviridae*: el citomegalovirus (CMV) y el herpes simple (VHS). El virus de Epstein-Barr (EBV) ocuparía, según los conocimientos actuales, un segundo plano, así como el virus de la varicela y del zoster (VVZ). Por el momento se desconoce la relación entre el virus herpes 6 y el pulmón.

En segundo lugar, estarían todos aquellos virus que por su epidemiología afectan por un igual a los pa-

cientes con SIDA, así como a la población sana, aunque las repercusiones clínicas en los primeros son más floridas. En pediatría son frecuentes los virus respiratorio-sincitial (VRS), adenovirus (ADV), parainfluenza (PFV) y coronavirus. Aunque todos estos agentes

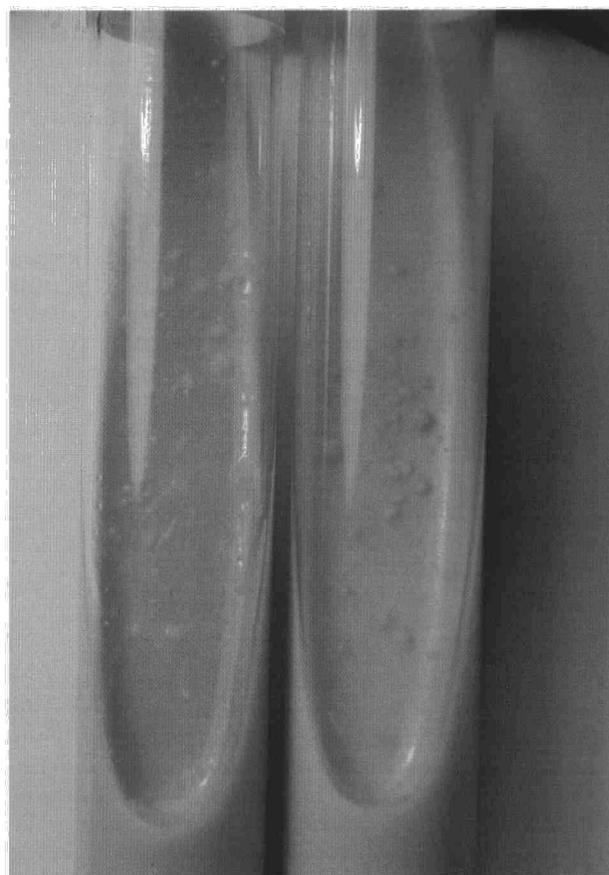


Fig. 1. Cultivo de dos cepas de micobacterias en medio de Lowenstein-Jensen. El tubo de la izquierda corresponde a *Mycobacterium tuberculosis* y el de la derecha a *Mycobacterium kansasii*. Obsérvese la típica pigmentación amarillenta que presentan algunas cepas de micobacterias ambientales.

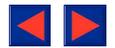


TABLA II
Muestras que se pueden estudiar según el agente etiológico de infección pulmonar

Tipo de muestra	Micobacterias	Otras bacterias	Levaduras/hongos	Parásitos	Virus
Aspirado nasofaríngeo	-	+	+	-	++
Espuito	+++	+	+	+	+
Aspirado gástrico	++	-	-	-	-
Aspiración traqueobronquial	++	+	+	+	++
Cepillado bronquial protegido	+	+++	++	+	+++
Lavado broncoalveolar	+++	++	++	+++	+++
Biopsia transbronquial	+++	+	++	+++	+++
Punción pulmonar aspirativa	++	+++	++	+	+++
Biopsia pulmonar	+*	++	++	+++	+++
Líquido pleural	+++	++	+	+	+
Sangre (hemocultivo)	+++	+++	+++	-	++
Suero (serología)	-	+	+	+	++
Heces	++	-	-	++	++
Orina	-	-	-	-	+

*Mayor utilidad de la biopsia pleural. +++: muy útil; ++: moderadamente útil; +: poco útil; -: en la actualidad no se utiliza.

pueden también afectar al paciente adulto, quizá por su frecuencia tengan mayor interés los adenovirus y los virus gripales.

Tipos de muestras a estudiar

En la tabla II se relacionan los tipos de muestra y su utilidad según el microorganismo responsable de la infección pulmonar. Aquellas que se destinen a aislamiento o visualización deben enviarse al laboratorio lo antes posible.

Aspirado nasofaríngeo

Se obtiene con una pera de goma o una jeringa conectadas a un tubito de teflón muy blando. Se utiliza muchísimo en pediatría, ya que no necesita la colaboración del paciente y el aislamiento de algunos de los agentes que en él se pueden aislar tienen alto valor diagnóstico, como por ejemplo el virus respiratorio sincitial que, al no haberse demostrado que hayan portadores sanos, se admite que su presencia en fosas nasales o faringe lo hace responsable de la bronquiolititis que pueda padecer el enfermo. Con menor rigor, este concepto se podría hacer extensible a virus gripales y parainfluenza.

Espuito

La muestra debe remitirse al laboratorio en un recipiente estéril de boca ancha y con cierre roscado hermético. Una buena muestra debe tener un volumen de 2 a 5 ml. Para la investigación de bacterias habituales es aconsejable la toma de dos muestras en el intervalo de unas horas, ya que aumentamos las posibilidades de obtención de una muestra de buena calidad y la detección del probable agente etiológico. Deben remitirse tres muestras de la primera expectoración de la mañana en días consecutivos, si se desea investigar micobacterias u hongos. Si el paciente no expectora espontáneamente, puede inducirse el espuito

mediante aerosoles o *clapping*, circunstancia que se da a menudo en la infección pulmonar por *P. carinii*.

El espuito es una muestra útil para investigación de micobacterias, siendo más difícil su interpretación en caso de infección por bacterias habituales, hongos y levaduras. La rentabilidad del espuito inducido para la investigación de *P. carinii* es variable según distintos autores.

Aspirado gástrico

Se limitará a la investigación de micobacterias. Su utilidad es sobre todo en enfermos pediátricos.

Aspiración traqueobronquial

En pacientes intubados con ventilación artificial, la obtención de secreciones traqueobronquiales se realizará con una sonda estéril conectada a un aspirador. En caso de obtenerse escasa secreción, puede cortarse estérilmente la porción distal de la sonda y remitirse al laboratorio. Su utilidad es limitada debido a la frecuente colonización de tráquea y bronquios en el paciente intubado.

Técnicas fibrobroncoscópicas

El aspirado bronquial tiene una alta rentabilidad para la investigación de micobacterias.

El cepillado bronquial con catéter telescópico protegido, deberá colocarse en un tubo estéril con un milímetro de solución lacteada de Ringer o similar. Su mayor utilidad es en el diagnóstico de neumonías producidas por bacterias habituales y virus (citomegalovirus y herpes simple) aunque también puede emplearse para detección de otros microorganismos.

Es aconsejable no utilizar para fines microbiológicos, la primera parte de la muestra recogida al realizar el lavado broncoalveolar.

La biopsia transbronquial se sumergirá en 1 a 3 milímetros de suero fisiológico estéril.



TABLA III
Utilidad de los diversos grupos de técnicas diagnósticas en las infecciones pulmonares bacterianas

Microorganismo	Visualización			Detección de antígeno			Aislamiento			Pruebas serológicas
	Gram	Ziehl	IF	Secreción respiratoria	Orina	Suero	Secreción respiratoria	Sangre	Otras	
<i>M. tuberculosis</i>	-	+++	+++ ^a	-	-	-	+++	++	++	-
Micobacterias ambientales	-	+++	+++ ^a	-	-	-	++	+++	+++	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+++	-	-	++	+	+	+++	++	+	-
<i>H. influenzae</i>	+++	-	-	-	-	-	+++	++	+	-
<i>Branhamella catarrhalis</i>	+	+++ ^b	-	-	-	-	+++	++	++	-
Enterobacterias	-	-	++ ^c	+	+	-	+++	+	+	++
<i>Pseudomonas sp.</i>	++	++	-	-	-	-	+++	++	++	-
<i>Nocardia sp.</i>	-	-	++ ^c	+	+	-	+++	+	+	++
<i>Legionella sp.</i>	-	-	++ ^c	+	+	-	+++	+	+	++
<i>Rhodococcus equi</i>	++	++	-	-	-	-	+++	++	++	-

IF: tinción por inmunofluorescencia; (a): tinción de auramina; (b) Ziehl modificado (tinción de Kinyoun); (c): inmunofluorescencia directa.

Las muestras obtenidas por fibrobroncoscopia son en general altamente rentables para el diagnóstico de las infecciones pulmonares en el paciente con SIDA. Estas muestras, aunque molestas para el paciente, son la base del diagnóstico etiológico de las neumonías intersticiales.

Punción pulmonar aspirativa

Es aconsejable depositar la muestra en un medio de transporte que preserve a los gérmenes anaerobios. Excepto para la investigación de parásitos en los que obtiene poca rentabilidad, es útil en la investigación de los demás agentes etiológicos.

Biopsia pulmonar

Se colocará el espécimen en un tubo con 1 a 3 milímetros de suero fisiológico. En caso de infección por *M. tuberculosis* será más aconsejable la obtención de una biopsia pleural.

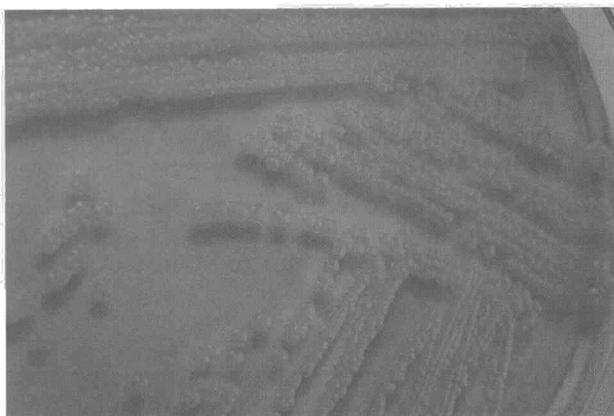


Fig. 2. Cultivo en medio de Saboureaud de una cepa de *Cryptococcus neoformans* aislada de una muestra de cepillado bronquial de un paciente con SIDA que presentaba neumonía.

Líquido pleural

Si se detecta su presencia en cantidad suficiente, se colocarán unos 10 ml en un tubo. En caso de sospecha de microorganismos anaerobios podrá enviarse al laboratorio en una jeringa en una aguja precintada.

Esta muestra tiene el inconveniente de que las proteínas de la misma pueden inactivar las partículas víricas y en consecuencia hay un número elevado de resultados negativos.

Sangre

Variará si se trata de hacer su cultivo o si se desea hacer serología. Para el cultivo de bacterias y levaduras se extraerán 10 ml de sangre y, previo cambio de la aguja, en dos frascos de hemocultivo (aerobio y anaerobio), se inyectarán 5 ml de la muestra en cada uno.

El citomegalovirus por ser un parásito del linfocito OKT4 y ocasionalmente de los polimorfonucleares, circula por la sangre de manera prolongada y por tanto para su aislamiento debe remitirse al laboratorio 5 milímetros de sangre con heparina, con la finalidad de sembrar la fracción leucocitaria.

Si la analítica requerida es serología, la sangre no llevará anticoagulante alguno y se obtendrá una cantidad entre 5 a 10 ml según el número de pruebas deseado.

Heces

Deben ser recogidas inmediatamente después de la deposición y deben enviarse al laboratorio en cantidad semejante a la de un garbanzo para investigación de micobacterias o virus.

En caso de sospecha de parásitos se remitirán tres muestras de heces con varios días de intervalo y no de tres días consecutivos. La recogida se efectuará en un recipiente transparente, ya que así se facilita el estudio macroscópico de las heces.

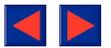


TABLA IV

Utilidad de los diversos grupos de técnicas diagnósticas en las infecciones pulmonares producidas por hongos y levaduras

Microorganismos	Visualización		Detección antígeno		Aislamiento			Pruebas serológicas
	En fresco	Tinción	Orina	Suero	Secreción respiratoria	Sangre	Otras	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	++	+++	-	+	++	++	+++*	-
<i>Candida sp</i>	++	+++	-	+	+	+++	+++*	+
<i>Histoplasma capsulatum</i>	+	+++	+	+	+++	+++	+++	+
<i>Coccidioides immitis</i>	+	+++	+	+	+++	+++	+++	+
<i>Mucor</i>	+++	+++	-	-	++	+	+++*	+
<i>Aspergillus sp</i>	+++	+++	+	+	++	+	+++*	-

*Debido a la ubicuidad de estos microorganismos, el aislamiento en biopsia pulmonar confirma la infección. Pueden localizarse en otros órganos (sistema nervioso central, ojos, piel, membranas mucosas, orina, etc).

Orina

Tiene un valor secundario en la infección pulmonar vírica. En ella es frecuente aislar citomegalovirus y adenovirus.

Técnicas diagnósticas en las infecciones bacterianas pulmonares

En la tabla III se resumen las principales técnicas empleadas en este tipo de infección pulmonar.

Visualización del agente etiológico

La tinción de Gram es de gran utilidad para el diagnóstico de las infecciones por bacterias distintas de las micobacterias y *Legionella sp*. Nos permitirá controlar la calidad de las muestras de esputo y secreción traqueobronquial aplicando los criterios de Murray y Washington² o la proporción inferior o superior de células de vías altas (signos de contaminación orofaríngea) en las muestras de lavado broncoalveolar³. Además, permite la visualización de los microorganismos presentes en la muestra.

Las tinciones de Ziehl o auramina se aplican a la investigación de micobacterias, dependiendo su rendimiento del tipo de muestra⁴.

Legionella sp puede visualizarse por inmunofluorescencia directa de la muestra. Es una técnica específica pero poco sensible.

Detección antigénica

Neumococo y *H. influenzae* pueden detectarse en esputo, orina o suero con el uso de la contraelectroforesis, aglutinación de partículas de latex o coagulación, habiéndose publicado mejores resultados al ser aplicadas a *Streptococcus pneumoniae*.

Aunque no aplicable a un diagnóstico de rutina, se ha detectado por técnicas de radioinmunoanálisis y ELISA, antígeno de *Legionella sp* en secreciones respiratorias, pero aunque son técnicas prometedoras, todavía no son de utilidad en la práctica diaria, como tampoco las recientemente aparecidas técnicas de PCR o reacción en cadena de la polimerasa, que se ha utilizado sobre todo para la detección de micobacterias.

Aislamiento

Para micobacterias suele utilizarse el medio de Löwenstein-Jensen o los sistemas radiométricos y *Legionella sp* requerirá la siembra en agar BCYE- α con antibióticos. Los demás microorganismos presentes en la tabla III crecen en los medios de cultivo utilizados habitualmente en bacteriología (agar sangre, agar chocolate, agar Mac Conkey, etc). Todas las bacterias suelen crecer entre 24 y 48 horas. *Legionella sp* no lo hará hasta el tercero a sexto día y los cultivos para micobacterias deberán mantenerse en observación durante 2 meses, ya que excepto algunas micobacterias ambientales que pueden crecer en menos de una semana, *M. tuberculosis* y la mayoría de micobacterias ambientales requieren una prolongada incubación.

Diagnóstico serológico

Cuando se produce una seroconversión o un título $\geq 1/256$ el diagnóstico de neumonía por *Legionella pneumophila* no ofrece dudas, aunque se han descrito algunos casos de reacciones cruzadas con *M. pneumoniae*. Hay que tener en cuenta que en el SIDA, debido a la importante inmunodepresión, la respuesta serológica puede estar ausente.

La detección de anticuerpos específicos frente antígenos micobacterianos, tanto en suero como en muestras biológicas mediante la técnica ELISA, siguen en estudio.

Técnicas diagnósticas en las infecciones pulmonares por levaduras y hongos

En la tabla IV están resumidas las principales técnicas de diagnóstico microbiológico en la patología pulmonar producida por estos microorganismos.

Visualización del agente etiológico

En las infecciones fúngicas, el examen microscópico es el método más rápido y útil. Un examen en fresco con hidróxido potásico (KOH) al 10 % es el método más usado. La tinción de Gram es útil para la detección de levaduras, tales como *Candida sp* y *C. neoformans*.

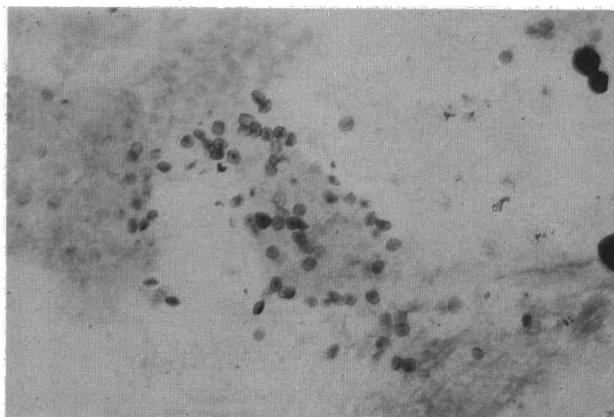


Fig. 3. Muestra de un lavado broncoalveolar en el que se observaban abundantes formas quísticas que corresponden a *Pneumocystis carinii*. Tinción de plata metenamina (x 400.)

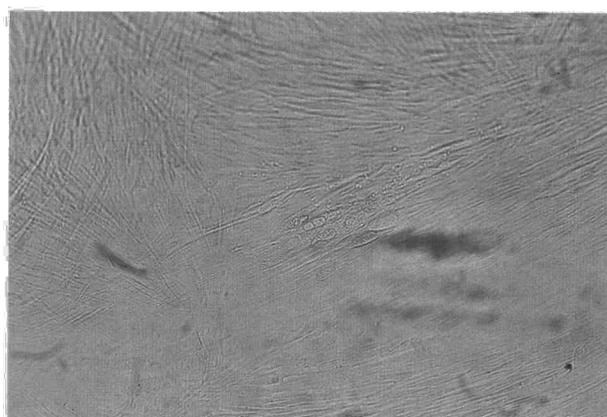


Fig. 4. Efecto citopático de *Toxoplasma gondii* en fibroblastos de pulmón de embrión humano en cultivo *in vitro*. Obsérvese en el centro una célula con dos quistes en su interior. Este aislamiento corresponde a un paciente afecto de SIDA con neumonía, del que se estudió el lavado broncoalveolar. Preparación en fresco (x 100.)

TABLA V
Utilidad de los diversos grupos de técnicas diagnósticas en las infecciones pulmonares por parásitos y helmintos

Microorganismo	Visualización		Detección de antígeno	Aislamiento	Por pruebas serológicas
	en fresco	tinción			
<i>Pneumocystis carinii</i>	-	+++	+	-	-
<i>Toxoplasma gondii</i>	-	++	-	+	+
<i>Cryptosporidium</i>	+	+++	-	-	-
<i>Strongyloides stercoralis</i>	+++	++	-	+	-

mans y las hifas de hongos como *Aspergillus sp* y otros hongos filamentosos.

Tinciones específicamente histológicas como la plata metenamina, pueden también ser usadas para la visualización de hongos en tejidos y líquidos orgánicos y son de uso obligado en caso de sospecha de patología producida por hongos dimórficos (*H. capsulatum*, *C. immitis*, etc).

Detección antigénica

C. neoformans puede detectarse por técnica de aglutinación de partículas de latex en muestras de suero y de líquido cefalorraquídeo, teniendo una sensibilidad del 99 % en los pacientes con meningitis. Solamente en aproximadamente el 66 % de pacientes con criptococosis diseminada, se detecta antígeno en suero y cuando la afectación es solamente pulmonar, en menos del 10 % de los casos⁵.

En las infecciones por *Candida sp* se ha usado una técnica de aglutinación en latex para la detección de antígenos proteicos en suero y en algunos estudios se ha evidenciado su capacidad para diferenciar infección de colonización. También metabolitos de *Candida sp*, como la manosa y el arabinol, han sido demostrados en suero por cromatografía⁵.

En el caso de *Aspergillus sp* se han detectado antígenos solubles en suero, orina y otros líquidos orgánicos por medio de ELISA y radioinmunoanálisis⁵. No se dispone de productos comercializados.

La presencia de *H. capsulatum* se ha puesto en evidencia por medio de radioinmunoensayo en orina y suero de pacientes con SIDA que tenían una enfermedad diseminada por este microorganismo⁶.

Aislamiento

El aislamiento de estos microorganismos por cultivo es el medio más definitivo para detectar e identificar un agente etiológico como causa de infección. Toda una batería de medios de cultivo son necesarios para aislar todos los tipos de hongos y levaduras enumerados en la tabla IV a partir de muestras clínicas.

Las infecciones pulmonares suelen aparecer en estadios terminales de SIDA y muchas veces tienden a presentarse de forma diseminada, por lo que aparte del cultivo de las secreciones respiratorias, también deberán cultivarse otras muestras como: sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, biopsias (pulmón, piel y mucosas, etc), que nos confirmarán el diagnóstico de afectación pulmonar, por ser en algunos casos difícil valorar si se trata de infección o simple colonización.

Diagnóstico serológico

La respuesta del enfermo con SIDA en estadio avanzado es pobre o nula. En algunos casos se han detectado anticuerpos a *Candida sp* por ELISA, contraelectroforesis, etc. Un problema adicional es la dificultad de discernir entre colonización e infec-

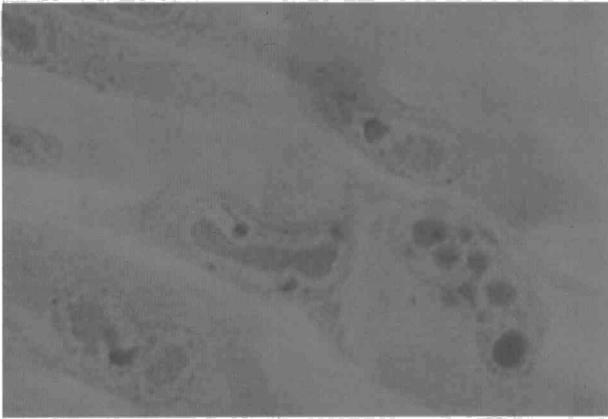
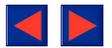


Fig. 5. Efecto citopático de citomegalovirus en cultivo celular de fibroblastos de pulmón de embrión humano. Pertenece a un cultivo de lavado broncoalveolar practicado a un paciente trasplantado de hígado con neumonía intersticial. Tinción de hematoxilina-eosina ($\times 400$).

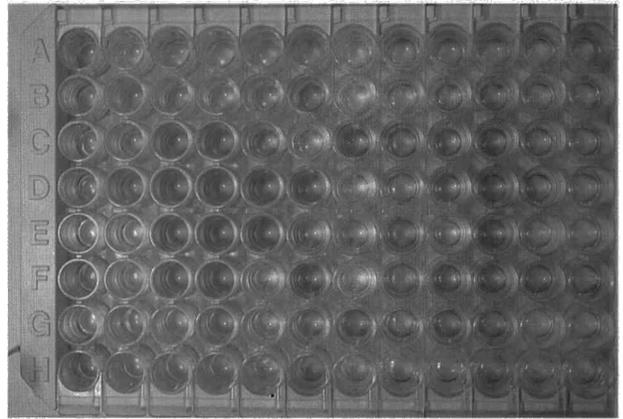


Fig. 6. Investigación de IgM anti-citomegalovirus, método cualitativo, por enzaimunoensayo. Cada pocillo de placa corresponde a un suero probado y el color rojo de la reacción denota positividad.

ción. Con *Aspergillus sp* los resultados han sido todavía menos esperanzadores.

Usando técnicas de fijación de complemento, inmunodifusión y ELISA, se han demostrado anticuerpos a *C. immitis* en suero de pacientes con SIDA, pero la experiencia es muy limitada⁶.

Se ha reportado un caso de mucormicosis sistémica, en el que se halló anticuerpos en suero por técnica de ELISA⁵.

Técnicas diagnósticas en las infecciones pulmonares por parásitos y helmintos

En las infecciones pulmonares por este tipo de microorganismos existen pocas técnicas microbiológicas que nos permitan su identificación (tabla V).

Visualización del agente etiológico

Pneumocystis carinii puede presentarse en tres formas: trofozoitos, esporozoitos o formas quísticas. Los quistes poseen una pared gruesa y en su interior están los esporozoitos, que al ser liberados evolucionan a trofozoitos. Las tinciones histológicas que permiten la visualización de la pared de los quistes, como la clásica tinción de Crocott de plata metenamina y sus variantes rápidas son las más empleadas. También se utiliza la tinción de azul de toluidina, Papanicolau, etc. Otros métodos de tinción sí permiten detectar trofozoitos y esporozoitos como el May-Grünwald Giemsa, Wright, Giemsa modificado, etc. Finalmente otras técnicas permiten visualizar los tres elementos mencionados como el Gram-Weigert, azul de toluidina, etc. Recientemente se han utilizado técnicas de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales.

La persistencia de *P. carinii* en el lavado broncoalveolar o la biopsia pulmonar después de hasta 35 días de un tratamiento efectivo, hace totalmente ineficaz la utilización de este criterio microbiológico para juzgar el carácter favorable o desfavorable de la evolución clínica. Sólo nos apoyaremos en criterios clíni-

cos. Por desgracia, aunque la evolución sea favorable, la respuesta clínica es bastante lenta⁷.

El diagnóstico de certeza de la toxoplasmosis se hace demostrando la presencia de trofozoitos con o sin quistes, mediante tinciones de hematoxilina-eosina o inmunoperoxidasa, ya que la identificación de solamente los quistes no constituye una prueba fiable de que la enfermedad activa sea debida a *T. gondii*. En muestras de lavado broncoalveolar usando técnicas de citocentrifugación pueden en algunos casos demostrarse la presencia de este parásito por tinción de Wright-Giemsa.

Asimismo, *Cryptosporidium* cuando afecta al pulmón puede ponerse en evidencia en muestras de aspirado bronquial o de lavado broncoalveolar mediante examen en fresco teñido con yodo o más fácilmente con colorantes acidorresistentes (auramina y Ziehl-Neelsen modificada). La utilización de anticuerpos monoclonales para la detección de ooquistes, podría constituir en el futuro una técnica más sensible.

La demostración de larvas de *Strongyloides stercoralis* en esputo u otro tipo de secreción respiratoria por examen en fresco es 100 % específica. Hay que tener en cuenta que la refrigeración de la muestra da lugar a la destrucción de las larvas, que también pueden visualizarse en muestras de heces frescas, ya que es difícil encontrar huevos en la materia fecal. En caso de negatividad pueden hallarse en jugo duodenal. Cuando existe una infección diseminada, las larvas pueden demostrarse en esputo, orina, líquido cefalorraquídeo y de hecho en casi cualquier muestra clínica. Además del examen en fresco, podrán detectarse larvas de *S. stercoralis* por técnicas tintoriales (tinción con yodo, Giemsa, etc).

Detección antigénica

En la actualidad, la detección de antígenos circulantes de *P. carinii* no se considera una técnica de diagnóstico fiable. Se han utilizado la contrainmunolectroforesis, la aglutinación de partículas de latex y PCR entre otras.



Las técnicas para demostración de antígenos toxoplásmicos no son todavía utilizables en estos momentos.

Aislamiento

Se han comunicado aislamientos de *T. gondii* en cultivos celulares de fibroblastos de embrión humano utilizados para cultivo de virus. También puede diagnosticarse por inoculación al ratón.

P. carinii no ha podido ser cultivado con éxito de forma prolongada.

El cultivo de heces durante 48 horas puede dar lugar a la producción de larvas filariformes y según la etapa en que se encuentre el parásito, también puede producir *Strongyloides* adultos de vida libre.

Diagnóstico serológico

La presencia de anticuerpos séricos anti-*P. carinii* determinados por inmunofluorescencia o ELISA no parece ser una técnica sensible habida cuenta de la alta prevalencia de estos anticuerpos en la población general.

El estudio de anticuerpos específicos en casos de infección por *T. gondii* es decepcionante en el paciente con SIDA, ya que la presencia de anticuerpos residuales es habitual y el aumento de títulos durante la infección en fase aguda sólo se observa en menos del 30 % de los casos. La presencia de IgM específica es todavía más infrecuente. Además se han observado casos con altos títulos de anticuerpos antitoxoplásmicos sin signos de infección clínica⁷.

Por técnica de ELISA existen pocas reacciones cruzadas en la detección de anticuerpos a *Strongyloides stercoralis*, aunque como en el caso anterior, en el paciente con SIDA es problemático.

Técnicas diagnósticas en las viriasis pulmonares

Hay el concepto generalizado de que los métodos de diagnóstico de las infecciones víricas son tan lentos que carecen de utilidad en la clínica. Desgraciadamente, algunas técnicas obtienen sus resultados cuando quizá el enfermo está en una fase crítica, o se ha

curado. Por este motivo el virólogo busca aplicar técnicas rápidas que puedan dar soluciones diagnósticas en horas o incluso minutos, dejando las más lentas como pruebas de confirmación. Se pueden considerar pruebas rápidas las basadas en la observación del agente vírico en la muestra clínica, o la detección de sus antígenos en la misma. Se suelen considerar lentas las que utilizan el cultivo de la muestra para aislar el virus y una buena parte de las técnicas serológicas^{8,9} (tabla VI).

Visualización del agente etiológico

Debido al pequeño tamaño de los viriones, la microscopía óptica tiene unas funciones limitadas. En los cortes de las piezas biópsicas, previa tinción tisular, se pueden observar algunas células con inclusiones que caracterizan a los citomegalovirus o al virus herpes simple, pero su sensibilidad está muy por debajo de otras técnicas y además no es posible distinguir siempre las inclusiones de un virus de las de otra especie afín.

Utilizando la inmunofluorescencia con sueros específicos contra adenovirus respiratorio sincitial, parainfluenza y virus de la influenza sobre células de descamación faríngea, se pueden conseguir resultados en unas pocas horas. Esta técnica se utiliza para aislar a los enfermos pediátricos que deben ingresar y evitar las infecciones hospitalarias.

La microscopía electrónica, por los aumentos en que trabaja, nos permite visualizar la partícula vírica, pero para poder localizar algunas, la muestra debe ser muy rica en ellas y esta circunstancia no se suele dar en muestras procedentes del aparato respiratorio. En suma, pues, la visualización tiene unas funciones muy limitadas en el diagnóstico.

Detección de los antígenos virales en la misma muestra

Se utiliza con mucha frecuencia. Tiene la ventaja de que pueden estudiarse muchas muestras al mismo tiempo. Las desventajas están en que algunas de estas reacciones no son suficientemente específicas o sensibles, todas son caras y si la organización del laboratorio no permite ejecutarlas a diario, los resultados a la práctica no son tan rápidos. Se fundamentan en técni-

TABLA VI
Utilidad de los diversos grupos de técnicas diagnósticas en las infecciones víricas pulmonares

Técnicas	Visualización del agente vírico	Por detección de sus antígenos	Por aislamiento (cultivo)	Por pruebas serológicas
<i>Virus</i>				
Citomegalovirus	+	+	+++	++
Herpes simple	+	+	+++	+
Adenovirus	-	-	+++	++
Respiratorio sincitial	++	+++	+++	+
Parainfluenza	++	+++	++	+
Influenza	++	+++	+++	+
Varicela-zoster	+	-	+++	+
Coronavirus	-	-	+	+
Epstein-Barr	-	-	-	+++



cas de enzima inmunoensayo y más recientemente en reacciones basadas en biología molecular a nivel de ácidos nucleicos. En las primeras, la muestra previamente tratada se pone en contacto con una fase sólida en la que están fijados anticuerpos antivirales que retienen las partículas víricas investigadas. El enzima inmunoensayo se utiliza ampliamente para detectar virus respiratorio sincitial, influenza, parainfluenza o adenovirus. La detección del ácido nucleico viral, tal como se ha comentado anteriormente, se puede realizar mediante la reacción de hibridación o más sensible todavía la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Hay que valorar con cautela los resultados obtenidos con estas técnicas, ya que difícilmente distinguirán a un virus en fase de multiplicación de uno en fase latente.

Aislamiento de los virus

Debido a que los virus, a diferencia de la mayoría de las bacterias, necesitan células para multiplicarse, en lugar de utilizar medios semisintéticos o artificiales, debemos sembrar las muestras clínicas en células vivas. Además, los virus tienen una cierta especificidad de especie, con lo que no todo tipo de tejido sería apto.

Desde 1932 se usa la inoculación al huevo embrionado de gallina. En la actualidad todavía se utiliza por ser un medio magnífico para aislar virus de la gripe, especialmente el tipo A.

La posibilidad de hacer crecer células de macroorganismo, como el hombre, en botellas, permite investigar la presencia de virus en un número elevado de muestras. Hay numerosos tipos de cultivos celulares. Algunos consiguen adaptarse a la vida *in vitro* y se les denomina líneas celulares. En el trabajo rutinario de diagnóstico suelen utilizarse líneas celulares por ser más económicas y prácticas. Una vez inoculadas las muestras en estudio en cultivos celulares, se incuban y se observan a diario. Nosotros las mantenemos hasta un máximo de 10 o 15 días, dependiendo de la muestra. Si hay crecimiento vírico, éste se manifestará por las lesiones que produzca en las células, el llamado efecto citopático. Este efecto citopático es característico en muchas especies víricas, con lo que su aparición permite reconocer el que pertenece a virus herpes simple, citomegalovirus, adenovirus, enterovirus, respiratorio sincitial, etc. A excepción del efecto citopático del citomegalovirus, que suele observarse a los 7 días o más, los demás por lo común se manifiestan entre 1 y 5 días.

Con la finalidad de detectar la presencia de citomegalovirus de una manera rápida, se combina el cultivo de 24-48 horas con la investigación de los antígenos tempranos, mediante inmunofluorescencia, lo cual permite dar el resultado en uno o dos días (Shell-vial).

Diagnóstico serológico

Del 70 al 90 % de las pruebas que se realizan en un laboratorio de virología corresponden a serología. En ella se investiga la presencia de anticuerpos frente a

determinadas virasis, en líquidos orgánicos, casi siempre en suero. Las técnicas que se pueden emplear son numerosas, pero pueden clasificarse en aquellas que detectan los anticuerpos globales de las que distinguen la IgG y la IgM por separado. Entre las primeras, la más empleada ha sido y es la reacción de fijación de complemento. En ella podemos estudiar un par de muestras de suero, una al inicio de la infección y otra a los 10 días para ver si hay aumento significativo del título de anticuerpos, es decir: seroconversión. Si la primera muestra ya tiene un título alto y no hay seroconversión, sólo tendrá un valor orientativo. En el segundo grupo tenemos reacciones como el enzima inmunoensayo, inmunofluorescencia y el radioinmunoensayo. De éstas, el enzima inmunoensayo es la más utilizada por su sencillez técnica. Si obtenemos un resultado positivo a IgM frente a determinado antígeno, en principio sabremos que el enfermo se encuentra en la fase aguda o subaguda de la infección.

Con estas reacciones es posible estudiar los anticuerpos frente a todos los virus mencionados, pero en los pacientes afectos del síndrome de inmunodeficiencia adquirida hay una seria limitación de la serología: muchos de estos enfermos, a pesar de estar infectados por citomegalovirus o herpes por ejemplo, son incapaces de producir anticuerpos, o lo hacen en cantidades muy pequeñas. Por otro lado, la reactivación de uno de estos virus no tiene porque tener siempre una respuesta en IgM y además, éstas, si se producen, aparecen en suero durante un periodo muy variable dependiendo del estímulo antigénico y de la inmunidad personal, que puede ser de incluso superior a un año, con lo que su valor como prueba de infección aguda, disminuye.

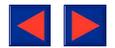
La serología es pues de valor limitado, siendo solamente útil si nos da resultados positivos¹⁰.

Valoración de los resultados microbiológicos

El diagnóstico de infecciones por gérmenes habituales en el organismo sano como: neumococo, *Haemophilus sp*, *Candida sp*, etc, y otros oportunistas como citomegalovirus o herpes simple, es difícil de establecer aún apoyándonos en las técnicas microbiológicas. La interpretación es más sencilla en las infecciones por agentes que no están o no suelen estar en las personas sanas: *M. tuberculosis*, *P. carinii*, hongos dimórficos, virus respiratorio sincitial, parainfluenza o influenza.

El diagnóstico perfecto sería aquel en que los síntomas clínicos del paciente fueran acompañados de un aislamiento o detección de antígeno en por lo menos una muestra de primer orden: biopsia pulmonar, lavado broncoalveolar, cepillado bronquial o sangre, acompañado de una seroconversión. Como en muchas ocasiones esta triada no es posible, hay que intentar sacar el máximo provecho de los datos que el laboratorio nos pueda proporcionar. Así se podría decir:

—El aislamiento o detección de antígeno en una muestra de primer orden, o la seroconversión, o la



investigación positiva de IgM específica, acompañada de una clínica sugestiva, tienen valor diagnóstico.

-El aislamiento de microorganismos primariamente patógenos como *M. tuberculosis* en cualquier muestra respiratoria es diagnóstico.

-El aislamiento o detección de antígeno en muestras de segundo orden (aspirado nasofaríngeo, esputo, heces, orina) o una serología elevada para los mismos puede ser notablemente orientativo, pero no nos asegura el diagnóstico.

-La obtención de títulos serológicos medios o bajos e inamovibles no son valorables tratándose de pacientes afectados de SIDA y estos resultados serológicos no demostrativos no descartan ninguna infección.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rozman C, Bladé J, Gatell JM. Infecciones en el paciente inmunodeprimido. Barcelona: Ediciones Doyma, 1988.

2. Murray PR, Washington JA. Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clin Proc* 1975; 50:339-344.

3. Khan F, Jones JM. Diagnosing bacterial respiratory infection by bronchoalveolar lavage. *J Infect Dis* 1987; 155:862-869.

4. Martín N, Vidal R. Clínica y diagnóstico de la tuberculosis. *En: Medicine* 5.^a ed. Madrid: IDEPSA 1989; 1.250-1.256.

5. Musial CE, Cockerill FR, Roberts GD. Fungal infections of the immunocompromised host: clinical and laboratory aspects. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1:349-364.

6. Minamoto G, Armstrong D. Fungal infections in AIDS: histoplasmosis and coccidioidomycosis. *En: Saude MA, Volberding PA, eds. The medical management of AIDS. Filadelfia: WB Saunders* 1988; 213-222.

7. Montagnier L, Rosebbaum W, Gluckman JC. SIDA et infection par VIH. Paris: Medecine-Sciences Flammarion 1989.

8. Chernesky MA, Ray CG, Smith TF. Laboratory diagnosis of viral infections. Cumulative techniques and procedures in clinical microbiology. Washington DC, Society for Microbiology, 1982.

9. Calicó I. Diagnóstico de las infecciones víricas por métodos de laboratorio. *Med Clin (Barc)* 1986; 86:854-858.

10. Gerna G, Parea M, Percivalle E et al. Human cytomegalovirus viraemia in HIV-1 seropositive patients at various clinical stages of infection. *AIDS* 1990; 4:1.027-1.031.