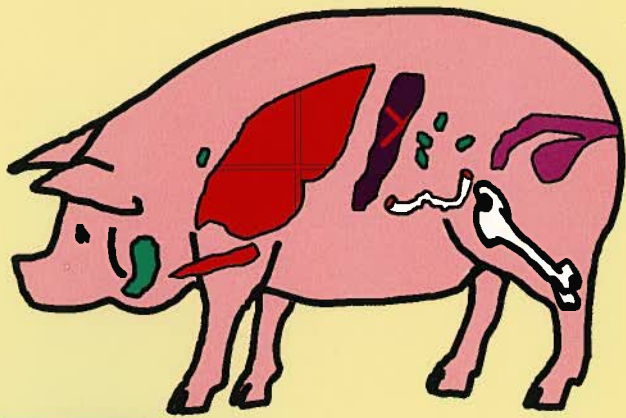


Diagnóstico de enfermedades de declaración obligatoria (EDOS)

Aplicación de técnicas de laboratorio



FUENTES:

- Saco vitelino
- Hígado fetal
- Médula ósea



DESARROLLO (1°):

- Timo
- Placas de Peyer
- Médula ósea



RESPUESTA

(2°):

- Amígdalas
- Bazo
- Ganglios I
- Placas de Peyer
- Médula ósea

Consejería de Agricultura y Pesca

DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES DE DECLARACIÓN OBLIGATORIA (EDOS)

APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE LABORATORIO

**DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES DE DECLARACIÓN OBLIGATORIA (EDOs).
APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE LABORATORIO**

© **Edita:** JUNTA DE ANDALUCÍA. Consejería de Agricultura y Pesca

Publica: Viceconsejería. Servicio de Publicaciones y Divulgación

Director-Coordenador: Antonio Gasca Arroyo

Autores: Varios

Ilustraciones: Autores

Colección: Ganadería

Serie: Sanidad Animal

Depósito Legal: SE.1621-04

I.S.B.N.: 84-8474-124-9

Maquetación e impresión: J. de Haro Artes Gráficas, S.L. Parque Ind. P.I.S.A,
Mairena del Aljarafe • Sevilla

**DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES DE DECLARACIÓN
OBLIGATORIA (EDOS)
APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE LABORATORIO**

Director-Coordenador

Antonio Gasca Arroyo *
Investigador-Jefe de Proyectos

*** Centro de Investigación y Formación Agraria. Almeda del Obispo. Córdoba**

Quiero hacer constar expresamente el interés y dedicación que en el trabajo informático y de pre-edición de este libro han desarrollado D^a. Aurora Camacho Zafra y D^a. Inmaculada Muñoz Bernal sin cuyo concurso e interés esta edición habría resultado aún más difícil.

Mi sincero agradecimiento por ello.

El Director-Coordador.

INDICE

	PAG.
EL LABORATORIO DE ANALISIS VETERINARIOS. ORGANIZACIÓN Y FUNCIONES. Prof. Antonio Gasca	11
LA SEGURIDAD BIOLOGICA EN EL LABORATORIO. Prof. M^a Luisa Sarazá	25
CALIDAD Y ACREDITACIÓN. Prof. Andrés Rueda Jimenez	31
USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN EN EL LABORATORIO. Prof. Fuensanta Gosálvez Luján	45
PRÁCTICA DE TOMA Y ENVIO DE MUESTRAS. Prof. Antonio Paniagua	57
TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO Prof. Fuensanta Gosálvez Luján	65
EL SISTEMA INMUNE: FUNDAMENTOS APLICADOS AL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSA DE LOS ANIMALES DOMÉSTICOS. Prof. Miguel Angel Gonzalez García	71
TECNOLOGIA ANALITICA EN SEROLOGÍA. Prof. Luis Santiago Fernández	85
NUEVAS TECNOLÍAS APLICADAS AL DIAGNOSTICO. Prof. Concepcion Gómez Tejedor	105
TECNOLOGIA ANALITICA EN VIROLOGÍA. Prof. Juan M. Gómez Pacheco	111
TÉCNICAS DE AISLAMIENTO VÍRICO. Prof. Beatriz Pasamontes B	131
TECNOLOGIA ANALITICA EN MICROBIOLOGIA. Prof. Eulalio J.Diaz Dueñas	141
TECNOLOGIA ANALITICA EN PARASITOLOGÍA. Prof. Juan Jorrín Novo	187
MICOBACTERIAS Y MICOBACTERIOSIS. EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA DE TUBERCULOSIS. Prof. Enrique Jesús Villalba Montoro	205
RESULTADOS DE LABORATORIO Y SU INTERPRETACION Prof. Antonio Gasca Arroyo	227

Antonio Gasca Arroyo
Investigador-Jefe de Proyectos
C.I.F.A. Alameda del Obispo. Córdoba

EL LABORATORIO DE ANALISIS VETERINARIOS. ORGANIZACIÓN Y FUNCIONES.

Resumen.

Se da una visión panorámica sobre la naturaleza, funciones y objetivos de las diferentes clases de Laboratorios de análisis veterinarios, haciendo hincapié en los de tipo Oficial. Se describen, de estos últimos, las funciones de los de Referencia Internacional, y Nacional, así como objetivos y funciones de los de tipo Regional y Local.

Se mencionan y describen tareas de los de Alta Seguridad Biológica (H.S.), y se concluye con algunas consideraciones sobre el papel de los dedicados a la Investigación, en el campo del diagnóstico veterinario.

El trabajo concluye ofertando listas de Laboratorios Oficiales en España, así como de Laboratorios Nacionales de Referencia.

INTRODUCCIÓN.

Los Laboratorios de Análisis Veterinarios, cada vez mas comúnmente llamados de "diagnóstico veterinario" ocupan un lugar crecientemente relevante en los planos de lucha sanitaria, así como en el control activo de determinados procesos patológicos que han de ser tenidos en cuenta en el comercio de animales vivos y/o productos de ellos derivados.

Efectivamente, cada vez se pretende tener mas seguridades objetivas sobre la condición sanitaria de un producto, y a medida que el proceso científico va poniendo a punto nuevas tecnologías, más precisas y precoces en cada avance, son mas necesarios los servicios de Laboratorios especializados capaces de poner a punto los métodos necesarios para su aplicación.

Todo ello esta íntimamente relacionado con la unificación territorial a efectos comerciales de la Unión Europea, así como a la distribución de responsabilidades en esta materia, en nuestro país, en 17 Comunidades Autónomas. Esta situación entraña en si misma la necesidad de objetivación de condiciones concretas, homologadas y fiables para todo tipo de animales y mercancías derivadas, de esta manera que estas condiciones necesariamente han de suministrar garantía, lo más sólidas posibles técnicamente, además de estar basadas en pruebas idénticas, homologadas y repetibles sea cual sea el nivel de responsabilidad territorial asumido: Autonómico Nacional, Unión Europea o Mundial.

Además de estas labores en la garantía del control sanitario para el comercio pecuario, los Laboratorios de análisis (o diagnóstico) Veterinarios han de participar en otra serie de actividades, no menos importantes como la identificación de patologías (endémicas o exóticas) en los animales, puesta a punto de reactivos, investigación de nuevas tecnologías, control de calidad de reactivos y vacunas, ensayos colaborativos, pruebas toxicológicas, investigación de residuos etc., etc. Todo ello en tendencia ascendente y de acuerdo con las exigencias, crecientes también, de garantías, tanto de salud animal como de salud publica.

Esta diversidad de tareas es una de las claves, entre otras, de la especialización y diferenciación de este tipo de Centros, que han de asumir la realización de unas labores complejas en si mismas y necesitadas de una fuerte coordinación, so pena de arrojar resultados sin la mínima fiabilidad.

De ahí que no nos cansemos de insistir, aun a sabiendas de haber perdido esa batalla hace tiempo, en que no es lo mismo "resultado analítico" que "diagnóstico" y que por tanto, la denominación Laboratorio de Análisis Veterinarios es más correcta que la de Laboratorio de diagnóstico veterinario. Normalmente un laboratorio no debería emitir diagnósticos, y de hecho lo que hace es emitir resultados; resultados que posteriormente deben ser correctamente interpretados e incorporados a un proceso men-

tal, individual e intransferible, que llevado a cabo por un veterinario especialista, dará lugar al veredicto o diagnóstico final. Otra cosa, distinta, es la validez legal de una prueba concreta, y las consecuencias que de la misma puedan derivarse, algunas tan graves como la sentencia de muerte para el animal examinado

En este sentido es sabido que en los programas de lucha obligatoria contra epizootías la fase de diagnóstico comporta obligatoriamente la realización de pruebas de laboratorio, normalmente de tipo serológico, a cuyo resultado positivo o negativo se fía la supervivencia del animal, estando todo ello recogido en disposiciones legales, que incluso indican que resultado ha de ser considerado equivalente a un diagnóstico de brucelosis, tuberculosis, o peste porcina, por ejemplo.. Esto ha contribuido en buena manera a la simplificación artificial del problema, cosa que además de ser objetiva, e incluso legal, también resulta ser mas cómoda y muy poco comprometida para los profesionales implicados.

Al margen de que los resultados analíticos no suelen tener valor absoluto y necesiten de mayor o menor cumplimentación interpretativa, es evidente que el diagnóstico veterinario cuenta con mas herramientas y medios que la sola analítica de laboratorio.

Así esta, en primer lugar, la sintomatología o computo de manifestaciones clínicas, que a una persona experimentada pueden bastarle para un primer diagnóstico presuntivo, o incluso, en ocasiones, definitivo, caso de haber síntomas o datos clínicos considerados "patognómicos". Este tipo de diagnóstico puede ser considerado, el de mas dificultad, ya que es el resultado de una mezcla de experiencia, sabiduría técnico/científica, y "ojo clínico", esa especie de intuición indefinible tan irregularmente repartida. Lo normal, y en ocasiones obligatorio (siempre si se trata de EDOS) es que tenga que ser confirmado mediante datos o pruebas complementarias.

Los datos de antecedentes epidemiológicos también deben de ser contemplados ya que en ocasiones, pueden ser determinantes para la emisión del diagnóstico. Efectivamente, la simple aparición de un solo síntoma, que por separado seria poco demostrativo, podría bastar para suponer la reaparición de un proceso en un colectivo ya afectado con anterioridad de la misma afección que ahora puede ser confirmada con la aparición de nuevo de un solo síntoma. Este hecho conlleva que en ocasiones, y en la practica, pueda valer con establecer el diagnóstico completo y confirmado por una sola vez. Los casos posteriores son añadidos automáticamente al mismo proceso, sin necesidad de confirmación de cada uno por separado.

Para terminar, también existe la posibilidad de emitir otros diagnósticos teniendo en cuenta otros indicios, alteraciones o características concretas. Tal es el llamado "Anatomopatológico", que tiene en cuenta las diferentes lesiones producidas en órganos, aparatos o sistemas, el de tipo histopatológico, igual al anterior, pero a nivel microscópico. O el etiológico, casi siempre incontestable para las patologías infecto contagiosa, o el bioquímico, genético, etc.

En realidad, como ya hemos dicho, estamos describiendo las diferentes partes de un "puzzle" cuya única posición correcta, con todas las piezas en su sitio, será el veredicto final que tuviera en cuenta cada pieza, dándole su valor como parte de un todo. Y al igual que en el "puzzle", ninguna pieza por si misma podría suministrar nunca mayor información que la que da en su sitio correcto, y en unión con las demás.

No queremos, ni mucho menos, con todo lo dicho, quitar un ápice de la importancia que indudablemente tiene un dato analítico de laboratorio. Insistimos en que muchas veces incluso basta legalmente para la toma de decisiones técnicas o administrativas. Lo único que pretendemos es llamar la atención sobre cierto "fundamentalismo" existente alrededor la infalibilidad de este tipo de resultados, recordando cuestiones complementarias, en demasiadas ocasiones poco tenidas en cuenta.

A lo largo de este curso habrá ocasión de analizar en profundidad el verdadero valor que cada prueba tiene, así como su correcta valoración. Nosotros mismos hemos reservado una parte de nuestra intervención, complementaria a este tema, especialmente dedicada al análisis de la metodología existente para la validación de un procedimiento

CLASIFICACION DE LOS LABORATORIOS DE ANÁLISIS VETERINARIOS

En un intento de sistematización de esta charla, creemos que en principio podrían hacerse dos grandes grupos: Primero, en función de la naturaleza de la actividad desarrollada, y segundo en función de la titularidad de los mismos.

A) POR LA NATURALEZA DE LA ACTIVIDAD.

Siguiendo con el intento de sistematización, mucho más didáctica que real, aquí podemos distinguir a su vez otros dos grupos.

1º). LABORATORIOS DE CONTROL.

En principio aquí encuadramos a aquellos dedicados a la determinación de parámetros de tipo químico, físico o incluso biológicos, pero sin que estos parámetros tengan relación, al menos directa, con el estado de salud de los animales, Son análisis cuali-cuantitativos de tipo no sanitario.

- De alimentos (piensos, subproductos, etc.): Los analitos determinados pueden ser a su vez múltiples, como Principios Nutritivos, presencia de Aditivos, etc.
- De productos finales: Tales como leche, carne, etc., realizando determinaciones similares a las anteriores; los analitos determinados son indicativos de composición/calidad de estos productos.
- De medicamentos y/o vacunas: Destinados a evaluar la eficacia y/o composición de este tipo de productos. En ello se derivarán o podrán derivarse, acciones de tipo técnico o administrativo muy importantes, como autorizaciones, retiradas del mercado, sanciones, etc.

Evidentemente, este grupo de Laboratorios de Control no se dedica en exclusividad a estas Tareas, y de hecho en la práctica casi nunca ocurre. Lo más normal es que simultanee estos controles con otros trabajos como los que se describen a continuación.

2º) LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO.-

Dedicados según su nombre, a suministrar datos de tipo sanitario, de cuyo estudio e interpretación se derivará un diagnóstico. Estos datos, a su vez, podrán ser muy diversos, pudiéndose a su vez agrupar en base a la tecnología dominante empleada para su obtención. Así, se podrá hablar de análisis histopatológicos, bioquímicos, microbiológicos, inmunológicos, etc. Etc.

Ocurre a menudo que la especialización, y sobre todo el coste, impone que no sea fácil encontrar un Laboratorio de diagnóstico que agrupe en sus instalaciones los medios tácticos suficientes para abarcar toda la gama posible de tecnologías aplicables a la identificación de cada proceso; ello obliga, en la práctica, a contar con datos a menudo parciales que siempre dejan espacio (afortunadamente, creemos nosotros) para la formación, intuición y ojo clínico de los que antes hablábamos.

Así, lo corriente es encontrar centros bien preparados para la bacteriología, pero no para virología, o solamente preparados para el análisis inmunológico; o muchas combinaciones posibles, por supuesto.

B) POR SU TITULARIDAD.

En función de la persona o Entidad responsable de la propiedad y/o funcionamiento de la instalación, podemos distinguir:

1º) LABORATORIOS OFICIALES

De iniciativa pública, son promovidos y mantenidos por la Administración, para dar cumplimiento a sus obligaciones legales en la materia. Pueden ser a su vez de cinco tipos:

- Laboratorios de Referencia.
- Laboratorios Centrales.

- Laboratorios Regionales, Provinciales y/o Locales.
- Laboratorios de Alta Seguridad.
- Laboratorios de Investigación.

Por la importancia de sus funciones, cometidos y estructura, nos referiremos a ellos más extensamente al final de esta clasificación.

2º) LABORATORIOS PRIVADOS.

De iniciativa privada su funcionamiento y titularidad corresponde a personas, unidades o Asociaciones que las emplean para la consecución de sus propios fines. Pueden, a su vez, encuadrarse en dos grandes grupos:

- De uso particular: normalmente montados por Empresas para el servicio de asociados o controles propios de la misma.
- De uso público: aquellos que realizan analítica a petición de particulares.

Tanto unos como otros han de contar con los preceptivos permisos y licencias de apertura y funcionamiento, así como con los oportunos controles por parte de la Administración, para poder dar cumplimiento de esta forma a lo ordenado por el Reglamento de Epizootias de 4 de Febrero de 1955 (Art. 11). En Andalucía, en el momento actual, está en estudio la norma que regule este tipo de establecimientos privados.

3º) LABORATORIOS MIXTOS.-

Son aquellos que, siendo de titularidad probada, están sin embargo autorizados por la Autoridad competente para realizar determinados análisis que tienen la consideración de oficial. Son los llamados Laboratorios ACREDITADOS es decir que han sufrido un proceso mediante el cual han demostrado su capacidad técnica y científica en la realización de protocolos oficiales de análisis.

Otra modalidad de Laboratorios de titularidad mixta son los Interprofesionales, que son aquellos normalmente de titularidad tripartita (Administración, Sector Industrial y Productores) cuya actividad va encaminada al soporte analítico de determinadas calidades, asumidas y compartidas tanto por productores como por industriales con el tutelaje de la Administración. Tal ocurre con los Laboratorios Interprofesionales Lecheros, encargados de garantizar la calidad de la leche de consumo, mediante la determinación de ciertos parámetros de tipo bioquímico/biológico (proteína, grasas, lactosa, agua, células somáticas, carga bacteriana total, etc.) que sólo sirven para garantizar calidades sanitarias, sino también precios comerciales del producto, a abonar por Centrales Lecheras o Centros de Transformación.

Estos Interprofesionales puede (y de hecho con algunos países europeos lo están haciendo) incorporar en su bagaje analítico algunos parámetros sanitarios (pruebas de "Ring-Test" en leche, por ejemplo), siendo valiosísimos colaboradores en Planes Oficiales de Vigilancia Epidemiológica, por ejemplo.

Una vez más hemos de decir que en Andalucía tampoco existen, por el momento este tipo de Centros.

LABORATORIOS OFICIALES DE REFERENCIA.

Ya de lleno en el territorio de la Sanidad Animal, merece la pena tratar con un poco más de detenimiento algunos tipos de Centro sobre los que hace una líneas prometíamos volver. A ello vamos:

Los Laboratorios de Sanidad Animal dedicados a la identificación y seguimiento de procesos patológicos están organizados, en cualquier país desarrollado, en los tres niveles que iniciaban antes, y lo que es más importante, con una clara división del trabajo a realizar: este trabajo, en términos muy generales y simples, pero creemos que didáctico sería:

- Primero, poner a punto técnicas y protocolos suficientemente fiables para la detección, precoz y segura, de las principales enfermedades animales.
- Segundo, suministrar esta tecnología ya puesta a punto a todos los países interesados, para su aplicación homogénea en todos los animales a control por todos los Laboratorios de diagnóstico

Podríamos poner un ejemplo para los amantes de la música y comprensible rápidamente por todos: Necesitamos quien escriba la partitura, quien dirija la orquesta y quien toque los instrumentos. El conjunto de todo ello, si está bien organizado y coordinado, dará lugar a una buena melodía; o por el contrario, a una jaula de grillos si no existe la suficiente coordinación.

El Laboratorio de referencia es, por tanto, el compositor, el que escribe la partitura, el único creador de todo el conjunto. Es quien investiga, experimenta y desarrolla nuevos procedimientos, de acuerdo con el momento científico que corresponde, ocupando el lugar de la locomotora en el tren. Pero, al igual que la locomotora aprovecha en muchos trayectos del recorrido la inercia de todas las unidades que lleva detrás, y de la misma manera que quien escribe la partitura necesita su realización instrumental (oír la melodía, en definitiva) para evaluarla y corregirla, igualmente el Laboratorio de Referencia necesita de los escalones inferiores (Centrales y Regionales) para poner a punto su metodología (Validación de un test, ver más adelante).

Son estos últimos los que, con su experiencia en la aplicación práctica de los procedimientos, establecen un indispensable "feed-back" que, retroalimenta el sistema, estableciendo así la imprescindible colaboración entre todos los niveles

En concreto, las actividades más importantes que estos Laboratorios de Referencia desarrollan son:

a).- Asesoramiento y consultoría.- Estos Centros, al ser Referencia Internacional de determinadas patologías, han de contar forzosamente con la tecnología disponible más avanzada y segura del momento. Son por tanto, los Centros indicados para asesorar o responder consultas de su especialidad normalmente a gobiernos u Organismos Internacionales (FAO, OMS, etc.)

b).- Publicaciones especializadas.- Suelen contar con Revistas y Publicaciones donde dan cuenta no sólo de sus propios avances, sino del de la especialidad a la que están dedicados. Su actividad supone, en general, una de las puntas de lanza en que se apoya el avance de la Ciencia Veterinaria en el Mundo (junto con las Universidades y/o Sociedades Científicas).

c).- Vigilancia Epidemiológica.- Aunque esta actividad corresponde típicamente al siguiente escalón (Nacional y Regional) sin duda participan en ella cuando confirman, o no, resultados sobre muestras enviadas por las Redes Nacionales, pueden también evidentemente, realizar vigilancia directa sobre situaciones epidemiológicas concretas, normalmente en el área geográfica de los países donde están ubicados.

d).- Elaboración y/o propuesta de metodología de Referencia ("Gold-Standard Test"). - Es aquí donde encuadra perfectamente nuestro anterior ejemplo de la sinfonía y la orquesta. Elaborar un método (escribir la partitura) es siempre una tarea compleja, aunque casi nunca se parta de cero; muchas veces lo que se hace son adaptaciones o modificaciones puntuales de tecnologías preexistentes, o puestas a punto para otras especies; Así es relativamente frecuente la adaptación para los animales de técnicas inicialmente puestas a punto para el diagnóstico sobre personas, siendo el caso contrario también.

Muy raramente un Laboratorio de Referencia propondrá una técnica para servir de referencia que sea absolutamente innovadora, y por tanto, demasiado moderna como para estar suficientemente probada. En este terreno estos Centros son extremadamente cautelosos, y las técnicas referenciadas suelen ser muy sólidas y muy experimentadas de tal manera que los resultados obtenidos en su aplicación sean incuestionables.

Más tarde veremos que las operaciones o requisitos indispensables para la validación de una prueba de Laboratorio son bastante exigentes, y pasan por varias fases consecutivas, (Valoración, Evaluación y Ensayo). Con más razón, la propuesta de un método que va a ser seguido por todos los Laboratorios Nacionales de un continente (y muy a menudo, del mundo entero) ha de ser cuidadosamente sopesada.

e).- Elaboración, valoración y distribución de reactivos de Referencia.- La puesta a punto de metodología de referencia pasa forzosamente por la normalización de todos los componentes y pasos de dicha metodología; es decir, la realización de un protocolo exacto, que entre otras cosas deberá tener en cuenta la elaboración y valoración de los reactivos empleados, especialmente de los de tipo biológico, (antígenos y anticuerpos) mucho más susceptibles de variación que los de tipo puramente químico. Normalmente, además, suministrarán patrones o alícuotas de estos reactivos de refe-

rencia a los Laboratorios Nacionales que los soliciten, asegurando, de esta manera la uniformidad del método por todos los usuarios. Estos reactivos serán igualmente facilitados a aquellas empresas comerciales que pretendan poner en el mercado métodos o procedimientos oficiales validados. Este tipo de reactivos de referencia actúan también como "reactivos patrón", y su existencia es indispensable para que exista un método de referencia.

f).- Realización de ensayos colaborativos.- Llamados también "Ensayos Comparativos" o "Ring-Test", no son más que pruebas analíticas simultáneas realizadas por varios Laboratorios Nacionales sobre una serie de muestras "ciega" suministrada por el Laboratorio de Referencia. Este procedimiento, muy simple, es su concepción y realización, permite asegurar la uniformidad de resultados, sean cuales sean los operadores y lugares geográficos de realización; que por otra parte, es lo mínimo que puede exigirse a este tipo de ensayos; bien entendido, sin embargo, que nos es la única prueba exigida ni exigible a una buena analítica.

LABORATORIOS CENTRALES.

Son los que realizan a escala Nacional, de un país concreto, lo que los de Referencia Internacional realizan a escala Mundial o de continentes (Europa, América, África, etc.). En nuestro ejemplo musical, el Laboratorio Central sería el director de la orquesta, que recibe, lee e interpreta la partitura escrita por el autor, y que, después de probarla y aprenderla con sus más íntimos colaboradores, la extiende, ensaya y practica con el resto de la orquesta, hasta ejecutarla de forma impecable. Es el primer y último garante de la melodía, y si un instrumento desafina, o no sigue al resto, es su responsabilidad corregirlo y ayudarlo a cumplir su papel; o en último caso, de ser necesario, apartarlo del conjunto, al menos para esa sinfonía. Garantiza, por tanto, la correcta puesta a punto, en un país concreto, de una técnica concreta, como única manera de uniformar resultados iguales para muestras iguales. Para ello, normalmente, su actuación se basa, a escala Nacional, en las siguientes líneas:

a). - Unificación de criterios y métodos diagnósticos para las patologías de referencia. Para ello, a su vez, tendrá que:

a.1) .- Distribución y explicación, aplicativa a las técnicas de referencia, recibidas a su vez de los Laboratorios internacionales. Publicación y distribución de protocolos pormenorizados; organización de reuniones técnicas; trabajos de divulgación, etc.

a.2).- Distribución y control de productos y reactivos de referencia, fabricados según normas "standard" del Laboratorio internacional, o recibidas directamente del mismo, Realización de Ensayos Colaborativos en Red entre todos los Centros autorizados para una tecnología, con periodicidad suficiente (entre 1 y 2 veces al año).

a.3).- Organización de cursos de reciclaje para técnicos y analistas, estancias, información bibliográfica, etc., etc.

b). - Diagnóstico inicial o confirmación de Patologías exóticas. En todos los países europeos los Laboratorios Centrales tienen confiada esta misión, de tal manera que, antes de asegurar (y por supuesto, declarar) una enfermedad exótica en un país, la sospecha deberá ser confirmada por el Laboratorio de Referencia Nacional. Si la patología es exótica también para el continente, deberá ser a su vez confirmada por el Laboratorio de Referencia Internacional o Mundial Nos referimos, naturalmente, a patologías incluidas en las listas de E.D.O.S., tanto de la O.I.E. como de la U.E.

c). - Control sanitario de importaciones/exportaciones (terceros países). A ser el estado de cada País miembro de la U.E. el garante ante toda Europa de las condiciones sanitarias de las mercancías o animales que ingresan en su territorio desde otros países no miembros, la responsabilidad de los controles recae también, evidentemente sobre el Estado Central, que es de quién normalmente dependen los Laboratorios Centrales. En este caso no estamos hablando de enfermedades referenciadas, sino de controles sanitarios que la Autoridad competente garantiza en sus resultados. Máxime cuando, en una Europa sin fronteras, cualquier mercancía circula libremente por todos los territorios de la Unión, una vez que un Estado Miembro le ha dado el visto bueno en algún PIF. Razonamientos similares pueden ser aplicados para las exportaciones desde la U.E., hacia terceros países.

Puede ocurrir, sin embargo, que por razones de diversa índole la autoridad estatal delegue, de forma puntual y expresa, la realización de determinados controles a alguna Comunidad Autónoma, que, en este caso, se limita a la realización y suministro de resultados, sin más atribuciones ni complicaciones administrativas. Todo ello en el clima de común entendimiento que han de presidir este tipo de relaciones.

d). - Colaboraciones en los Planes de Luchas. De forma puntual, o incluso continua, los Laboratorios Centrales, en tanto en cuanto forman parte de los Servicios Oficiales Veterinarios de un país, están involucrados y comprometidos en general con las tareas y objetivos de la Lucha Sanitaria, y pueden (y en ocasiones deben) colaborar para la consecución de las mismas. Normalmente esta colaboración se concreta en el apoyo diagnóstico de casos dudosos, así como suministro de determinados reactivos biológicos o no (sueros control positivos y/o negativos, reactivos "Standard", etc.).

e). - Intervención, arbitraje, informes peritales. Muchas de las labores analíticas de los Laboratorios de diagnóstico Veterinario comportan a su vez toda una serie de actuaciones legales o reglamentarias que, normalmente, prevén el derecho del usuario a la defensa o reclamación basada en el contraanálisis. Estos litigios, que suelen resolverse a escala local o regional, deben tener sin embargo garantía de solución final en los laboratorios Centrales, que de esta forma representan también una posibilidad legal de reclamación. Hemos de reconocer, no obstante, que los planes de lucha oficiales no prevén este tipo de acciones probablemente por la evidente dificultad práctica de requisitos legales en la recogida de muestras para analítica inicial, contradictoria y dirimente, en su caso.

Pero si es de relativa frecuencia, o incluso de obligada frecuencia (para planes como el P.N.I.R., por ejemplo) en otro tipo de analítica (piensos y materias primas lo más frecuente) donde el envío de muestras para analíticas dirimientes es cada día más frecuente (y con tendencia al alza, quizás como expresión de cada vez más firme conciencia de sus derechos por parte de usuaria y demandantes).

LABORATORIOS REGIONALES Y LOCALES.

Son los encargados a nivel territorial concreto, de la analítica en la que se basan los planes de Lucha. En nuestro ejemplo musical, representan el instrumento (o grupo de instrumentos) de la orquesta completa representada por el Nacional; y es a su nivel, responsable del sonido emitido por sus instrumentos, que ha de ser armónico y acoplado al conjunto. En nuestro país, y en el caso de las CCAA multi-provinciales, suele existir un Laboratorio de tipo Regional que comúnmente a su vez coordina y unifica los criterios de otros de ámbito territoriales más pequeños, de tipo provincial; o incluso comarcal. Tal ocurre en las Comunidades de Extremadura (con un Laboratorio Regional en Badajoz), Castilla-León (con un laboratorio Regional en León), Galicia (con un Laboratorio Regional en Lugo), Castilla la Mancha (con un Laboratorio Regional en Cuenca), Cataluña (con un Laboratorio Regional en Barcelona) o Andalucía (con un Laboratorio Regional en Córdoba). Además de estos Laboratorios "Regionales" existen en estas Comunidades otros "provinciales" o incluso "comarcales", como ocurre en Cataluña, que, a su nivel forman también una "Red", que, a su manera, toca o intenta tocar también su propia melodía. Resulta evidente que todo ello necesita un nivel de coordinación alto, o se corre el riesgo de convertir la famosa melodía en una simple algarabía.

También hay CCAA uniprovinciales, donde el modelo forzosamente se simplifica, con un único Centro Regional-Provincial, como pasa con Murcia o Madrid. U otras, como el País Vasco, donde un solo Centro atiende varias provincias.

En fin, muchos moldes y modelos distintos, demostrativos sin duda de que no ha habido durante el proceso de transferencias de estas competencias un modo único no ya impuesto, sino ni siquiera aconsejado; en total, más de cuarenta Laboratorios Oficiales, con distintos niveles de competencias administrativas, distintas potencialidades y especializaciones científico-técnicas y distintos modelos organizativos. Así, los hay desde aquellos que siguen respetando escrupulosamente la dependencia oficial (como éste de Córdoba y otros muchos), con otros que han cedido parte de sus instalaciones a Laboratorios de funcionamiento mixto, como los interprofesionales lecheros (tal ocurre en Mallorca) u otros con modelos de gestión privada (como el de Derio, en el País Vasco).

Las misiones que los Laboratorios Regionales desarrollan fueron fijadas en su día por Orden 1/XII/1980 que lo hizo para los once de este tipo de entonces existentes en España, los cuales ya debían su existencia a lo dispuesto por la Ley y Reglamento de Epizootias de 1952 y 1955, respectivamente. Con posterioridad a todo ello, el R.D. 995/85, de 25 de Mayo, fijó las condiciones para el Traspaso de Funciones y Servicios del Estado en material de Laboratorios Agrarios y de Sanidad y Producción Animal a la CCAA de Andalucía. De todas estas disposiciones extraemos a continuación un extracto de las principales misiones de este tipo de Centros.

a) Funciones encomendadas en general a los Laboratorios Regionales de Sanidad Animal(Orden 1/XII/80.

- 1º). Estudios, análisis y dictámenes en relación con la Sanidad, tanto de los animales como de las producciones ganaderas.
- 2º). Análisis y dictámenes bromatológicos, zoonosológicos y toxicológicos de aguas, piensos, aditivos, correctores y otros productos para la ganadería y la alimentación animal.
- 3º). La inspección y control de centros de producción y distribución de productos zoonosológicos y la contrastación laboratorial y de campo de los citados productos.
- 4º). La inspección y dictamen previo al registro y autorización o renovación de la inscripción de los laboratorios privados dedicados al diagnóstico de las enfermedades de los animales.
- 5º). Cuantos estudios, análisis y dictámenes les encomiende el Ministerio de Agricultura (antes de las transferencias) en relación con la producción, Sanidad e Higiene de los Animales, así como los de técnica veterinaria.

b). Funciones de la Administración del Estado que asume la CCAA Andaluza e identificación de los Servicios que se traspasan en materia de Laboratorios de Sanidad y Producción Animal (R.D. 995/85).

- 1º). Estudios, análisis y dictámenes en relación con la sanidad e higiene de los animales y de los medios de la producción ganadera.
- 2º). El registro y autorización de laboratorios privados dedicados a las materias señaladas en el punto anterior, dentro de las funciones asumidas.
- 3º) La expedición del certificado oficial de análisis en aquellos casos en que no esté reservado a la Administración del Estado en virtud de las competencias que a ésta corresponden. En todo caso la expedición de este certificado será de acuerdo con la metodología oficial establecida por la Administración General del Estado.
- 4º). La realización de los análisis e informes que se soliciten a petición de los particulares y de los Organismos de la Administración, con independencia de la procedencia de los productos o de la radicación de los peticionarios.

Por contraste, y aunque no corresponde exactamente a este apartado de nuestra exposición, en el citado R.D. la Administración del Estado se reserva las siguientes funciones:

- a) Estudios, análisis y dictámenes derivados de sus propias competencias, así como las que le sean encomendadas.
- b) Promulgación de métodos oficiales de análisis para conseguir la homogeneidad en todo el ámbito nacional de la actividad en materia de Laboratorios, con el fin de dar carácter oficial a las certificaciones que correspondan.
- c) La realización de ensayos de laboratorios en relación con utensilios, instrumentos, aparatos y máquinas de medida para análisis para la aprobación de prototipos y verificación posterior por la Comisión Nacional de Metrología y Metrotécnica.
- d) El visado y ratificación de certificados de análisis expedido por las Comunidades Autónomas para su convalidación oficial, a efectos del comercio exterior.
- e) La realización de análisis e informes arbitrales, en caso de discrepancias entre los realizados por Laboratorios Oficiales.

f) La autorización para la introducción en el territorio nacional de agentes patógenos con fines de estudio, experimentación o diagnóstico.

g) La supervisión de metodologías analíticas, así como la contrastación de sus resultados para verificar su idoneidad y homogeneidad.

h) Corresponde a la Administración del Estado las relaciones internacionales en materia de contrastación y métodos de análisis y seguimiento de tecnologías. La Administración del Estado podrá requerir a la Comunidad Autónoma para que participe dentro de la Delegación Española en aquellas reuniones de carácter internacional cuando afecte a sus intereses.

Por último, el citado R.D. fija aquellas funciones que podrán ser compartidas entre la Administración del Estado y la Autonómica, así como cauces para una correcta y fructífera colaboración, como no podía ser menos, entre las que cabe destacar:

1º).- A petición de la Administración del Estado, la CCAA Andaluza realizará prioritariamente aquellos análisis necesarios en materia de intervención agroalimentaria, comercio exterior y defensa contra fraudes.

2º).- Tanto el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación como la CCAA prestarán el apoyo necesario para la resolución de problemas planteados en el ámbito estatal, o en el caso de otras CCAA, en un marco de colaboración mutua.

3º).- En función de una mayor especialización en un determinado Laboratorio de realización por éste los ensayos, análisis y asesoramientos que le sean solicitados por la Administración del Estado o las restantes CCAA.

4º).- Atendiendo al principio de solidaridad, la Administración del Estado y las CAA prestarán asistencia a aquellas que carezcan de Laboratorios fijando el régimen de contraprestación.

5º).- Entre la Administración del Estado y las CCAA se establecerán los adecuados sistemas de colaboración que permitan mutua información y la mejor gestión de las funciones asumidas.

Nada se ha legislado con posterioridad a estas disposiciones, ni a nivel estatal ni a nivel de nuestra Comunidad Autónoma. Continúan vigentes, por tanto, las citadas funciones y tareas, aplicables, en principio, al funcionamiento de los Laboratorios existentes en el momento de las transferencias: Córdoba, transferido en su totalidad orgánica y funcional, y Granada, transferido en parte, y quedando la otra parte con dependencia Estatal

LABORATORIOS LOCALES.

Tienen la misma consideración, tareas y cometidos que los Regionales, con la excepción de que estos últimos tengan encomendada la labor de armonización de todos los existentes en un mismo territorio o Comunidad Autónoma. Esto último es lo que corrientemente sucede en España, añadiendo la figura de "Laboratorio Regional de Referencia" solidez y fiabilidad al conjunto de la Red, de tal manera, que, sin ser imprescindible la coordinación regional sí es muy deseable especialmente cuando el nº de Laboratorios Provinciales a coordinar es amplio.

Éste último caso es el de Andalucía, que con posterioridad al proceso de transferencias en estas materias optó por el modelo "provincial" con "coordinación regional", así, existen actualmente siete Laboratorios provinciales, siendo Málaga la única provincia que no lo tiene en marcha, pero sí en construcción actual. Todos ellos se dedican a labores de apoyo analítico a los programas de lucha sanitaria de impulso oficial, y algunos ofrecen servicios analíticos a petición de particulares.

El Decreto 4/96, de 9 de Enero, de la Consejería de Agricultura y Pesca, de la JJAA, clasifica estos Laboratorios en su Capítulo III como Centros Periféricos, y más concretamente, como "Centros Especializados Agrarios", haciéndoles depender, sin excepción, de las Delegaciones Provinciales correspondientes; y sin establecer distinciones entre ellos en Provinciales o Regionales.

Aún así, el Laboratorio de Córdoba, asume en la práctica la mínima coordinación técnica de esta "Red" andaluza, a través de las siguientes líneas de trabajo:

- a) Organización anual de ensayos colaborativos (Ring-Test) sobre diagnóstico serológico de enfermedades objeto de planes oficiales de lucha.
- b) Suministro de materiales y reactivos de uso común, incluidos antígenos y sueros de control
- c) Organización de reuniones periódicas de coordinación (de forma esporádica).

Todo ello está todavía a falta de reglamentación específica, de tal manera que sea posible la consolidación de un modelo que ha demostrado sobradamente su dedicación y eficacia, por encima y al margen de voluntarismos personales, más o menos momentáneos.

Volviendo a nuestro ejemplo melódico, ya estaría descrita la orquesta completa, desde el compositor al último y más desapercibido de los instrumentistas. La necesidad de coordinación de todo el conjunto es en definitiva el gran motor de toda la división del trabajo y diferentes especializaciones descritas; teniendo en cuenta, además, que, en definitiva, no se puede ni se debe hablar de primeros o últimos escalones, sino de la eficacia del conjunto; así, la experiencia masiva de los laboratorios locales en la aplicación de una técnica debe llegar con toda su fuerza a los Laboratorios de Referencia, porque no siempre una melodía suena en la orquesta como en la imaginación o el solitario piano del compositor. De hecho, más adelante veremos que el último paso para validar una prueba es el ensayo de la misma en condiciones de campo y sobre suficiente número de animales.

Cerraremos este capítulo con una frase del mundialmente conocido director de orquesta Herbert Von Karajan, y que merece la pena ser meditada, tanto para la música como para cualquier actividad de coordinación:

“El arte de dirigir consiste sobre todo en saber cuando hay que abandonar la batuta, para no molestar a la orquesta”.

LABORATORIOS DE ALTA SEGURIDAD BIOLÓGICA.

Otra clase muy específica de Laboratorios Veterinarios, que puede ser perfectamente simultaneada con otras propiedades de referencia o territorialidad son los de alta seguridad, o H.S. (High-Security) que no son más que aquellos que cuentan con medidas necesarias y suficientes como para garantizar que los microorganismos manejados en su interior no van a poder ser accidentalmente liberados al exterior desde el Laboratorio. Estos microorganismos, normalmente virus, suelen ser los agentes etiológicos de las enfermedades consideradas exóticas en el 1º mundo, que, en términos generales, están recogidas en la lista A de la O.I.E. o de la U.E.; se comprende fácilmente que para su manipulación, cultivo, identificación y conservación sean exigibles garantías extraordinariamente rígidas, dadas las consecuencias gravísimas de un fallo de este tipo (ya experimentado, por otra parte, con patologías tan serias como la Fiebre Aftosa, por ejemplo). El nivel de seguridad o de bioseguridad abarca también a todo lo referente a la protección personal de los trabajadores del Laboratorio, ya que muchas veces los agentes manejados son zoonóticos, o puede existir la posibilidad de que, sin serlo, puedan ser vehiculados mecánicamente por personas de dentro hacia fuera del edificio.

Clasificación de los agentes patógenos en función del riesgo de enfermedad (bioseguridad)

Siguiendo a P.K. Murray (1998) existen seis clasificaciones principales en este sentido correspondiendo cada una a Organismos o Centros tan importantes como la O.M.S., Laboratorio de Plun Island (USA), Centro Nacional de Enfermedades Animales Exóticas (Canadá) O.I.E., etc.; por simplificar, puede decirse que todos prácticamente distinguen hasta cuatro Grupos de Patógenos, yendo la clasificación de menor a mayor; es decir, desde el Grupo I, que abarca microorganismos productores de enfermedades de tipo enzoótico, no sometidas a control, hasta el Grupo 4, que agrupa a los agentes exóticos o enzoóticos, de alto riesgo de difusión, sometidas a control oficial, a menudo vehiculados por vectores, de alta significación económica en sus consecuencias infectivas. Pasando por los Grupos, II y III, ambos incluyendo organismos patógenos de control oficial, exóticos o enzoóticos, con bajo riesgo de difusión (grupo II) o moderado riesgo de difusión (grupo III), no difundidos por vectores (grupo II) o con posibilidad de serlo (grupo III).

En consecuencia con esta clasificación, y en conexión con la misma, existen igualmente cuatro niveles de bioseguridad, denominados como P-I, P-II, P-III y P-IV.

El nivel P-I equivale al Laboratorio más básico, que maneja agentes del Grupo I, y no necesita medidas especiales para evitar su difusión. Bien entendido que ello no exime de la responsabilidad, sea cual sea el nivel de protección alcanzado, de poner en práctica todos los medios necesarios para evitar contaminaciones accidentales, internas o externas, tanto de animales como de personas.

Los niveles P-II y P-III son los que corresponden a las condiciones de trabajo de los patógenos encuadrados en los Grupo II y III y las exigencias de bioseguridad, especialmente en el P-III son ya elevadas; son necesarias cámaras de Flujo Laminar, equipos de filtración de aire en determinadas áreas, medidas especiales de descontaminación de materiales y personas, etc., etc....

El nivel P-IV es el que existe en Laboratorios H.S., y el mismo incluye equipamientos y medidas de máximo nivel, Los principales son:

■ En relación con los protocolos de trabajo:

Ningún material podrá salir del laboratorio sin previa descontaminación. Esto incluye no sólo el de tipo biológico, sino todo tipo de documentos, ropas, aparatos, etc.

Las personas sólo podrán salir a través de vestuarios con ducha. La ropa de trabajo quedará siempre dentro, y cada vez que se salga será previa ducha. Las personas que accedan al interior serán expresamente autorizadas.

El suministro de materiales necesarios para el funcionamiento se hará mediante el sistema de doble puerta, airtok o cámara de esterilización.

■ En relación con los equipos.

Todos los trabajos se realizarán en cabinas de seguridad tipo III

Existirán trajes especiales de protección dotados de equipos de filtración microbiológica del aire y sistema autónomo de respiración.

□ Instalaciones especiales.

Arquitectónicamente, el Laboratorio de H.S., consiste en una zona especial, dentro de otra más grande, donde es obligatorio mantener condiciones de estanqueidad, y la premisa básica de que nada puede salir del primer recinto sin previa esterilización. Ello se consigue básicamente mediante el mantenimiento de presión aérea negativa en el primer recinto, de tal manera que, en caso de rotura de la estanqueidad, en todo caso entrará aire, pero nunca saldrá. Todo el aire destinado a la respiración y ventilación, será filtrado mediante sistema Hepa, y todos los residuos, de personas o animales, serán tratados térmicamente antes de eliminarlos al exterior.

Estas condiciones obligan a la adopción de sistemas especiales de construcción, puertas, y ventanas especiales, suelos, sanitarios, duchas, etc., que no consideramos necesario describir con mas detalle.

Y para terminar, el tipo de trabajo y las Misiones encomendadas a este tipo de Laboratorios son, en general, complementarias con las de los Convenciones, reservándose el trabajo sobre gérmenes patógenos de la clase IV, como ya se dijo.

Siguiendo al citado anteriormente P.K.Murray (1998) estas misiones podrían ser, en general, clasificadas como sigue:

CLASE DE TRABAJO	LINEAS DE ACCION
DIAGNOSTICO	-Patologías exóticas. -Determinados controles para export/import. -Desarrollo de Pruebas.
INVESTIGACIÓN	-Caracterización vírica. -Patogenia/Transmisión/Patología de algunas enfermedades. -Desarrollo de Vacunas. -Inmunología. -Epidemiología. -Contratos Comerciales con terceros.
ENTRENAMIENTO	-Reconocimiento de exóticas por veterinarios. -Cursos de diagnóstico veterinario.
OTROS TRABAJOS	-Masters, doctorados. -Toxicología. -Vacunas Fiebre Aftosa. -Cepas de Referencia. Etc., etc.

España cuenta con uno de los mejores laboratorios H.S. del mundo. Es además referencia internacional para Peste Porcina Africana, y Laboratorio autorizado para Patologías Exóticas para nuestro País. Depende del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, y está encuadrado dentro del INIA (Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias). Físicamente está ubicado en Valdeolmos (Madrid), y se denomina Centro de Investigación en Sanidad Animal. (CISA).

LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN VETERINARIA.

Por el momento son mayoritariamente Oficiales, aunque en España, y dependiendo normalmente de Empresas Multinacionales existen algunos dedicados a la I+D en el Campo de la Sanidad Animal. También existen Empresas puramente españolas, que dedican sus esfuerzos a la innovación tecnológica en el terreno del diagnóstico, y a las que se le puede auspiciar, creemos, un futuro prometedor.

En el terreno de lo Oficial, son especialmente las Universidades, y más concretamente las que cuentan con Facultades de Veterinaria, las que poseen este tipo de instalaciones, normalmente bien dotadas y con objetivos prioritariamente investigadores. Ello no impide, sin embargo, que ofrezcan servicios de diagnóstico "para la calle", con fines fundamentalmente más de docencia que de servicio público.

Pueden ocupar, y de hecho así lo hacen muchos de ellos, un lugar destacado, en sus áreas de influencia, colaborando sin duda al desarrollo pecuario de su zona.

Deben, sin embargo, atenerse a las mismas normas de control y coordinación que, en el caso del diagnóstico de E.D.O.s., hemos visto anteriormente, para no "desafinar" en el conjunto regional o nacional. Pudiendo y debiendo, aspirar incluso a referencias técnicas tanto nacionales como internacionales. (Tal es el caso de la FAVE de Zaragoza con las E.E.T., de las que es Referencia Nacional).

Es en el tema de la investigación e innovación tecnológica donde pueden y deben jugar un mayor papel, ya que, a priori, cuentan con inmejorables condiciones, tanto de instalaciones como de personal, para situarse a la vanguardia de la búsqueda de nuevos procedimientos y tecnologías en las que basar la identificación de patologías que, en sí mismas, también constituyan grandes retos, como la B.S.E., antes mencionadas. Y es igualmente en ese mismo terreno donde la colaboración con Laboratorios Oficiales, de tipo Nacional o Regional, debería ser "obligadamente" fructífera.

ANEXOS.

- Relación de Laboratorios Regionales de España.
- Relación de Laboratorios Nacionales de Referencia de España.

LABORATORIOS OFICIALES DE REFERENCIA NACIONAL DEPENDIENTES DE LA ADMINISTRACION CENTRAL.		
DENOMINACIÓN	UBICACIÓN Y TELEFONO	PATOLOGÍA Y/O MATERIAS DE REFERENCIA
LABORATORIO DE SANIDAD ANIMAL DEL ESTADO	Camino del Jau s/n Santa Fe (Granada) Tlf: 958 44 03 75	-Brucelosis animales. -Perineumonía Contagiosa bovina. -Rabia Animal.
LABORATORIO CENTRAL DE VETERINARIA. M.A.PA..	Algete (Madrid). Ctra. Madrid-Algete Km.5,40. Tlf: 91 629 03 00	-Leucosis Enzoótica Bovina. -Peste Porcina clásica (1) -Peste Equina Africana (2) -Enfermedad de Newcastle. -Peste Aviar. -Enfermedad de Aujeszky. -Enfermedad de los peces. -Salmonelosis animales. -Tireostáticos y tranquilizantes.
CENTRO DE INVESTIGACION EN SANIDAD ANIMAL (CISA). I,N,I,A, MAPA	Crta. Del Casar s/n Valdeolmos. (Madrid). Tlfn: 91 620 23 00	-Enfermedades vesiculares (3) -Peste Porcina Africana (4). -Enfermedades Exóticas (5). -Peste Equina Africana (2).
CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA DE E.E.T.	Avd. Miguel Servet 177 Facultad de Veterinaria Dpto. Histología y Anatomía. Zaragoza. Tlf: 976 76 10 00	-B.S.E.

- (1) Solo sobre el papel del B.O.E.- En la práctica quien se ocupa de todos los trabajos de la Referencia es el CISA de Valdeolmos.
- (2) Tiene la Referencia Nacional y la de la U.E.- comparte con CISA la de la O.I.E.
- (3) *Fiebre aftosa, Enfermedad Vesicular Porcina, Estomatitis Vesicular, Exantema Vesicular.*
- (4) También referencia Mundial.
- (5) Actúa como Laboratorio Autorizado para el manejo de este tipo de agentes. No existen Referencias Nacionales de estas Patologías.

LABORATORIOS OFICIALES DE DIAGNÓSTICO VETERINARIO DEPENDIENTES DE COMUNIDADES AUTÓNOMAS. (REGIONALES CON *)			
COMUNIDAD	LOCALIDAD	DIRECCION	TELEFONO
ANDALUCIA	Jerez de la Fra. (Cádiz)	Crta. de Arcos km. 4,600.	956 30 47 71
	Sevilla	Cortijo el Cuarto (Bellavista)	954 69 25 61
	Aracena. (Huelva)	C/ Tenerías s/n	955 12 76 32
	Jaén	Crta. Bailén-Motril s/n	953 28 10 61
	Santa Fé.(Granada)	Camino del Jau s/n	958 44 03 71
	La Cañada.(Almería)	Crta. De la Playa, 1	950 29 17 24
	Córdoba*	Crta. Nacional IV Km. 395.	957 32 53-02/03
ARAGON	Zaragoza*	Doctor Iranzo, 6	976 41 29 00
ASTURIAS	Gijón.(Oviedo)	Jove del Medio	985 32 77 51
BALEARES	Palma de Mallorca*	Ibab, S.A.	971 42 84 45
CANARIAS	La Laguna* (Sta.Cruz Tenerife)	Crta. La Cuesta-Taco	922 64 11 09
CANTABRIA	Santander	Peña Bejo s/n	942 33 24 00
CASTILLA LA MANCHA	Cuenca*	Crta. Toledo-Cuenca Km. 173.	969 21 37 63
	Talavera	Carlos Barral, 4	925 80 53 13
	de la Reina (Toledo)		
	Marchamalo. (Guadalajara)	Extramuros s/n	949 25 00 09
	Albacete	Crta. Casas Ibañez, 25	967 21 07 73
	El Chaparrillo (Ciudad Real)	Crta. De Porzuna Km, 4	926 23 14 00
CASTILLA-LEON	Ávila	Crta. De Burgohondo, 1	920 21 18 89
	Burgos	Polígono La Losa	947 48 20 47
	León*	Alcaide Miguel Castaño, 78	987 20 33 12
	Palencia	Crta Magaz, s/n	979 72 82 00
	Salamanca	Cordel de Merinas 40/50	923 21 96 06
	Segovia	Crta. De Riaza, 4	921 43 06 00
	Soria	Casa del Agricultor Diputación, 1	975 21 28 40
	Valladolid	Santuario, 14	983 20 09 11
	Zamora	Eduardo Julián Pérez 17	980 54 73 29
CATALUÑA	Lleida	Partida de la Carrapela,97	973 28 08 48
	Vic (Barcelona)	Bisbe de Morgades,6	93 885 52 02
	La Poble de Segur (Lleida)	Milenari de Catalunya,2	973 35 11 10
	Girona	Avd.Sant Narci, 105	972 23 13 63
	La Seo D´Urgell (Lleida)	Sant Ermengol, 50-2º	973 35 11 10
	Roquetes-	Crta.Valencia, 108	977 50 01 74
	Tortosa (Tarragona)		
	Reus. (Tarragona)	Doctor Ferran 40	977 31 25 81
Barcelona*	Zona Franca Via Circul. Norte	93 233 46 23	
COMUNIDAD VALENCIANA	Valencia*	Ing.Manuel Soto 18	96 324 14 80
EXTREMADURA	Cáceres	Crta.Depuradora s/n	927 18 11 34
	Badajoz*	Estación Pecuaria, 17 Aptdo.Correos 173	927 18 11 34
GALICIA	Lugo*	Avd de Madrid,77	982 22 17 50
	Salcedo (Pontevedra)	Cabana	986 86 08 90
	Bergondo (A Coruña)	Crta. N-VI Km. 541	981 79 50 18
LA RIOJA	Logroño	Crta.de Burgos Km. 6	941 20 64 26
MADRID	Colmenar Viejo	Crta.Guadalix de La Sierra Km, 1,80	91 846 15 00
MURCIA	El Palmar	Crta.Mazarrón Km, 2	968 88 07 91
NAVARRA	Villava	Avd. Serapio Huici s/n	948 42 79 83
PAÍS VASCO	Durana. (Álava)	Crta. De Arzobiaga s/n	945 18 18 37

María Luisa Sarazá

Jefe de Servicio de Seguridad Biológica y Mantenimiento.
Centro de Investigaciones en Sanidad Animal (CISA)
INIA, MAPA 28130 Valdeolmos.

LA SEGURIDAD BIOLÓGICA EN EL LABORATORIO.

INTRODUCCIÓN.

Seguridad es una palabra que presenta múltiples connotaciones y cuyo significado puede variar para cada persona. ¿Qué es seguridad?. Según el punto de vista de un científico, la seguridad aparece a la hora de diseñar un experimento. El ingeniero de una planta mira a la seguridad como uno de los factores necesarios en el proceso productivo. Un legislador puede apreciar la seguridad como parte importante de una ley de medio ambiente. El público generalmente contempla la seguridad como una ausencia de riesgo en el empleo de un producto o un proceso. Por último, la persona que manipula materiales peligrosos, como puede ser el personal de un laboratorio, piensa en la seguridad como una herramienta imprescindible a la hora de manejar dichos materiales. Estos podrían ser algunos de los muchos aspectos que entraña la seguridad.

El designar un acto como seguro o no, no es nunca una definición absoluta; el término es relativo. Si una actividad parece estar libre de provocar cualquier accidente, la solemos llamar segura. Sin embargo, habitualmente, aún cuando la probabilidad de accidente pueda ser baja, la total ausencia de riesgo de accidente no existe. Una actuación puede entonces establecerse como relativamente segura. La palabra clave es "relativamente". Un soldador conoce como usar una máquina soldadora debido a su experiencia y formación. Por ello, el empleo del equipo por el profesional es considerado relativamente seguro en comparación con alguien que utiliza un equipo de soldadura para hacer bricolaje en su casa los fines de semana.

La seguridad también incluye la aceptación de un riesgo. Es decir, que la cantidad de riesgo de sufrir un accidente que es aceptable para una persona no lo es para otro. Esta podría ser una de las razones de porqué la práctica de alpinismo, por ejemplo, es menos popular que la del baloncesto.

Pero incluso las actividades que implican grandes niveles de riesgo potencial pueden ser desempeñadas de manera segura. ¿Cómo se pueden minimizar los riesgos de manera que descendan a niveles aceptables?. Esto se puede llevar a cabo identificando las fuentes de peligro y evaluando los riesgos inherentes a estos peligros. La mayoría de los riesgos con que nos enfrentamos en un laboratorio se conocen ya y las técnicas para evitar una exposición innecesaria a ellos están muy desarrolladas. Por ello, consideramos vital una actuación en doble sentido, por un lado que el empresario se adhiera estrictamente a la legislación vigente en materia y, por otro, que el trabajador se haga responsable del cumplimiento exacto de las normas que se le impongan.

LA SEGURIDAD E HIGIENE DEL TRABAJO. CONCEPTOS BÁSICOS.

El ser humano se halla inmerso en un medio ambiente con el que interactúa continuamente. Parte de ese medio es el que le rodea mientras desarrolla su actividad laboral, de cuya importancia podemos darnos cuenta si consideramos que el hombre permanece alrededor de un cuarto de su vida en el ambiente de trabajo (1). De las consecuencias que presenta la interacción entre **el trabajo**, como origen del riesgo, y la **salud**, como bien preciado por el hombre y que puede verse alterado por el trabajo, es de lo que se ocupa la **Seguridad e Higiene en el Trabajo**. Recientemente existe la tendencia a utilizar la denominación global **Salud Laboral**.

Desde antiguo es conocida la relación entre el trabajo y la salud de los trabajadores, existiendo referencias clásicas de los efectos negativos más evidentes del trabajo sobre la salud, como la sordera de los herreros (por la exposición al ruido), la locura de los sombrereros (por la utilización del mercurio en

el tratamiento del fieltro) o el cáncer en los deshollinadores (por la exposición a derivados hidrocarbónicos) (2).

Por ambiente o condiciones de trabajo no sólo debemos entender los factores de naturaleza física, química o técnica (materias utilizadas o producidas, equipos empleados y métodos de producción aplicados), que pueden existir en el puesto de trabajo, sino que también deberán considerarse incluidos aquellos otros factores de carácter psicológico o social que pueden afectar de forma orgánica, psíquica o social a la salud del trabajador.

A partir de este concepto, **el ambiente de trabajo** se puede considerar subdividido en (3):

- ◆ Ambiente Orgánico.
- ◆ Ambiente psicológico.
- ◆ Ambiente social.

El denominado ambiente orgánico, que es el que nos ocupa, está constituido por aquellos factores ambientales que pueden dañar la salud física y orgánica del trabajador, comprendiendo:

- **Factores mecánicos:** elementos móviles, cortantes, punzantes, etc., de las máquinas, herramientas, manipulación, transporte de cargas...
- **Factores físicos:** condiciones termohigiénicas, ruido, vibraciones, presión atmosférica, radiaciones ionizantes y no ionizantes, iluminación
- **Factores químicos:** productos químicos.
- **Factores biológicos:** virus, bacterias, protozoos...

Del estudio de los factores de riesgo laboral que hemos denominado mecánicos se hace cargo la **Seguridad del Trabajo**, técnica de prevención de los **accidentes de trabajo**. Mientras que es la **Higiene del Trabajo** o Higiene Industrial, la que se ocupa de los factores de riesgo físicos, químicos y biológicos, constituyendo una técnica de prevención de las **enfermedades profesionales**. Por otro lado, a estos factores de riesgo, la Higiene Industrial se suele referir a ellos como **contaminantes**.

Expresado en otras palabras y ampliando un poco más el concepto, podemos establecer que, dado que la salud del trabajador se encuentra amenazada por las condiciones de trabajo que realiza, para su prevención, se puede proceder de dos formas diferentes: actuando sobre la salud (técnicas médicas: Medicina del Trabajo) o actuando sobre el ambiente o condiciones de trabajo (técnicas no médicas: Seguridad del Trabajo, Higiene del Trabajo, Ergonomía, Psicología...).

Es de sobra conocido, que la verdadera labor empresarial en materia de Seguridad e Higiene en el Trabajo pasa por realizar una adecuada acción preventiva. Para ello es necesario poder disponer de una información precisa que nos permita conocer, tras el correspondiente análisis, las deficiencias existentes en la situación inicial o de partida. Entre los diferentes métodos utilizados para diagnosticar esta situación de partida destacan los **mapas de riesgos**.

El mapa de riesgos, o en terminología anglosajona, el **programa de salud laboral**, es el documento que permite identificar los peligros y localizar y valorar los riesgos existentes en un medio laboral cualquiera, así como conocer el grado de exposición al que están sometidos los diferentes grupos de trabajadores afectados por ellos. Una vez realizado este análisis de los riesgos, se procede al diseño y puesta en práctica de la política preventivista. Dentro de los factores a considerar como integrantes del mapa de riesgos están los constituidos por los **contaminantes biológicos**, objeto de esta presentación.

RIESGOS DE LABORATORIO.

Como ya se ha dicho, cualquier actividad de nuestra vida (incluido el trabajo) implica algún tipo de riesgo (el riesgo cero no existe), aunque los riesgos pueden ser muy diferentes dependiendo de la actividad, lo mismo que es diferente el grado de aceptación de los mismos por parte del individuo.

Si hay un ambiente laboral al que tradicionalmente la Salud Laboral ha prestado menos atención, ese es el **laboratorio**, situación que se agrava al considerar que los riesgos existentes en el laboratorio no son, en general suficientemente valorados y tienen características propias (4) (5).

En este sentido, un aspecto importante a considerar es su variedad. En un laboratorio pueden detectarse riesgos de origen y consecuencias muy diferentes que dependerán, evidentemente, de las instalaciones existentes y de las operaciones que en ellos se llevan a cabo. No es extraño encontrar en el ambiente laboral del laboratorio riesgos eléctricos, junto con riesgos químicos, riesgos asociados a la manipulación de diversos equipos y cargas o riesgos de tipo biológico.

Otra característica a tener en cuenta es su intensidad. En un laboratorio pueden tener lugar exposiciones puntuales muy intensas y es corriente trabajar con productos de elevada toxicidad o estar expuestos a riesgos biológicos de consideración por los altos volúmenes que se manejan de agentes infecciosos, en el caso, por ejemplo, de plantas de producción de biológicos. Así mismo, la exposición puede ser continuada durante un largo periodo de tiempo y dar lugar a alteraciones crónicas.

Una tercera particularidad reside en la multiplicidad de riesgos, pues suele existir riesgo químico o biológico derivado de gran cantidad de agentes de índole muy diversa.

No podemos dejar de citar, finalmente, que en determinados tipos de laboratorios se da con frecuencia la presencia de trabajadores en prácticas o que realizan tareas muy específicas de forma eventual (personal visitante, intercambios con otras instituciones), lo que significa que éstos se hallan menos familiarizados con los procedimientos de actuación en accidentes y/o emergencias que el personal habitual

EL RIESGO BIOLÓGICO EN LA LEGISLACIÓN ESPAÑOLA.

Un contaminante es, según definición del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, *unos productos químico, una energía o un ser vivo presente en un medio, en nuestro caso un medio laboral, que en cantidad o concentración suficiente pueden afectar la salud de las personas que entren en contacto con él.* (6).

Pero, ¿a qué se puede llamar ser vivo desde la óptica de la contaminación biológica?. En el R.D. 664/1997 sobre protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo, se establece que por agentes biológicos se entiende: *microorganismos, con inclusión de los genéticamente modificados, cultivos celulares y endoparásitos humanos, susceptibles de originar cualquier tipo de infección, alergia o toxicidad.* (7).

Además, en su artículo 3, clasifica los agentes biológicos en función del riesgo, en cuatro grupos, y, en el anexo II, presenta una lista de agentes biológicos (bacterias, virus, parásitos y hongos) a los que asigna uno de esos grupos de acuerdo al criterio expuesto.

En el Anexo IV establece los niveles de contención 2, 3 y 4 y las indicaciones relativas a las medidas de contención a observar así como hace los mismos en el anexo V pero para el caso de procesos industriales. R.D., éste muy útil, a nuestro parecer, porque facilita enormemente la elaboración del mapa de riesgos de un laboratorio en el que aparezcan los riesgos biológicos (8).

LA SEGURIDAD BIOLÓGICA. (9) (10) (11) (12)

El objetivo de la Seguridad Biológica es hacer que el manejo de agentes biológicos se realice de forma que resulte segura tanto para las personas que entran en contacto más o menos directo con ellos, por motivos de su actividad laboral, como para las personas y/o animales del entorno.

De una forma muy simple, pero gráfica, se podría identificar la Seguridad Biológica, con una única palabra **protección**. Un primer nivel de protección, el del personal y del medio interno del laboratorio, viene proporcionado por unas buenas técnicas microbiológicas junto al empleo de equipo de protección instituido para tal fin. La vacunación, en determinados casos, puede contribuir a reforzar el nivel de protección personal. Un segundo nivel en la seguridad vendría en la protección del medio externo al laboratorio, que resultaría de la combinación del diseño de la instalación y los adecuados métodos de trabajo.

Así, podemos concluir que los tres elementos de que consta la Seguridad Biológica son: técnicas de laboratorio, equipo de seguridad y diseño de la instalación.

Técnicas y prácticas de laboratorio. El elemento más importante de la protección de la persona es el correcto cumplimiento de las prácticas normalizadas de trabajo dentro del propio laboratorio donde se manipulen los agentes biológicos. Los trabajadores que están en contacto con microorganismos o materiales infectados deben ser conscientes de los riesgos potenciales que ello encierra y, además, han de recibir formación adecuada en las prácticas requeridas para el manejo seguro de tales tipos de agentes.

Por otro lado, cada laboratorio debe desarrollar o adoptar un manual de seguridad biológica, que incluya los riesgos que pueden surgir, así como especificar las prácticas o procedimientos designados para minimizar o eliminar estos riesgos.

Equipo de Seguridad (también denominado barreras primarias). En este apartado se incluye tanto el aparataje cuyo objetivo es eliminar la contaminación en el lugar de producción de la misma (ej.: cabinas de flujo laminar) como las prendas de protección personal (gafas, máscaras, ropa, cubre-calzado, guantes...). Con mucha frecuencia se recurre al empleo combinado de ambos tipos de equipos, por ejemplo a la hora de trabajar en cabina de flujo laminar se recomienda emplear siempre guantes y mascarilla.

Diseño de instalación. (o barreras secundarias). Es importante en cuanto que proporciona también una barrera para el resto del personal que trabaja fuera del laboratorio y para aquellas personas o animales del entorno exterior al laboratorio y que pueden verse afectados por el escape accidental de agentes infecciosos. Aquí se incluiría el material de construcción a emplear, disponer los filtros adecuados, mecanismos frontera de desinfección, tratamiento de los diferentes residuos, etc.

Niveles de Seguridad Biológica. Generalmente se describen cuatro niveles, que se estructuran siguiendo una combinación progresiva de los tres elementos de que consta la Seguridad Biológica, todo ello de acuerdo a las manipulaciones de agentes biológicos que, en diferentes tipos de ambientes laborales, se realizan, así como el peligro potencial de estos agentes.

De esta manera, para cada uno de los niveles establecidos se describen una serie de medidas tanto desde el punto de vista de la práctica microbiológica, como de equipo de protección como de características de la instalación.

En general, y lo mismo ocurre en el R.D. 664/97, la mayoría de las instituciones u organismos, tanto de ámbito nacional como internacional, establecen los cuatro niveles exclusivamente en función del riesgo que suponen los agentes biológicos para el hombre, sin considerar su efecto sobre la salud de los animales. Basándonos en experiencias previas, se puede afirmar que criterios de contención similares a los que se siguen en el caso de patógenos humanos, se pueden aplicar a los patógenos animales (13); un ejemplo de nivel 3 lo constituye el Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA).

EL CISA COMO EJEMPLO DE NIVEL 3 DE SEGURIDAD BIOLÓGICA.

Para ampliar e intensificar sus actuaciones en materia de Sanidad Animal, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, creó hace aproximadamente siete años, en el seno del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), el **Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA)**. Situado en la madrileña localidad de Valdeolmos, está ubicado en una finca de 34 Hectáreas y construido con los más modernos sistemas de seguridad, a fin de poder trabajar con agentes infecciosos animales de alto riesgo y/o exóticos. Sus características de diseño y construcción hacen que forme parte de la red de laboratorios de alta seguridad que existen en el mundo (EEUU, Reino Unido, Alemania, Holanda, Australia, Suiza y Canadá) dedicados a la Sanidad Animal (14).

Con una doble función de investigación y diagnóstico de enfermedades infecciosas animales, dispone de casi 13.000 m² construidos, de los que 11.000 se consideran como de nivel 3. También posee laboratorios y acuarios destinados al estudio de los procesos toxicológicos que afectan al medio ambiente.

Los agentes infecciosos que se manipulan son principalmente virus animales de interés económico para España, como son los productores de la fiebre aftosa, peste porcina africana, peste porcina clásica,

enfermedad vesicular porcina, síndrome respiratorio y reproductivo del cerdo, peste equina, enfermedad de Aujeszky, lengua azul, mixomatosis, enfermedad hemorrágica del conejo, rinotraqueitis infecciosa bovina, diarrea vírica bovina, enfermedad de border, así como el agente productor de la encefalopatía espongiiforme bovina.

Es laboratorio de referencia español, europeo y mundial para diversas enfermedades y dispone de programas de formación nacionales e internacionales en muy diversos materias, incluidas en la formación en seguridad biológica, sin olvidar la transferencia tecnológica que de manera continuada se realiza.

La zona de nivel 3 posee unas características arquitectónicas y funcionales que permiten la manipulación de los agentes biológicos en condiciones de máxima seguridad. Para su diseño se siguieron directrices internacionalmente aceptadas, la mayoría de las cuales partieron en origen de normativas del CDC estadounidense, OMS, UE... Estos mismos organismos, junto con otros como FAO, OIE, son los que periódicamente supervisan la marcha de los diferentes centros que hay en el mundo.

Entre las características arquitectónicas destacan una estructura de hormigón armado, ventanas blindadas, sellado independiente de todas las conducciones, revestimiento del interior de toda la zona con resina epoxídica, puertas de cierre neumático, así como un diseño en tres alturas, siguiendo el principio de contención de *box-in-a-box*, a fin de incrementar el nivel de seguridad.

Las características funcionales principales incluyen diferentes gradientes de presión negativa en el interior de la zona, con respecto a la atmosférica, el filtrado de todo el aire que sale al exterior a través de 74 filtros HEPA y el tratamiento individualizado de cada tipo de residuo, ya sea tratamiento térmico de los efluentes líquidos o diversos tratamientos de residuos sólidos (autoclaves de vapor, de óxido de etileno, tratamiento químico...).

A ello se podría añadir, entre otros, el cambio completo de ropa para trabajar, ducha a la salida de la zona, control mediante ordenador de todas las constantes del edificio, equipos que aseguran el suministro eléctrico permanente, vigilancia externa con circuito cerrado de TV. Etc.

Bajo este nivel 3 se cuenta con 32 laboratorios y zonas auxiliares (tratamiento informático de imágenes, preparación de vidrio, lavandería, almacenes, cafetería...). Y un animalario en el que se puede alojar cualquier especie animal (ratones, conejos, cerdos, caballos) con sala de necropsias y laboratorio de histopatología.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Bartual, J., Castejón, E., Gade, E., Guardino, X., Guasch, J., Hernández, A., Luna, P. Y Obiols, J. "Higiene Industrial", Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, Madrid (1994).
- (2) Cortés, J.M. "Técnicas de Prevención de Riesgos Laborales". Tébar Flores Editorial. Madrid (1997).
- (3) Sarazá, M.L. "Los riesgos laborales en un animalario". Animales de experimentación, 2(3): 16-21 (1997).
- (4) Jódar, P. "Condiciones de trabajo". En "Salud Laboral. Conceptos y Técnicas para la prevención de riesgos laborales". Benavides, F., Ruiz, C. Y García A.M. (Eds), Masson S.A., Barcelona (1997).
- (5) Guardino, X. Y Heras, C. "Seguridad y condiciones de trabajo en el laboratorio". Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, Madrid, (1992).
- (6) Martí, M.C., Alonso, R.M., Constans, A y Guardino, X. "Prevención de riesgos biológicos en el laboratorio", Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, Barcelona (1997).
- (7) Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. B.O.E. nº 124, de 24 de mayo de 1997.

- (8) Sarazá, M.L. "La Seguridad Biológica en el Laboratorio como parte integrante del Programa de Salud Laboral". *Industria Farmacéutica*, XV(1):99-104 (2000).
- (9) Sarazá, M.L. "Bio-Containment. An overview of containment level 3 & 4 facilities". En: 2º Annual Conference of the European Biosafety Association, Harlow, Essex, 20 de noviembre de 1998.
- (10) Best, M. (Ed). "Containment standards for veterinary facilities", Agriculture & Agri-Food Canada, Nepean, ON, (1996).
- (11) "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention y National Institutes of Health, Washington, (1999).
- (12) Layburn, S.R. "The foundations of Laboratory Safety", Springer-Verlag, Nueva York, (1990).
- (13) Barbeito, M.S., G. Abraham, M. Best, P. Cairns, W.G. Sterritt, D. Barr, W. Meulepas, J.M. Sánchez-Vizcaíno, M.L. Sarazá, E. Requena, M. Collado, P. Mani, r. Breeze, H. Brunner, C.A. Mebus, R.L. Morgan, S. Rusk, L.M. Siegfried y L.H. Thompson. "Recommended biocontainment features for research and diagnosis facilities where animal pathogens are used", *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz*,14(3):873-887 (1995).
- (14) Murray, P.K. "An overview of the roles and structure of international high-security veterinary laboratories for infectious animal diseases". *Rev.sci.tech.Off.int.Epiz*, 17(2): 426-443 (1998).

Andrés Rueda Jiménez

Jefe del Dptº de Seguridad y Normalización.
Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Córdoba.

CALIDAD Y ACREDITACION

Resumen:

Se inicia el tema de la Calidad y Acreditación de Laboratorios, haciendo más hincapié en los elementos básicos de la calidad y en la trascendencia de la Acreditación de los Laboratorios de Diagnóstico de Enfermedades de Declaración Obligatoria. Más tarde revisamos los elementos básicos de los sistemas de garantía de calidad sobre todo de los Procedimientos Normalizados de Trabajo. Se señalan las dificultades y los beneficios de la implantación de estos sistemas. Finalizamos estudiando las vías para Evaluar la calidad de un Laboratorio, y más detenidamente los gráficos de control entre los procedimientos de evaluación interna y los ejercicios de intercomparación en el ámbito de una evaluación externa.

INTRODUCCION.

Intentar plasmar en pocas páginas un tema sobre calidad y acreditación de laboratorios, teniendo en cuenta la extensa y variada literatura al respecto, resulta hoy día complicado, más problemático se convierte si lo hacemos en el marco de un curso dedicado al diagnóstico laboratorial de enfermedades de declaración obligatoria en el ámbito de la sanidad animal. Por una parte, resulta difícil escapar de las clásicas exposiciones sobre calidad en el laboratorio en las que tan solo repasar los conceptos y las generalidades sobre el tema no permiten espacio para más, por otra parte, se podría cometer el error de dar por conocido estos conceptos básicos y entrar en apartados más concretos sin un fundamento necesario. Por último, en nuestro caso nos encontramos estudiando un tipo de laboratorios muy específicos donde la implantación de estos sistemas de calidad, su control y evaluación así como los criterios y normas de acreditación, aun no están bien definidos.

Hay que tener muy en cuenta que de los resultados analíticos de estos laboratorios se deriva en un primer momento un diagnostico y en base a este diagnostico se van a tomar una serie de decisiones (autorizaciones de desplazamiento, campañas de saneamiento o erradicación) y en el marco del comercio internacional un reconocimiento del estado sanitario animal de una región.

Las premisas anteriores nos llevan en este caso a hacer más hincapié en los conceptos genéricos de la calidad en los laboratorios y en sus sistemas de acreditación. Por otra parte, y teniendo en cuenta el perfil de los destinatarios, vamos a detenernos en ciertos aspectos que en algunos casos por su importancia (protocolos normalizados de trabajo) y en otros por resultar quizás más llamativos o haber tenido en algún momento contacto con ellos, pueden resultar de más interés (gráficos de control en los sistemas de evaluación interna del control de calidad y ejercicios de intercomparación).

CONCEPTO DE CALIDAD EN LOS LABORATORIOS.

El Laboratorio de forma general y particularmente los laboratorios de diagnóstico de enfermedades de declaración obligatoria en sanidad animal son básicamente *fuentes de información*. La información todos sabemos que está considerada en la sociedad actual como el llamado "cuarto poder" (en unión de los otros tres poderes el legislativo, ejecutivo y judicial). En el plano de la economía mundial constituye uno de los pilares básicos junto al capital, el trabajo y las materias primas. Nadie puede dudar pues de la trascendencia de la información y por tanto del alcance de la "calidad" de esa información que en nuestro caso representa la generada por los laboratorios.

Pero ¿qué es Calidad?, Partiendo de la definición de la Real Academia de la Lengua se considera como "propiedad o conjunto de propiedades inherentes a una cosa que permita apreciarla como igual, mejor

o peor que las restantes de su especie". Esta definición en *términos comparativos* nos llevaría a entender que el resultado de un laboratorio es mejor que el de otro (calidad) si se acerca más al valor verdadero (exactitud) y presenta una menor dispersión (precisión).

La Organización Internacional para la Estandarización (I.S.O.), define la calidad como "la totalidad de rasgos y características de un *producto, proceso o servicio* que inciden en su capacidad de satisfacer necesidades reguladas o implícitas". En este caso la calidad se refiere a la satisfacción o no, de requisitos o necesidades sociales o tecnológicas que tiene un producto, un sistema o un servicio (público o privado). En este último apartado podríamos incluir los laboratorios analíticos.

La concepción pues de calidad integral implica pues dos aspectos genéricos una realidad objetivable que se puede cuantificar y una realidad subjetiva relacionada con el valor o la utilidad del producto, sistema o servicio.

Si la anterior concepción de calidad integral la trasladamos a un laboratorio podemos considerar una calidad externa referida a los productos o sistemas que son los objetivos del ente público o privado del cual depende el laboratorio y una calidad interna que engloba la calidad del trabajo que realiza y la calidad de los resultados que genera.

Considerando las concepciones anteriores estamos en condiciones de dar una definición de **Calidad de un Laboratorio** como el "conjunto de características de la información generada que satisfacen las demandas/exigencias del organismo público/privado del que dependen y/o del cliente o usuario".

Las **propiedades analíticas** pueden considerarse divididas en dos grupos, las denominadas básicas: exactitud, precisión, sensibilidad, selectividad y rapidez y las complementarias: coste, automatización, robustez, transferibilidad, seguridad para el personal, incidencia en el medio ambiente, etc.

El resultado analítico final basa su calidad en dos propiedades básicas la exactitud (ya señalada) y la representatividad (grado de concordancia entre la muestra tomada y la definición del problema analítico), quizás sea esta última propiedad la que imprima mayor trascendencia en la elaboración de guías de acreditación para laboratorios de diagnóstico veterinario debido al objetivo final de su función, el diagnóstico.

Vamos a definir ahora los elementos básicos de la calidad de los Laboratorios:

- 1. GARANTIA DE CALIDAD** ("Quality Assurance"), definida como el conjunto general de actividades diseñadas, ejecutadas y contrastadas para proporcionar al ente público o privado, o al cliente/usuario la seguridad de un producto, sistema o servicio (información analítica- exactitud y representatividad-) posee unos requisitos (calidad) perfectamente definidos y con un determinado margen de confianza.
- 2. CONTROL DE CALIDAD** ("Quality Control"), en un laboratorio se concreta en una serie de acciones, planificadas y ejecutadas para proporcionar la información analítica con un nivel delimitado de calidad que satisfaga las exigencias impuestas.
- 3. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD** ("Quality Assesment"), en un laboratorio se concreta en el contraste sistemático y continuado de las actividades implicadas en el Control de Calidad..
- 4. PLAN DE GARANTÍA DE CALIDAD**, es el conjunto pormenorizado de actividades dirigidas a asegurar la calidad de los resultados, establecida según requerimientos. Es imprescindible que esté perfectamente descrito en el denominado MANUAL DE GARANTÍA DE CALIDAD, que debe convertirse en el pilar básico del trabajo en el laboratorio. Es el conjunto de documentos que contiene una descripción de todos los pasos a seguir para implementar la Garantía de Calidad.

CONCEPTO DE ACREDITACION DEL LABORATORIO. TRASCENDENCIA.

Antes de comenzar a interrelacionar estos principios generales de la calidad en los laboratorios con los laboratorios de diagnóstico en EDOs, vamos a introducir el tema hablando de la Acreditación de Laboratorios. Para ello, conviene diferenciar desde un principio cuatro conceptos:

- **CERTIFICACION** proceso por el que un organismo gubernamental o privado garantiza que un producto o servicio cumple con lo especificado por determinadas normativas.
- **HOMOLOGACION**, Aprobación oficial de un producto, proceso o servicio, realizada por un organismo que tiene esta facultad por disposición reglamentaria.
- **REGISTRO**: Proceso por el que un producto o un laboratorio queda inscrito en una lista custodiada por un organismo oficial o privado.
- **ACREDITACION**: proceso por el que un organismo-gubernamental o privado- evalúa el programa de trabajo de un determinado laboratorio y define si cumple o no con unos niveles técnicos previamente establecidos. Se trata del reconocimiento de la competencia para llevar a cabo análisis específicos. El organismo acreditados es una Organización Nacional especializada que debe tener una autorización explícita o implícita por el Gobierno correspondiente y el reconocimiento internacional.

En el comercio internacional la libre circulación de animales y productos de origen animal está marcado por los acuerdos de la Aplicación de las Medidas Sanitarias y Fitosanitarias, la Organización Mundial de Mercado y una serie de resoluciones del Comité Internacional y de las Comisiones Regionales de la Oficina Internacional de Epizootías. Estos condicionantes conllevan que las certificaciones veterinarias demandadas sean de una alta calidad. Uno de los componentes y elemento básico que integra esta certificación veterinaria internacional es la identificación del laboratorio de diagnóstico veterinario, por lo tanto para que los resultados emitidos generen fiabilidad deberían proceder de laboratorios que dispusieran de una Garantía de Calidad.

El primer punto a considerar es ¿qué nivel de calidad analítica requiere el mercado y que criterios de reconocimiento internacional de esa calidad van a ser satisfactorios?.

Comenzamos pues a conectar las nociones generales relacionados el principio con los laboratorios de diagnóstico veterinario. Así la GARANTIA DE CALIDAD en estos centros es necesaria por las siguientes situaciones.

- Calidad de sus datos de los que se derivan diagnósticos, actuaciones, autorizaciones o reconocimientos de trascendencia sanitaria, económica y social.
- En el clima actual del comercio internacional el grado de confianza del que en los conceptos generales hemos denominado "usuario/cliente" es de vital importancia para satisfacer sus exigencias. Así pues un programa sólido de garantía de calidad reconocido internacionalmente avala esta confianza.
- Para evitar que los resultados analíticos generados por los laboratorios de sanidad animal no se conviertan en un obstáculo para el comercio internacional se ha llegado a una serie de acuerdos para el reconocimiento de los mismos y para evitar entre otras cosas la duplicación de las investigaciones. Para este mutuo reconocimiento los laboratorios deben cumplir unas normas de acreditación reconocidas internacionalmente y refrendadas por las Entidades de Acreditación bien vía Guía (ISO/IEC) 58 o su equivalente en la UE (EN 45003).
- Así pues la Garantía de Calidad puesta en marcha por un laboratorio de diagnóstico puede ser un ejemplo de cómo se puede convertir en requerimiento para el libre mercado. Estos estándares de calidad pueden ser impuestos por legislaciones nacionales o, en otros casos, por acuerdos comerciales en base a la protección de la salud humana o animal.

Para aplicar de manera satisfactoria las Medidas Sanitarias y Fitosanitarias en el marco de la Organización Mundial del Comercio, sin que se conviertan en barreras injustificadas al mercado, es necesario adaptarlas bajo estándares internacionales de reconocimiento mutuo en base a un análisis de riesgo. En este sentido las normas publicadas en esta área por la I.S.O., han sido reconocidas como modelos aceptables en el campo de la Sanidad Animal.

* La puesta en marcha de estas normas, en concreto de la Guía ISO/IEC 25 para los laboratorios, bien por obligación legal en ciertos países o de forma voluntarias en otros casos a demanda del mercado, se

revela como una herramienta válida. No obstante la O.I.E., es consciente de que llegar a ese grado tan elevado de acreditación puede ser difícil. Por ello, ha elaborado unas directrices para contribuir a facilitar la supresión de obstáculos al comercio mediante una aceptación recíproca de las pruebas entre los países.

De lo que detallado hasta el momento se deduce la existencia de una variedad en las normas o estándares que regulan los sistemas de calidad en los laboratorios. En estos momentos esta apunto de llegarse a un acuerdo entre los organismos de normalización para conseguir una armonización y unificación de las distintas normas (EN-ISO 17025). Prácticamente hay una equivalencia entre los criterios de calidad para laboratorios de ensayo de la Guía ISO/IEC 25 y la EN 45001, a su vez equivalente a la UNE 66501 y por último, la Guía ISO/IEC 39 sobre Organismos de Acreditación y la EN 45004. Si bien podríamos entrar a discutir pequeñas diferencias entre ellas prácticamente su equivalencia es total.

SISTEMAS DE GARANTÍA DE CALIDAD.

Tal y como comentamos al principio del tema, es imposible abordar todos los puntos relacionados con la calidad y acreditación de laboratorios aún presentando un verdadero interés. Al hablar de calidad y acreditación de laboratorios nos estamos refiriendo a: el desarrollo de una acreditación, las auditorías, la documentación y archivo, la trazabilidad, la incertidumbre en las medidas, los tratamientos estadísticos básicos de las medidas, la toma de muestras, los materiales de referencia, los programas de calibración, la gestión y organización del laboratorio, el papel de la informática y el estado de la legislación.

Nos vamos pues a limitar a estudiar una serie de aspectos muy concretos que por su importancia o por resultar en cierto modo atractivos pueden llamar nuestra atención. Antes de comenzar vamos a distinguir rápidamente los dos sistemas de garantías de calidad el basado en la EN 45001 del que ya hemos comentado su equivalencia y el de las Buenas Prácticas de Laboratorio (en un principio de la OCDE, ahora U.E.), que si difieren en este caso de las B.P.L de la F.D.A. o E.P.A.

Desde hace unos veinte años se ha venido sucediendo una serie de reglamentaciones encaminadas a establecer unos sistemas de garantía de calidad en los laboratorios de modo que no sea suficiente afirmar de un modo subjetivo que los procedimientos analíticos son de una calidad adecuada, sino que es necesario poder demostrarlo objetivamente.

Existen dos sistemas de garantía de calidad que se ocupan de establecer el diseño formal y el modo de trabajo realizados en los laboratorios analíticos, uno de ellos es el basado en las **B.P.L.**, establecido por la O.C.D.E., con el objetivo de garantizar los datos analíticos, (químicos, físicos y biológicos) generados en los estudios de valoración de riesgo de nuevas moléculas. Su ámbito de aplicación abarca productos cosméticos, productos químicos industriales, productos farmacéuticos destinados tanto al hombre como a los animales, aditivos alimentarios, aditivos para piensos y plaguicidas, con objeto de determinar sus efectos sobre las personas, los animales y el medio ambiente.

El otro sistema basado en las recomendaciones generales incluidas en la **serie 45000 de Normas Europeas** cuya finalidad es garantizar la validez, fiabilidad e integridad de los ensayos y permitir una reconocimiento multilateral de los resultados. Su ámbito de aplicación es un amplio abanico de laboratorios de control desde el sector medio ambiental hasta de diferentes sectores industriales. Esta serie de normas, especifica no sólo los criterios de competencia técnica sino los criterios generales de acreditación.

Los elementos básicos de las B.P.L., están basados:

- En una organización del personal del laboratorio.
- Un Programa de Garantía de Calidad que asegura que los estudios se realizan bajo las normas de las B.P.L., (manual). Parte importante de este programa es la U.G.C. (Unidad de Garantía de Calidad)
- Disponer de unos locales e instalaciones adecuadas.
- Disponer de un equipo adecuado.

- Una base documental, reflejada en los P.N.T. (Protocolos Normalizados de trabajo).
- La emisión de resultados y el almacenamiento de material y de resultados.

Los elementos básicos de la norma europea 45001 son:

1. Identidad legal.
2. Imparcialidad, independencia e integridad.
3. Competencia técnica
 - Gestión y organización
 - Personal
 - Locales y equipos.
 - Procedimientos de trabajo
4. Cooperación con clientes, organismos de acreditación y con otros laboratorios y organismos de normalización.
5. Obligaciones resultantes de la acreditación.

PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO.

Punto común y elemento básico de ambos sistemas son los **Procedimientos Normalizados de Trabajo (P.N.T.)**. Los procedimientos normalizados de trabajo, son sin duda uno de los fundamentos de los sistemas de calidad en los laboratorios y como tal queda reflejado tanto en la norma UNE 66501 (EN 45001), como en los principios de la B.P.L., de la OCDE.

La OCDE los define como "Procedimientos escritos que describen de forma pormenorizada, cómo realizar determinados métodos analíticos, como deben manejarse y calibrarse los instrumentos, realizarse ciertos ensayos rutinarios de laboratorio o actividades cuyo seguimiento es de obligado cumplimiento".

La definición anterior deja claro que los P.N.T., son un conjunto de instrucciones perfectamente detalladas que deben seguirse al pie de la letra para realizar la labor especificada. La Unidad de Garantía de Calidad es la encargada de comprobar que los PNT son diseñados según el formato establecido y es también la encargada de su cumplimiento.

La elaboración de los PNT aportan **beneficios** como:

- Métodos no personalizados
- Mayor uniformidad en las técnicas.
- Mayor repetibilidad de los resultados.
- Mejor rendimiento de aparatos y equipos.
- Disminución de errores.
- Responsabilidades bien definidas.
- Resolución de dudas con mayor rapidez.

No obstante estos beneficios en la **elaboración de los PNT conlleva:**

- Tiempo para redactarlos.
- Se incrementa el trabajo administrativo.
- En algunos casos hay que cambiar hábitos de trabajo.
- Se deben actualizar con la frecuencia requerida.

En cuanto a los aspectos de la **estructura de los PNT**, se puedan hacer las siguientes recomendaciones:

- Los PNT deben estar numerados y codificados.
- Todos los PNT deben seguir un modelo determinado con una primera hoja en la que figuren los siguientes datos: nombre del laboratorio, título, código del PNT y número de versión, nombre y firma de la persona que los redacta de la que los aprueba y de la que los autoriza.
- Su contenido deberá tener una estructura bien definida.
- Estar realizados en un lenguaje claro y de fácil comprensión.

Los **PNT de métodos analíticos** tendrán los siguientes apartados:

- A.- Título.
- B.- Campo de aplicación.
- C.- Fundamento.
- D.- Requerimientos.
- E.- Método de Análisis:
 - Preparación de reactivos.
 - Preparación de muestras de ensayo.
 - Modo operativo.
- F.- Cálculos.
- G.- Interpretación de resultados.
- H.- Observaciones al Método.
- I.- Validación del Método.
- J.- Otros PNT relacionados.
- K.- Control de Calidad.
- L.- Bibliografía, Referencias y Legislación.
- M.-Anexos.

No es fácil el desarrollo de los sistemas de calidad de los laboratorios analíticos, ni mantenerlos durante un amplio periodo de tiempo. Varios de los problemas genéricos que se plantean se van a comentar a continuación.

En primer lugar hay que considerar la necesidad de realizar estas tareas por convencimiento, con ilusión y no simplemente por obligación. La **mentalización** adecuada de los responsables directos del laboratorio, del personal directivo del mismo y de los gerentes/directores del organismo del que depende es el punto de partida y un apoyo clave de los sistemas de calidad.

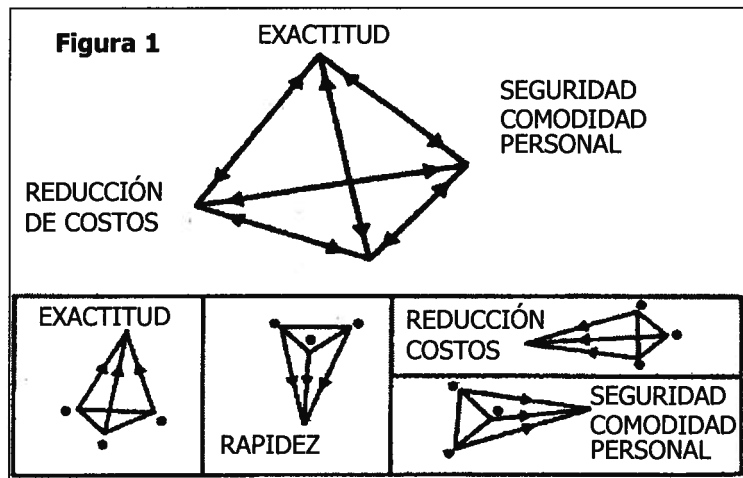
Consecuencia de ello es la **actitud** del personal. La calidad se exige desde el usuario hasta el personal del laboratorio paso a paso. La actitud de cada tipo de personal es importantísima para lograr los objetivos de calidad. El factor humano es decisivo puesto que se le va a exigir un esfuerzo muy intenso y de forma constante.

La implantación de los sistemas de calidad y su mantenimiento suponen una importante **partida presupuestaria**. Se han hecho muchos cálculos al respecto y, en general, se puede afirmar que suponen un incremento del 25-30% de los gastos ordinarios de funcionamiento. Esta cifra relativa no tiene en cuenta el gasto inicial de implantación, que es elevado ni la disminución en el número de muestras procesadas estimado entre un 20 a un 30%.

Otro problema importante que se debe resolver es la **compatibilización** entre tareas ordinarias de análisis y las tareas implicadas en la Garantía de Calidad. La eficacia y rapidez de los servicios rutinarios del laboratorio deben mantenerse y los sistemas de calidad nunca deben constituir un obstáculo que las dificulte.

Otro grupo de problemas puede nacer en la divergencia entre las exigencias a que puede ser sometido el laboratorio. La calidad (exactitud, representatividad) y la rapidez exigida en los resultados, mientras que al trabajo o funcionamiento se le pueden exigir aspectos tales como: bajo coste, seguridad y comodidad para el personal. Estas divergencias implican que una presión excesiva sobre alguna de estas exigencias repercute de forma negativa en el resto, gráficamente puede representarse como un tetraedro en cuyos vértices se disponen las exigencias..

La **constancia** en la implantación y seguimiento de los sistemas de Calidad (día a día, mes a mes, año a año), es un aspecto de extraordinaria importancia. Al ser tareas lentas y tediosas es lógica la tendencia a la dejadez y abandono simplemente a realizarlas cuando se va a ser sometido a evacuación. Sin esta propiedad, los sistemas de calidad carecen de sentido. La documentación/archivo puede ser un indicador adecuado para comprobar el mantenimiento constante de los sistemas de calidad en un laboratorio analítico.



BENEFICIOS DE LA IMPLANTACION DE LA CALIDAD.

Pese a los problemas mencionados, los Sistemas de Calidad son muy útiles y productivos. Prueba de ello es su implantación y consolidación en países más desarrollados desde hace muchos años.

El beneficio directo más importante de la Garantía de calidad es que proporciona un **aval fundamentado sobre la credibilidad de la información generada por el laboratorio**, lo que es de especial trascendencia genérica. Existen una serie de ventajas indirectas más específicas que también son importantes, tales como:

- Promocionar la buena imagen (externa e interna) del laboratorio.
- Propiciar la confianza usuario/cliente.
- Ayudar a la clarificación de objetivos,
- Facilitar la racionalización del trabajo
- Eliminar repeticiones innecesarias.
- Minimizar la indecisión.
- Facilitar la toma de decisiones.
- Propiciar el entrenamiento del personal.
- Generar nuevos puestos de trabajo.

ERRORES ALEATORIOS Y SISTEMATICOS. PRECISION Y EXACTITUD. REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD.

Antes de seguir con el estudio de los sistemas para la Evaluación de la Calidad en los laboratorios vamos a definir una serie de términos que nos van a ser necesarios posteriormente.

Dado que todos los resultados obtenidos en los laboratorios analíticos llevan siempre asociado un cierto error, es necesario definir una serie de términos y conceptos que permitan su cálculo y el establecimiento de su importancia.

El término error describe la diferencia entre el valor verdadero o esperado y el medio para un cierto parámetro. Se pueden distinguir dos tipos de errores: errores aleatorios ("random errors") y errores sistemáticos ("systematic errors").

Los errores aleatorios no pueden predecirse y varían de signo y magnitud. Se evidencian cuando al realizar una serie de análisis repetitivos de una misma muestra se obtienen resultados que oscilan alrededor de un valor central. A medida que aumenta el número de repeticiones, el efecto de los errores aleatorios sobre medidas que estima el valor central, tiende a disminuir, dado que se compensan unos a otros.

La presencia de errores aleatorios afecta a la **precisión** de los resultados, es decir, al *grado de concordancia de los distintos valores obtenidos al realizar una serie de medidas repetitivas e independientes unas de otras bajo unas condiciones específicas*.

Fuentes de errores aleatorios.

- ✓ Envejecimiento de reactivos.
- ✓ Respuesta de los instrumentos en función del tiempo que llevan conectados o de la temperatura ambiental.
- ✓ Fluctuaciones de la red eléctrica.
- ✓ Diferencia entre pipetas, buretas, etc.
- ✓ Apreciaciones diarias, de tipo personal, de puntos de viraje, etc.
- ✓ Baños con ligeras variaciones de temperatura.
- ✓ Diferencias debidas a la marca del reactivo.

Los errores sistemáticos dan lugar a una desviación, siempre en el mismo sentido, de los resultados obtenidos respecto al valor verdadero. Afectan a la exactitud de los resultados, es decir, al *grado de concordancia entre el obtenido experimentalmente y el valor verdadero*.

Entre las fuentes de errores sistemáticos podemos señalar:

- Poca recuperación en las extracciones.
- Error en la calibración: patrón de poca pureza.
- Error inherente a los blancos de muestra.
- Mala calibración del instrumento.

Pueden ser constantes o proporcionales, en el primer caso son independientes de la concentración del analito, mientras que en el segundo caso existe una dependencia con respecto a la concentración del analito presente.

Dos términos importantes se han propuesto en este sentido: La repetitibilidad ("repeatability"), y la reproducibilidad ("reproducibility"). La Organización Internacional de Estandarización, ISO, en su definición de **repetibilidad**, establece que es la "Diferencia entre los resultados de ensayos mutuamente independientes, mediante el mismo método aplicado a la muestra a analizar en el mismo laboratorio con el mismo equipamiento, el mismo operador en un intervalo corto de tiempo". Cuantitativamente se puede

definir como la diferencia máxima entre dos resultados cualesquiera expresados en valor absoluto obtenidos en unas condiciones especificadas para un determinado nivel de significación ($P=0,05$). Por ejemplo si la repetibilidad de un método determinado es de 0.1, quiere decir que, con un nivel de significación del 0.05 (probabilidad del 99.95%), dos determinaciones sucesivas realizadas por el mismo operador sobre la misma muestra en las mismas condiciones y en el mismo laboratorio darán dos resultados que diferirán como máximo 0.1. La repetibilidad se acepta como una medida de varianza interna y refleja la precisión máxima que se puede obtener con un cierto método.

Las condiciones establecidas para la **reproducibilidad** indican que "se obtengan resultados de ensayos independientes mediante el mismo método aplicado a la muestra a analizar en diferentes condiciones tales como diferentes laboratorios, diferente equipamiento o distintos operadores". La reproducibilidad de un método es una indicación de cuál será la diferencia que podemos encontrar cuando comparamos resultados obtenidos por distintos laboratorios e incluye la precisión intralaboratorio. El valor de la reproducibilidad será mayor que el de la repetibilidad.

EVALUACION DE LA CALIDAD DE UN LABORATORIO.

La calidad de un laboratorio analítico se fundamenta en tres pilares:

- 1.- Diseño y planificación de sus actividades.
- 2.- Control del diseño y planificación.
- 3.- Evaluación de que el diseño, planificación y control han sido correctos.

Existen dos vías para evaluar un laboratorio, una evaluación externa y otra interna, entre los procedimientos de una **evaluación interna** destacamos:

- a). Medidas repetitivas de una misma muestra.
- b). Uso de patrones internos, muestras enriquecidas o muestras control ("ciegas" o "doble ciegas").
- c). **Cartas de control** en donde de manera gráfica se representa la variación con el tiempo del valor que se obtiene al medir repetidamente un mismo parámetro.
- d). Intercambio de operadores y equipos.
- e). Auditorías internas (Unidad de Garantía de Calidad).
- f). Aplicar metodología analíticas diferentes caracterizadas por una calidad contrastada.

En el caso de la **evaluación externa** podemos incluir:

- a). Ejercicios de intercomparación.
- b). El intercambio de muestras entre laboratorios.
- c). El uso de materiales de referencia.
- d). Auditorías externas.

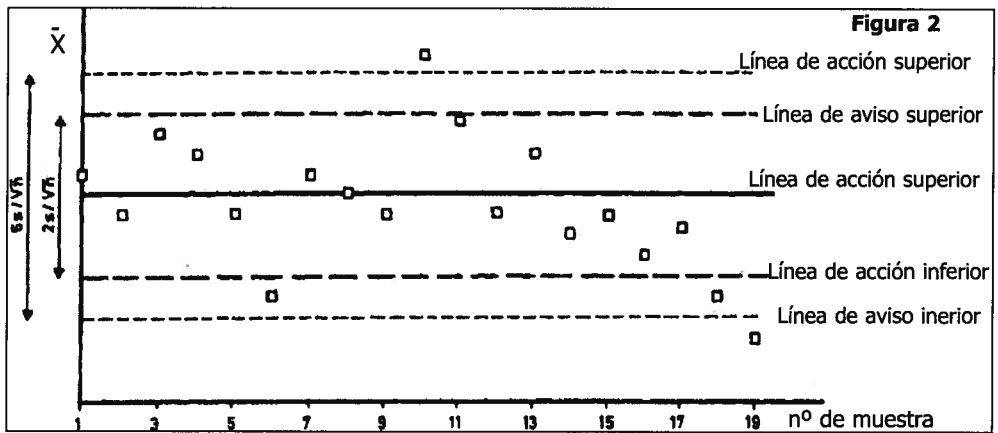
GRAFICOS O CARTAS DE CONTROL PARA LA EVALUACIÓN INTERNA DEL CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO.

Para la evaluación del control de calidad en los caracteres de exactitud y precisión una estrategia ya clásica que consiste en la utilización de cartas gráficas que emplean intervalos de confianza y que permiten detectar aquellos resultados que no son aceptables. Estas estrategias de control tienen un carácter correctivo, pero no debemos olvidar otras de carácter preventivo.

Vamos a estudiar algunos de los gráficos de carácter correctivo más importantes:

Gráficos de Shewhart

En estos se representa la variable de interés (p ej.: concentración – como medida única o media-, desviación estándar), en función del número de muestras o del tiempo. Estos gráficos poseen una línea central que define la mejor estimación del valor central de la variable elegida. Alrededor de ella se localizan los límites entre los que pueden oscilar. Normalmente estos límites están situados a una distancia de $\pm 2\sigma$, es decir, dos veces la desviación estándar respecto al valor central (una sola medida). Las zonas entre estas líneas son las llamadas líneas de aviso y suponen un 95% de los resultados si nos encontramos en un proceso de distribución Gaussiana. El otro límite, denominado límite de acción $\pm 3\sigma$ incorpora aproximadamente un 99.8% de los resultados. Si representamos medias los límites se fijan en $\pm 2\sigma/\sqrt{n}$ y $\pm 3\sigma/\sqrt{n}$. Estos gráficos tienen como propiedad más interesante que responden de forma rápida a la introducción de un error de cierto tamaño. Pero su respuesta a cambios más graduales debidos a errores pequeños es más lenta para ello son más útiles los gráficos Cusum.



Gráficos Cusum

En estos gráficos se representa la suma acumulativa c , de diferencias entre los valores observados x y el valor medio determinado previamente. Es decir:

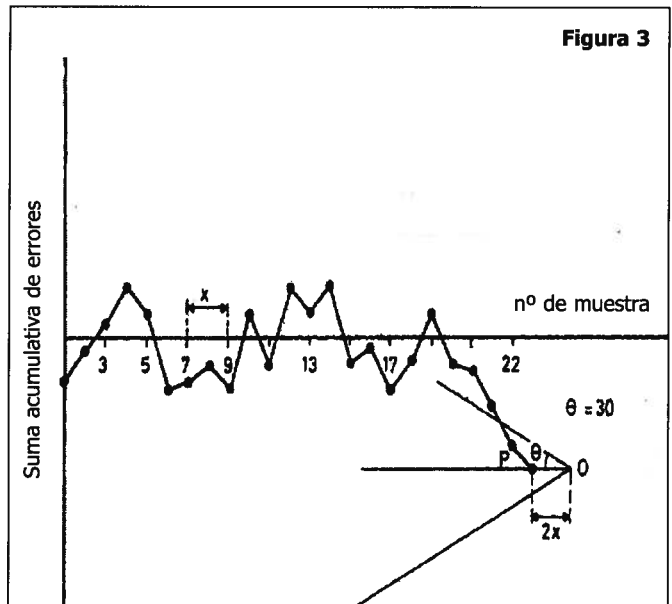
$$C_1 = X_1 - \bar{X}$$

$$C_2 = C_1 + (X_2 - \bar{X})$$

$$C_3 = C_2 + (X_3 - \bar{X})$$

$$C_n = C_{n-1} + (X_n - \bar{X})$$

Los valores C_i deben oscilar, en presencia de errores únicamente aleatorios alrededor del cero. Si existe algún error sistemático se suma a cada valor de C_n por lo que éste se aleja sucesivamente del valor central. La posición del cambio de pendiente indica el momento del cambio en la calidad de los resultados generados. Los límites se establecen mediante una plantilla en forma de V o parábola, de tal forma que la bisectriz del ángulo sea paralela al eje horizontal del gráfico. Las unidades de este eje se separan una distancia σ/\sqrt{n} . Esta distancia d , sirve para situar el vértice de la plantilla: se sitúa a una distancia de $2d$ del punto más reciente del gráfico de Cusum. Si los límites de la plantilla cortan en algún



punto al gráfico de Cusum, es a partir de este último punto donde se considera significativa la tendencia del error detectado. Normalmente se emplean plantillas con un ángulo de 30°.

Gráficos de Levey-Jennings:

Similares a los gráficos de Shewhart, tan sólo reflejan en sus ejes de ordenadas seis líneas alrededor del valor central ± 1 , ± 2 y ± 3 la desviación estándar.

Por otra parte la toma de decisiones en base a los resultados obtenidos de estas muestras control se han concretado en diversos procedimientos como los diagramas de flujo basados en las reglas de Westgard.

EJERCICIOS DE INTERCOMPARACIÓN.

Un ejercicio de intercomparación se basa en la aceptación por parte de varios laboratorios de llevar a cabo un mismo trabajo analítico bajo la coordinación de una organización, con objeto de evaluar la calidad de su trabajo, de evaluar un método, o bien de determinar el contenido de un elemento o de un compuesto en un material. Estos ejercicios son uno de los mejores medios de que dispone un laboratorio para evaluar la calidad de su trabajo y de sus resultados, a la vez que supone una evaluación externa de dicha calidad.

Existen tres tipos de ejercicios de intercomparación en función de su objetivo:

- Ejercicios de intercalibración.
- Ejercicios colaborativos.
- Ejercicios de certificación.

Los **ejercicios de intercalibración (aptitud o pericia – “Proficiency Test”-)** tiene como objetivo evaluar el buen funcionamiento de los laboratorios para una:

- Visión general de los errores analíticos que existen en un grupo de laboratorios.
- Medir la calidad de un laboratorio individual.
- Que un grupo de laboratorios consiga una exactitud analítica aceptable.
- Estimular el interés en la calidad de los datos.

Los ejercicios de intercalibración son en general los primeros con los que entra en contacto un laboratorio cuando desea evaluar su funcionamiento. Para que la información sea válida el laboratorio debe trabajar en las condiciones de rutina ya que de este modo conocerá cuál es el nivel de calidad de su trabajo diario. En este tipo de ejercicios no se fija un método analítico determinado.

La característica de estos ejercicios es que los laboratorios que participan en ellos lo hacen de forma continuada para evaluar en el tiempo su evolución. Cuando este ejercicio se hace de una forma puntual se denomina estudio cooperativo, también conocido como **“ring-test o round-robin”**.

En los **estudios colaborativos** regulados por la norma ISO 5725 se pretende evaluar un método o comparar métodos entre sí. Sus objetivos son evaluar los parámetros de calidad de un método, precisión, exactitud, sensibilidad, límite de detección, etc. Están dirigidos a los laboratorios con experiencia elegidos por la organización. Otro posible objetivo de estos ejercicios es la mejora de un método ya estandarizado.

En los **estudios de certificación** se pretende obtener los valores que serán fijados en la certificación de un material de referencia. Es obligatorio que la medida se lleve a cabo utilizando diversos procedimientos, métodos y técnicas.

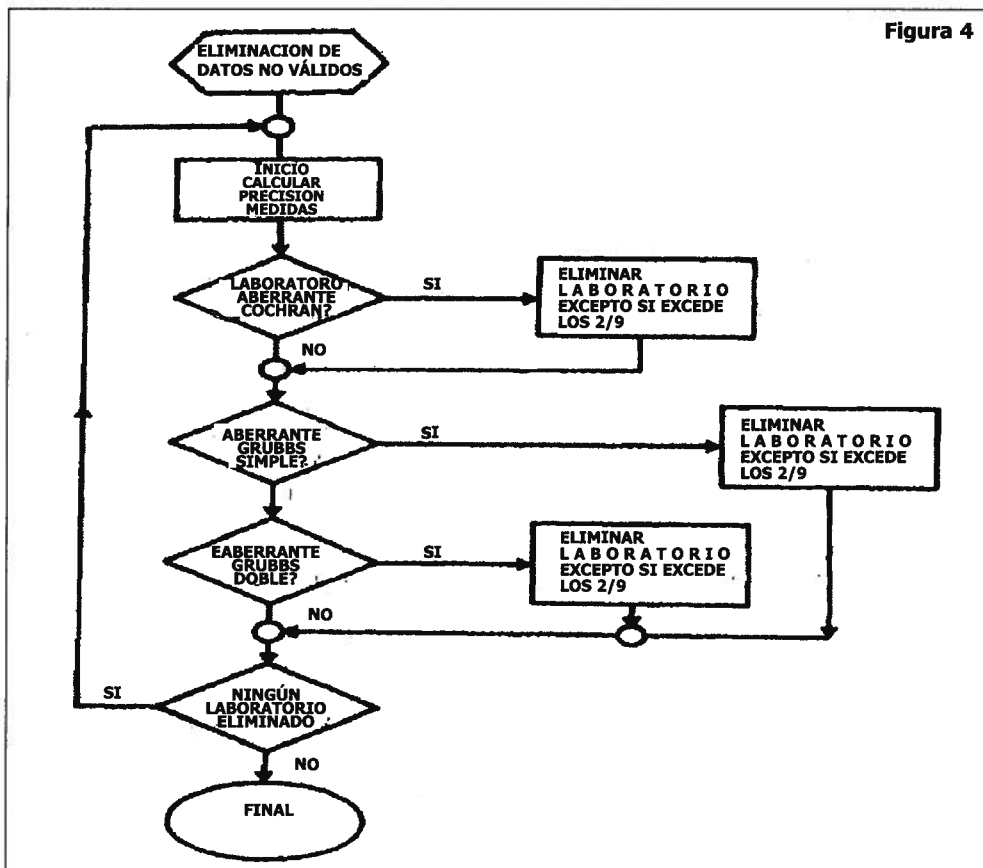
Vamos a prescindir en este apartado del diseño y realización de los ejercicios de intercomparación y a centrarnos más en el tratamiento de los datos de un ejercicio de intercalibración. El primer paso es

descartar los llamados resultados discrepantes ("outliers"), definidos como aquellos que no pertenecen a una población o que existe una probabilidad inferior de que pertenezcan a ella. Sus causas pueden ser:

- Cálculos incorrectos errores aritméticos.
- Errores de redacción en el informe.
- Uso de patrones incorrectos por pesados o medidas volumétricas, etc.

Se considera que es excesiva la eliminación de las de 2/9 de los resultados. Los criterios de significación que normalmente se aplican para decidir la eliminación de resultados aberrantes son el **test de Cochran** y los **tests de Grubbs simple y doble**, siguiendo un diagrama de flujo (figura 4). El test de Cochran sirve para eliminar laboratorios cuya varianza intralaboratorio es significativamente mayor que los varianzas de los demás. Para su aplicación se calcula la varianza de todos los laboratorios y se divide el valor de las varianzas encontrado por la suma de todas las varianzas, el valor del cociente es el estadístico de Cochran, si este valor supera al tabulado indica su carácter discrepante.

El estadístico de Grubbs simple se calcula obteniendo el valor medio de los resultados obtenidos por todos los laboratorios participantes y se calcula la desviación estándar de esos valores medios. A continuación se calcula la desviación estándar del conjunto de valores medios una vez eliminado el valor medio más elevado (S_H) y la desviación estándar del conjunto de valores medios eliminando el menor valor (S_L). Finalmente se calcula la disminución de la desviación estándar aplicando las siguientes expresiones



$(1 - S_L/S)/100$ y $(1 - S_H/S)100$. El mayor de estos porcentajes es el estadístico de Grubbs simple, Si su valor excede el tabulado para el nivel de significación elegido, el laboratorio se considera discrepante. El **test de Grubbs** doble se aplica calculando S_L (eliminando los dos valores medios más bajos) y S_H (eliminando los dos valores más altos) y S_{H1} (eliminando los valores medios más altos y más bajos). Se toma el menor valor de los tres y se calcula el porcentaje de disminución de la desviación estándar al

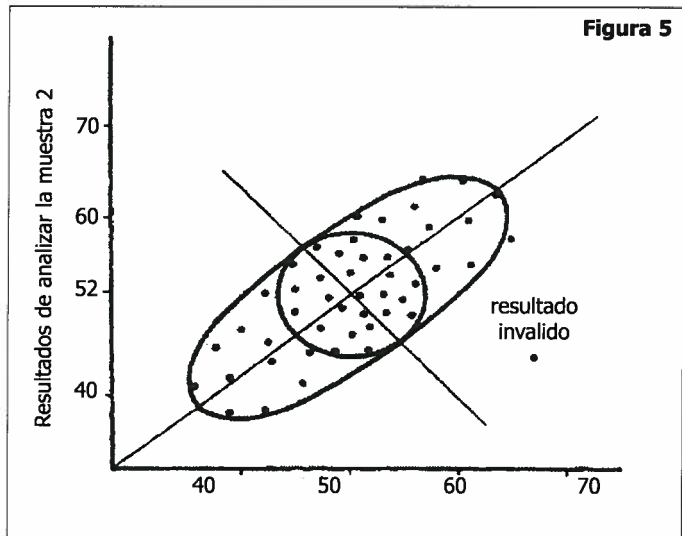
igual que en el test simple, refiriéndolo al valor inicial de s sin eliminar ningún laboratorio. Si el valor obtenido excede al tabulado para el nivel de significación elegido el laboratorio se considera discrepante.

Otro test empleados son la **Q de Dixon**, en este caso se colocan los valores experimentales obtenidos en orden de magnitud y se calcula dividiendo la diferencia entre el valor sospechoso X_q y su vecino X_{q-1} por la diferencia entre el primer valor y el último de la serie X_n . Si el valor absoluto de Q calculado es mayor que el valor de Q tabulado el resultado de ese laboratorio se considera discrepante.

Una primera revisión inicial de los datos para descartar los valores inválidos es representarlos en el llamado **gráfico de Youden** (figura 5), para ello se deben de suministrar a cada participante del estudio dos muestras cuya concentración sea igual o sólo difiera ligeramente y representar el valor obtenido para cada una en cada uno de los ejes de las coordenadas.

La exactitud de un test de aptitud sólo puede conocerse cuando:

- A la muestra se le ha añadido una cantidad conocida de la sustancia a investigar.
- Se trata de un material de referencia certificado.
- Se trata de una muestra analizada por un método considerado definitivo.



En el resto de los casos se considera que el valor medio hallado por el conjunto de laboratorios en el propio ejercicio se puede utilizar como referencia.

La precisión se estima calculando la desviación estándar relativa, puesto que esta es independiente de la concentración de la sustancia. Si se trata de un ejercicio colaborativo para estudiar un método de análisis, el aumento de la desviación estándar relativa al disminuir la concentración del elemento a determinar evidencia que se está llegando al límite de utilidad de un método analítico:

$$\text{(Ecuación de Horwitz: } CV(\%) = 2^{(1-0,5 \log C)})$$

El tratamiento estadístico aplicado por el organizador del ejercicio de intercalibración a los resultados es muy sencillo. Consiste en asignar a cada laboratorio una "puntuación" por:

- Parámetros individuales.
- Grupos de parámetros.
- O rondas de ejercicios de aptitud.

La "puntuación" denominada **z-score** es el parámetro individual obtenido en una ronda concreta de participación de cada laboratorio. El valor de z se obtiene restando al valor de medio de n réplicas del parámetro analizado el valor medio del parámetro asignado del material a analizar y dividiendo entre la desviación estándar de este último valor. Si el valor calculado se ajusta al del material, el valor de z debe ser una función normal de media igual a cero y varianza igual a uno. Se considera que los valores de z entre ± 2 son aceptables, superiores a $+2$ o inferiores a -2 son cuestionables, y si están fuera de ± 3 están fuera de control.

Se pueden aplicar diferentes combinaciones de varias puntuaciones z cuando se investigan más de un parámetro en la misma ronda o cuando se considera la participación de un laboratorio en la determinación de un parámetro individual a lo largo de diferentes rondas.

Fuensanta Gosalvez Luján.

Jefa del Dpt^o de Coordinación, Ensayos y Técnicas.
Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Córdoba.

USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION EN EL LABORATORIO.

Resumen

La presente conferencia tiene como objeto dar una idea actual sobre como se encuentra la experimentación animal, hablando algo del pasado y del futuro. Se menciona la legislación vigente, surgida en base a las exigencias de la sociedad que en un momento dado solicitaba la protección y defensa de los animales y en concreto la protección y defensa de los animales de laboratorio. De forma breve se mencionan las condiciones de alojamiento, manejo y cuidado que se deben cumplir al trabajar con animales de experimentación.

Desde que el hombre existe se ha realizado experimentación animal. Aristóteles, Hipócrates y sobre todo Galeno, realizan muchas alusiones en sus tratamientos médicos a experiencias de disección y vivisección.

Sin embargo, durante el amplio periodo de la Edad Media no existe documentación sobre experimentación con animales, en base al criterio de que el hombre se considera como un ser único, carente de similitud con los animales. Esta idea, aparentemente descabellada, cobra fuerza en la actualidad, aunque con objetivos diferentes, en el sector antiviviseccionismo, que considera que la disección y/o vivisección no son vías para el conocimiento del hombre. PRINCIPIOS ÉTICOS DE LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.

La concepción anteriormente indicada implicó la práctica directa con el ser humano como modelo experimental: en Persia y otras culturas se utilizan los condenados a muerte. CELSE aprueba abiertamente la vivisección en criminales haciendo el siguiente comentario: "No es cruel imaginar los suplicios de los condenados a muerte, en las pruebas realizadas con ellos, que indirectamente han curado a muchos inocentes durante el curso de los siglos". Esta práctica se ha mantenido como se sabe durante años con su máximo exponente en la Alemania Nazi.

Es a partir del siglo XVII, con HARVEY, REDI, entre otros, cuando empieza a tener importancia la experimentación-observación de animales hasta llegar al estudio de las enfermedades diferenciándolas con arreglo a criterios que permitan su individualización, tanto en la patología animal como humana.

Con CLAUDE BERNARD, se enfrentan la Medicina tradicional pasiva y expectante, frente a la Medicina experimental activa, fundada sobre la realización de experiencias según 3 principios:

1. Constatar un hecho
2. Emitir una hipótesis.
3. Imaginar una experiencia para verificar o no la hipótesis.

En el siglo XIX surgió un importante movimiento en contra de la experimentación animal, donde fisiólogos como C. Berbard fueron blanco de críticas. La primera organización antiviviseccionista creada en Inglaterra (la sociedad de la Calle Victoria), fue creada en Inglaterra en 1875. También fue en Inglaterra donde se aprobó la primera ley sobre la protección de los animales experimentales: La Ley sobre la Crueldad con los Animales. El Reino Unido fue el primero y durante muchos años el único país que contaba con una legislación para proteger a los animales con fines científicos.

Durante el s. XIX, la investigación experimental alcanza un alto desarrollo, PASTEUR (inmunización con ÁNTRAX e inoculación de la rabia); KOCH (teoría del germen).

Actualmente la utilización de animales como reactivos biológicos, en el contexto de la investigación científica, incluyendo dentro de ella la investigación veterinaria, vendría dado por los beneficios derivados de su uso y por la importancia cuantitativa (número de animales utilizados). La producción y estandarización de los animales de laboratorio, se encuentra en pleno desarrollo y perfeccionamiento, ante las

investigaciones cada vez más sofisticadas en los campos de la inmunología, histoquímica, control del medio ambiente, prueba de medicamentos, terapia de enfermedades básicas: cardiovasculares, de SNC, geriatría, etc. La aparición de animales transgénicos que son el último avance en cuanto modelos animales ya que por medio de la ingeniería genética y la ingeniería embrionaria se han logrado formar animales que manifiesten una gran gama de afecciones humanas.

Actualmente existen investigaciones tan importantes como el estudio realizado por la doctora Almudena Ramón-Cueto con 21 raras parapléjicas, sin movimiento en las patas traseras. A nueve de ellas se les trasplanta glía envolvente olfatoria y después fueron sometidas a un test de nueva creación que permite distinguir el movimiento voluntario de los animales del reflejo. Los roedores debían ser capaces de subir por una rejilla, cuya rampa tenía cuatro niveles de dificultad y si lo hacían, tenían un premio: crema de chocolate. Seis meses después del trasplante, se comenzó a realizar la evaluación de los resultados. Los nueve animales habían recuperado la sensibilidad y habían podido trepar por la rejilla con una inclinación de 45 grados. Siete de ellos consiguieron hacerlo con una rampa de 60 grados, seis con una de 75 y dos con la situada en posición vertical. Las ratas que no recibieron ningún trasplante no superaron ninguna prueba. Una vez concluidos los ejercicios, el equipo científico examinó el tejido de la médula espinal en la zona donde antes había una lesión. Incluso sin microscopio podía verse la reparación del tejido dañado: los axones lesionados se habían regenerado hasta tres centímetros. La clave de este experimento radica en los axones, que son las terminaciones nerviosas que transmiten la información al cerebro a través de la médula espinal y a la inversa. Cuando se produce una lesión en la médula, se pierden permanentemente las funciones motora y sensitiva porque estos axones no se regeneran. Pero hay una parte del organismo, el bulbo olfatorio, donde los axones si se regeneran gracias a las células denominadas glía envolvente olfatoria, De esta forma, se transplantaron axones del bulbo olfatorio a la medula espinal.

Es cierto que existen enemigos absolutos de la experimentación animal. Existen tremendas reacciones que han ido apareciendo en muchos países desarrollados en contra del uso de animales con fines de diagnóstico e investigación, existen verdaderos movimientos de masas que hacen cada día más complicada la experimentación animal. Hay quien dice que si no hubiera movimientos antiviviseccionistas habría que crearlos.

Existen países en la Unión Europea como es Gran Bretaña, donde la crítica al uso de animales de experimentación se llevan a extremos máximos. Es tan exagerado que existen movimientos terroristas que incluso mandan bombas a investigadores que trabajan con animales de experimentación.

Se han realizado estadísticas comprobándose que el movimiento proteccionista ha coincidido con el distanciamiento creciente de la sociedad respecto del mundo rural. Quienes proceden del medio agrícola y ganadero ven en los animales simples objetos de explotación, en tanto que los que han tenido animales de compañía tienden a mirarlos con más cariño.

La actitud del hombre difiere de la actitud de la mujer, en todos los países encuestador. Las mujeres son más partidarias de los derechos y más opuestas a las prácticas viviseccionistas que los hombres.

También existe una diferencia generacional, las personas de más edad y menos instruidas ven a los animales como simples recursos, mientras que la población joven e instruida tiende a verlos con compasión.

Casi todos los proteccionistas son vegetarianos, muchos de ellos incluso se abstienen de lecho y huevos y evitan el uso de sueros y otros productos animales.

Nosotros mismos podemos preguntarnos ¿SÍ O NO A LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACION?.¿PARA QUE SÍ Y PARA QUE NO?.

Lo cierto es que hace mucho surgieron las primeras voces de los que reclaman los derechos de los animales y en especial las voces de aquellos que concretan sus demandas en los derechos de los animales utilizados en la experimentación animal.

La necesidad de utilizar animales de experimentación es evidente, dados los resultados de que ésta se obtienen para mejorar la calidad de vida de los seres humanos y animales. Sin embargo a nadie se le

escapa que esta utilización debe revestir todas las garantías necesarias para que los animales utilizados lo sean de forma más racional, tanto en menor número posible de animales empleados, como en que estos no soporten sufrimiento innecesario alguno.

La Comunidad Internacional tiende a una mayor protección de estos animales y la Comunidad Económica Europea, sensible a la demanda social y con acuerdo de sus Estados miembros, ha desarrollado una legislación que tiene como objetivo el servir de marco para todos los Estados miembros a fin de unificar sus legislaciones. De ahí surge la Directiva del Consejo 86/609/CEE, con respecto a la protección de los animales utilizados en la experimentación y otros fines científicos, que tiene como fin armonizar la legislación de los distintos Estados miembros.

En 1985, anteriormente a la publicación de la Directiva del Consejo de Europa en Estrasburgo, llegó a un acuerdo sobre la Convención para la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Sin embargo, esta Convención que no es un documento vinculante y no tiene fuerza legislativa. Contiene una disposición en la que se establece que las partes deberían mantener consultas multilaterales para examinar el progreso de la implantación de esta Convención y la necesidad de revisión o ampliación de cualquiera de sus disposiciones a medida que se vayan produciendo nuevos hechos a desarrollar.

El objetivo de dicha Directiva era unificar y armonizar la diversidad existente en los Estados miembros en materia de legislación sobre animales de experimentación, garantizando la reducción del número de animales empleados y que se les conceda un trato que evite al máximo el dolor, el sufrimiento o la lesión prolongada innecesariamente o fomentarlos y la puesta al día de técnicas alternativas.

La Directiva consta de 27 artículos y dos anexos. El anexo I, consta de la lista de animales de experimentación a los que se aplican las disposiciones del artículo 21 de la Directiva.

- Ratón.
- Rata.
- Cobaya.
- Hámster dorado.
- Conejo.
- Primates no humanos,
- Perro.
- Gato.
- Codorniz.

Este artículo nos dice que las especies enumeradas en el Anexo I destinados a la utilización en experimentos deberán ser animales de cría, a no ser que se haya obtenido una excepción general o especial, conforme a las modalidades que determine la autoridad. Como animales de cría se entienden los animales criados para su utilización en experimentos en instalaciones aprobadas o registrados por la autoridad.

En el anexo II se establecen las líneas directrices relativas al alojamiento y a los cuidados de los animales.

Se encuentra constituido por tres epígrafes:

- a). - Instalaciones.
- b). -Condiciones ambientales en los locales de alojamiento y su control.
- c). -Cuidados.

a). Dentro de este epígrafe se recogen tres tipos de locales distintos:

1.-Locales de alojamiento.

2.-Laboratorios y locales de experimentación con fines generales y especiales.

3.-Locales de servicio. Locales para el almacenamiento de comida, almacenamiento de jaulas, instrumentos, locales de limpieza y lavado.

El proyecto general se basa en construir todas las instalaciones de forma que suministren un ambiente adecuado para las especies alojadas en ellas. Conviene organizarse a fin de evitar el acceso de personas no autorizadas. Se recomienda la existencia de un programa de mantenimiento para las instalaciones, a fin de evitar cualquier fallo del material.

b). Dentro de este epígrafe se recogen 6 puntos:

1.-Ventilación.

La Directiva nos dice que debe existir un sistema adecuado de ventilación que satisfaga las exigencias de las especies alojadas. El objeto del sistema es suministrar aire fresco y mantener bajo el nivel de olores, gases nocivos, polvo y agentes infecciosos de cualquier tipo. También eliminará el exceso de calor y humedad.

Es aconsejable que el aire del local se renueve con intervalos frecuentes. Un régimen de ventilación de 15-20 renovaciones de aire por hora es adecuado en condiciones normales. Se deben de evitar las corrientes de aire nocivo. Se debería prohibir fumar en los locales donde haya animales.

2.-Temperatura.

La Directiva establece unos intervalos de temperatura para las distintas especies. Sin embargo los animales jóvenes y recién nacidos necesitan a menudo un nivel de temperatura mucho más alto.

3.-Humedad.

Las variaciones extremas de humedad relativa afectan desfavorablemente a la salud y al bienestar de los animales. Por lo tanto, se recomienda que el nivel de HR en los locales de alojamiento sea el adecuado a las especies correspondientes y se mantengan generalmente al 55%+/-10%.

4.-Iluminación.

En los locales que carezcan de ventanas, es necesario disponer de un sistema de iluminación controlado tanto para satisfacer las necesidades biológicas de los animales como para proporcionar un ambiente de trabajo satisfactorio. También es necesario controlar la intensidad y el ciclo de luz-oscuridad.

5.-Ruidos.

Los ruidos pueden constituir una importante causa de molestia en el alojamiento de los animales. Los locales de alojamiento y de experimentación deberían aislarse de ruidos fuertes. Los ruidos súbitos pueden provocar cambios importantes en las funciones orgánicas, pero dado que a menudo son inevitables, a veces puede ser conveniente disponer en los locales de alojamiento y de experimentación, de un sonido continuo de intensidad moderada, como por ejemplo una música suave.

6.-Sistema de alarma.

Deberían existir sistemas de alarma para la detección de incendios, para controlar el sistema de ventilación y de calefacción. Se debería de disponer de un grupo electrógeno, etc. Se velará porque el sistema da alarma perturbe lo menos posible.

c). Cuidados.

Este epígrafe está constituido por 11 puntos:

1.-Salud.

La persona responsable del establecimiento debe procurar que un veterinario u otra persona competente inspeccione regularmente a los animales y el alojamiento y supervise los cuida-

dos.

Según el riesgo potencial que represente para los animales, se recomienda prestar la debida atención a la salud y a la higiene del personal.

2.-Captura.

Los animales salvajes deberían capturarse solamente mediante métodos humanitarios y con la intervención de expertos.

3.-Condiciones de embalaje y transporte.

Para los animales, cualquier traslado supone indudablemente una experiencia penosa que conviene aliviar en la medida de lo posible. Es aconsejable que los animales estén en buen estado de salud cuando se transporten, los animales que estén enfermos o se encuentren mal por cualquier causa no deberán ser transportados, a no ser por razones terapéuticas o de diagnóstico. Hay que tener cuidado con las hembras en avanzado estado de gestación. Se debe evitar cualquier sufrimiento innecesario debido a ventilación adecuada, exposición a temperaturas extremas, etc.

4.-Recepción y desembalaje.

Se recomienda recibir y desembalar los envíos de animales evitando cualquier retraso. Después de inspeccionarlos, se aconseja colocar los animales en jaulas o cercados limpios y darles alimentos y agua en función de las necesidades. Se recomienda mantener los animales que estén enfermos o se encuentren mal por cualquier otra causa en observación y apartarlos de los otros animales. Un veterinario o persona competente debería examinarlos lo antes posible y en caso necesario, tratarlos. Los animales que no tengan posibilidad de recuperación deberían ser sacrificados inmediatamente por un método humanitario. Por último todos los animales recibidos deben registrarse y marcarse.

5.-Cuarentena, aislamiento y aclimatación.

Los objetivos de la cuarentena son:

- a) proteger a los otros animales del establecimiento.
- b) proteger al hombre de las zoonosis.
- c) fomentar las prácticas científicas correctas.

Al menos que el estado de salud de los animales introducidos en un establecimiento sea satisfactorio, se recomienda que se sometan a un periodo de cuarentena.

Se recomienda disponer de instalaciones separadas para aislar a los animales en los que se sospeche o que presenten síntomas de mala salud y que podrían representar un peligro para el hombre o los otros animales. Incluso cuando los animales presenten buen estado de salud, es conveniente someterlos a un periodo de aclimatación antes de utilizarlos en un experimento.

Se conocen enfermedades vírales emergentes que están relacionados con animales de laboratorio, tanto en su origen como en su difusión. Como es el caso de la fiebre hemorrágica con síndrome renal (*virus Hantoon*) y *Ébola*.

La infección en ratas de laboratorio con virus Hantoon fue publicada por primera vez en Japón en 1979, y después en Corea en 1982, lugares donde varios técnicos de laboratorio fueron contagiados, en 1983 existieron casos similares en Bélgica y en 1984 en Francia e Inglaterra. Esta situación se ha limitado a personal que ha estado en contacto estrecho con ratas de laboratorio. Tomando en cuenta estos antecedentes, los grandes productores de animales de laboratorio en USA mejoraron sus sistemas de barreras.

En el caso del virus *Ébola* de la *Fam.Filoviridae*. Ciertamente las 4 cepas del virus *Ébola* ya han sido identificadas, pero hasta la fecha se desconoce el ciclo natural de transmisión de la enfermedad; se sabe que los brotes epidémicos han estado asociados al manejo de monos de labo-

ratorio y que la dispersión de la enfermedad ha sido facilitada por malas practicas hospitalarios, pero se desconoce el hospedador reservorio. Puesto que los monos padecen y mueren de la enfermedad sin poder generar anticuerpos suficientes, difícilmente podrían serlo. El virus se replica bien en cobayas, hámster.

Para concluir, si bien estas enfermedades son exóticos, toda persona que trabaje con animales de laboratorio debe estar consciente que el riesgo de contagio existe, remoto ciertamente, pero real.

6.-Enjaulado.

Las jaulas y cercados no deber ser de materiales perjudiciales para la salud de los animales y se aconseja proyectarlos de forma que los animales no puedan lesionarse y a menos que sean desechables, deberán hacerse de material resistente y que respondan a las técnicas de limpieza y descontaminación.

7.-Alimentación.

Al seleccionar, producir y preparar alimentos, se recomienda tener precauciones para evitar la contaminación química, física y microbiológica. Es oportuno envasar los alimentos en sacos cerrados herméticamente y en su caso marcarlos con la fecha de producción. Los locales de almacenamiento deberían ser frescos, oscuros, secos y estar protegidos de parásitos e insectos. Es recomendable limpiar de forma regular y en su caso, esterilizar los comederos, bebederos y demás utensilios destinados a la alimentación.

8.-Agua.

Normalmente se utilizan dos métodos: biberones y sistemas automáticos.

Los biberones se suelen utilizar para animales pequeños, como roedores y conejos. Cuando se utilicen biberones, es aconsejable que sean de material transparente para permitir el control de su contenido. Conviene que sean de boca ancha para facilitar su limpieza y si se utiliza material plástico, interesa que este no libere sustancias solubles. También conviene que tapas, tapones y tubos sean esterilizables y de fácil limpieza. Interesa que biberones y accesorios se desmonten, limpien y esterilicen a intervalos regulares y adecuados.

El agua de la red pública suele estar clorada para reducir el crecimiento de microorganismos. Dicha cloración no siempre basta par impedir el crecimiento de algunos gérmenes patógenos potenciales, como por ejemplo Pseudomonas. Como medida complementaria, cabe elevar el nivel de cloro del agua o acidificarla para conseguir el efecto deseado.

9.-Cama.

Es recomendable que la cama esté seca, sin polvo, sea absorbente, no tóxica y este libre de agentes infecciosos, parásitos o cualquier otra forma de contaminación. Interesa poner especial cuidado en evitar la utilización de serrín o material de cama derivado de madera tratada químicamente.

10.-Ejercicio y manipulación.

Es aconsejable aprovechar cualquier oportunidad para que los animales hagan ejercicio.

11.-Limpieza.

Se recomienda establecer un programa adecuado para la limpieza, el lavado, la descontaminación y cuando sea necesario, la esterilización de jaulas y accesorios, biberones y cualquier material.

SACRIFICIO HUMANITARIO DE LOS ANIMALES.

Se puede desangrar a animales en estado de inconsciencia profunda pero no conviene hacerlo, sin anestesia previa. Tampoco conviene usar medicamentos que paralizan los músculos antes de que se pro-

duzca la inconsciencia ni los de efecto curarizante, ni la electrocución sin paso de corriente por el cerebro. No debe permitirse la eliminación de los cadáveres antes de que sobrevenga el rigor mortis.

Pero dado que la Directiva es una norma jurídica que no puede aplicarse directamente en el ámbito territorial de los Estados miembros, requiere por lo tanto un desarrollo legislativo de adaptación por parte de los Estados miembros, de ahí surge el R.D. 223/1998, que es la norma fundamental hoy en materia de experimentación animal, estableciendo el marco de utilización de los mismos. Hasta esta fecha la legislación española era muy escasa, no existe hasta el presente ninguna normativa legal específica en esta materia, si bien la Real Orden Circular de 31 de julio de 1929, actualizada por Orden del Ministerio de Gobernación de 1 de marzo de 1961 establece las sanciones a las personas que suministran sin causa justificada, droga o sustancias nocivas a un animal no dañado o lo someten a cualquier intervención quirúrgica hecha sin el cuidado o la humanidad debidos o consientan la administración de aquellas o la ejecución de esta.

El R.D., recoge fielmente dicha Directiva, hasta poder decir que es un calco de la misma.

El R.D., tiene por objeto asegurar la protección de los animales utilizados en la experimentación y otros fines científicos y esto lo lleva a cabo por tres caminos:

1. Dignificando los animales. Ocupándose de que los animales reciben los cuidados adecuados, mediante la supervisión por parte de un veterinario de los aspectos relacionados con la salud de los mismos.
2. Protección de los animales. Se deberá evitar el causar dolor, sufrimiento o lesión prolongada e innecesaria a los animales.
3. Reducción del número de animales. Tratando de que se utilice el menor número de animales, así como de que, en todos los casos en que sea posible, se lleven a cabo los experimentos mediante técnicas alternativas.

El R.D. consta de 15 artículos, 1 disposición adicional, 2 transitorias y dos adicionales.

El R.D., establece que la utilización de animales en experimentación solo podrá tener lugar cuando esta persiga los siguientes fines:

1. **La prevención de enfermedades**, alteraciones de la salud y otras anomalías o sus defectos, así como el diagnóstico y el tratamiento de las mismas en el hombre, los animales vertebrados o invertebrados o las plantas; el desarrollo y la fabricación de productos farmacéuticos y alimenticios y otras sustancias o productos, así como la realización de pruebas para verificar su calidad, eficacia y seguridad.
2. **La valoración, detección, normalización** o modificación de las condiciones fisiológicas en el hombre, los animales vertebrados o invertebrados o las plantas.
3. **La protección del medio ambiente** natural, en beneficio de la salud o bienestar del hombre, los animales vertebrados o invertebrados o las plantas.
4. **La investigación científica.**
5. **La educación y la formación.**
6. **La investigación médico-legal.**

Se establecen tres tipos de establecimientos tanto públicos como probados: establecimientos usuarios, de cría y suministradores.

Se entiende como establecimiento de cría, cualquier instalación donde se críen animales para utilizarlos en experimentos. Aquellos establecimientos usuarios que críen animales para su uso exclusivo, bastará que se registren como establecimientos usuarios.

Establecimiento suministrador, cualquier establecimiento diferente de un criadero que suministre animales con vista a su utilización en experimentos.

En España hay registrados actualmente 104 E, usuarios (81,8%); suministradores 2 (1,6%), cría 8 (6,3%), usuarios-cría 10 (7,9%) y 3 cría-usuarios (2,4%).

Se establecen las normas para la inscripción de los establecimientos en el registro, así como las inspecciones que sobre los mismos se podrán llevar a cabo, debiendo contar los establecimientos de experimentación con los medios de instalaciones y equipos, tanto materiales como humanos, apropiados a las especies y experimentos a realizar, teniendo en cuenta los criterios establecidos en el Anexo II de la Directiva 609/CEE. Como específica en su disposición transitoria el R.D., establece 18 meses de plazo, a partir de la entrada en vigor del R.D. y este entró en vigor al día siguiente de su publicación en el BOE, para que los establecimientos de experimentación se inscriban en el Registro.

La legislación da una serie de definiciones estableciendo tres niveles dentro del personal que trabaja con los animales de experimentación. Estas serán de mayor a menor formación, el responsable o especialista, el experimentador y el cuidador.

Los establecimientos solo pueden obtener los animales para sus investigaciones mediante la compra de los mismos en los establecimientos suministradores o criándolos en los centros que se encuentren autorizados para ello. No podrán ser utilizados para la experimentación los animales salvajes o vagabundos, salvo autorización expresa.

Será imprescindible que los establecimientos de experimentación cuenten con unos libros de entrada y salida de animales, donde deberán quedar registrados los movimientos de animales de dicho establecimiento ya sea de forma individual en los casos de los perros, gatos o primates no humanos o de forma colectiva para otros, Igualmente constará la procedencia y destino.

Los establecimientos usuarios deberán comunicar trimestralmente los experimentos que se propongan realizar.

Los animales solo pueden utilizarse cuando un experimento no se pueda llevar a cabo mediante otro método científicamente satisfactorio y contrastado. Se realizará bajo anestesia general o local, o con la autorización de la institución competente si no se le anestesia.

Los experimentos solo podrán realizarse por personas competentes o bajo la responsabilidad directa de las mismas. Después de recuperarse de la anestesia los animales deberán de ser tratados con analgésicos u otros medios idóneos que sean compatibles con el fin del experimento. Así mismo deberá decidirse si se mantiene el animal con vida o si se sacrifica por medios humanitarios. Adoptándose las medidas oportunas podrá la autoridad competente autorizar que un animal sea devuelto a su medio habitual.

Cuando en un experimento los animales puedan sufrir un intenso dolor, se deberá presentar memoria justificativa con 30 días de antelación mínima al inicio del experimento.

En resumen, vamos a ver las exigencias que el R.D. impone a los establecimientos:

1. Solicitar la inscripción del mismo.
2. Disponer de instalaciones y equipo, tanto material como humano, apropiado a los animales y experiencias a realizar.
3. Contar con asesoramiento veterinario para la salud de los animales.
4. Pasar una inspección.
5. Emitir trimestralmente la información de los experimentos a realizar.
6. Contar con unos libros de entrada y salida de los animales.
7. Contar con un responsable administrativo al frente del establecimiento.

En cuanto a los animales el R.D. impone los siguientes puntos:

1. Solo podrán utilizarse animales de cría o suministro de centros autorizados.
2. No podrán utilizarse animales salvajes o vagabundos en los experimentos.
3. Solo podrán utilizar los animales una vez cuando la experiencia conlleve

4. Dolor, stress o lesión prolongada para ellos.
5. La intervención se realizará con anestesia, salvo autorización expresa.
6. Posteriormente a la intervención serán tratados los animales con analgésico o métodos similares.
7. Concluida la experiencia se decidirá si se mantiene el animal con vida o si se sacrifica por medio de un método humanitario.
8. En ocasiones la autoridad podrá autorizar la devolución del animal a su medio habitual.
9. Se precisará autorización para aquellos experimentos en los que el animal deba sufrir un intenso dolor.
10. Se utilizarán el menor número posible de ellos.
11. Solo se utilizarán animales cuando no existan técnicas alternativas.

Posteriormente al R.D. 233/88, se publicó la Orden de 13 de octubre de 1989, por la que se establecen las normas de registro de establecimiento de cría, suministradores y usuarios de animales de experimentación de titularidad estatal, así como los de autorización para el empleo de animales de experimentación. En esta Orden se establecía que era la Dirección General de la Producción Agraria a la que le correspondía la inscripción y autorización de estos establecimientos. Sin embargo no hay legislación en nuestra Comunidad Autónoma sobre animales de experimentación, con lo cual no se establecen competencias sobre el tema. Se considera que es la Delegación de Agricultura y Pesca por analogía. Hay que decir que la Comunidad Autónoma andaluza es la única Comunidad Autónoma que no tiene legislación sobre la materia. Dentro de las distintas Comunidades Autónomas esta competencia no siempre la tiene la Consejería de Agricultura en algunas de ellas intervienen la Consejería de Educación.

A la solicitud dirigida al Director General de la Producción Agraria, se le tenía que adjuntar además de los datos generales del establecimiento, un proyecto conteniendo memoria descriptiva y planos o croquis de situación y distribución de las construcciones, instalaciones, dependencias y sus accesos, así como la capacidad de alojamiento de los mismos por especies animales. Además se hará un informe técnico-sanitario.

A la vista del expediente y el informe emitido por la correspondiente Dirección Territorial o Provincial, la Dirección General de la Producción Agraria podrá proceder a la inscripción en el Registro oficial de dicha actividad, poniendo tal hecho en conocimiento del solicitante y de la Dirección Territorial o Provincial.

La perspectiva de futuro de la experimentación animal se basaría en dos principios evidentes:

1. Mayor especialización en la estandarización del Reactivo biológico.
2. Restricción en su uso por razones etológicas y éticas, a medida que se vayan poniendo a punto técnicas capaces de sustituirlo, perfeccionamiento de cultivos celulares y tisulares, tecnologías de los diagnósticos serológicos, etc.

Existen ciertos factores que pueden alterar a este reactivo biológico, por lo tanto es importante controlar tanto al animal de laboratorio, ya que este influye en el experimento como al experimento en sí, para ello hay que conocer los factores que pueden influir. Dentro de estos factores nos encontramos con:

- a). - *Factores microbiológicos*: Existen gérmenes propios del animal, como flora propia, que debido a un estado de inmunodeficiencia en un momento dado se pueden convertir en flora patógena. Existen gérmenes ambientales como extoparásitos o distintos microorganismos en el aire, alimento, agua.
- b). - *Factores macrobiológicos*: Influye considerablemente el factor hombre, tanto el personal científico, como el personal técnico. Influye el factor animal, tanto animales de la misma especie como de otras especies, insectos, roedores silvestres, etc.
- c). - *Factores físicos*: En los animales de experimentación influye el clima, la luz y el sonido principalmente como factores físicos. Dentro del clima nos encontramos con la temperatura y sus cambios,

así como la humedad, la presión atmosférica, la tasa de aireación, el polvo, De la luz influye tanto su periodo, intensidad, ritmo, color. El sonido influye, influye su intensidad, su frecuencia, etc.

d). - *Factores químicos*: Dentro del aire respirado hay que tener en cuenta si existen gases, otras contaminaciones, carcinógenos, etc. Hay que tener en cuenta el alimento que se les da a estos animales, sus ingredientes, sus componentes, sus toxinas, el agua de bebida. En la cama tenemos que tener en cuenta los desinfectantes, solventes utilizados.

¿Cómo se controlan estos factores?

- Si en un experimento en concreto necesitamos el control de la endoflora podemos utilizar para ello animales gnobióticos, transferencia de embriones, etc.
- En el caso de gérmenes ambientales deberíamos tener una barrera higiénica efectiva, apropiado diseño de construcción.
- Para el control del aire se pueden utilizar filtros de aire (filtros de polvo, filtros HEPA).
- Para el control del alimento y cama se puede utilizar la pasteurización, esterilización.
- Para el agua se utilizan técnicas de pasterilización, esterilización, acidificación, etc.
- Para el control de la plantilla, personal se utilizan filtros de aire, apropiado diseño de construcción.
- Para el control de insectos y parásitos se debe utilizar un apropiado diseño de construcción profesional.
- Para el control de otros animales se utiliza la cuarentena, facilidades higiénicas de contención efectivas.

Dentro de los factores no biológicos, hay que controlar la unidad animal, habitación mediante planificación, diseño y construcción profesional.

- Para controlar el clima (Temperatura, humedad, aireación, presión del aire, concentración de gases) se debe construir una planta acondicionada de aire, apropiado diseño y construcción profesional, basado en la producción de calor de los animales, ajuste automático de los valores preseleccionados.
- Para controlar la luz (periodo, intensidad y color), se realiza un encendido periódico automático.
- Para controlar el sonido debe existir un sistema de aislamiento, prevención del sonido originado en la construcción, selección del equipo apropiado. Las jaulas deben estar construidas de superficies suaves, conductividad de la temperatura, bienestar.
- El alimento debe ser de ingredientes naturales, dieta definida químicamente.
- La cama debe estar libre de polvo, hecha de material no tratado químicamente.

Actualmente los animales de experimentación se suelen utilizar principalmente para investigación básica; controles de calidad, diagnosis en general, educación, etc. Los países que más animales de experimentación utilizan son Suiza y EE.UU. En la Unión Europea los países que más utilizan animales de experimentación son Alemania, Inglaterra y Francia, el menor Luxemburgo.

Dentro de las especies más utilizadas nos encontramos primero con el ratón, rata, conejos... Los primates son los animales de experimentación menos utilizados Hay que tener en cuenta que la anatomía y la fisiología es diferente en cada una de las especies utilizadas en los ensayos in vivo, el conocimiento de las mismas en muchos casos, nos va a facilitar la elección del animal adecuado para la realización de un estudio. Hay que decir que no existe un modelo experimental perfectamente transponible al hombre. Como la variabilidad de especies utilizadas en experimentación es elevada y el tiempo limitado, daremos algunas breves nociones sobre los animales más utilizados.

El ratón doméstico, *Mus musculus*, un roedor de la familia de los *Muridae*, es el vertebrado más empleado en la investigación biomédica y de diagnóstico. Existen varias razones para esta popularidad.

Además de ser pequeño y relativamente fácil de manejar, los ratones están bien caracterizados tanto anatómicamente como fisiológicamente.

Con fines experimentales existen varias cepas y categorías etiológicas del ratón doméstico. La selección de la cepa o clase dependerá evidentemente del propósito de la investigación. Comercialmente disponibles están las siguientes cepas:

1. **Consanguíneas** Producidas por 20 o más generaciones de cruces entre hermanos
2. **Híbridos F1.** Producidas por el cruce de dos cepas consanguíneas.
3. **No consanguíneas.** Son poblaciones con una gran diversidad genética y se mantienen evitando precisamente la consanguinidad.

Como categorías etiológicas encontramos las siguientes, todas ellas obtenidas por cesárea, a excepción de los animales convencionales:

- Libres de gérmenes, con ausencia total de organismos detectables.
- De flora definida: libres de todos los gérmenes excepto organismos específicos.
- Libres de gérmenes específicos: como su propio nombre indica, se hallan libres de determinados organismos.
- Convencionales: se hallan libres de los organismos que producen las enfermedades más frecuentes.

Los ratones en comportamiento actúan agrupados, son animales sociales. Unos con otros interactúan siguiendo una estructura jerárquica y estableciendo diferentes territorios. Considerados como animales no agresivos, solo luchan ante la provocación. Si se alojan muchos machos juntos lucharán para establecer un orden jerárquico y las hembras alojadas juntas lucharán para defender sus camadas. Cuando se manejan se deberá prestar atención a los mordiscos.

Omnívoro por naturaleza, el ratón doméstico criado en cautividad se adapta fácilmente a una dieta a base de pienso comercial. Ya que demuestran una tendencia a fabricar nidos, se recomienda mantenerlos en jaulas con un material de cama.

RATA.

Pertenece a la *Fam. Muridae*, es el mamífero más abundante y cosmopolita, totalmente domesticado y el primero de los animales de laboratorio. Es una especie de alta adaptabilidad, vive tanto solitaria como en grupos sociales muy cohesionados, en gran variedad de hábitat y climas. Especialmente desarrollado el oído, con visión escasa y con gran capacidad de adaptación a nuevas situaciones, su régimen de actividad es nocturno. Son animales tranquilos, inteligentes y de fácil manejo. Son animales de hábitos nocturnos, construyen nido rudimentario. Los machos no son agresivos en grupo. Puede existir agresividad entre hembras lactantes y en animales aislados. La hembra puede abandonar la camada si se molesta en los primeros días tras el parto (ruidos), aunque tienen mayor instinto maternal que el ratón hembra.

CONEJO.

El conejo, *Orusyctolag cuniculus* es el único animal de laboratorio, de entre los más comunes, que es un lagomorfo y no un roedor.

La raza más empleada es la Neozelandesa.

Como comportamiento los conejos son animales tímidos y que se asustan con facilidad. A menos que se hayan criado juntos, los mayores de 3 meses, al ser alojados en la misma jaula, mantendrán luchas. Por esta razón, las jaulas para conejos no suelen contener más de un animal. Los conejos que son mantenidos en cautividad durante periodos prolongados de tiempo se pueden volver agresivos y su sujeción se convierte en más difícil, pero en general no son animales difíciles de manejar y únicamente hay que evitar los arañosos.

Hemos visto anteriormente que los primates son los animales menos utilizados, siendo en cierta forma lógico. Como hecos dicho anteriormente, el uso de animales de experimentación existirá siempre que no hay técnica alternativa y si es posible utilizar animales menos evolucionados, así como el coste que estos tienen y su problema de extinción. El artículo 7 de la Directiva 609/86, al elegir entre diversos experimentos, se seleccionaran aquellos que utilicen el menor número de animales, que afecten a animales con el grado más bajo de sensibilidad neurofisiologica, que causen el menor dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero y que puedan proporcionar los resultados más satisfactorios.

D. Antonio Paniagua Benito

Ex-Director Sanitario del Matadero Comarcal de Córdoba.

PRÁCTICA DE TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS.

En la toma de muestras que han de servir de base para la aplicación de técnicas de laboratorio al diagnóstico de EDOs (*Enfermedades de Declaración Obligatoria*) hemos de hacer tres consideraciones:

1. DÓNDE se realiza la toma de muestras.
2. QUÉ muestras se han de tomar.
3. CÓMO se debe proceder en la toma de muestras y su envío al laboratorio.

En cuanto al primer punto la muestra puede tomarse en:

- a). - En el campo (explotación ganadera).
- b). - En el matadero.

En uno y otro lugar se puede actuar sobre:

- a). - Animal vivo.
- b). - Animal muerto (cadáver o sacrificado).

En el primer caso y actuando sobre el animal vivo en el campo se procederá a realizar la toma de muestras de líquidos orgánicos: sangre, leche, orina, exudados, heces y otras sustancias, o tenidos como pelos, raspados de piel, etc.

Si se trata de un cadáver se procederá de la forma que le han expuesto en la descripción de la autopsia reglada que ya conocen.

Aunque también se puede actuar sobre el animal vivo en el recinto del matadero pues a él vivos llegan los animales, sin embargo se sobreentiende que en principio dichos animales se encuentran libres de EDOSs, pues vienen amparados por un documento que así lo garantiza cual es la Guía de Origen y Sanidad, pero no en términos absolutos, pues hay enfermedades que pueden no haberse evidenciado o se encuentran solapadas como es el caso de la Tuberculosis.

Donde sí podemos actuar en el matadero en sentido general es sobre el animal muerto, es decir, sobre la canal una vez sacrificado y es donde y sobre en lo que hoy vamos a actuar para la realización de la toma de muestras que constituirá la primera parte de la misma, siendo la segunda parte el CÓMO se debe proceder al realizar la toma de muestras y su envío al laboratorio, parte esencial pues de su correcta realización que ha de ajustarse a un protocolo establecido dependerá en mucho o en todo el éxito del fin que perseguimos: llegar al diagnóstico de los procesos infecciosos que tratamos de definir.

Así pues, en la presente exposición queremos dar especial importancia a la ordenación sistemática en la práctica de la inspección.

En el examen de los animales de carnicería deben inspeccionarse con especial atención aquellas partes que resultan afectadas por las enfermedades más frecuentes en las respectivas especies animales.

En la toma de muestras, como base para el diagnóstico de EDOs, hemos de actuar en todos los órganos y sistemas del organismo animal que nos lleven, mediante la aplicación de las técnicas adecuadas, al diagnóstico deseado.

Así pues empezamos con el:

1. - ESQUELETO.

En este aspecto destacan en todos los animales de carnicería, particularmente las enfermedades de las articulaciones y tendones de las extremidades y la toma de muestras recaerá de manera especial sobre

los huesos largos de las extremidades, las vértebras, esternón, hueso iliaco y articulaciones, que no vamos a describir por ser de todos conocidos. Solamente diremos que los huesos se pueden clasificar según su forma en:

- *Huesos largos o tubulares* (huesos largos de las extremidades).
- *Huesos planos y anchos* (escabulla, ilión, costillas, huesos de la cabeza).
- *Huesos cortos* (columna vertebral, esternón, huesos del carpo y del tarso).

Según el proceso o enfermedad de que se sospeche se tomarán unas u otras muestras.

2. - MÚSCULOS.

La musculatura esquelética constituye asimismo la base para la toma de muestras orientada al diagnóstico de EDOs.

Si se trata de enfermedades parasitarias (cisticercosis: *Cisticercus Bovis* –tenia inermis-*C. Cellulosae*-tenia solium-) o triquinosis (*Trichinella spiralis*), los músculos de elección son:

- Músculos masticatorios.

M. masseter (masetero), *masticatorio externo*, adaptado a la superficie externa de las mandíbulas superior e inferior, *M. Pterygoideos*, músculo masticatorio interno que se encuentra en la cara interna de la mandíbula inferior

- Musculatura sublingual.

Interna y externa y en estrecha relación con ella se encuentra la musculatura hioidea.

- Diafragma.

Pared tendo-muscular que separa la cavidad torácica de la abdominal con sus dos porciones: una periférica musculosa (*Pars muscularis*) y otra central musculosa (*septo diafragmático*). EN la primera se encuentran los pilares diafragmáticos, esencialmente utilizados para la investigación de triquinas.

Si se trata de efectuar investigación bacteriológica hay que tomar una muestra de un cuarto anterior y de un cuarto posterior obtenida de uno de los siguientes músculos:

- Extremidades anteriores:

- *M. Supraespinatus* (supraespinoso). Corresponde a la pieza de carnicería conocida como "pez" o "solomillo inglés"
- *M. triceps brachii* (triceps braquial o ancóneo).
- *M. brachialis* (músculo del brazo).

- Extremidades posteriores:

- *M. rectas femoris*, es una porción del cuádriceps femoral (extensor de la rodilla), forma parte de la pieza de carnicería conocida como "babilla".
- *M. semitendineus* (semitendinoso). Constituye la mayor parte del borde caudal de la nalga. Corresponde a la pieza denominada "contra".
- *M. gastrocnemius* (gastronemio). Constituyen los gemelos de la pierna.

3. - ÓRGANOS DE INTERÉS DIAGNÓSTICO.

- Lengua.

Órgano musculoso recubierto de mucosa. En ella cabe distinguir: el dorso, la punta, el cuerpo y la base, así como las papilas de diferente forma (filiformes, fungiformes, etc.). Muy importante en el diagnóstico de fiebre aftosa y otras.

- Corazón.

Órgano musculoso consistente, rodeado por el pericardio; la pared está constituida por el epicardio (exterior), miocardio (medio) y endocardio (interno). En la pared dorsal se encuentran las aurículas y en posición ventral los ventrículos.

- Pulmones.

De color rosa pálido; con dos alas: izquierda y derecha divididas a su vez en lóbulos que varían en número con las especies, así como la tráquea el árbol bronquial con sus ramificaciones a partir de la bifurcación de la tráquea. Relacionados topográficamente con los pulmones y la tráquea hemos de tener en consideración dos glándulas de secreción interna de importancia en la toma de muestras: el timo y el tiroides. El primero situado en la entrada del pecho y el segundo en la región traqueal de la glotis.

- Bazo o Splen.

Pertenece por su función al sistema circulatorio defensivo del organismo. Su tamaño y forma varía con las especies. Con una superficie diafragmática y otra víscera; dos bordes: craneal y causal, y dos extremidades: proximal y distal. En los bóvidos el bazo es rojo oscuro en los machos y gris-azulado en las hembras.

- Hígado o Hepar.

Presenta una cara diafragmática o anterior convexa y otra visceral o posterior cóncava. Cabe distinguir una *pars sinistra* y otra *pars destra*, entre las cuales se encuentra la *pars intermedia*, con la Porta hepática, que divide a esta porción media en una *pars intermedia supraportalis* y otra *infraportalis*. La segunda constituye el lóbulo cuadrado colocado entre la vesícula biliar y el *Ligamentum teres*. Las *pars intermedia supraportalis* consta del *lobus quadratus* (lóbulo de Spigelio). Estas partes se dividen y conforman de manera distinta según las especies animales. Las venas hepáticas desembocan en la cara diafragmática en la vena cava posterior (*vena cava caudalis*), soldada al hígado. El tamaño, color y lobulaciones varían con las especies.

- Riñones o Nephros.

Tienen forma de judía con dos caras, una dorsal y otra ventral. El borde lateral es convexo, mientras que el medial se encuentra recogido sobre sí mismo, umbilicado formando el *Hilus renalis*. El riñón izquierdo se halla al lado de la aorta abdominal y el derecho junto a la vena cava posterior.

En posición craneal a los riñones se encuentran las glándulas adrenales o suprarrenales.

En la vaca los riñones tienen profundas cisuras que los dividen en lóbulos.

- Estomago o Gaster.

Presenta un orificio de entrada o cardias u otro de salida o píloro. Varía con las especies. En los rumiantes es plurilocular o compuesto; consta de tres pro-ventrículos: Panza o *rumen*, bonete o *reticulum* y librillo u *omaso*, y el estómago glandular o cuajar (*abomaso*). La panza queda al lado izquierdo, el bonete en posición craneal y el librillo a la derecha, mientras que el cuajar se incluye hacia la izquierda por encima del bonete y la panza.

- Intestino.

Consta de intestino medio e intestino terminal. El intestino medio empieza en el píloro hasta la válvula ileocecal y constituye el intestino delgado, con tres porciones: duodeno, yeyuno e íleon. Relacionado con el primero se encuentra la glándula páncreas. El intestino terminal o grueso consta de tres tramos: ciego, colon y recto. La mucosa del intestino delgado tiene vellosidades y en ella se encuentran las *placas del Peyer*, la del grueso es lisa, la pared intestinal se compone de serosa, muscular y mucosa.

- Vasos sanguíneos.

Arteria Aorta: nace del ventrículo izquierdo formando el gran cayado de la aorta o aorta ascendente a nivel de la 6ª vértebra dorsal, a partir de aquí discurre como aorta descendente dividiéndose en

cuatro ramas: Arteria ilíaca externa (dos) para las extremidades posteriores, y arteria hipogástrica (dos) para la pared y vísceras pelvianas. Del cayado de la aorta nacen cuatro arterias para la cabeza y extremidades anteriores.

Vena Cava: la vena cava posterior sale de la aurícula derecha del corazón, pasa por el diafragma y asciende entre el pilar diafragmático derecho y el hígado hasta la región lumbar donde se bifurca en las venas ilíacas. La cava anterior sale de la aurícula derecha del corazón y la entrada del pecho se ramifica en dos venas subclavias y dos venas yugulares.

4. - SISTEMA LINFÁTICO.

En la inspección de la carne, así como en la toma de muestras para el diagnóstico de EDOs, el examen del sistema linfático y las lesiones en él encontradas revisten especial importancia para el dictamen a emitir. Es por ello importante conocer la morfología así como la exacta localización de los ganglios linfáticos y la región anatómica correspondiente a cada ganglio. Sin entrar en más detalles bástenos saber que la circulación linfática es la corriente líquida continuada entre la sangre y los tejidos a nivel de las áreas capilares. La linfa se compone de plasma linfático (quilo) y de linfocitos. La linfa circula desde los capilares linfáticos, a través de vasos colectores y de desagüe y de los ganglios en ellos intercalados. Hasta las venas gruesas. El tamaño de los ganglios linfáticos es variable, su color es gris, blanco o gris-amarillento, pero también aparecen coloraciones negras, verdosas o azuladas como por ejemplo en la región mesentérica de los bóvidos. Los ganglios linfáticos desempeñan una misión de defensa en el organismo y participan en los procesos inmunológicos mediante la formación de anticuerpos.

-Tonsilas.

Las tonsilas o amígdalas constituyen el anillo faríngeo-linfático o de Waldeyer siendo las siguientes: Amígdala del paladar, amígdala del velo del paladar, amígdala epiglótica lateral, amígdala lingual, amígdala faríngea y amígdala tubárica. No son constantes en todas las especies siendo muy importantes en la vaca y en el cerdo la amígdala palatina y la del velo del paladar.

La tonsila palatina superior o tonsila del velo del paladar, en el cerdo tiene forma de almendra con cáscara- de ahí el nombre de amígdalas- y se encuentra situada a ambos lados del velo del paladar.

La tonsila palatina inferior paraepiglótica- en forma de acúmulo de vaina- se encuentran a ambos lados de la raíz de la lengua, en la base de la epiglotis.

En la vaca la tonsila palatina está ubicada en el paladar con envoltura fuerte a derecha e izquierda de la base de la lengua.

Centro linfáticos y sus ganglios o lymphonodus.

Entendemos por Centro linfático o linfocentro el conjunto de elementos linfáticos pertenecientes a una región corporal, y linfonodos a los ganglios linfáticos que integran dicha región.

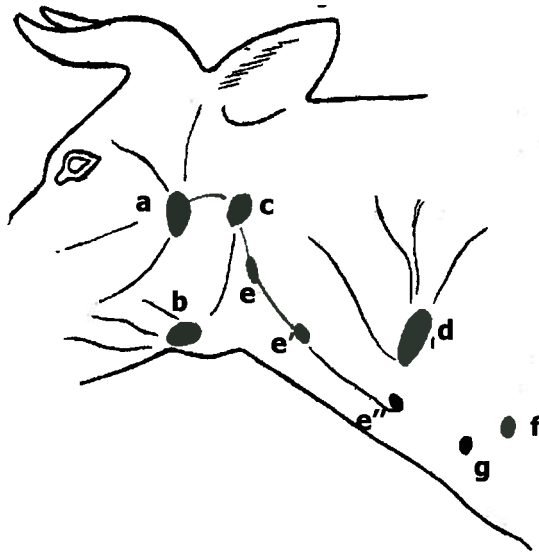
Representación gráfica de los ganglios linfáticos esenciales correspondientes a las distintas regiones corporales:

Los ganglios hasta aquí representados son los ganglios linfáticos llamados de la carne entendiendo por tales aquellos que reciben la linfa de los músculos, huesos, etc., sin relación alguna con las vísceras y serosas. En las canales que se sospeche la existencia de tuberculosis se han de inspeccionar dichos ganglios de la carne. Lo más importantes son los siguientes:

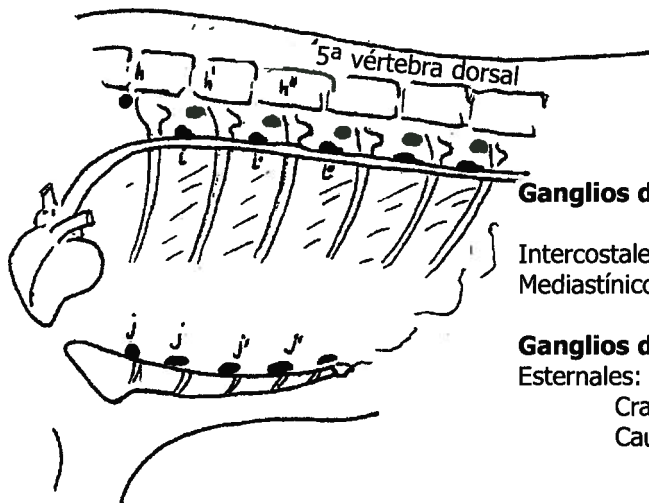
1 Ganglio cervical superficial o preescapular:

Es un ganglio voluminoso, el principal del cuarto delantero, se encuentra delante y encima de la articulación escápulo-humeral y cubierto por los músculos supraespinoso, mastoideo-humeral y omotraqueliano. Un corte paralelo, al borde craneal de la escápula de unos ocho centímetros secciona los citados músculos y pone al descubierto el paquete adiposo que contiene al ganglio.

Ganglios linfáticos de la cabeza, cuello y extremidades escapulares:



- Parotídeo- a
- Mandibular- b
- Retrofaríngeo- c
- Cervical superficial- d
- Cervicales profundos:
 - Craneal- e
 - Medio- e'
 - Caudal- e''
- Axilar propio (no visible)- f
- Axilar de la primera costilla- g



Ganglios de la pared costal superior

- Intercostales- h, h' h''
- Mediastínicos superiores dorsales- i, i. i''

Ganglios de la pared costal inferior

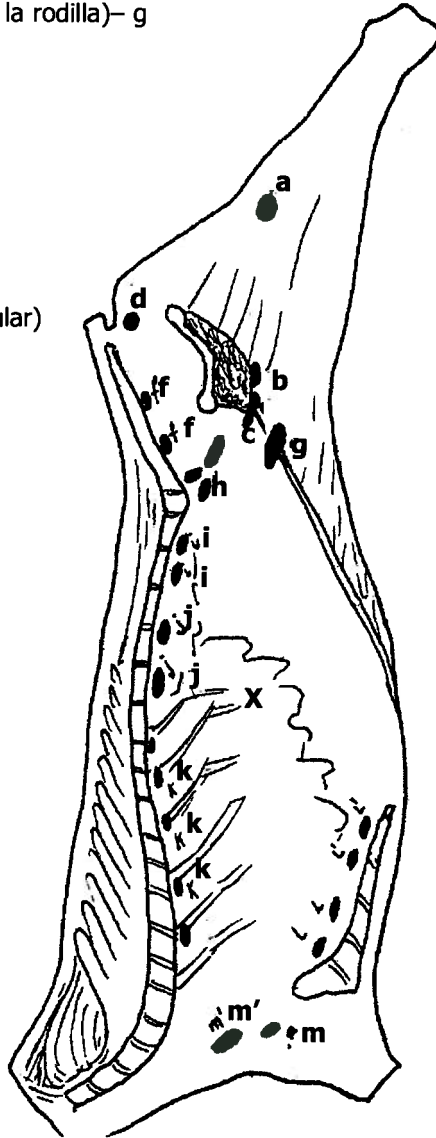
- Esternales:
 - Craneales- j
 - Caudales- j'

2 Ganglio axilar.

Este ganglio se descubre haciendo la prueba de May que consiste en levantar la espalda y poner al descubierto el plexo braquial y todo el tejido conjuntivo que recubre la región, para lo cual se seccionan los músculos trapecio-cervical, omotransversal y braquicéfalo siguiendo el borde del cartílago de prolongación de la escápula.

Gánglios de las paredes abdominales y pelvianas

- Poplíteo- a (situado en el hueco poplíteo)
- Supramamarios- b
- Inguinales- c
- Isquiático- d
- Epigástrico- e
- Sacrales- f
- Subílico o precurral (del pliegue de la rodilla)- g
- Iliacos- h
- Lumbares- i
- Renal- j
- Intercostales- k
- Externales:
 - Craneales- l
 - Caudales- l'
- Cervical:
 - Profundo- m
 - Superficial- m' (pre-escapular)



Es el ganglio más importante del cuarto posterior. Está situado en la parte anterior del músculo de la fascialata y del borde posterior del panículo. Es el ganglio conocido como del pliegue de la rodilla.

4 Ganglio poplíteo.

Es un ganglio profundo. Está situado en el vértice del ángulo formado por el perfil posterior de los gemelos de la pierna y el borde anterior del semimembranoso. Para ponerlo en evidencia se practica

una incisión en la grasa siguiendo la bisectriz del ángulo citado y en el fondo en el hueco poplíteo se encuentra dicho ganglio.

Además de estos pero de menor importancia se encuentran los ganglios **lumbares**, los **ilíacos**, los **sacros** y los **torácicos**, que aunque se encuentran en la canal, no son considerados como ganglios propios de la carne, porque la región aferente, donde reciben la linfa, corresponde a serosas, vísceras y también músculos pero de menor importancia.

Ganglios de los órganos pectorales

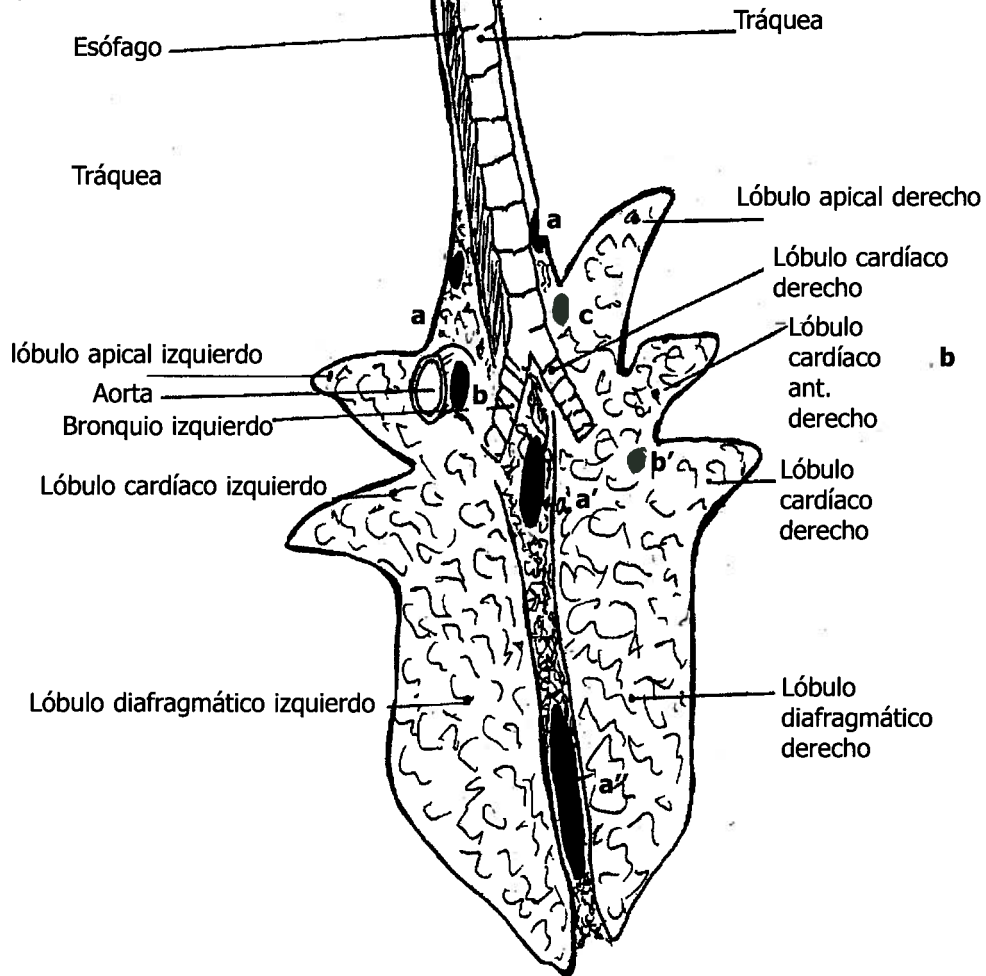
Mediastínicos:

- Craneales- a
- Medios- a'
- Caudales- a''

Bronquiales:

- Biurcationis sinistri- b
- Bifurcationes dexter - b'

Eparterialis- c



Ganglios linfáticos de los órganos abdominales y pelvianos

Linfocentro celiaco:

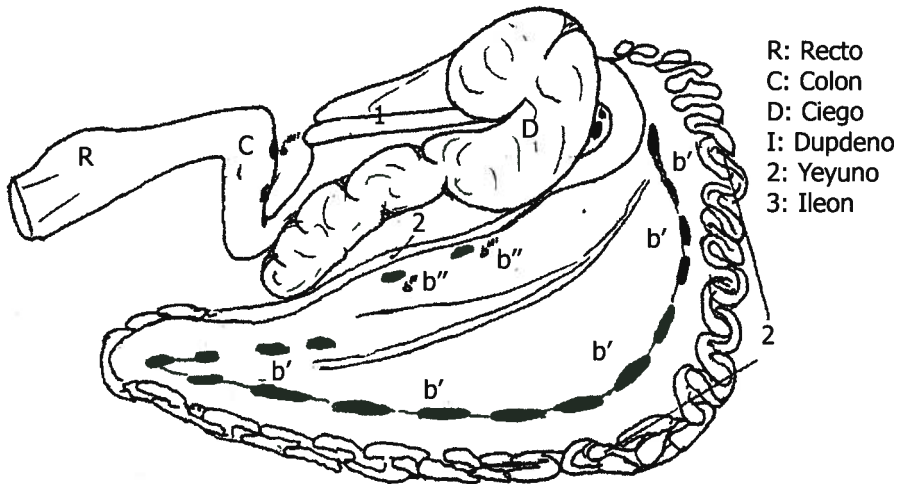
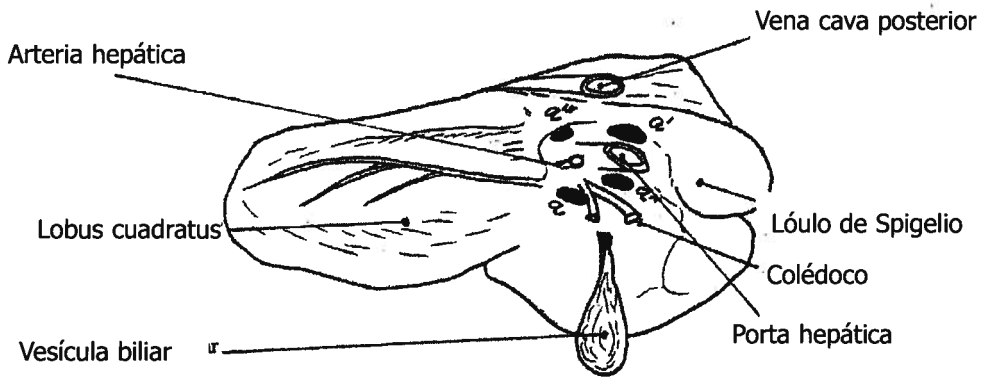
- Gánglios celíacos- a
- Gánglios gástricos- a'
- Gánglios hepáticos- a''

Linfocentro mesentérico craneal:

- Gánglios m. anteriores- b
- Gánglios linfáticos yeyunales- b'
- Gánglios iliaco- b''
- Gánglios cecales- b'''
- Gánglios cólicos- b''''

Linfocentro mesentérico caudal:

- Gánglios m. caudales- c



Fuensanta Gosálvez Luján.

Jefa del Dptº de Coordinación, Ensayos y Técnicas.
Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Córdoba

Antonio Paniagua Benito.

Ex-Director del Matadero Comarcal de Córdoba.

TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS AL LABORATORIO.

La toma y envío de muestras tiene como objeto la obtención de un resultado analítico que nos ayude en el diagnóstico de las enfermedades, nos dé datos del estudio de un proceso, respuesta de una vacuna o tratamiento, etc.

El éxito y valor final de examinar una muestra clínica en el laboratorio depende inicialmente del cuidado ejercido en la selección, recolección y envío de muestras. La muestra seleccionada debe ser la que sea más probable de contener el agente causal y se debe hacer un esfuerzo para evitar su contaminación con organismos del medio ambiente. Hay que tener en cuenta la cantidad y calidad, sin olvidar el bienestar del animal y la seguridad de la persona que realiza la toma.

Tan importante como la toma, es el envío donde hay que tener en cuenta la seguridad del envase, rapidez de llegada al laboratorio. En caso de duda para la toma, como para el envío, lo mejor es ponerse en contacto con algún responsable del lugar donde van a ser enviadas las muestras.

Es necesario saber que no todos los laboratorios son capaces por su tecnología de realizar cualquier analítica que sea solicitada, en realidad no existe ninguno que pueda hacerlo. Es necesario en caso de no conocer el centro de destino, informarse con anterioridad, para que el trabajo no sea inútil.

Procedimientos para la toma y envío de muestras al laboratorio.

Normas Generales: Para la adecuada recolección, conservación y envío de muestras, es indispensable tener presente las siguientes normas:

Toda muestra debe ser remitida con su historia clínica completa y perfectamente identificada.

Las muestras ideales se obtienen de animales vivos en distintos estadios de la enfermedad. Si es necesaria la necropsia, ésta debe guardar un orden y metodología adecuadas, además, debe realizarse al menor tiempo posible después de la muerte del animal (1 hora).

Las muestras para estudio bacteriológico deben tomarse antes de la administración de medicamentos y empleando siempre material estéril. Para evitar que la muestra se seque y lograr una adecuada conservación, en algunos casos es necesario utilizar medios de transporte.

Para la recolección de cualquier otro tipo de muestra, utilizar material limpio y seco.

Los envases utilizados para el envío de muestras deben ser en lo posible irrompibles, herméticos y de dimensiones adecuadas, el tiempo entre la obtención de la muestra y su llegada al laboratorio no debería ser superior a 24 horas.

Identificación de las Muestras: La identificación de las muestras es de primordial importancia para el laboratorio y deben estar acompañadas de la siguiente información:

- Ubicación completa.
- Especie, raza, sexo y edad del animal.
- Identificación o nombre del animal.
- Número de animales en la explotación.
- Porcentaje de morbilidad y mortalidad.
- Signos y síntomas.

- Tiempo de evolución de la enfermedad.
- Tratamiento efectuado.
- Vacunas aplicadas (número y fecha).
- En caso de necropsia, descripción de hallazgos macro.
- Tipo de muestras, fecha y hora de la toma.
- Sistema de conservación utilizado.
- Observaciones.

Embalaje y envío de muestras.

Considerando que las muestras biológicas son potencialmente infecciosas, se recomienda el transporte de manera adecuada y responsable, para lo cual se deben seguir las siguientes recomendaciones mínimas:

Como medio ideal de conservación, se utiliza la refrigeración.

La totalidad de las muestras recolectadas deben enviarse utilizando un sistema de doble caja. La caja interna, preferentemente debe de ser de un material aislante de temperatura externa, bajo peso y fácil manipulación.

Las muestras deberán ser enviadas en recipientes individuales y bien identificadas. Entre cada funda, frasco o recipiente se coloca un material que amortigüe los golpes, mantenga fija las muestras y absorba la humedad.

La información básica que acompaña las muestras se envía debidamente protegida, dentro de un sobre y en funda plástica, entre la caja interna y la externa.

La caja externa se cierra de tal manera que todas las esquinas y/o tapas queden selladas con cinta adhesiva (aumente la resistencia de la caja y garantiza el aislamiento de las muestras. Colocar con letra grande y clara:

¡Manéjese con cuidado. Material biológico refrigerado!.

Igualmente, pero de manera menos relevante anotar la dirección del laboratorio.

Muestras para cultivo bacteriológico:

Como dijimos anteriormente, las muestras para estudio bacteriológico deben tomarse antes de la administración de antibióticos y empleando material estéril.

Tejidos y órganos: De entre todos los órganos deben tomarse muestras de aquellos que se afecten o sean diana de la enfermedad o enfermedades que se sospechen. Si el animal es pequeño se cogerá entero y si es grande se tomarán trozos del mismo. En este último se harán de zonas afectadas. Basta con unos 50-100 gramos de cada órgano.

Debe evitarse contaminaciones cruzadas entre órganos.

Las porciones de intestino deben enviarse con los extremos atados o empacados individualmente.

Sangre entera y suero: La sangre (completa o para suero), se toma con jeringa estéril, o mejor con sistemas estériles de vacío, 10-20 ml. Son suficientes en la mayoría de los casos. La sangre entera se usa para análisis micro y virológicos o para detectar parásitos hemáticos, debiendo tenerse en cuenta que para algunos propósitos no sirve cualquier anticoagulante, ya que puede interferir las pruebas de laboratorio. La sangre completa nunca debe congelarse.

El suero se usa para pruebas de detección de anticuerpos. Una vez tomada la sangre sin anticoagulante se deja a temperatura ambiente y se espera a que se separe del coágulo. En ese momento se debe poner en refrigeración.

Muestras de piel: Son muchas enfermedades de la propia piel, como aquellas que no siéndolo producen lesiones en la misma.

En los procesos bacterianos y micóticos, son necesarios raspados en profundidad, que den material suficiente en cantidad y calidad.

Isopos: Son la forma preferida para enviar muestras de secreciones (nasal, franjea, ocular, cutánea, cervical, vaginal, etc.), exudados, contenido de absesos, etc., introducidos en medio de transporte adecuado (medios de transporte) y enviados en refrigeración.

Heces: Las muestras fecales deben ser recolectadas directamente del recto del animal para evitar contaminación, puestas en un envase hermético y enviadas en refrigeración. Se debe evitar el envío de excretas expuestas al medio ambiente. En caso de animales grandes, la muestra puede ser enviada dentro del mismo guante plástico que se utilice para su recolección.

Leche: Las muestras se deben recolectar asépticamente en envases estériles, con tapa de rosca. Se recogerán de varios pezones, tras limpiar los mismos. Se descartará la leche del principio y del final del ordeño o los primeros chorros si la toma se hace fuera del mismo. Las muestras se deben refrigerar inmediatamente y deben ser enviadas al laboratorio lo antes posible.

Orina: Se utiliza un recipiente estéril; el sondeo vesical es la forma ideal para evitar la contaminación, en su defecto, la micción espontánea es la técnica aconsejable. La muestra debe enviarse al laboratorio en refrigeración.

Cerebro: Se toma la mitad del cerebro y se envía al laboratorio en refrigeración.

Técnicas para recolección de muestras para virología.

El diagnóstico de las enfermedades virales en términos generales, puede requerir de suero, exudados (enfermedades vesiculares) y tejidos con el fin de llevar a cabo pruebas serológicas, aislamiento del virus y estudios estructurales.

Las muestras deben ser frescas, tomadas con asepsia, de preferencia durante el periodo agudo de la enfermedad y no debe añadirseles fijadores o antisépticos. Si se demora su llegada al laboratorio, se deben enviar congeladas.

Cuando se sospeche de una enfermedad viral, el diagnóstico serológico se comprueba tomando dos muestras de los mismos animales (sueros pareados) durante el periodo agudo del brote y tres semanas después. El resultado positivo (+) con una sola muestra de suero tiene un valor diagnóstico muy limitado.

Técnicas para recolección de muestras de tejidos (histopatología).

Al cortar, las muestras deben contener una parte del tejido afectado junto a otra de aspecto normal.

El grosor de la muestra depende del tejido, pero por lo general no debe ser mayor de 0,5 cm.

Colocar la muestra en un frasco que contenga formol al 10%, amortiguado a un pH de 7,2 y en un volumen no menor a 10 veces el tamaño de la muestra.

Los recipientes para las muestras deben ser de boca ancha para que puedan salir íntegras y fácilmente.

Las muestras para estudio histológico nunca deben congelarse.

ANATOMÍA PATOLÓGICA COMPARADAS

Servicio de Diagnóstico
Campo de Rabanales
Ctra de Madrid, s/nº
14014 Córdoba

SOLICITUD DE ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

NECROPSIAS

Nº / FECHA:

DATOS DEL ANIMAL: Referencia/nombre

Especie: Raza: Sexo: M H Castrado Edad:

VETERINARIO:

Centro/Clínica
Dirección:

Teléfono: Fax:

PROPIETARIO:

Nombre:
Dirección

Teléfono: Fax:

FORMA DE PAGO:

Efectivo

Cheque nominativo

Domiciliación Bancaria

Entidad _____

Cuenta _____

HISTORIA CLÍNICA

Síntomas y evolución:

Animales nº: Morbilidad: Mortalidad: Edad:

Tratamientos:

Alimentación:

Modo de vida:

Vacunaciones:

Tipo de muerte: *Eutanasia/Enfermedad*

Tiempo aproximado de la muerte: Conservación del cadáver: Ambiente frío/Congelación

ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS:

Sangre:

Orina:

Heces:

Leche:

Exudados:

DIAGNÓSTICO CLÍNICO PRESUNTIVO:

OBSERVACIONES MACROSCÓPICAS
Estado General:
Posición del cadáver: Costado derecho/izquierdo
Sistema Tegumentario: Piel: Mucosas explorables:
Sistema Locomotor:
Sistema Cardiovascular:
Aparato Respiratorio:
Aparato Digestivo:
Aparato Urinario:
Sistema Reproductor:
Sistema Linfoide:
Sistema Endocrino:
Sistema Nervioso:
DIAGNÓSTICO MACROSCÓPICO:

Miguel Ángel González García.
Jefe de Servicio de Sanidad Animal.
Consejería de Agricultura y Pesca.

EL SISTEMA INMUNE: FUNDAMENTOS APLICADOS AL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS DE LOS ANIMALES DOMESTICOS.

INTRODUCCIÓN.

Los animales domésticos viven en un entorno lleno de microorganismos de muy variada índole. Su convivencia secular permite que hayan evolucionado y se hayan seleccionado de manera conjunta, desarrollando unos y otros diversos mecanismos que han permitido su supervivencia y perpetuación. Por una parte, los microorganismos han aprendido muy variadas formas de agresión con el propósito de aprovechar los recursos que les proporcionan los animales superiores para mantener su material genético. De otra, los animales superiores han desarrollado mecanismos destinados a impedir o defenderse de la colonización de los microorganismos. Este proceso evolutivo se ha repetido ininterrumpidamente a lo largo de la historia, lo que ha conducido a la aparición, en los agentes patógenos, de estrategias de evasión de las defensas desarrolladas por los animales y, en los domésticos, de procesos de perfeccionamiento y maduración de las barreras de defensa frente a las infecciones.

El sistema inmune es el encargado de proteger a los animales de los microorganismos infecciosos y sus productos tóxicos. Para ello, posee un vigoroso rango de recursos que incluye un método para localizar, atrapar y procesar macromoléculas, virus o células extrañas, un mecanismo de reacción específica mediado por células sensibles y un sistema de memoria para futuros encuentros.

ANTÍGENOS.

Se denominan **antígenos** a todas las moléculas que son reconocidas como extrañas por el sistema inmune y que provocan una respuesta por parte de éste. La antigenicidad está asociada a algunas características de la molécula como son su tamaño (cuanto más grande mejor), su complejidad, su estabilidad estructural (flexibilidad), su degradabilidad y su carácter extraño.

Una vez reconocidos como extraños, se produce una estimulación del sistema inmune para responder de manera adecuada. Esta capacidad de producir respuesta se denomina inmunogenicidad.

Dentro de cada antígeno se reconocen determinadas partes como extrañas, a las que se denominan **epitopos**.

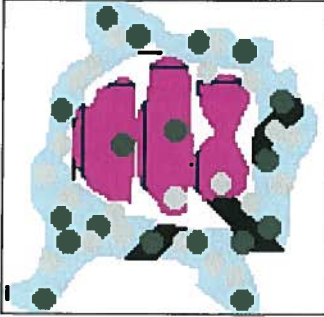
En algunas ocasiones, moléculas extrañas de pequeño tamaño (< 1.000 Da) denominadas haptenos, pueden no ser reconocidas por el sistema inmune si no van unidas a una proteína que actúa como portadora. La unión del hapteno con su portador sí constituye un epitopo desde el punto de vista funcional (p.e. penicilina+albúmina).

CÉLULAS FAGOCÍTICAS DEL SISTEMA INMUNE.

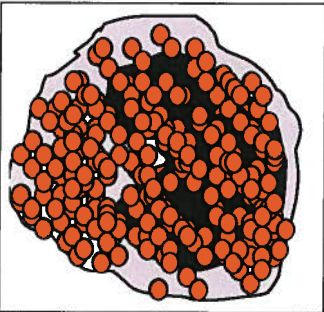
Todas las funciones del sistema inmune se desarrollan por la actividad de determinadas células o los productos liberados por ellas. De la destrucción del material extraño, mediante el fenómeno de la fagocitosis (Metchnikoff, 1.882), se encargan dos sistemas complementarios. Uno de ellos, llamado sistema mieloide, está formado por células que actúan con rapidez pero que son incapaces de mantener un esfuerzo continuado. El segundo sistema, el de los fagocitos mononucleares, está formado por células que actúan con más lentitud pero que son capaces de fagocitosis repetidas.

a). -Sistema mieloide.

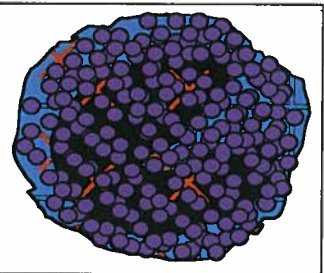
Todas las células del sistema mieloide se derivan de precursores localizados en la médula ósea. Su citoplasma posee gran cantidad de gránulos, por lo que reciben el nombre de **granulocitos**. Todas poseen un núcleo irregular, extensamente lobulado y por ello se describen como **polimorfonucleares**. A su vez, pueden dividirse en tres grupos basándose en las características tintoriales de sus gránulos. Las células cuyos gránulos incorporan colorantes básicos se denominan basófilos; aquellos cuyos gránulos incorporan colorantes ácidos se denominan eosinófilos, y aquellas que no incorporan colorantes ácidos ni básicos, se denominan neutrófilos.



El **neutrófilo**, es el tipo más abundante e importante del sistema mieloide. Constituye entre el 60 y 75% de los leucocitos sanguíneos en los carnívoros y entre el 20 y 30% en los rumiantes. Se forman en la médula ósea y emigran hacia la corriente sanguínea donde permanecen unas doce horas antes de desplazarse hacia el interior de los tejidos. Poseen dos tipos de gránulos, los principales se denominan azurófilos y contienen enzimas microbicidas, proteasas e hidrolasas ácidas. Los gránulos secundarios o específicos poseen enzimas del tipo de la lisozima y la colagenasa. La función principal de los neutrófilos es la captura y destrucción de material extraño por medio de la fagocitosis.



Los **eosinófilos** abandonan la médula ósea en un estado relativamente inmaduro y se mueven de manera directa (en tan sólo 30 minutos), hacia el bazo donde alcanzan la madurez. Subsecuentemente, migran a los tejidos donde tienen una vida media de doce días. Hay aproximadamente 500 eosinófilos en los tejidos por cada uno que es observado en la sangre. Poseen gránulos que contienen fosfatasas y peroxidasas. Su función principal, al igual que el neutrófilo, es la de ingerir y destruir material extraño. Son capaces de fagocitar partículas pequeñas, pero son más adecuados para la destrucción extracelular de parásitos grandes.



Los **basófilos** son menos numerosos que los anteriores. No se encuentran, por lo general, en los tejidos aunque pueden infiltrarse bajo la influencia de los linfocitos. En los tejidos provocan inflamación, ya que sus gránulos poseen amina vasoactivas, como la histamina y la serotonina.

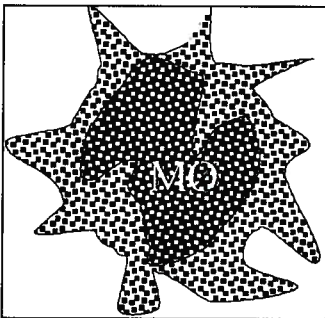
Las **plaquetas** pueden fijar e ingerir bacterias (pseudofagocitosis) siendo luego retiradas de la circulación por el sistema fagocítico mononuclear.

b). - Sistema fagocítico monocuclear.

El sistema fagocítico mononuclear es un conjunto de células con capacidad fagocítica sostenida. Además, poseen otras funciones importantes que las diferencian de las células de la serie mieloide.

- Procesamiento y presentación de antígenos.
- Liberación de mediadores solubles que amplifican la respuesta inmune.
- Control de la inflamación.
- Reparación de los daños tisulares, retirando los tejidos dañados y cooperando en la restauración de los mismos.

Las células de este sistema están distribuidas por todo el organismo. Así, se denominan monocitos en la sangre, histiocitos en el tejido conjuntivo, células de Kupffer en el hígado, células de microglía en el sistema nervioso y macrófagos alveolares en el pulmón.

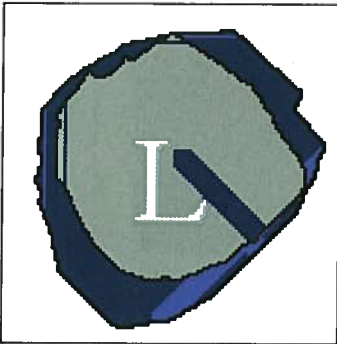


Aunque con formas diversas, tienen en común un único núcleo de forma más o menos redondeada, un citoplasma abundante con organelas preparadas para la síntesis y la secreción de proteínas y un citoplasma periférico sin organelas y en continuo movimiento.

Todas las células proceden de los monoblastos de la médula ósea, la cual abandonan en forma de promonocitos hacia la sangre donde se transforman en monocitos y finalmente se dirigen a los tejidos en forma de macrófagos.

LINFOCITOS.

Los linfocitos son las células que componen el sistema inmune específico. Son células redondeadas de pequeño tamaño, poseen un núcleo grande y redondo que se tiñe de manera intensa y uniforme.



Los linfocitos T y B son células indistinguibles morfológicamente entre sí. Sin embargo, se pueden definir subpoblaciones con base en sus receptores de superficie. Proceden de la médula ósea y maduran y se diferencian en los dominios T y B, respectivamente, de los órganos linfoides primarios y secundarios. Los linfocitos T suponen un 80% de los linfocitos circulantes, correspondiendo un 20% a los linfocitos B. Las células T tienen una vida larga (6 meses a 10 años) en comparación con los linfocitos B (de 5 a 7 semanas).

Hay un tercer tipo de linfocitos denominados células mortíferas naturales (NK) que no responden ni a las características de los linfocitos T ni a las de los linfocitos B. Son granulares y grandes en comparación con los otros tipos y poseen una mayor proporción de citoplasma.

ÓRGANOS LINFÓIDES.

Las reacciones inmunes ocurren en el interior de determinados órganos denominados linfoides. En ellos se dan las condiciones para la interacción eficiente entre los linfocitos, los macrófagos, las células dendríticas y los antígenos.

1. Fuentes de linfocitos.

Durante el periodo embrionario los linfocitos se forman en el saco vitelino y el hígado. Desde el final de la gestación la médula ósea es la fuente principal de linfocitos. Éste órgano es capaz de suministrar todas las células necesarias para restaurar las funciones del sistema inmune y es el órgano hematopoyético principal. Además, es un órgano linfóide primario (excepto en rumiantes) y el lugar donde se procede el 75% de los anticuerpos.

2. Órganos linfoides primarios:

Los órganos linfoides primarios son aquellos que regulan la producción y diferenciación de las distintas clases de linfocitos. Son el timo, la piel, la bolsa de Fabricio en las aves, las placas de Peyer y la médula ósea.

En el **timo** se destruyen los timocitos (precursores de los linfocitos T) que responden a los antígenos propios y que por lo tanto son indeseables. En sentido contrario, estimula la proliferación de los que responden a los antígenos extraños. Estas actividades las realiza por medio de las células nodrizas que son capaces de fagocitar hasta 50 timocitos simultáneamente. Además, en el timo se produce y segrega una hormona linfoestimulante denominada timulina.

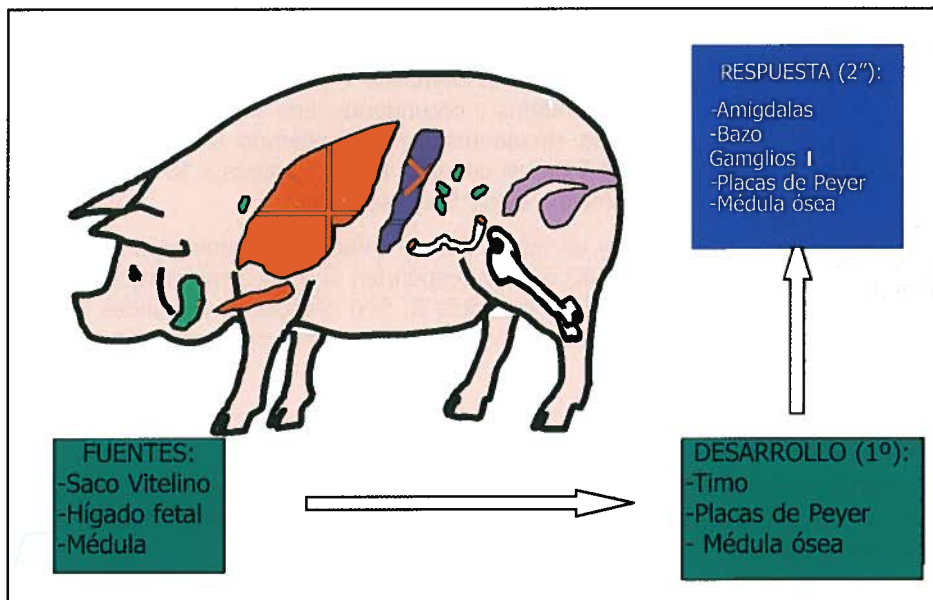
La **piel** tiene el mismo origen embrionario que el timo y en ella se desarrolla una subpoblación específica de linfocitos T.

La **bolsa de Fabricio**, de las aves es un lugar de proliferación y maduración de linfocitos B que son los responsables de la producción de anticuerpos.

Las **placas de Peyer** son acumulaciones de tejido linfoide del intestino. En los rumiantes son un órgano linfoide primario. Existen dos tipos con morfología y funciones diferentes. Las placas de Peyer ileocecales, descritas sólo en los rumiantes, constan de folículos linfoides densamente dispuestos y poseen células B, mientras que las yeyunales, con forma de pera, poseen tanto células B como T. La médula ósea es un órgano linfoide primario en las especies no rumiantes y hace las funciones de las placas de Peyer ileocecales, con respecto a las células B, en el resto de las especies.

3. Órganos linfoides secundarios.

Se originan en el mesodermo en una etapa tardía del desarrollo fetal y persisten toda la vida del animal. Se encargan de la estimulación antigénica. Son muy ricos en macrófagos y células dendríticas. Actúan a manera de filtros eficaces que atrapan antígenos, los presentan y estimulan al resto de células del sistema inmune. Su estructura está adaptada a ofrecer las máximas oportunidades a los antígenos procesados para que sean presentados a las células sensibles a ellos.



Los ganglios linfáticos son órganos a través de los cuales fluye la linfa procedente de los tejidos a través de los vasos aferentes. La linfa abandona el ganglio por los vasos eferentes hacia otros vasos de mayor tamaño y de allí al conducto torácico para evacuarse definitivamente en la vena cava. Los linfocitos usan la vía sanguínea para llegar a los ganglios y órganos. Si no han encontrado su antígeno, pasan de nuevo a la vía sanguínea.

A pesar de su número aparentemente alto en la sangre, hay un 2% de los linfocitos de todo el organismo. Para entrar en los órganos linfoides deben unirse a las células endoteliales y atravesar su espacio de separación por medio de la diapédesis.

Los antígenos son transportados desde el lugar de la infección por flujo tisular (linfa) hacia los ganglios linfáticos regionales. Los macrófagos medulares captan los antígenos no unidos a anticuerpos y los presentan a los linfocitos T y B para producir una respuesta primaria. En el caso de un contacto anterior con el agente, los antígenos unidos a sus anticuerpos son retenidos por las células dendríticas y los presentarán a los linfocitos para desencadenar una respuesta secundaria basada en la memoria.

El **bazo** hace las mismas funciones que los ganglios pero filtran la sangre en vez de la linfa. Por ello es un órgano muy importante durante las bacteriemias o viremias consecuentes a la generalización de una enfermedad infecciosa. Además, realizan una función hemocaterética consistente en la eliminación de células sanguíneas viejas. Por último el bazo acumula células sanguíneas de reserva que puede poner en circulación si las circunstancias lo requieren.

Al final de la respuesta primaria las células de memoria abandonan los órganos linfoides y colonizan la médula ósea. Es precisamente en este órgano donde se producirán las grandes cantidades de anticuerpo que caracterizan a este tipo de respuestas.

MOLÉCULAS QUE RECONOCEN EL ANTÍGENO.

El reconocimiento de un antígeno extraño es el punto crucial de la respuesta inmune adaptativa. Dentro de este apartado vamos a estudiar tres tipos diferentes de moléculas:

1. Los anticuerpos.
2. Los receptores de los linfocitos.
3. Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad.

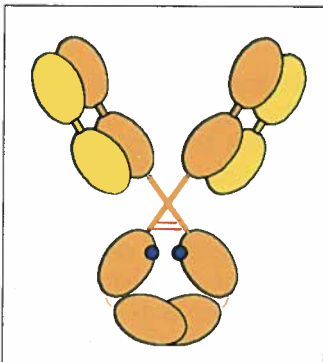
1. LOS ANTICUERPOS.

Los anticuerpos son moléculas de naturaleza proteica producidas por las células B y las células plasmáticas. Se producen tras la interacción del antígeno con el receptor específico de las células B (anticuerpo fijado a la membrana). Una vez estimuladas las células B proliferan para producir células de memoria y células productoras y secretoras de anticuerpos (células plasmáticas). Se producen fundamentalmente por las células plasmáticas de la médula ósea desde donde son secretados en grandes cantidades al torrente sanguíneo con objeto de que lleguen rápidamente a todos los tejidos. Los anticuerpos secretados se unen específicamente al tipo de antígeno que originó su producción con objeto de neutralizarlo y destruirlo.

Por su movilidad electroforética se pueden clasificar como γ -globulinas (son las que migran a menor velocidad hacia el polo positivo) del suero.

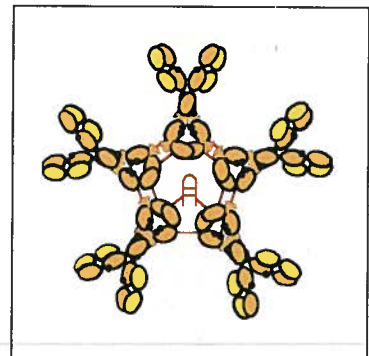
La unidad básica de un anticuerpo está constituida por dos cadenas ligeras y dos pesadas dispuestas en forma de Y. Cada cadena está formada por regiones constantes y variables que se disponen de forma coincidente. Dentro de las regiones variables existen zonas hipervariables que debidamente plegadas constituyen el paratopo que es el lugar de reconocimiento del antígeno.

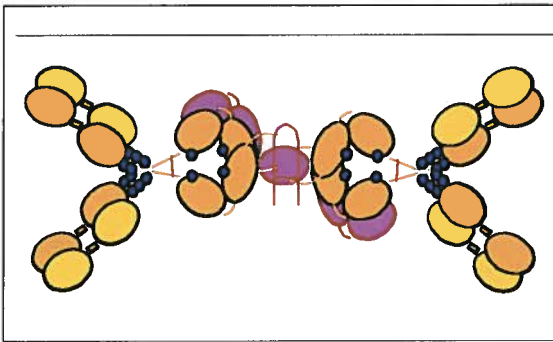
Cada clase de anticuerpo se caracteriza por poseer un tipo diferente de cadenas pesadas. Hay cinco tipos que se denominan con letras del alfabeto griego α , μ , γ , δ , y ϵ para las IgA, IgM, IgG, IgD e IgE, respectivamente. En el caso de las cadenas ligeras también existen dos tipos denominados κ y λ . Las moléculas de anticuerpos poseen cualquiera de las cadenas pesadas pero nunca los dos tipos en el mismo anticuerpo.



La **IgG**, es la clase más abundante de anticuerpo en el suero. Es de pequeño tamaño y abandona con facilidad el torrente circulatorio para llegar a los tejidos. Puede opsonizar, aglutinar y precipitar a su antígeno específico. También participa en la activación del complemento por la vía clásica. Para ello es necesario que esté unida a su antígeno lo que provoca los cambios de conformación necesarios para dejar expuesto el lugar de unión al complemento que se sitúa cerca de la región bisagra.

La **IgM**, es la segunda en concentración sanguínea. Se compone de cinco monómeros enlazados en forma de estrella por una secuencia denominada cadena J. Es muy importante en la respuesta primaria (sin memoria), aunque se produce igualmente en la respuesta secundaria. Resulta mucho más eficiente que la IgG en sus funciones, pero debido a su gran tamaño queda confinada al torrente sanguíneo.





La **IgA**, es monomérica en su inicio. Se enlaza por medio de una cadena J para formar un dímero activo y finalmente se une con un componente secretor antes de abandonar la superficie de las mucosas donde actúa principalmente. Es el componente de mayor importancia en las secreciones externas, sobre todos en las especies no rumiantes. Su principal acción es la de aglutinar a las bacterias y virus para impedir su adhesión a los epitelios o superficies corporales y consecuentemente su invasión.

La **IgE**, es una inmunoglobulina de forma típica. Está casi ausente en el suero. Es el mediador de las reacciones alérgicas y está ligada a las infecciones producidas por los helmintos. Se une a los receptores de los basófilos en la sangre y a su equivalente en los tejidos (mastocitos), provocando su degranulación y la secreción de las aminas vasoactivas características de este tipo de respuestas. Su vida media es extremadamente corta.

La **IgD**, tiene igualmente una forma típica. Posee una región bisagra prolongada y sin enlaces disulfuro lo que la hace muy sensible a la proteólisis. Actúa como receptor de las células B junto con la IgM monomérica con la que parece estar relacionada si es que son distintas.

La **IgN** es un anticuerpo de bajo peso molecular descrita en los patos. Puede considerarse como una subclase de IgG en esta especie.

ESPECIE	IgG	IgA	IgM	IgE	IgD
Caballo	Ga,b,c	A	M	E	?
Vaca	G1, 2a	A	M	E?	?
Oveja	G1,2	A ₁ ,A ₂	M	E	?
Cerdo	G1, 2,3,4	A ₁ ,A ₂	M	E	D
Perro	G1, G2abc	A	M	E	?
Pollo	G1	A	M	?	D
Ratón	G1,G2abc	A ₁ ,A ₂	M	E	D
Hombre	G1,2,3,4	A ₁ ,A ₂	M ₁ ,M ₂	E	D

Producción de anticuerpos.

Las células pre-B se producen en la médula ósea poseyendo la capacidad de producir un solo tipo de paratopo. A continuación se dirigen a los órganos linfoides primarios donde maduran (Placas de Peyer, en los rumiantes, Bolsa de Fabricio en las aves y médula ósea en el resto). Desde allí colonizarán los órganos linfoides secundarios (bazo, ganglios y médula ósea) donde tendrán la oportunidad de contactar con su antígeno específico.



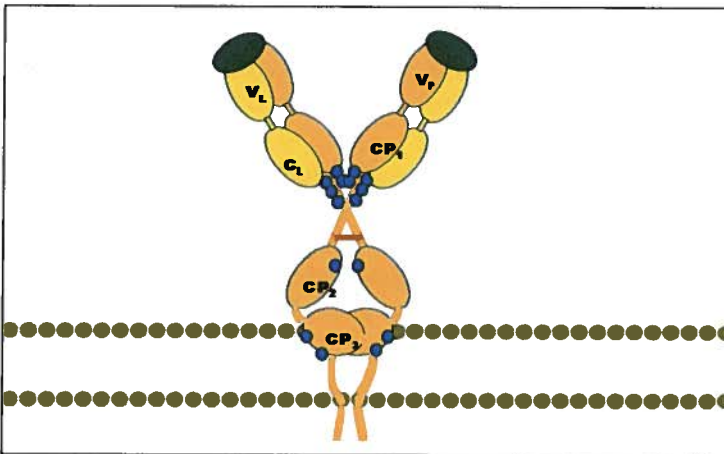
La especificidad del anticuerpo que es capaz de producir cada célula B, se produce al azar lo que significa que existe una gran probabilidad de que se generen, en la médula ósea, células con anticuerpos dirigidos contra componentes del animal donde se producen. Cuando llegan a los órganos linfoides primarios, las células B autorreactivas son eliminadas. A este fenómeno se le denomina selección clonal ya que impedirá que se generen clones de células autorreactivas en el futuro. En el caso poco probable de que alguna célula B autorreactiva no fuese eliminada convenientemente, existe un segundo mecanismo de seguridad que garantiza la

protección del huésped. Ésta consiste en la necesaria participación de una célula T de la misma especificidad y que por ser autorreactiva igualmente debe haber sufrido la delección clonal.

Las células B poseen en su superficie y ligadas a la membrana, moléculas de anticuerpo que actúan como receptores y que reconocen a su antígeno específico. Una vez que se produce el contacto, la célula B está en condiciones de activarse y proliferar para producir dos líneas descendientes. La primera está formada por las **células plasmáticas** que son un tipo especializado de células B. Son de mayor tamaño y poseen gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso destinado a la producción y secreción de anticuerpos. La otra línea la constituyen las **células B de memoria**, que colonizan la médula ósea, La velocidad de transformación de las células B de memoria en células plasmáticas es muy alta y las células plasmáticas así formadas producen grandes cantidades de IgG, típicas en las reacciones secundarias.

2. LOS RECEPTORES DE LOS LINFOCITOS.

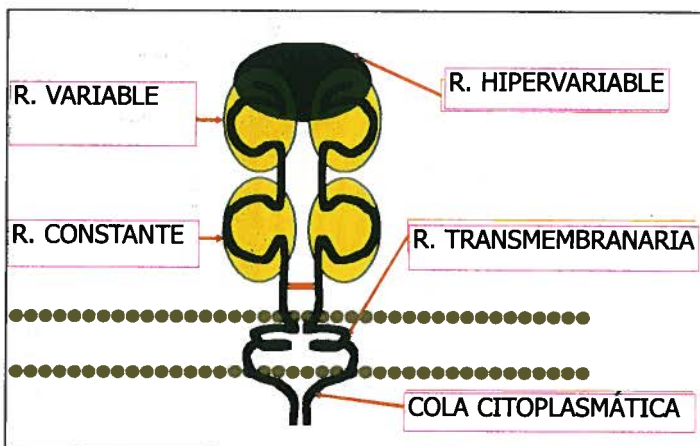
Como se ha visto con anterioridad, el receptor de los linfocitos B es una molécula de IgM o IgD ligada a la membrana.



El reconocimiento de los antígenos por parte de los linfocitos T tiene una importancia decisiva para producir y regular la respuesta inmune. Este reconocimiento se realiza a través del receptor de células T denominado TCR.

Los receptores de las células T tienen varios rangos en común con los anticuerpos. Se encuentran unidos a la superficie de la membrana. Consisten en un heterodímero, formado por dos cadenas polipeptídicas, denominadas alfa/beta o gamma/delta. Cada cadena se divide

en cuatro regiones o dominios de la que el primero es variable y los tres restantes son constantes. El tercer dominio atraviesa la membrana y está formado por unos 20 aminoácidos y el cuarto, . E corto y se encuentra dentro del citoplasma. Las cadenas están enlazadas por un puente disulfuro. Las regiones variables apareadas constan de un área hipervariable que forma el lugar de unión al antígeno.



3. COMPLEJO MAYOR DE HISTO-COMPATIBILIDAD.

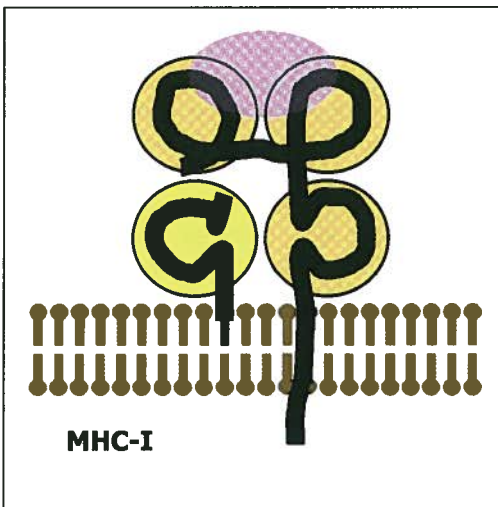
Desde los primeros intentos del trasplante quirúrgico de tejidos u órganos se observó que los receptores de los mismos rechazaban los tejidos del donante transcurrido algún tiempo. El rechazo correspondía a una reacción inmunitaria frente a los antígenos del tejido, que eran reconocidos como extraños. Estos antígenos son proteínas de superficie celular a las que se denominó antígenos de histocompatibilidad.

Cada animal individual posee sus propios antígenos de histocompatibilidad característicos. A aquellos que resultan de mayor potencia (immunogenicidad) para provocar el rechazo de injertos, se denominan antígenos mayores de histocompatibilidad y se heredan a través de la actividad de un conjunto ligado de genes conocido con el nombre de **complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)**. Con posterioridad se descubrió que estas moléculas estaban implicadas en la regulación de la respuesta inmune.

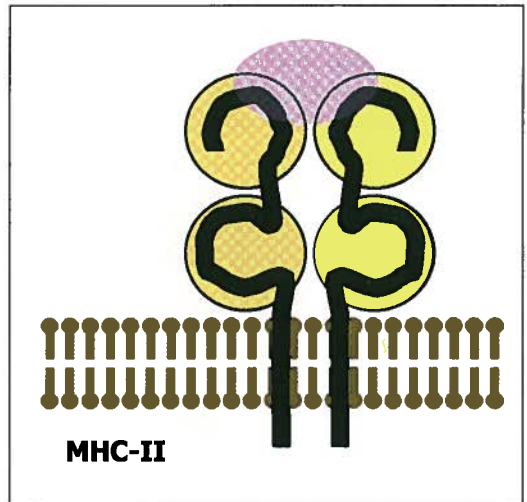
A diferencia de los linfocitos B, las células T no pueden reconocer a los antígenos intactos. Requieren que sean fragmentados en el interior de las células en cadenas cortas, de unos 15 a 20 aminoácidos. Una vez se ha unido a las moléculas del MHC, el fragmento es transportado hacia la membrana y, de esta manera, puede ser reconocido por los linfocitos T.

Al igual que ocurre con los anticuerpos y los receptores de las células T, las moléculas de MHC, consisten en cadenas polipeptídicas plegadas que dejan una ranura de unión para el antígeno. Los antígenos del MHC se dividen en varias clases, de las que nos interesan la I y II en este momento. Aunque existen diferencias significativas entre las cadenas polipeptídicas y la estructura de las moléculas MHC, de las clases I y II, el hecho de mayor relevancia lo constituye la distribución tisular de unos y otras.

Los antígenos de clase I del MHC (**MHC-I**), se encuentran en la superficie de la mayoría de las células nucleadas. Actúan como receptores para los péptidos producidos cuando se procesan proteínas endógenas, dentro de una célula. De esta manera, los antígenos MHC-I controlan el reconocimiento de antígenos extraños sintetizados de manera endógena por los linfocitos y participan en la destrucción de las células infectadas por virus y las células tumorales.



Los antígenos de clase II (**MHC-II**), tienen una diferente distribución tisular ya que se encuentran en las células del sistema inmunitario, especialmente en las células presentadoras del antígeno (macrófagos, dendríticas y linfocitos B), y en algunas células T activadas.



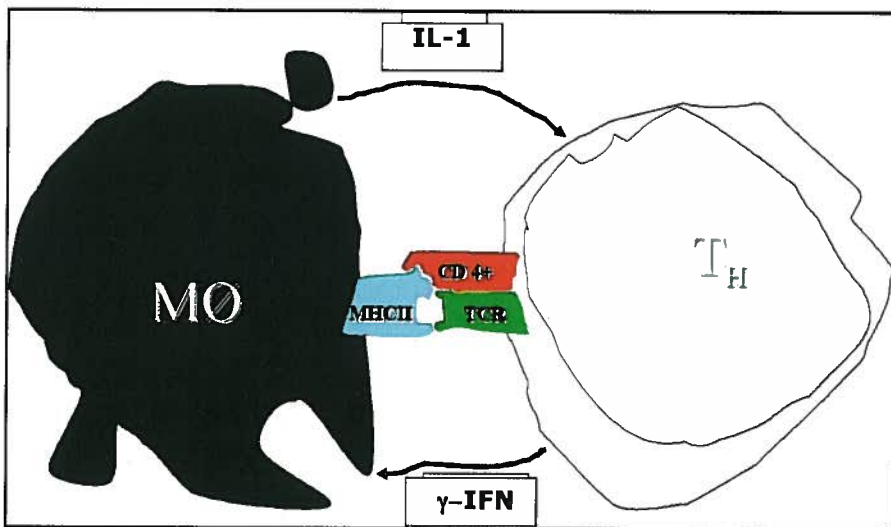
LA COOPERACION CELULAR.

Si los fagocitos pudieran ingerir y destruir todos los antígenos no sería necesario poseer un sistema de defensa adaptativa capaz de provocar una respuesta específica. Cuando esto no es posible, los fagocitos tienen la capacidad de procesar los antígenos y presentarlos a los linfocitos.

Para que se inicie una respuesta inmune adecuada es necesario que se produzcan dos hechos de forma simultánea. Uno, es el reconocimiento del antígeno por una molécula apropiada, y el otro, la estimulación o activación celular. Por otro lado las células viejas, infectadas o tumorales es necesario destruirlas y eliminarlas para evitar las consecuencias de su mal funcionamiento. Es necesario, por tanto, la existencia de algún mecanismo que evite la estimulación indebida de células que deben ser destruidas y viceversa. Para ello todas las células de los animales poseen entre las proteínas de la membrana celular una serie de receptores específicos que identifican a cada individuo de manera inequívoca, Estas proteínas tienen carácter antigénico y son las responsables del rechazo de los injertos y trasplantes de tejidos extraños y se les denomina antígenos del sistema mayor de histocompatibilidad (MHC). Además de este efecto inconveniente en los trasplantes, las moléculas de MHC, tienen un destacado papel en el control de las reacciones del sistema inmunitario.

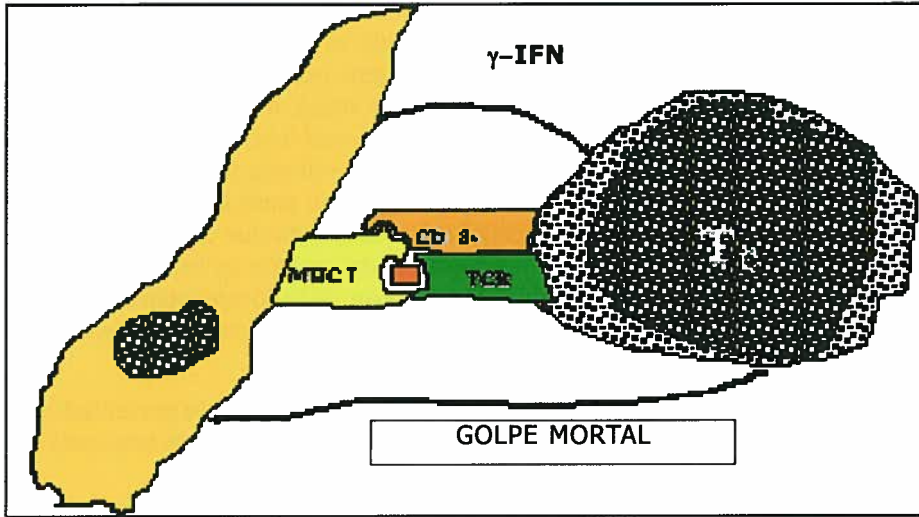
Tenemos pues la necesidad de reconocer el antígeno, correctamente presentado, y de identificar adecuadamente el tipo de célula que lo posee con objeto de dar la respuesta adecuada (estimulación o destrucción).

Los **antígenos exógenos**, o extracelulares son ingeridos, principalmente, por los macrófagos e incluidos en el interior de fagosomas. Con posterioridad se produce la fusión con los lisosomas (gránulos). Dentro de los fagolisosomas se produce una degradación proteica que reduce las proteínas a fragmentos cortos de unos 10 a 20 aminoácidos. Más tarde esos fragmentos se unen a una molécula de MHC de clase II, que finalmente emerge a la superficie, y son presentados a los linfocitos. Esta presentación es necesaria pero no suficiente para desencadenar la respuesta. Cuando los linfocitos se unen necesitan una señal adicional del macrófago que consiste en la producción por parte de éste último de la IL-1. El linfocito responde mediante la secreción de otro mediador denominado interferón (IFN- γ) que lo convierte en un macrófago activado con capacidades reforzadas de destrucción bacteriana.



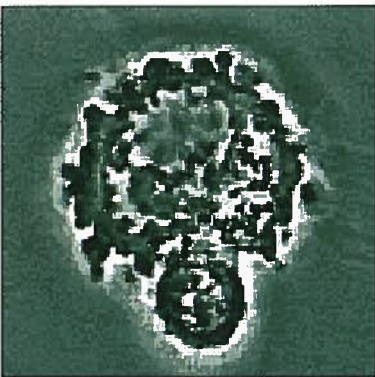
Los **antígenos endógenos** son aquellos que se forman en el interior de las células infectadas por un virus. Pueden ser elementos constituyentes o no del virus y la célula infectada, siguiendo un mecanismo similar a los antígenos exógenos, los presenta en la superficie asociados a las moléculas de MHC de clase I. EN este caso, si un linfocito detecta el antígeno asociado al MHC-I, entiende que la célula que lo porta está infectada, y que, por tanto, debe ser destruida.

Como puede desprenderse de lo anterior, el hecho de que las células defensivas (fagocitos, células dendríticas y células B) expresen MHC-II y el resto de las células expresen MHC-I se traduce en una respuesta diferente y adecuada a cada situación.



Los linfocitos T, pueden subdividirse en dos poblaciones con papeles completamente diferentes. Los **linfocitos T cooperadores (Th)**, son aquellos que se encargan de estimular al resto de las células defensivas. Para ello emplean un repertorio de mediadores solubles llamados linfocinas. Éstas actúan sobre los macrófagos para convertirlos en macrófagos activados como se describió anteriormente. También están sobre las células B para convertirlas en linfocitos B activados con capacidad de proliferación hacia las células plasmáticas y de memoria y sobre los linfocitos citotóxicos para transformarlos en células efectoras con capacidad de agresión. Los linfocitos Th, por tanto, son la pieza clave de las respuestas humoral y celular. Su función está determinada por la expresión de un receptor denominado CD4 que es la molécula que reconoce al MHC-II, sobre los tipos de células descritos.

La otra estirpe de células T son los **linfocitos T citotóxicos (Tc)**. Éstos son los responsables de la inmunidad específica de tipo celular y se caracterizan por expresar el marcador CD8, que es la molécula capaz de reconocer al MHC-I en las células infectadas. Una vez reconocido el antígeno y la molécula MHC-I, está en condiciones de ser activada por los Th y descargar contra ella todo su arsenal enzimático lo que conducirá a la muerte por apoptosis (desintegración nuclear).



Esta actividad es denominada citotoxicidad y es la función efectora más importante llevada a cabo por las células T. Todos los microorganismos intracelulares que afectan al animal son eliminados por este mecanismo.

Los antígenos que disparan la respuesta de las células T no son fagocitados, sino que se producen en el interior de la célula infectada y se expresan en la superficie asociados a MHC-I. Allí son reconocidos por los linfocitos T CD8+ a través de su receptor TCR. Una vez que ha recibido el estímulo se convierte en linfoblasto que producirá más células citotóxicas específicas y células T de memoria. Las células citotóxicas se adhieren a las células infectadas y le asestan un "golpe mortal" al liberar el contenido de sus gránulos. Entre las sustancias más importantes que se liberan está una de la familia de las

perforinas (similar al MAC del complemento), así como el factor de necrosis tumoral (FNT, linfotoxinas, etc.). Ello conduce a la activación de las fosfolipasas y endonucleasas que provocan la destrucción de las mitocondrias, la fragmentación del núcleo y finalmente la muerte celular.

INMUNIDAD FRENTE A LAS INFECCIONES.

De manera muy simplificada podemos decir que la experiencia demuestra un mayor peso de la inmunidad humoral en las infecciones producidas por bacterias y de la inmunidad celular en las infecciones víricas. Este hecho lo demuestra la predisposición al padecimiento de enfermedades bacterianas en los sujetos con problemas en la producción de anticuerpos y un mayor padecimiento de enfermedades víricas en los sujetos con deficiencias de inmunidad celular.

En realidad hemos visto que la participación de la cooperación celular llevada a cabo por los linfocitos Th es esencial en ambos tipos de respuesta, y que los anticuerpos representan un papel importante en los fenómenos de citotoxicidad, por lo que la separación de la inmunidad en humoral y celular es sólo de carácter didáctico.

De cualquier forma, vamos a repasar todo lo visto con anterioridad sobre la base del estudio de las infecciones bacterianas normales, de las producidas por microorganismos intracelulares facultativos y de las generadas por los virus.

A). Las infecciones bacterianas.

La defensa frente a las bacterias se realiza, en primera instancia, por medio de los mecanismos de inmunidad innata que poseen los animales, entre los que se cabe destacar la falta de susceptibilidad genética, la producción de sustancias antibacterianas (p.e. lisozima) o la fagocitosis.

También se desarrolla **inmunidad adquirida** o específica frente a las bacterias.

Los mecanismos más destacados son:

- Neutralización de las toxinas por los anticuerpos (antitoxinas)
- Lisis bacteriana por el complemento y los anticuerpos.
- Destrucción por la fagocitosis.

Frente a las defensas instauradas las bacterias han ido desarrollando diversas estrategias de **evasión** que les permitan subsistir:

- Factores que inhiben la fagocitosis (*M. tuberculosis*).
- Toxinas solubles contra las células defensivas (*P. Haemolytica*).
- Inhibición de la blastogénesis de las células T (*M. Mycoides*).
- Pigmentos (*S. Aureus*).
- Sustancias que bloquean los anticuerpos (Proteína A de *S. Aureus*).
- Inhibición del complemento (plásmido de *E. Coli*).
- Enzimas proteolíticas para las inmunoglobulinas (*H. Influenzae*).
- Destrucción de linfocinas (*P. Aeruginosa*).
- Variación antigénica cíclica (*Campylobacter fetus*).

B). Parásitos intracelulares facultativos.

Ciertas bacterias, protozoos y hongos de gran importancia veterinaria pueden ser fagocitados (ingeridos) aunque no destruidos con eficacia. Por este motivo pueden replicarse en el interior de los fagocitos en un ambiente completamente libre de anticuerpos. En estos casos la respuesta humoral es relativamente ineficiente.

La activación contra ellos consiste en la activación de los macrófagos llevada a cabo por los linfocitos Th. Ésta requiere el transcurso de unos diez días, tras los cuales los macrófagos se transforman en **macrófagos activados**. Estas células son de mayor tamaño y poseen una intensa actividad membranaria que les hace ser más dinámicos, desarrollar gran cantidad de seudópodos y procesos de pinocitosis. También poseen mayor movilidad, una capacidad reforzada de síntesis de mediadores

inmunes y una mayor concentración de enzimas y metabolitos de estallido respiratorio. Por último, producen metabolitos reactivos de nitrógeno que le confieren una capacidad de destrucción inespecífica para su amplio rango de bacterias.

C). Inmunidad frente a los virus.

Aunque los anticuerpos y el complemento son capaces de neutralizar partículas víricas y destruir células infectadas por virus (ADCC), la inmunidad celular es más eficiente en este tipo de situaciones.

Interferones.

Los interferones son glucoproteínas que se producen en respuesta a las infecciones virales. Se reconocen tres clases de interferones denominadas alfa, beta y gamma. Los interferones alfa y gamma se han clonado y caracterizado en porcinos y bovinos.

Son sintetizados por células infectadas por virus y secretadas al medio. Una vez contactan con los receptores de las células del entorno, éstas se vuelven más resistentes a la infección vírica. El mecanismo implicado en la interferencia es la inhibición de la síntesis de ARN y de proteínas virales.

Se producen desde el inicio de la infección y los niveles máximos se alcanzan a las 48 horas, siendo detectables durante 7 días más. Suponen la línea defensiva previa a la inmunidad específica.

Inmunidad específica celular.

La respuesta celular la desarrollarán los macrófagos activados y los linfocitos Tc que pueden reconocer las células infectadas.

Las células infectadas por virus desarrollan una serie de antígenos nuevos en su superficie. Esto puede deberse tanto a la salida del virus por gemación como a la producción de proteínas (no estructurales) necesarias en cualquier fase del ciclo de replicación del virus. Algunos de estos antígenos se transportan a la superficie de la célula asociados a MHC-I. Esta es la señal que identifica a una célula infectada y que es reconocida por los linfocitos TC.

Cuando un virus no es muy citopático y puede crecer en el interior de los macrófagos u otras células defensivas se pueden producir infecciones persistentes sin estimulación del sistema inmune. Este caso, entre otros, de las infecciones producidas por el virus BVD

La capacidad de evadir la respuesta inmune es inversamente proporcional a la virulencia. De acuerdo con este criterio podemos hablar de virus mal adaptados, como el de la rabia, que son muy virulentos y causan una gran mortandad. Además, la infección en especies no carnívoras es completamente inútil para la subsistencia del virus en la naturaleza ya que no hay posibilidades de transmisión.

Otro grupo estaría compuesto por virus moderadamente adaptados (fiebre aftosa, gripe...) que no provocan tanta mortandad y que tienen más posibilidades de transmitirse.

Los virus bien adaptados, como el de la anemia infecciosa equina o el de Visna-Maedi, causan infecciones persistentes y el sistema inmune no es capaz de eliminarlos. En estos casos la vacunación, además, suele ser ineficaz.

Un último grupo lo formarían los virus de adaptación extrema, como los herpesvirus, que llegan a integrar su ADN con el de la célula huésped dando formas de infección latente.

Estrategias de evasión.

A su vez los virus han desarrollado estrategias de evasión entre las que podemos citar:

- Generan estados de inmunodeficiencia (inmunodeficiencia felina).
- Variación genética (virus de la influenza tipo A).
- Estimulan la producción de anticuerpos no neutralizantes (CAEV, PPA...)
- No se difundan en medio extracelular (Herpesvirus)

- Se replican en el sistema inmune (Herpesvirus)
- Generan fenómenos de tolerancia inmunológica (BVD en terneras infectadas in útero)
- Latencia (Herpesvirus).

INMUNIDAD DEL FETO Y EL RECIEN NACIDO.

El sistema inmune del feto es inmaduro, circunstancia que puede durar hasta el segundo año de vida. Esto provoca que determinadas infecciones poco evidentes en la madre pueden manifestarse con gravedad o ser letales para el feto. Como ejemplo puede señalarse que la infección prenatal por el virus de la IBR es normalmente mortal.

En el caso de la BVD la infección prenatal provoca la muerte o malformaciones. Si el virus no es muy citopático puede causar una infección persistente y las terneras recién nacidas pueden ser virémicas y seronegativas debido a la tolerancia. Incluso la inoculación, con vacunas vivas atenuadas, entre el día 90 y 120 de gestación puede provocar fenómenos teratogénicos.

La placenta de los animales de renta (de tipo sindesmocorial en las especies rumiantes y epiteliocorial en las cerdas) impide por completo el paso de inmunoglobulinas, procedentes de la sangre de la madre al feto. Por este motivo, los recién nacidos dependen de la ingestión de calostro para aprovisionarse de anticuerpos maternos. EL calostro es rico en IgG e IgA. La capacidad de absorción de anticuerpos es máxima desde el momento del nacimiento hasta que transcurren las primeras 6 horas. Después declina progresivamente y es muy baja una vez transcurridas las 24 horas. Los anticuerpos pasan a la circulación alcanzando un título máximo a las 12 a 24 horas. Manteniéndose detectables durante un periodo de unas 15 semanas.

El calostro es igualmente rico en células (hasta 1.000.000 cél/ml) de las que la mitad son linfocitos T. Algunos de estos linfocitos pueden atravesar la luz intestinal y llegar a los ganglios linfáticos mesentéricos. Por este mecanismo pueden ingresar algunos virus en el animal lactante como se ha podido demostrar en la leucosis bovina enzoótica.

CINETICA DE LOS ANTICUERPOS.

Las células B se originan en la médula ósea. Maduran en los órganos linfoides primarios como las placas de Peyer, la bolsa de Fabricio o la médula ósea. Posteriormente migran a los órganos linfoides secundarios, en donde sobreviven durante varias semanas. Normalmente no circulan por la sangre.

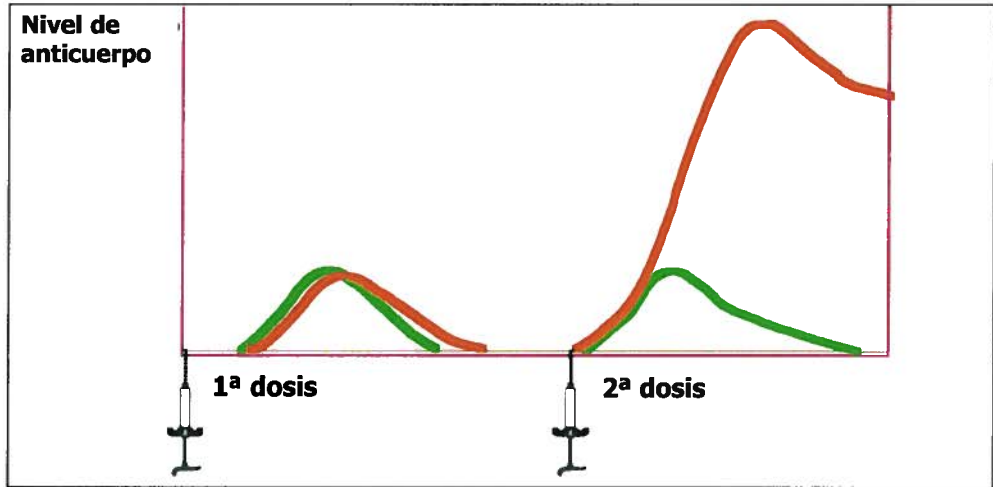
Las células B se unen al antígeno por medio de sus inmunoglobulinas de superficie que actúan como receptores específicos. La activación de las células B requiere de la participación de los linfocitos Th. Este efecto cooperado se produce en dos etapas distintas. En la primera se produce un contacto directo entre la célula B y el linfocito Th, mediada por el antígeno unido al MHC-II. En la segunda etapa, las células T cooperadoras (Th) liberan sustancias que estimulan a las células B activadas para que se dividan y se diferencien. Una parte de su progenie desarrollará un retículo endoplásmico rugoso, incrementará su velocidad de síntesis de inmunoglobulinas y comenzará a segregirlas. Estas células se denominan células plasmáticas y se encuentran en grandes cantidades en el bazo, en la médula de los ganglios linfáticos y en la médula ósea.

La segunda población, procedente de una célula B activada, es la de células de memoria. Las células de memoria forman una población de reserva de células sensibles al antígeno, que podrán responder a las siguientes exposiciones al antígeno. No poseen una morfología característica, sino que se asemejan a los demás linfocitos pequeños. Se encuentran en el bazo y los ganglios linfáticos y cuando entran en contacto con el antígeno migran a la médula ósea. En consecuencia, la médula ósea puede ser la fuente más importante de anticuerpos durante una respuesta secundaria.

Fases de la respuesta de anticuerpos

1. Fase de latencia, durante la cual no se detectan anticuerpos. Corresponde a la activación, proliferación y diferenciación de las células B hacia las células plasmáticas.
2. Fase de incremento logarítmico del nivel de anticuerpos.
3. Fase de meseta, durante la que la concentración de anticuerpos es más o menos estable.
4. Fase de descenso en la que la concentración de anticuerpos decrece por eliminación o catabolismo.

Esta respuesta varía dependiendo de si es el primer contacto con el antígeno o, si por el contrario, la estimulación antigénica es secundaria y existen células de memoria.

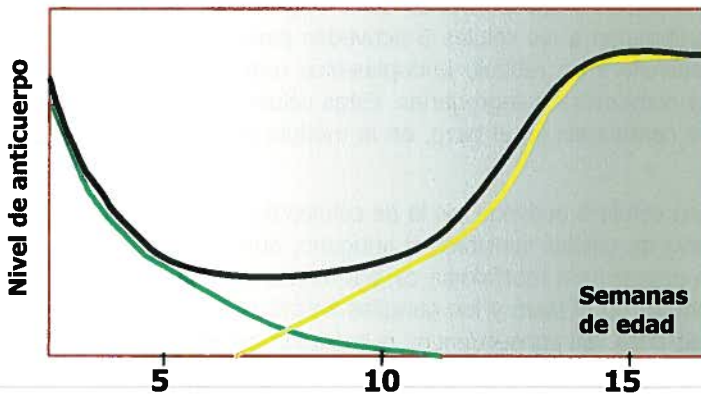


El nivel de anticuerpos en la respuesta secundaria se caracteriza por:

- Aparece más rápidamente.
- Persiste durante más tiempo.
- Alcanza títulos más elevados.
- Se compone principalmente de IgG.

Estas diferencias también aparecen en las reacciones primarias y secundarias de la respuesta inmune de tipo celular, como ocurre en el rechazo de los injertos cutáneos heterólogos.

La inmunidad pasiva en los recién nacidos depende de la absorción de calostro en las primeras horas. En los primeros días de vida, por tanto, los anticuerpos circulantes del animal recién nacido tienen su origen en el calostro y su concentración disminuye hasta desaparecer alrededor de las 10 semanas.



La concentración de anticuerpos sintetizados por los animales recién nacidos aumenta progresivamente, a medida que madura su propio sistema inmune, hasta alcanzar una concentración normal. En la práctica, existe una edad en la que el animal joven queda relativamente indefenso y que constituye el momento de mayor susceptibilidad a las infecciones, sobre todo a las producidas por bacterias.

Luis Manuel Santiago Fernández.
Sección de Epidermiología.
Delegación Provincial de Salud. Córdoba.

TECNOLOGÍA ANALÍTICA EN SEROLOGÍA

Resumen:

La medición de las interacciones antígeno-anticuerpo con fines diagnósticos se denomina serología. Esta ciencia se considera imprescindible para el seguimiento y control de las enfermedades infecciosas y, entre ellas, las enfermedades animales de declaración obligatoria. La necesidad de conocer el estado sanitario de los animales implica el poder disponer de métodos de laboratorio sencillos que a su vez emitan resultados válidos. Los métodos desarrollados se basan en un mismo principio, que es la unión de un antígeno con su anticuerpo homólogo. En esta ponencia se relacionan y explican las principales pruebas de análisis serológico que se emplean actualmente para evaluar la respuesta inmune de un animal frente a antígenos de las enfermedades infecciosas, tanto víricas como bacterianas. Para ello se han clasificado las pruebas en orden a la funcionalidad de la unión de antígeno-anticuerpo en pruebas basadas en la precipitación, pruebas basadas en la aglutinación, fijación del complemento y pruebas inmunoenzimáticas.

TECNOLOGÍA ANALÍTICA EN SEROLOGÍA.

La introducción de los procedimientos basados en las reacciones inmunológicas han representado un importante avance, sobre todo en la medida de sustancias presentes en el organismo a muy bajas concentraciones, tales como ciertas proteínas séricas, hormonas, enzimas y otras sustancias de interés en biología animal y vegetal difíciles de medir empleando los métodos bioquímicos actuales. Dentro de los procesos inmunológicos, los más útiles y prácticos son aquellos que se basan en la especificidad de la unión Ag-Ac y el seguimiento de los complejos Ag-Ac formados. Estos métodos se caracterizan por su sensibilidad, sencillez y precisión. La medición de las interacciones antígeno-anticuerpo con fines diagnósticos se denomina serología. Las técnicas de serología diagnóstica caen en tres categorías dependiendo de la funcionalidad de la unión Ag-Ac.

a). - Pruebas de reacción inmune primaria: miden directamente el enlace de antígenos y anticuerpos. Se realizan combinando Ag-Ac, y después se miden las cantidades de complejos inmunitarios que se han formado. Se utilizan radioisótopos, colorantes fluorescentes o un marcado enzimático, para identificar a algunos de los reactivos. Se distinguen las técnicas de radioinmunoanálisis, inmunoquímica enzimática e inmunofluorescencia.

b). - Pruebas de reacción inmune secundaria: miden los resultados de la interacción Ag-Ac in vitro. Comprende las reacciones de aglutinación, precipitación y floculación. También se incluyen las técnicas en la que ponen de manifiesto la activación de la vía clásica del complemento. (lisado eritrocitos (fijación del complemento). Se ponen de manifiesto mediante observación microscópica o visualización directa.

c). - Pruebas de reacción inmune terciaria: miden el efecto protector real de los anticuerpos de un animal. Requieren la manifestación fisiológica del hecho de la unión, tales como fagocitosis, citolisis, neutralización y quimiotaxis.

A) TÉCNICAS BASADAS EN LA PRECIPITACIÓN.

La precipitación es una reacción secundaria que se da tras la unión Ag-Ac, y que puede ser visualizada fácilmente. Para ello se hacen difundir los antígenos y los anticuerpos en medios líquidos o gelifi-

cados, siendo estos últimos los que se usan en la práctica. Cuando llegan a encontrarse los antígenos con sus correspondientes anticuerpos se unen ambos formando un inmunocomplejo que precipita, fenómeno que es observado y analizado. A los anticuerpos que participan en este tipo de reacciones se les denomina precipitinas.

A.1) Técnicas de Inmunodifusión en geles.

La difusión en medios gelificados es la más usada en la práctica, tanto para diferenciar anticuerpos como antígenos. Las leyes de difusión, establecen que la distancia a la que una sustancia difunde está en relación directa con su concentración y en relación inversa con su peso molecular. El soporte del medio que principalmente se usa en esta técnicas es el gel de agar. Es extraído de un alga marina, denominada *Gelidium amansii*. Se le adicionan sales de iones sulfato y otros iones como Na^+ , K^+ , Ca_2^+ y Mg_2^+ , que son las que ayudan a la gelificación. Los geles se preparan disolviendo el polímero seco en agua a ebullición y enfriando posteriormente a temperatura ambiente. El agar es un material ideal para técnicas de electroforesis en gel así como para inmunoelectroforesis e inmunodifusión. Dependiendo de la proporción de agar que se utilice, así será el tamaño del poro que obtengamos.

Se han descrito técnicas cualitativas y cuantitativas basadas en este principio:

- a.- Difusión simple monodimensional
- b.- Doble difusión monodimensional.
- c.- Doble difusión bidimensional.
- d.- Difusión radial.

a.- Método de difusión simple monodimensional.

Método conocido como la táctica de Oudin simple, por ser este el autor que la describió con detalle en 1946. Consiste en hacer difundir una solución antigénica a través de un agar en el que se encuentra mezclado un determinado anticuerpo, o bien al contrario.

Se introduce en un tubo agar fundido mezclado con un volumen igual del antígeno para analizar. Producida la solidificación se añade la solución que contiene los anticuerpos, que en nuestro caso será un suero problema. Por difusión a través del gel, el antígeno va penetrando creando un gradiente de concentración. En la interfase gel-líquido no se forman precipitados, dada la alta concentración de anticuerpos, pero aparecen en forma de bandas cuando la concentración del anticuerpo que ha difundido es la óptima. El número de bandas de precipitación nos indica la cantidad mínima de sistemas reaccionantes, aunque dependerá de las concentraciones de los reactivos.

b.- Método de difusión simple bidimensional.

También se efectúa en tubo, colocado en la parte inferior un volumen de agar fundido mezclado con partes iguales de antígeno. Producida la gelificación, se agrega agar disuelto en solución salina. Después de la solidificación se cubre todo con un volumen de agar mezclado con igual volumen de suero problema. Antígenos y anticuerpos migrarán hacia la zona media, y cuando los que son equivalentes se encuentren interaccionarán, desencadenándose la precipitación cuando las concentraciones son óptimas. Si las cantidades de antígenos y de anticuerpos añadidas son las que corresponden a la zona de equivalencia, la precipitación se producirá en la parte central de la zona de reacción y las bandas serán nítidas y estables. Sin embargo, las bandas estarán desplazadas hacia los extremos y en parte se disolverán cuando dichas condiciones no se cumplan.

c.- Método de difusión doble bidimensional:

Este método fue desarrollado simultáneamente por Ouchterlony (1949) y Elk (1948). Consiste en enfrentar en pequeñas perforaciones efectuadas en el agar gelificado sobre una placa, y a distancias convenientes, las soluciones de antígeno y anticuerpos. Para ello se dispone de una placa en la que añadimos un gel de agar y practicamos pocillos en los que se introducen la solución antigénica y pocillos para la solución que contiene anticuerpos (suero problema). Los

anticuerpos y los antígenos difunden a través del gel hasta que se encuentran, formando una línea opaca de precipitación en la región donde se encuentran en proporciones óptimas. Los pocillos se pueden hacer en círculo alrededor de un pocillo central, en triángulos, en cuadrados o a lo largo de un pocillo en canal.

Esta técnica permite diferenciar las distintas sustancias según la forma de reaccionar de las líneas de precipitación de dos ovarios sistemas, Así mismo, también pueden aparecer bandas inespecíficas que deben de ser descartadas de las específicas por el mismo principio. Para la detección de anticuerpos frente a un antígeno determinado se emplea una solución antigénica valorada y un suero control positivo.

Originalmente Ouchterlony describió tres tipos de reacciones denominadas: de identidad, no identidad o identidad parcial Con el suero puesto en el pocillo *a*, el suero control positivo en el pocillo *b* y el antígeno colocado en el pocillo *c* pueden darse las siguientes reacciones:

- 1.- Si se observa que las líneas de precipitación del suero problema y el suero control se unen y fusionan, indica que, efectivamente, en los pocillos *a* y *b* se encuentra el mismo anticuerpo (reacción de identidad).
- 2.- Cuando la línea del pocillo *a* cruza la línea del pocillo *b*, indica que en el pocillo *a* hay anticuerpos específicos frente al antígeno y otros no específicos aunque similares (reacciones de identidad parcial).
- 3.- Si las líneas de los pocillos *a* y *b* se cruzan pero no se unen, la línea formada en el pocillo *a* no es específica. (Reacciones de no identidad).

En los métodos donde parámetros están bien definidos (distancia entre pocillos, concentración de antígenos) la especificidad de la técnica es muy alta (podríamos hablar del 100%) pero la sensibilidad es baja. Otro inconveniente de este método es que resulta laborioso manejar muchas muestras a la vez. Para el diagnóstico de Leucosis Enzótica Bovina, ésta técnica es oficial, aunque no se usa en la práctica al ser sustituida por el ELISA.

d.- Método de difusión radial.

Es una técnica que resulta menos útil desde el punto de vista cualitativo que cuantitativo, ya que la doble difusión de Ouchterlony aporta mayor información en ese sentido. Fue descrita por primera vez por Petrie (1932) con el propósito de ser cualitativa, y posteriormente Mancini la desarrolló con propósitos cuantitativos. Esta técnica ha sido empleada durante años para diferenciar anticuerpos vacunales de lo de campo de infecciones por *Brucella abortus* en bovinos, y es la que vamos a explicar:

Las especies de *B. Abortus* y *B. Mellitensis*, poseen dos componentes principales a nivel antigénico. Uno de ellos, el LPS-S, es un complejo proteína-liposacárido con actividad endotóxica responsable de la especificidad hacia aglutinógenos de superficie lisa (o sea, capaz de aglutinar cepas de *Brucella* de superficie lisa) y principal componente antigénico de las especies de *Brucella*. El otro, el poli-B, es un polisacárido que carece de actividad endotóxica y no juega un papel muy importante en los test de aglutinación. Este antígeno es el que se emplea en esta prueba. Debido a este hecho, la vacunación con B-19 (vacunas oficiales anteriormente permitidas) en terneras menores de 6 meses rara vez induce anticuerpos (tipo precipitinas) frente al poli-B.

La técnica consiste en detectar un anillo de precipitación que se produce cuando se da la unión Ag-Ac específica en un gel de agar que contiene el antígeno sobre una muestra de suero con anticuerpos específicos. En la preparación de la placa de agar se añade un volumen igual de solución antigénica previo a la fusión de aquella. Una vez producida la solidificación, se practican orificios en la placa en forma lineal y en cada uno de ellos se colocan los sueros problema en los que se quieren buscar los anticuerpos específicos. En uno de los pocillos debemos incluir un suero control positivo y en otro un suero control negativo, para comprobar la correcta realización de la técnica. Cuando los sueros son positivos, aparecerá un halo o anillo de precipitación alrededor del pocillo. Cuando la muestra no posee anticuerpos frente a *Brucella* o pertenece a un animal vacunado, no se observará ningún halo de precipitación.

La especificidad de esta técnica en la detección de bovinos vacunados está sobre el 90%. En casos más desfavorables, cuando se vacunan animales adultos, se ha encontrado que su especificidad está sobre el 80%.

A.2) Condiciones óptimas de precipitación y aglutinación.

La precipitación y la aglutinación de los complejos Ag-Ac se produce porque estos son hidrófobos. Sin embargo, estas reacciones pueden no observarse siempre que se mezclan las mismas clases de antígenos y de anticuerpos. Aunque siempre se produzca la unión sólo se hace visible si la proporción entre ambos es la correcta, no observándose si se hayan presentes demasiados antígenos o anticuerpos. Si hacemos una serie de diluciones del antígeno y añadimos a cada una la misma cantidad de anticuerpos, se forman diferentes cantidades de precipitados en el medio, de manera que puede dibujarse una curva de precipitación. En el punto en que se produce la máxima precipitación es donde el antígeno y el anticuerpo se encuentran en proporciones óptimas.

Para la explicación de este fenómeno hay que tener presente que los anticuerpos tienen dos lugares de unión con los determinantes antigénicos de un antígeno, mientras que los antígenos deben tener muchos determinantes o epitopos en su superficie. Cuando se une un anticuerpo a un antígeno se produce la unión primaria, formándose un complejo soluble que no precipita. Las partículas antigénicas, o incluso éstas totalmente recubiertas de anticuerpos, son demasiado pequeños y permanecen en suspensión. En condiciones óptimas los complejos Ag-Ac se unen a otros complejos Ag-Ac a través de puentes de unión trazados por anticuerpos, llegando a formar una trama de partículas. La formación de tramas o redes de antígenos unidos a anticuerpos y a su vez entrelazados con otros complejos Ag-Ac si que resultan insolubles y precipitan. Cuando se haya presente un exceso de anticuerpos, la superficie de cada partícula de antígeno llega a recubrirse de tantas moléculas de Ig que no quedan determinantes libres para que otras Ig puedan unirse a otros complejos. Cuando es el antígeno el que se haya presente en exceso, la precipitación se inhibe porque cada lugar de unión de la Ig se une a un solo hapteno y no deja sitio libre para la unión de otros complejos Ag-Ac.

El fenómeno de la floculación aparece sólo en algunos casos y se caracteriza porque no se forman precipitados hasta que la cantidad de antígeno añadido no excede de ciertos límites, cosa que no ocurre en la precipitación. En la floculación los complejos formados sólo se agregan y sedimentan en un rango muy estrecho de la relación Ag-Ac.

B) TÉCNICAS BASADAS EN LA AGLUTINACIÓN.

Las reacciones de aglutinación consisten en la agregación de partículas tales como células o material sintético. Los anticuerpos que intervienen en estas reacciones son llamados aglutininas. La reacción tiene lugar en la superficie de eritrocitos, bacterias o grandes partículas, donde los determinantes antigénicos ubicados en sus superficies quedan de esta manera expuestos a los anticuerpos. La utilidad de este simple procedimiento, mezclar partículas antigénicas con anticuerpos, dio origen a la era del serodiagnóstico en microbiología, adelanto el papel de los microorganismos en la causa de las enfermedades, y llevó al descubrimiento de los grupos sanguíneos ABO.

Bordet propuso que la aglutinación tiene lugar en dos fases: Combinación específica de antígenos y anticuerpos y agregación visible de partículas. Ambas fases están medidas por la atracción específica entre antígenos y anticuerpos. Partículas tales como eritrocitos y bacterias, estando en suspensión, portan ligeras cargas negativas y se repelen unas a otras de modo, que el potencial de superficie es tal que la unión cruzada específica de los antígenos de superficie de las partículas cubiertas por anticuerpos y formando puentes de Ig, se ve impedida. La falta de aglutinación se llama "aglutinación incompleta". Reduciendo la fuerza iónica relativa del medio mediante proteínas o solutos inorgánicos (modificación del pH), se reduce la distancia entre partículas, permitiendo la formación de puentes entre los anticuerpos con la aparición de una red de complejos Ag-Ac.

Aunque la carga es importante para completar la aglutinación, es evidente que otros factores tienen su incidencia en la aglutinación de partículas por anticuerpos. La viscosidad del medio también parece ser de importancia para completar la aglutinación, puesto que el agregado de moléculas como el dex-

trano aumenta significativamente la aglutinación. Son las IgM las que generalmente provocan la agregación en el medio de partículas de antígeno, en tanto que las IgG por sí mismas pueden hacer fracasar una aglutinación completa. Se dice que la IgM es 750 veces más eficiente que la IgG en las reacciones de aglutinación.

Las técnicas de aglutinación pueden ser cualitativas o cuantitativas. : las primeras detectan e identifican mientras que las segundas además miden la cantidad de anticuerpos.

B.1) Pruebas de aglutinación cualitativas:

Dentro de las técnicas cualitativas hay dos que están autorizadas de forma oficial para la detección de anticuerpos en brucelosis: la prueba del anillo en leche y la prueba del antígeno brucelar tamponado.

1. Prueba del anillo o ring test.

Es una prueba de aglutinación realizada en leche para determinar la infección por *Brucella abortus* en el ganado vacuno. Se emplea como antígeno una suspensión de una cepa lisa de la *Brucella abortus* (células enteras) coloreadas con hematoxilina o tetrazolín. Para ello se mezcla una cantidad determinada de leche con otra de solución antigénica, se mezcla y se incuba 45-60 minutos a 37°C. Una vez sacado de la estufa se esperan 15 minutos y se realiza la lectura de la prueba.

Si se hallan presentes anticuerpos frente a la *B. Abortus*, se aglutinan los gérmenes teñidos y son elevados en el tubo con los glóbulos grasos, formando un anillo azul en la capa inferior de la capa de nata que está por encima de la leche. La interpretación de la prueba es:

Reacción negativa: leche coloreada, crema incolora.

Reacción positiva: leche y crema coloreadas de forma idéntica o leche incolora y crema coloreada.

Esta reacción es muy sensible y puede emplearse sobre muestras conjuntas de leche. La vacunación con vacuna viva B19, hace que el animal sea positivo a esta prueba durante un periodo de 2 o más años en ganado adulto, aunque en menor medida en terneros. Se recomienda el uso de esta técnica en rebaños, pudiendo detectar el 88% de los rebaños infectados. No se recomienda para su uso como técnica de diagnóstico individual, debido a que existen animales infectados que son negativos a la prueba (falsos negativos). Sin embargo, y aunque se trate de casos raros, hay que tener presente la existencia de animales con infecciones localizadas en la ubre en los que en su suero no pueden ser detectados anticuerpos. Estos animales eliminan *Brucellas* por la leche y en ellos la detección de anticuerpos sobre muestras de leche en determinados si está recomendada.

2. Prueba del antígeno tamponado de *Brucella*.

Es la técnica que se utiliza como screening o de criba para la detección de anticuerpos frente a la *Brucella* debido a su sencillez y alta sensibilidad. Los anticuerpos aglutinan inespecíficamente determinadas suspensiones bacterianas. Esta actividad aglutinante inespecífica de la Ig desaparece a pH muy ácido, mientras que se mantiene la capacidad aglutinante de los anticuerpos específicos. La prueba desarrollada por el Dr. D. Pietz, denominada del Rosa de Bengala, se basa en este principio. En ella se emplea una suspensión de *Brucella* en tampón lactato a pH 3,6 teñida con el colorante Rosa de Bengala. La prueba ha sido evaluada por diversos autores que han demostrado que es la más sensible en bovino (menos sensible en ovino y caprino), pero también la que menos capacidad tiene para diferenciar animales infectados de vacunados. La prueba del Rosa de Bengala está descrita como técnica oficial en el Real Decreto 2611/1966, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales y a su vez como "prueba prescrita" por la O.I.E. El método descrito en la normativa es el realizado sobre una placa de vidrio.

Actualmente y de forma oficial, la fabricación del antígeno se realiza a partir de la cepa número 99 de Weybridge, la cepa USDA 1119 u otra de sensibilidad equivalente, siempre que sea suficientemente testado con una batería de sueros negativos y positivos.

La prueba descrita de forma oficial es la manual, que se realiza en placas de vidrio. Su realización es sencilla cuando se manejan pocas muestras, pero engorrosa cuando se maneja cientos o miles de

sueros y es de interpretación subjetiva en reacciones de baja intensidad. Consiste en poner una gota (0,03 ml) de antígeno y otra gota de suero problema sobre una placa blanca. Se agita la placa con movimientos alternativos de delante hacia atrás (alrededor de 10 movimientos por minuto) durante 4 minutos. La lectura debe efectuarse con buena luz y se interpreta como positiva cuando se produce una aglutinación (aparecen unos punteados que pueden llegar a ser grumos), comprobando que no se produce un secado excesivo en los bordes de la mezcla.

La normativa admite el uso de un método automático siempre que sea de igual sensibilidad que el del método manual. El método que se emplea en los Laboratorios de Sanidad Animal es el recomendado por el Laboratorio Nacional de Referencia de Brucelosis en Animales (Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Santa Fe, y que el denominado método de la microtitulación por realizarse en placas de plástico de microtitulación, llamándose por tanto al realizado en placa de vidrio método de microtitulación.

Para ello primero se prepara la solución antigénica mezclando 2 partes de antígeno Rosa de Bengala con una parte de tampón lactato en solución salina fenolada y a pH 3,6. Se adicionan 75ml del suero problema en las placas de microtitulación de fondo en V, y luego 25ml de antígeno coloreado con rosa de bengala (a una proporción 2/3). Se agitan 1-2 minutos en un agitador de placas. Se incuban en estufa a 37°C durante 8 minutos en un agitador orbital (o helicoidal). Seguidamente se centrifugan las placas durante 5 minutos entre 200-300 r.p.m. y se lee en un lector.

La aparición de un resultado positivo reflejará un botón de aglutinación neto con sobrenadante claro (positivo fuerte) o rosáceo (positivo débil). El suero negativo refleja un contenido homogéneo. El uso de la técnica de microtitulación permite el manejo de gran número de sueros de forma simultánea y fácil, dada la gran capacidad de las placas y su sencillo manejo. Además, existen en el mercado numerosos instrumentos que ayudan al manejo de las muestras y las placas que los contienen: pipetas automáticas, sistemas dispensadores, agitadores para placas.

Esta técnica tiene una gran sensibilidad y especificidad. Dado que la interpretación de los resultado de la técnica puede llegar a ser subjetiva, sobre todo cuando se procesan gran cantidad de muestras, los resultados positivos deben confirmarse con otra técnica más compleja, de alta sensibilidad y especificidad, y de lectura más objetiva. En el caso de la Brucelosis se emplea la técnica de la Fijación del Complemento como técnica de confirmación.

B.2) Pruebas de aglutinación cuantitativas:

En brucelosis, la prueba oficial cuantitativa que se emplea es la seroaglutinación lenta en tubo. Existen también otras técnicas cuantitativas en placa. La unidad de medida empleada es el título aglutinante, que se define como la mayor dilución de suero que aglutina a un antígeno dado.

1. Seroaglutinación lenta en tubo (SAT).

Es una prueba oficial para la Brucelosis bovina. Hoy en día esta prueba no se utiliza debido a que es poco sensible, particularmente en los casos crónicos. La técnica consiste en hacer diluciones de suero problema con solución salina en unos tubos. Después se le añade a cada tubo la misma cantidad del antígeno. Se homogeneiza e incuba a 37°C durante 24 horas, al cabo de las cuales se hace la lectura.

Todo antígeno empleado en una reacción de aglutinación debe titularse frente a un suero estándar internacional anti-B. Abortus. De hecho, los resultados se expresan en unidades internacionales. La conversión se realiza utilizando una tabla en la que se relaciona la dilución en la que aparece la aglutinación, así como el grado de aglutinación observando en ésta, con una cifra que corresponde a las unidades internacionales por mililitro. Los animales con ≤ 30 UI/ml son negativos, entre 30-80 UI/ml sospechosos y ≥ 80 UI/ml son considerados positivos.

B.3) Causas de error en las técnicas de aglutinación.

La principal desventaja del fenómeno es que la reacción es semicuantitativa. Realizando la aglutinación en condiciones estandarizadas, se dice que los resultados cuantitativos son precisos incluso si existe una diferencia de hasta 4 títulos de aglutinación entre ellos. No obstante tiene sus ventajas y es que es una reacción simple y tiene elevada sensibilidad.

La aparición de anticuerpos bloqueantes en la Brucelosis puede desembocar en un fenómeno prozona o de zona. En estos casos se produce la reacción Ag-Ac pero no se verifica la aglutinación, dando lugar a falsas reacciones negativas. Para algunos autores se tratan de anticuerpos que debido a su tamaño y forma son incapaces de unirse a otros complejos Ag-Ac y forma una trama; se trataría de los llamados anticuerpos incompletos. Otros defienden que en determinados sueros hay presencia de anticuerpos no aglutinantes por ser predominantes los del tipo IgG. En Brucelosis las IgG poseen mayor afinidad por las Brucellas que las IgM, y en el caso de una baja proporción de éstas últimas llevaría a una falta de aglutinación con la consecuente emisión de un falso resultado negativo. Esto puede suceder en el caso de las Brucelosis crónicas, donde pueden existir grandes cantidades de IgG y pequeñas de IgM. Para detectarlos podemos diluir los sueros, ya que así estos anticuerpos no interfieren en la interpretación de la prueba de aglutinación al tener las Ig más oportunidades de unirse a los antígenos y verificar así la aglutinación.

El Test de Combs, puede emplearse para determinar anticuerpos bloqueantes, aunque fundamentalmente se emplea para determinar los grupos sanguíneos ABO en humanos. Para ello es necesario disponer de un antisuero específico contra la inmunoglobulina de la especie animal que se estudie. El método consiste en mezclar el antígeno con diluciones del suero que contiene los anticuerpos bloqueantes e incubar las mezclas a 37°C durante una hora. La ausencia de aglutinación no quiere indicar que no existan uniones entre antígenos y sus anticuerpos homólogos, sino que ésta no se evidencia hasta que se adiciona el antisuero que contiene anticuerpos antihomólogos, sino que ésta no se evidencia hasta que no se adiciona el antisuero que contiene anticuerpos y que producirá aglutinación en el caso de la presencia de uniones Ag-Ac con anticuerpos incompletos.

En estas técnicas se hace presente también el fenómeno de equivalencia en la proporción de antígeno y anticuerpo, al igual que en las técnicas de precipitación.

C) FIJACION DEL COMPLEMENTO.

Durante un largo periodo de la "era serológica", el ensayo de fijación del complemento (FC) fue considerado el "emperador" del serodiagnóstico, debido en gran parte a que hizo posible por rutina un grado de sensibilidad no comúnmente logrado por otros métodos. En algunas áreas fue considerada como la prueba de referencia con la cual se compararon otros métodos. Hoy, pese al desarrollo de recientes técnicas de mayor sensibilidad, es todavía un arma importante en el arsenal del serodiagnóstico para el estudio de virus, bacterias y hongos.

C.1) Sistema del complemento.

El término complemento engloba, al menos, veinte sustancias proteicas, nueve de las cuales actúan en un determinado orden. Estas fracciones se representan por C', acompañadas de un subíndice con numeración desde el 1 al 9, de acuerdo con el orden de su descubrimiento, (c1, C2, C3, C4. ...C9). Cada una de estas fracciones corresponde a una proteína, a excepción de C1, que está formada por un complejo de tres proteínas: C1q, C1r, C1s. Cuando se produce la activación del complemento se ponen en marcha una serie de reacciones, en forma de cascada, de modo que a partir de cada una de ellas se genera un producto activo que además de influir en que la reacción prosiga, puede tener diferentes acciones biológicas importantes en la defensa del organismo.

Las proteínas del complemento representan al menos un 15% de la fracción globulínica del plasma. El conjunto del sistema es termolábil y carece de especificidad inmunológica, es decir, actúa de manera inespecífica y no aumenta en el suero tras la inmunización.

La activación del sistema del complemento puede iniciarse mediante dos vías: la clásica y la alterna.

- **Vía clásica de activación del complemento:** se puede producir por complejos Ag-Ac, en que los anticuerpos participantes sean de la clase IgM o IgG. También se activa debida a agregados de inmunoglobulinas, ADN y proteína C reactiva (liberada en procesos inflamatorios y por ciertas membranas celulares). La activación se produce por una actuación directa sobre la C1, de estos elementos o por la vía alterna.

- **Vía alternativa de activación del complemento** (o aceleradora properdínica, porque actúa la properdina): se puede producir por lipopolisacáridos vegetales o animales (presentes también en la membrana de ciertas bacterias o productos de destrucción tisular), ciertos factores del veneno de la cobra, algunas enzimas y la IgG, IgA e IgE.

Características de la acción del complemento:

1. - Puede llevar a cabo su acción defensiva sin la acción de los anticuerpos.
2. - Una vez producida la activación, toda una serie de reacciones subsiguientes se llevan a cabo por un proceso multiplicador, de tal forma que son muchas las moléculas con actividad biológica que aparecen en el curso de las reacciones del complemento.
3. - La acción de estas moléculas puede ser local o a distancia.
4. - Tiene un importante papel en la inducción de la inflamación local.
5. - Interviene en la modulación de la respuesta inmunológica a través de su interacción con los complejos Ag-Ac y los receptores de membrana.

Acciones del complemento:

1. - *Acción citolítica*: Tras la activación de C' éste puede adosarse a la membrana de las células produciendo su lisis. Este mecanismo produce la lisis de gran número de bacterias (*Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*...) y también de células neoplásicas libres. El C' también puede intervenir por este mecanismo en reacciones de autoinmunidad e hipersensibilidad, destruyendo o lesionando tejidos propios.
2. - *Acción facilitadora de la fagocitosis*: los macrófagos y polimorfonucleares neutrófilos poseen en su membrana receptores capaces de unir la molécula C3b resultante de la activación del complemento. Cuando estas moléculas se unen a los antígenos, fenómeno que se conoce con el nombre de opsonización, se produce la fagocitosis de los mismos por los macrófagos.
3. - *Acción quimiotóxica*: Determinadas fracciones del complemento poseen una potente acción quimiotáctica, que consiste en atraer al lugar donde se está produciendo la reacción, tanto a macrófagos como a polimorfonucleares. Esta acción es importante en focos de infección y en tumores.
4. - *Acción anafilotóxica*: A partir de C3 y C5 pueden obtenerse sustancias llamadas anafilotoxinas, cuya acción consiste en una potente actuación sobre las células cebadas que activan, produciéndose en consecuencia la liberación de la histamina y otras sustancias vasoactivas que incrementan la permeabilidad capilar, facilitando de esta forma la afluencia de elementos celulares. Además, producen contracción de fibras musculares lisas. Todo este fenómeno se corresponde con el desarrollo de un proceso inflamatorio local.

C.2) Realización de la técnica.

Esta técnica está descrita como oficial en el desarrollo del Programa Nacional de erradicación de Brucelosis bovina, ovina y caprina y de la Perineumonía Contagiosa Bovina en España. Permite detectar anticuerpos frente a la Brucelosis en muestras de suero sanguíneo así como indicar la titulación del mismo, esto es, cuantificarlos. Es una prueba de alta sensibilidad y especificidad y se utiliza como técnica de confirmación en Brucelosis para aquellos sueros que resultan positivos a la prueba de screening (criba) de aglutinación con antígeno coloreado con rosa de bengala.

En la fijación del complemento tenemos dos sistemas a considerar:

- 1.-) sistema específico de la reacción: suero problema+antígeno+complemento.
- 2.-) sistema inespecífico o revelador: Hematíes de carnero y antihematíes de carnero.

Los anticuerpos IgG e IgM, reaccionan con la suspensión antigénica. Tras añadir complemento con una titulación conocida, éste se fijará a los complejos Ag-Ac en mayor o menor medida dependiendo de la cantidad de anticuerpos específicos. Para visualizar la reacción se le añade al sistema anterior una cantidad conocida de mezcla hemolítica (hematíes de carnero unidos a antihematíes de carne-

ro). Si ha quedado complemento libre sin fijar en la primera fase por no haber anticuerpos específicos, se unirá a la mezcla hemolítica lisando los hematíes. Por lo contrario, la ausencia de hemólisis indicará la existencia de IgM o IgG específicos.

La FC no sirve para diferenciar animales infectados de vacunados recientemente. Sin embargo, esta reacción posee un gran valor como prueba de confirmación, incluso en animales vacunados, siempre que hayan sido vacunados entre los 3 a 6 meses de edad y que hayan pasado más de 6 meses desde la vacunación.

1.- Reactivos necesarios.

- a) Tampón veronal calcio-magnesio.
- b) Complemento de cobaya.
- c) Hematíes de carnero
- d) Suero hemolítico
- e) Antígeno de reacción de fijación de complemento
- f) Sueros negativos y positivos de título conocido.

a) El tampón veronal se emplea para diluir sueros y reactivos en reacciones de fijación de complemento. Permite mantener unas condiciones precisas de pH (7,2) y la presencia de iones Ca^{++} y Mg^{++} que refuerzan la actividad del complemento. También hace disminuir la presencia de sueros anticomplementarios.

b) El complemento se obtiene de suero de cobaya. El suero de este animal lo emplearemos como fuente de complemento en la técnica de FC.

Es imprescindible conocer una serie de características del complemento para después poder manejarlo de forma adecuada; es extraordinariamente termolábil: a $56^{\circ}C$ durante 30 minutos se inactiva, fuera del organismo es percedero en el tiempo: a los 4-5 días se inactiva y que es muy sensible a la luz. El complemento debe valorarse antes de su utilización en FC a fin de utilizar la proporción adecuada con respecto a su poder.

c) Los hematíes de carnero se obtienen por punción en la yugular de un carnero joven. Se utiliza para ello bolsas de extracción de sangre con anticoagulantes (las utilizadas en humana). Los hematíes permanecen en las bolsas conservadas en cámara de frío durante un mes aproximadamente hasta el momento de su uso.

d) El suero hemolítico o hemolisina es un suero antihematíes de cordero. Normalmente se utiliza un suero comercial titulado procedente de conejos inmunizados frente a los hematíes de cordero. Se utiliza una determinada cantidad en cada técnica, medida en unidades hemolíticas. Debemos utilizar una hemolisina valorada.

e) El antígeno y los sueros de control son suministrados por el Laboratorio de Referencia ya titulados y preparados para su uso. Se emplean extractos enriquecidos con LPS-S.

2.- Desarrollo de la prueba:

Una vez separados los sueros en las placas debemos inactivar el complemento que contienen. Para ello aprovechamos la sensibilidad al calor del C', con lo que procederemos a calentar los sueros durante 32 minutos a una temperatura de $56^{\circ}C$ en sueros bovinos y a $58-59^{\circ}C$ en los ovinos y caprinos.

La prueba se realiza sobre las placas de microtitulación con fondo en U, echando primero los sueros problema en los primeros pocillos de cada columna y después realizamos diluciones dobles. En cada pocillo debemos añadir luego el antígeno y el complemento. Posteriormente se cubre la placa y se incuba en estufa ($37^{\circ}C$, 32 minutos). Tras la primera incubación añadimos el sistema hemolítico a cada pocillo y volvemos a incubar, tras lo cual centrifugamos a 300 r.p.m. durante 5 minutos. La lectura de las placas es el paso final y nos indicará la titulación de cada suero.

El título del suero será la dilución más alta del mismo que siga fijando el complemento. El grado de hemólisis se determinará por un sistema de cruces:

(++++) equivalente a un 0% de hemólisis (+++) equivalente a un 25% de hemólisis.
(++) equivalente a un 50% de hemólisis. (+) equivalente a un 75% de hemólisis.

El título de fijación de complemento se espesará en unidades U.E., por mililitro. La conversión de los títulos FC se hará según una tabla, dando un valor para cada dilución y grado de hemólisis observado.

En cada ensayo que hagamos debemos realizar los siguientes controles en pocillos independientes:

- Control del poder anticomplementario del suero: no se adiciona antígeno. Debe reflejar un 100% de hemólisis.
- Control de la mezcla hemolítica: no se adiciona suero, ni antígeno ni complemento. Debe reflejar un 0% de hemólisis.
- Control del antígeno: no se adiciona suero. Debe reflejar un 100% de hemólisis.
- Control del complemento: no se adiciona ni suero ni antígeno. Debe reflejar un 100% de hemólisis.
- Análisis a un suero control positivo y a un suero control negativo: los títulos del ensayo han de coincidir con los títulos previamente determinados.

3.- Causas de error en la interpretación de resultados:

Fenómeno de zona: ocurre en raras ocasiones. Se observa que los sueros no fijan el complemento a bajas diluciones pero si a altas diluciones, lo contrario de lo que debería suceder. Se da en sueros muy positivos.

Poder anticomplementario del suero (PAS): Son sueros que poseen la capacidad de fijar el complemento sin que se produzca una unión Ag-Ac. Se desconocen las causas que lo provoca. No se puede realizar una interpretación del título de FC porque no podemos distinguir si el complemento fijado es debido sólo a que el suero posee esa capacidad o a que además posee anticuerpos anti-Brucella.

D) TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS.

Las técnicas inmunoenzimáticas están basadas en dos importantes hechos biológicos:

1. - el extraordinario poder de discriminación de los anticuerpos, basado en la habilidad del sistema inmune de los vertebrados de producir variedades ilimitadas de anticuerpos, cada una de las cuales con una afinidad por un determinado componente extraño (antígeno).
2. - El extremado poder catalítico y específico de las enzimas, los cuales pueden ser detectados con gran facilidad.

Los enzoinmunoensayos consisten pues en dos estrategias: las reacciones entre dos inmunorreactivos (anticuerpo frente a su correspondiente antígeno) y la detección de la reacción usando enzimas, marcando a los reactivos como indicadores. Gran cantidad de marcadores han sido empleados, como los marcadores radiactivos (radioinmunoensayo: RIA), marcadores fluorescentes, metales, radicales libres, látex y bacteriófagos. Las ventajas del uso de los ensayos inmunoenzimáticas son las siguientes:

- se consigue una muy alta sensibilidad, detectabilidad y especificidad.
- el equipo requerido es relativamente barato.
- los ensayos pueden ser muy rápidos y simples
- la reproducibilidad es alta y la evaluación es objetiva.
- no hay riesgo de irradiaciones
- los reactivos son relativamente baratos y generalmente con largo periodo de conservación.

- la versatilidad de los ensayos puede ser significativamente incrementada por la gran variedad de propiedades específicas de las enzimas.
- pueden aprovecharse las ventajas de los anticuerpos monoclonales.
- la posibilidad de automatización de los métodos, pudiendo analizar gran cantidad de muestras fácilmente.

D.1) E.L.I.S.A.

1.- Antecedentes históricos del ensayo inmunoenzimático:

Las técnicas inmunoenzimáticas fueron desarrolladas en la mitad de la década de los sesenta a partir de los trabajos de Avrameas y Uriel (1966) que marcaron los antígenos y anticuerpos con enzimas para su uso en técnicas serológicas convencionales. Nakane y Pierce (1966 y 1967) y Avrameas y Wicher (1966) marcaron anticuerpos con enzimas con el fin de localizar antígenos virales en cortes histológicos. En 1969, Avrameas, puso a punto la utilización del glutaraldehído como agente puente para marcar proteínas con enzimas. Engvall y Perlmann (1971 y 1972) describieron el denominado ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para titular inmunoglobulinas. Utilizaron tubos de poliestireno como inmunoabsorbente (fase sólida) e indicaron que el método poseía una sensibilidad comparable al radioinmunoensayo. En las mismas fechas, Van Weemen y Schuurs (1971,1972) utilizaron conjugados antígeno-enzima y hapteno-enzima en ensayos serológicos. Voller y cols. (1974) pusieron a punto la realización del método en microplacas de poliestireno y sugirieron su uso para titular anticuerpos inducidos por enfermedades infecciosas, como la malaria. En 1975, Ruitenberg, Steerenberg y Brosi aplicaron por primera vez el método ELISA en patología animal para la detección de anticuerpos específicos en *Trichinella spiralis*. El desarrollo de los métodos de producción de anticuerpos monoclonales (Kohler y Milstein, 1975) aumentó la posibilidad de una mayor estandarización de los ensayos mejorando la especificidad y sensibilidad.

2.- Fundamento.

El ensayo inmunoenzimático ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpos) marcado con una enzima y el otro insolubilizado sobre un soporte, el complejo Ag-Ac quedará inmovilizado y, por tanto, podrá ser fácilmente revelado mediante la adición de un sustrato específico que, al actuar sobre la enzima, producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o colorímetro. La prueba ELISA es así una prueba colorimétrica, ya que los ensayos dan un producto de reacción coloreado que absorbe la luz en el espectro visible, siendo la densidad óptica del mismo proporcional o inversamente proporcional a la cantidad de producto a detectar.

3.- Materiales, reactivos y equipos.

a). Antígenos.

Para la detección de anticuerpos frente a los virus o bacterias de enfermedades de declaración obligatoria, se emplean distintos tipos de antígenos. Los de enfermedades más comunes son:

- *Brucelosis Bovina*: el LPS-S, un complejo de proteína liposacárido con actividad endotóxica y principal componente antigénico de las especies de *Brucella*.
- *Peste porcina Africana*: está formado por un conjunto de proteínas estructurales del virus que van mezcladas con proteínas celulares, ya que se producen en cultivos de células.
- *Leucosis Enzoótica Bovina*: la glicoproteína de envoltura gp⁵¹.
- *Tuberculosis Bovina*: existe un Kit que detecta el g-interferón, producido por linfocitos aislados de sangre, previa sensibilización con un derivado de proteínas purificadas. También existe esta prueba para la Paratuberculosis.
- *Peste Porcina Clásica*: la proteína estructural E2, anteriormente denominada gp⁵⁵.
- *Enfermedad de Aujeszky*: La existencia en esta enfermedad de vacunas delectadas hace que sea posible, mediante el diagnóstico serológico, la diferenciación entre animales vacunados o

infectados. La vacunación en nuestro país, es obligatoria desde marzo de 1995, siempre que sea con una vacuna delectada de la proteína vírica gp1 (actualmente denominada gpE), quedando prohibidas las vacunas que utilicen antígenos víricos con la gp1. Deben vacunarse todos los animales reproductores al menos tres veces al año, y todos los animales de cebo al menos una vez entre las diez y doce semanas de vida. Se establecen dos calificaciones sanitarias de explotaciones y unidades veterinarias locales: a) Indemne de E. De Aujeszky: se permite un programa de vacunación pero los animales deben dar resultados negativos a la detección de anticuerpos frente a la gp1; b) Oficialmente indemne de E. De Aujeszky: no se realiza vacunación desde al menos los últimos doce meses y además los animales deben reflejar un resultado negativo frente a la gp1 y a la gp2.

El que den un resultado negativo a gp1, indica que los animales no están infectados (ya que las cepas de campo sí tienen esa glicoproteína) pero no puede vislumbrar si han sido o no vacunados. En cambio, en los animales con un resultado negativo a la gp2 si se puede tener la certeza de que no han sido vacunados con vacunas delectadas de gp1 y no tienen anticuerpos de infección.

Un problema que se encuentra en las pruebas diagnosticas es que los antígenos deben producirse continuamente y en grandes cantidades inoculando virus en cultivos celulares o en animales infectados. Estas preparaciones tienen una serie de desventajas:

- son caras.
- a menudo tienen una vida media corta.
- cada lote de producción debe ser estandarizado.
- potencialmente contienen antígenos adicionales que pueden ser reconocidos por sueros de animales vacunados, emitiendo así resultados falsos positivos.

Un procedimiento alternativo es la preparación de antígenos por medio del ADN recombinante.

b) Fase sólida:

La fase sólida es el soporte sobre el que se realiza la técnica. El inmunoabsorbente debe permitir su fácil manejo, así como la reproducibilidad de la unión de los antígenos o anticuerpos sobre su superficie. El soporte utilizado es la placa de microtitulación, que posee un total de 96 pocillos distribuidos en 8 filas y 12 columnas y cuyo fondo es plano. El material usado en su fabricación es el poliestireno. Estas placas pueden adquirirse estériles, con o sin tapa, y envasadas individualmente. En los Kits comerciales las placas ya vienen con los antígenos o anticuerpos fijado, pero a veces el laboratorio de diagnóstico debe de realizar ese paso, como ocurre en el ELISA e detección de anticuerpos frente a la Peste Porcina Africana.

c) Anticuerpos.

Los reactivos que se emplean como anticuerpos en los ensayos de ELISA son:

- *Anticuerpos policlonales:*

Son anticuerpos que se obtienen por inmunización activa con antígenos altamente purificados en diferentes especies animales: Cabra, caballo, conejo, oveja... Los anticuerpos obtenidos son desarrollados frente a diferentes determinantes antigénicos de un mismo antígeno. Cuando se obtienen de diferente especie animal de aquella con la que se va a trabajar se dicen que son anticuerpos heterólogos.

- *Proteína A (SpA).*

La proteína A, aislada de la pared celular del *Staphylococcus Aureus* (normalmente de la cepa Cowan 1), tiene afinidad por los fragmentos Fc de muchas inmunoglobulinas. Esta reactividad hacia las Ig (como un anticuerpo) hace de la proteína A una poderosa herramienta para el aislamiento de IgG (o sus subclases) o de complejos inmunes, empleándose como anticuerpo marcado con una enzima en los ensayos inmunoenzimáticos.

- *Anticuerpos monoclonales.*

Cada anticuerpo se elabora en una estirpe distinta de linfocitos y células plasmáticas derivadas. Si consiguiéramos separar una célula tal que fabricara un único anticuerpo distinto, la prole o clon de esta célula sería una fuente de grandes cantidades de anticuerpos idénticos frente a un único determinante antigénico: se trataría pues de un anticuerpo monoclonal (AcM).

La disponibilidad de AcM ha marcado una revolución en Biología. La enorme especificidad que estos reactivos poseen los capacitan para identificar moléculas biológicas complejas con gran precisión. También permiten medir sustancias que de otra manera serían indetectables. En 1975, Georges Köhler y Cesar Milstein (Premios Nobel de Medicina y Fisiología en 1984), trabajando en el Laboratorio de Biología Molecular de Cambridge, publicaron en la revista Nature una técnica que permitía producir cantidades ilimitadas de anticuerpos de especificidad predecible y definida. Estos científicos encontraron que fusionando células de bazo de un ratón inmunizado con eritrocitos de oveja, y células de mieloma de ratón, en el medio de cultivo del híbrido se detectaba no solamente la proteína del mieloma, sino también anticuerpos frente a los eritrocitos de oveja.

Los tumores causados por células secretoras de anticuerpos transformados en malignas se conocen con el nombre de plasmocitomas o mielomas, y poseen la capacidad de autorreproducirse de forma indefinida y de producir grandes cantidades de inmunoglobulinas anormales. Estas inmunoglobulinas en, en efecto, anticuerpos monoclonales, pero no hay forma de saber contra qué antígeno se dirigen, ni modo de inducir que los mielomas produzcan anticuerpos frente a un antígeno específico. Los mielomas son relativamente frecuentes en ratas y ratones, y por ello que se utilizan estas especies animales para la producción de mielomas induciéndolos mediante inoculación intraperitoneal de aceites minerales.

La producción de un anticuerpo monoclonal se inicia con la inmunización de un ratón por un antígeno purificado, procediendo como si se tratara de un anticuerpo policlonal. Cuando se detecta una tasa de anticuerpos elevada en el ratón, éste se sacrifica, extrayéndose el bazo, en el cual se ubican numerosas células B. Se procede a continuación a fusionar estas células B con células de mieloma de ratón, en presencia de una solución de polietilenglicol. De esta unión se obtiene una población de células híbridas denominadas hibridomas, entre las que se deben seleccionar las mieloma-células B de bazo, lo cual se consigue cultivando el conjunto de elementos celulares en medios selectivos HAT (Hipoxantina-maninopterin-timidina).

Alcanzando el crecimiento indefinido de las células híbridas, hay que realizar la selección clonal de las diferentes células que elaboran los respectivos anticuerpos específicos, frente a los diversos epitopos del antígeno. Una vez logrado este objetivo, se puede proceder de dos maneras:

- Cultivar en placas multipocillo con medios artificiales el clon seleccionado, pudiendo recuperar el anticuerpo monoclonal del líquido sobrenadante.
- Inyectar el clon elegido en la cavidad peritoneal del ratón y extraer el líquido ascítico, producido como consecuencia del crecimiento tumoral intraperitoneal, donde se hallará el AcM.

Los anticuerpos monoclonales poseen, entre otras, las siguientes características que los hacen de gran utilidad en el laboratorio:

- Alto grado de especificidad.
- Gran estabilidad de las reacciones.
- Posibilidad de disponer siempre el mismo AcMo.
- Fácil conservación de los hibridomas productores.
- Fácil disponibilidad haciendo crecer los hibridomas.
- Mejor estandarización de las técnicas.
- Fácil manipulación.

d) Enzimas marcadoras.

Las tres enzimas más comúnmente usadas como marcaje para ELISA son la peroxidasa de rábano picante (HRPO), la fosfatasa alcalina de ternero y la β -galactosidasa de E. Coli, ya que cumplen, si no todos, la mayoría de los criterios necesarios para obtener ensayos sensibles, baratos y fáciles de realizar. Estas enzimas se fijan al inmunorreactivo en cuestión, antígeno o anticuerpo, y darán lugar a lo que se denomina conjugado.

La más usada es la HRPO ya que posee más ventajas que las otras. Entre otras destacamos:

- Estable cuando se almacena y manipula adecuadamente.
- Puede almacenarse a 4°C durante más de 6 meses.
- Disponible como enzima libre y como conjugada.
- Bastante barata.
- Pequeño tamaño (PM⁺o-40.000 Da).
- Hay muchos sustratos comerciales disponibles para ella.

e) Sustratos.

Los Sustratos más usuales empleados en colorimetría son TMB, ABTS y OPD si la enzima es la peroxidasa, y p-NPP si la enzima es la fosfatasa alcalina. El color que emiten una vez producida la reacción y la longitud de onda a la que se realiza la lectura son las siguientes:

<u>Peroxidasa</u>	TMB	(azul $\lambda=650\text{nm}$)
		(amarillo; $\lambda=450\text{nm}$)
	ABTS	(azul verdoso: $\lambda=405-410\text{ nm}$)
	OPD	(amarillo; $\lambda=490\text{nm}$)
<u>Fosfatasa alcalina</u>	p-NPP	(amarillo; $\lambda=405-410\text{ nm}$).

Aunque son muchos los factores que afectan a la medida de la actividad enzimática (temperatura, pH, fuerza iónica, composición del buffer, reducción del sustrato, formación de productos inhibidores, feed-back por formación de algún producto final, desnaturalización de la enzima), los que más afectan al ensayo, hoy en día, son el tiempo de reacción, la temperatura y la exposición a la luz.

Tiempo de reacción: Ya que las reacciones enzima-sustrato son cinéticas, el tiempo transcurrido desde el comienzo de la reacción hasta su finalización, afecta a la concentración del producto final. Con el fin de asegurar un control preciso del tiempo, debe seguirse el siguiente esquema para cada ensayo que se efectúe, independientemente del número de pocillos o placas que se vayan a ensayar:

- Situar el cronómetro al tiempo deseado y predeterminado de incubación del sustrato.
- Iniciar el cronómetro con la adición del sustrato en el primer pocillo o conjunto de pocillos.
- Usar un patrón de pipeteo rítmico para añadir el sustrato a todos los pocillos.
- Cuando el cronómetro señale el final del periodo de incubación, parar la reacción usando el mismo patrón y tasa de pipeteo que el usado para añadir el sustrato.

Condiciones de desarrollo: La temperatura y la luz pueden afectar al ensayo. Estos dos parámetros son la causa del "efecto borde", es decir, que la densidad óptica en los pocillos exteriores de la placa pueda ser mayor que en los centrales. La causa es que en los pocillos periféricos hay más superficie expuesta a intercambio de temperatura con el exterior y a la exposición a la luz. Hay que pensar que todas las reacciones enzimáticas, al ser reacciones cinéticas, dependen de la temperatura, lo cual implica que debe permanecer constante durante todo el ensayo. Para evitar este efecto se deben atemperar los reactivos antes de su utilización y las placas deben incubarse tapadas con adhesivos.

La luz puede ser causa del efecto borde cuando el sustrato es fotosensible (como OPD), aunque la causa principal es la temperatura. Aunque muchos sustratos son estables con la presencia de la luz,

es muy recomendable que la incubación del mismo sea realizada en completa oscuridad, con el fin de prevenir problemas con el efecto borde causados por las variaciones de luz incidente en cada pocillo. También se debe evitar trabajar muy cerca de ventanas donde entre mucho sol.

f) Cromóforo.

Antes de leer la densidad óptica debe adicionarse a cada pocillo la solución de frenado. Después es importante mezclar completamente el contenido de los pocillos para asegurar el cese por completo de la reacción y la total dispersión del producto de color.

g) Métodos de detección.

Hay una gran amplia gama de lectores en el mercado que varían desde el simple colorímetro (capaz de leer a una sola longitud de onda), a sofisticados espectrofotómetros para microplacas (capaces de leer a varias longitudes de onda). La principal función del lector de placas es medir la luz absorbida por la solución coloreada a longitudes de onda determinadas (que se indica en el protocolo del ensayo). Hoy en día los espectrofotómetros se acompañan de programas informáticos que hacen más fácil la emisión e interpretación de resultados. La lectura del color se realiza en unidades de absorbancia (UA) o densidad óptica (DO).

4.- Interpretación de los resultados:

Es importante decir que el ELISA es una prueba cuantitativa. Para la interpretación de los resultados, una vez conocidos los valores de los testigos positivos, testigos negativos y blanco de las pruebas, debemos aplicar unas reglas de validación del ensayo así como fórmulas para la cuantificación. El blanco de reactivos nos indicará el ruido de fondo de la prueba. Los testigos positivo y negativo nos indican si la prueba se ha desarrollado con éxito o no. También debe establecerse un punto de corte o "cut off", que es la lectura a partir de la cual se definirán aquellos sueros que son negativos, dudosos o positivos.

Por ejemplo, en la prueba de detección de anticuerpos frente al virus de la Peste Porcina Africana, se deben realizar las siguientes comprobaciones:

Cut off = CN + (CP*0,2) CN: Densidad óptica del control negativo.

CP: densidad óptica del control positivo.

- Todos los sueros con valores de absorbancia por debajo del cut off se considerarán negativos.
- Todos los sueros con valores de absorbancia comprendidos entre el cut off y el cut off±0,200 se considerarán dudosos.
- Todos los sueros con valores de absorbancia por encima del cut off ± 0,200 se considerarán positivos.

Así pues, hay tres posibles resultados que pueden emitirse tras el ensayo: negativo, dudoso y positivo.

5.- Clasificación de los ELISA.

Los ELISA se pueden clasificar en función de lo que signifique la producción de color.

A) *No competitivos* (si produce más color el resultado es más positivo).

A.1) Indirecto]=Ag + **Ac+anti-AC***E

A.2) Doble sándwich de anticuerpos (DAS)

]Ac+**Ag**+Ac*E

A.3) Indirecto doble "sándwich" de anticuerpos (IDAS)

] =Ac+**Ag**+Ac+anti-Ac*E

A.4)]=Ac=Ag+**Ac**+anti-Ac*E

A.5) Comparación de la respuesta a dos antígenos:

] = Agviral + **Ac** + anti-Ac * E comparación de resultados.

] = Ag celular + **Ac** + anti-Ac * E

A.6) Prueba de la detección de g-interferón:

Incubación para producir g-interferón

] = Ac + γ -**IFN** + anti- γ -IF

B) *Competitivos* (si produce más color el resultado más negativo).

B.1) Indirecto] = Ag + **Ac** + Ac * E

B.2)] = Ac + (Ag * E + **Ag**)

B.3)] = Ag + (Ac * E + **Ag**)

B.4) Captura competición

] = Ac + Ag + Ac * E + **Ac**.

Leyenda:] fase sólida En negrita el reactivo a detectar
 = unión a la fase sólida E es una enzima fijada a un reactivo
 + adición de un reactivo () adición de los reactivos al mismo tiempo.

A continuación explicaremos uno de los tipos de ELISA citado para comprender los pasos que tiene la prueba:

A.1). ELISA INDIRECTO NO COMPETITIVO:

1. - Fijación de antígenos específicos para anticuerpos objeto de estudio. Lavado para eliminar aquellos antígenos no fijados o deficientemente fijados.
2. - Adición de suero problema. Si no hay anticuerpos reaccionarán con los antígenos fijados. Lavado para eliminar los anticuerpos no fijados deficientemente fijados.
3. - Adición de Anti-Ig conjugadas con una enzima. Estas reaccionaran con la Ig que quedaron unidas al Ag-Lavado para eliminar las Anti-Ig marcadas que no se hubieran fijado.
4. - Adición de un sustrato que sea capaz de actuar sobre la enzima marcadora. Frenado de la reacción.
5. - Lectura de las placas en un espectrofotómetro.

A.6) ELISA para detección de g-interferon (-IFN) en respuesta al Mycobacterium bovis:

Es interesante conocer el fundamento y los pasos en la realización de ésta técnica pues difiere de las demás y puede ser usada en el diagnóstico de tuberculosis de ganado vacuno. Primero recordemos lo que es el γ -interferon. Los interfeerones son péptidos de acción antiviral que juegan un papel importante en la resistencia inespecíficas de la infección. Al menos hay tres entidades distintas denominadas α , β , y γ , que no solo funcional como antivirales sino que también han demostrado poseer un efecto antiproliferativo y participan activamente en los mecanismos reguladores de la respuesta inmune.

El γ -IFN es producido por linfocitos T (CD4+ y CD8+) y células NK, estimulados con antígenos o mitógenos. El γ -IFN producido es eficaz contra cualquier otro tipo de infección viral, pero únicamente protege las células de la especie animal de donde proviene. El ácido nucleico viral, al penetrar en la célula, comienza a replicarse y es durante esa fase cuando la célula reactiva el material genético contenido en el ADN nuclear transcribiendo un mensaje en un ARNm. La traducción de ese mensaje significa la síntesis de la proteína interferón. Cada especie animal sintetiza su propio interferón, que

abandona la célula productora destinada a morir por la infección viral. Por sí solo es incapaz de salvar a una célula agredida, pero resulta efectivo para la protección de células invadidas.

Las funciones que desarrolla el γ -IFN son:

- Efecto antiproliferativo de los virus en células invadidas.
- Potencia la expresión de las moléculas de clase I y de clase II codificadas por el Sistema Mayor de Histocompatibilidad, lo que favorece la presentación de los antígenos a los linfocitos T.
- Es el activador de células K, NK y macrófagos más potente de los que se conocen.
- Promueve la maduración de linfocitos T citotóxicos y estimula la secreción de anticuerpos en los linfocitos B.
- Activa las células NK, los neutrófilos (aumenta la producción de radicales de oxígeno) y las células endoteliales.

El fundamento de la prueba es similar al de la prueba de la intradermorreacción: los animales que han estado expuestos al *M. Bovis* o que han contraído la infección tienen linfocitos en la sangre sensibilizados a los antígenos microbacterianos. En los animales infectados se observa una respuesta de hipersensibilidad retardada in vivo después de la administración subcutánea de un derivado de proteína purificada (PDD) del *M. Bovis*. Esta respuesta de hipersensibilidad puede simularse in vitro si se exponen los linfocitos de las reses infectadas al PPD de *M. Bovis*. En respuesta a esta exposición, los linfocitos T sensibilizados producirán gamma-interferón, que puede detectarse mediante el ELISA. Los linfocitos que proceden de animales que no han estado expuestos a estos antígenos no producirán g-interferón.

Realización del ELISA: Se necesita una muestra de sangre entera de cada animal, recogida preferentemente en tubos de vacío con algún anticoagulante. Lo que interesa de estas muestras es la población de linfocitos de la misma y, para asegurar su viabilidad, la incubación de la sangre entera con los PPD, debe comenzar dentro de las 16 horas siguientes a su obtención.

Una vez en el laboratorio se inicia rápidamente el ensayo. Para cada muestra, se agrega a 3 tubos limpios 1 ml. de sangre. A los tres tubos de cada muestra se le añade: al primero nada, al segundo PPD-M. Bovis y al tercero PPD-M. Avium. Incubamos durante 18 a 36 horas (óptimo 24 horas) en una estufa de ambiente húmedo de CO₂ (al 5%) a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se centrifugan los tubos a 1500g durante 20 minutos, para separar las células del plasma. El plasma puede analizarse inmediatamente o almacenarse congelado a -20°C, hasta el momento en que se realice el análisis.

El ELISA empleado es del tipo no competitivo y de doble sándwich de anticuerpos, siendo el "antígeno" a buscar el gamma-interferón. Se debe tener en cuenta que cada sangre tiene tres fracciones a analizar.

La interpretación de los resultados entra dentro de la comparación entre las tres fracciones por muestra. Esta técnica de diagnóstico para la tuberculosis bovina posee ventajas sobre la realizada en el campo, la intradermorreacción:

- Sólo hace falta una manipulación del animal, lo cual puede ser una alternativa para aquellas explotaciones de difícil manejo.
- No hay que esperar una desensibilización del animal para realizar otros diagnósticos.
- Al realizarse una prueba ELISA se tiene la ventaja de la automatización y procesamiento de gran número de muestras.

Como desventajas presentan:

- El análisis debe realizarse antes de las 16 horas de extracción de la sangre, lo cual puede suponer un inconveniente por cuestión de horarios y distancias entre la explotación y el laboratorio.

- Posee los mismos fallos de sensibilidad y especificidad que la prueba de la tuberculina al estar basada en los mismos principios.
- Los Kits comerciales son caros.

E) IMMUNOBLOTTING O WESTERN BLOTTING.

El término blotting se refiere a la separación de ADN, ARN o proteínas por electroforesis en geles y su transferencia e inmovilización a una membrana. El inmunoblotting (IB) aplica las técnicas inmunoquímicas para la identificación de las moléculas transferidas. Es una técnica muy sensible, de fácil manejo y ejecución, que no necesita de aparataje especial para su ejecución. Actualmente ésta técnica se emplea como técnica de confirmación para la detección de anticuerpos frente al virus de la Peste Porcina Africana. El tercer paso de la técnica, el inmunoblotting en si, es el que desarrolla en los laboratorios de diagnóstico, siendo desarrollados los pasos anteriores en el C.I.S.A.-I.N.I.A., de Valdeolmos (Madrid), que es el Laboratorio Nacional de Referencia de la Peste Porcina Africana.

En enfermedades infecciosas, en las que se pretende la detección de anticuerpos,, las técnicas de confirmación se utilizan de forma rutinaria, Estas técnicas se basan en general en la detección de proteínas específicas inducidas por los agentes infecciosos, que reaccionan con los sueros positivos. Rutinariamente, en nuestro país el análisis de sueros porcinos para la detección de anticuerpos frente al virus de la Peste Porcina Africana se realiza mediante la técnica ELISA. Sin embargo, y al igual que sucede con otras enfermedades, se hace necesario confirmar que los resultados positivos obtenidos con las técnicas de análisis de gran número de muestras, como sucede con el ELISA.

El virus atenuado España 75 (E75) es el utilizado para la preparación del antígeno soluble citoplasmático (SC-P). Las proteínas que se utilizan en el diagnóstico son las inducidas en las células infectadas por el virus, de peso molecular comprendido entre 23 y 35 Kilodaltons (concretamente las de peso molecular: 23, 23,5, 24,5, 25, 25,5, 30, 31 y 34 Kilodaltons). Estos polipéptidos son los primeros en reaccionar en inmunoblotting, alrededor del 8º día post-infección.

E.1) Pasos de la Técnica.

La técnica comprende varios pasos:

- 1.- Separación electroforética de proteínas.
- 2.- Transferencia de las proteínas a una membrana.
- 3.- Detección inmunoquímica de las proteínas.

1) Separación electroforética de las proteínas.

Es el primer paso y comprende la realización de una electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Este paso separará las distintas proteínas virales según su peso molecular.

2) Transferencia de las proteínas desde geles a membranas:

Se realiza electroforéticamente, aplicando una corriente eléctrica. Esta técnica empleada se denomina transferencia electroforética, transferencia semiseca o blotting semiseco, debido a que en su utilización no es necesario un volumen de tampón de transferencia excesivo. En la transferencia electroforética el papel usado es la nitrocelulosa, que es colocado entre el gel y el paquete de papeles absorbentes. Luego son suspendidos en un tanque de tampón entre dos electrodos. Una vez realizada la transferencia se recortan transversalmente las láminas, seleccionando sólo la zona del filtro en la que se hayan fijado las proteínas comprendidas entre los 23 y 35 kilodaltons de peso molecular, como material antigénico, desechando el resto.

3) Inmunorreacción y revelado de las tiras de inmunoblotting:

Este último paso es el que se realiza en los Laboratorios de diagnóstico de Sanidad Animal. Las tiras se emplazan en una bandeja de metacrilato con una serie de canales especialmente diseñada para

ello. Siempre que se realiza una prueba hay que reservar una tira que se hará reaccionar con un suero control positivo, es decir, que tiene anticuerpos específicos frente a las proteínas fijadas, y otra con un suero control negativo. Los pasos a dar son los siguientes:

1. - Bloqueo de las tiras con PBS pH 7,2 con leche en polvo. Es esencial para prevenir uniones no específicas de los reactivos de las membranas de nitrocelulosa. El bloqueo satura los sitios de unión no ocupados por las proteínas transferidas
2. - Incubación de los sueros problemas y del suero control diluidos al 1/40 en tampón PBS/leche durante 45 minutos a 37°C en agitación.
3. - Lavado de las tiras con PBS pH 7,2 con leche en polvo.
4. - Adición del conjugado de proteína A-peroxidasa e incubación de otros 45 minutos a 37°C en agitación.
5. - Lavado de las tiras con PBS pH 7,2 con leche en polvo.
6. - Revelado de las tiras con una solución de PBS pH 7,2, 4-cloronaftol y agua oxigenada.
7. - Frenado de la reacción con agua destilada.

E.2) Interpretación de los resultados.

Tras el revelado se puede observar en la tira donde se incubó el suero control positivo, la aparición de una serie de bandas teñidas de color azul que corresponden a las proteínas transferidas. La aparición de bandas en las tiras de los euros problemas en concordancia con la distribución de las mismas, hace que el resultado sea positivo. Es importante resaltar que debe coincidir la altura y la intensidad de color.

La técnica podría emitir resultados falsos negativos si los sueros a analizar se encuentran en mal estado de conservación y podridos, aunque conserve la positividad durante más tiempo que cuando ese mismo suero se analiza por la técnica ELISA. También pueden observarse la aparición de bandas no específicas que no coinciden con las de la tira del suero control positivo.

THE UNIVERSITY OF CHICAGO LIBRARY
1207 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637

THE UNIVERSITY OF CHICAGO LIBRARY
1207 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637

THE UNIVERSITY OF CHICAGO LIBRARY
1207 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637

THE UNIVERSITY OF CHICAGO LIBRARY
1207 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637

THE UNIVERSITY OF CHICAGO LIBRARY
1207 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637

THE UNIVERSITY OF CHICAGO LIBRARY
1207 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637

THE UNIVERSITY OF CHICAGO LIBRARY
1207 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637

THE UNIVERSITY OF CHICAGO LIBRARY
1207 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637

THE UNIVERSITY OF CHICAGO LIBRARY
1207 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637

THE UNIVERSITY OF CHICAGO LIBRARY
1207 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637

THE UNIVERSITY OF CHICAGO LIBRARY
1207 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637

THE UNIVERSITY OF CHICAGO LIBRARY
1207 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637

Concepción Gómez-Tejedor Ortíz

Laboratorio Central de Veterinaria. (Algete.Madrid).

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

NUEVAS TECNOLOGIAS APLICADAS AL DIAGNÓSTICO.

En los últimos años el diagnóstico laboratorial ha experimentado grandes cambios debido al desarrollo de avances biotecnológicos que han mejorado considerablemente técnicas ya existentes y que han permitido la puesta a punto de otras técnicas no inimaginables hace tan solo 15 años.

AVANCES TECNOLÓGICOS APLICADOS A LA DETECCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son las configuraciones proteínicas específicas producidas por los linfocitos B en respuesta a un antígeno específico y capaz de reaccionar con dicho antígeno. Los anticuerpos se producen en el tejido linfóide y una vez producidos se encuentran fundamentalmente en la fracción plasmática de la sangre.

La serología se refiere a las reacciones que utilizan las reacciones antígeno-anticuerpo en el laboratorio con fines de diagnóstico. Las pruebas serológicas se pueden utilizar en el laboratorio de dos formas diferentes: para identificar antígenos desconocidos o para detectar anticuerpos producidos frente a un antígeno específico en el suero de un animal.

Actualmente para la detección de antígeno se utiliza muchos sistemas de ELISA, de captura de antígeno usando como anticuerpo de captura un anticuerpo monoclonal y como anticuerpo detector otro anticuerpo monoclonal distinto que reconozca otro epitoma o bien un suero policlonal. Hay que recordar que el uso de ELISAs se ha extendido, abaratado y estandarizado mucho con la incorporación de anticuerpos monoclonales.

Para la detección de anticuerpos se están desarrollando cada vez más, ELISAs, que utilizan proteínas recombinantes solas o asociadas con anticuerpos monoclonales.

1.1. - Anticuerpos monoclonales.

Para utilizar anticuerpos conocidos los podemos preparar de dos formas:

- **Preparación de antisuero en animales:** Se inoculan animales con el antígeno. Tras dejar tiempo suficiente, según los protocolos específicos de inmunización, para que se hayan producido los anticuerpos frente a dicho antígeno, el animal se sangra y se obtiene el suero. El uso de estos antisueros policlonales tiene el problema de que el 90% de anticuerpos en el suero animal pueden haber sido producidos frente a antígenos del ambiente en vez de frente al antígeno inyectado. El desarrollo de la técnica de anticuerpos monoclonales ha solucionado ampliamente este problema.

- **Preparación de anticuerpos monoclonales:** Son anticuerpos de un único tipo específico. Para producirlos, un animal es inyectado con el antígeno específico para el anticuerpo deseado. Después del tiempo apropiado para la producción de anticuerpos, se toma el bazo del animal. El bazo es rico en células plasmáticas y cada célula plasmática produce únicamente un tipo de anticuerpo específico. Sin embargo, as células plasmáticas no crecen artificialmente en cultivos celulares. Por eso, una célula plasmática, produciendo el anticuerpo deseado, se fusiona con una célula de mieloma (una célula cancerígena que crece rápidamente en cultivos celulares) y se produce una célula híbrida o hibridoma. El hibridoma tiene las características de las dos células madre: Produce anticuerpos específicos como la célula plasmática y se reproduce rápidamente en cultivos celulares como la célula de mieloma. Los hibridomas se multiplican artificialmente produciendo grandes cantidades de anticuerpo específico.

Los anticuerpos monoclonales se utilizan actualmente de forma rutinaria en investigación y en diagnóstico, pudiéndose utilizar en prácticamente todas las técnicas basadas en la reacción antígeno-anti-

cuerpo. La ventaja fundamental del uso de anticuerpos monoclonales frente a sueros policlonales es la calidad constante no dependiendo de lotes ya que una vez producido el hibridoma se pueden obtener anticuerpos monoclonales de forma indefinida. Esto hace también que el precio sea más bajo. Así mismo, hay que valorar la falta de inespecificidades. Algunas aplicaciones de los anticuerpos monoclonales son bastante recientes, empezando a ser utilizados para el tratamiento de algunos tipos de cáncer y algunas otras enfermedades. Para este uso, los anticuerpos monoclonales deben ser modificados con el fin de hacerlos más compatibles con el sistema inmune humano por lo que se están utilizando anticuerpos monoclonales recombinantes en los que se sustituyen las secuencias de la región constante del ratón por las correspondientes secuencias de la región constante humana sin modificar la región específica del anticuerpo monoclonal.

1.2. - Proteínas recombinantes.

El uso de proteínas recombinantes para la detección de anticuerpos en sueros problema presenta varias ventajas respecto de los antígenos convencionales. El primer punto a destacar es que no es material infeccioso, lo que puede permitir su uso en laboratorios sin instalaciones adecuadas de bioseguridad. También es fundamental el hecho de que el uso de productos recombinantes permite la selección de los antígenos que mejor rendimiento, sensibilidad y especificidad demuestran. Igual que pasa con los anticuerpos monoclonales, una vez obtenidas las proteínas recombinantes, existe una producción prácticamente ilimitada de reactivos de idéntica calidad. Los antígenos recombinantes se purifican con mayor facilidad que los convencionales obtenidos en cultivos celulares o en animales lo que reduce los falsos positivos.

Para su producción el primer paso consiste en el clonaje de los genes de las proteínas que interesan y su expresión en sistemas procariotes para su obtención a gran escala. Para probarlas, una vez obtenidas, se enfrentan a paneles de sueros controlados, sueros negativos y sueros positivos tanto policlonales como monoclonales si se dispone de ellos.

DETECCION DEL GENOMA: REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La PCR es una técnica que se basa en la amplificación de secuencias específicas de ADN reproduciendo "in vitro" un fenómeno natural. Se producen millones o billones de copias de un fragmento de ADN en pocas horas. En el ámbito del diagnóstico veterinario se utiliza para la detección de virus, bacterias o parásitos. La PCR se desarrolló en 1985 por Kary B. Mullis, quien fue galardonado por ello con el Premio Nobel de Química en 1993 y las primeras publicaciones de PCR aplicado en veterinaria datan de 1989.

Las amplificaciones del ADN por PCR se lleva a cabo por la sucesión de tres pasos que implican incubaciones a diferentes temperaturas. En el primer paso, la doble cadena del ADN se desnaturaliza por calor quedando separadas las dos cadenas complementarias. En el siguiente paso, el de anillamiento, dos "primers" o cebadores (secuencias de aproximadamente 18-30, nucleótidos) hibridan específicamente, a baja temperatura las secuencias exactas de ambos extremos de la región concreta que nos interesa amplificar dentro del ADN. Durante el último paso se produce la extensión, a temperatura media, de los cebadores hibridados utilizando la enzima ADN polimerasa. El conjunto de estos pasos se denomina ciclo y es repetido de forma seguida durante 20 a 40 veces, actuando las cadenas sintetizadas como moldes para el siguiente ciclo. Estos ciclos se lleva a cabo de forma automática en un aparato programable denominado termociclador en el que se programa el número de ciclos y las temperaturas adecuadas de cada paso dentro de los ciclos. La secuencia de ADN diana se amplifica de forma exponencial aproximadamente 2^n , siendo n el número de ciclos.

Cuando el ácido nucleico que se quiere amplificar es ARN, en vez de ADN, hay que realizar un paso previo a la amplificación, que consiste en el paso de ARN a ADN, complementario con el uso de otra enzima que es la Transcriptasa Reversa (RT). En este caso la PCR pasa a denominarse RT-PCR. La técnica PCR presenta como ventajas evidentes frente a otras técnicas de detección de agentes patógenos, la sensibilidad (ya que existe una amplificación de millones de veces), la rapidez (se realiza en horas mien-

tras que por ejemplo el aislamiento necesita días e incluso semanas) y el hecho de que no utilice reactivos biológicos. Entre los inconvenientes se puede destacar la necesidad de una mayor formación que para la mayoría de las otras técnicas, el exquisito cuidado con el que hay que realizarla ya que las contaminaciones son frecuentes y el precio que a pesar de que con la extensión de su uso va disminuyendo, aún sigue siendo bastante elevado.

Variaciones de la técnica PCR:

- La PCR "nested" consiste en el uso de un segundo par de cebadores para amplificar un subfragmento del producto de PCR de la primera reacción. Esta PCR "nested" presenta una mayor sensibilidad ya que la amplificación se está llevando a cabo dos veces. Asimismo tiene una mayor especificidad al usar cuatro cebadores en vez de dos. Como inconveniente hay que poner énfasis en la mayor posibilidad de contaminación respecto de la PCR simple.
- La PCR "multiplex" que permite el diagnóstico de diferentes agentes en una única reacción de PCR lo que es muy útil cuando hay que descartar varias posibles etiologías de una forma simple y sobre todo rápida.
- La PCR "in situ" consiste en una PCR que se lleva a cabo directamente sobre tejido.

El resultado final de la amplificación del fragmento de Adn seleccionado tiene que ser puesto en evidencia.

- La forma más generalizada es visualizando el producto final de la amplificación en un gel de agarosa comparando el número de pares de bases del producto con el número esperado para la secuencia diana.
- Otra forma de poner en evidencia el producto amplificado y además de confirmar la especificidad es con el uso de una sonda de ADN específica que hibride con el producto final, estando esta sonda marcada bien con radiactividad o bien de forma enzimática.
- Una forma cómoda para algunos laboratorios es la detección e identificación del producto por medio de un ELISA (utilizando cebadores biotinizados) alargándose en este caso considerablemente la técnica.

Actualmente, una vez ya extendido el uso de la PCR, se están haciendo esfuerzos dirigidos a la cuantificación del ADN inicial, a la automatización y a la reducción del tiempo de realización de las reacciones de PCR. Tanto la automatización como el ahorro de tiempo se pueden poner en práctica en las distintas etapas de la PCR: extracción, preparación/amplificación y detección de producto.

Reducción del tiempo:

Extracción:

La extracción del ácido nucleico se ha venido realizando por dos sistemas básicamente, precipitación por centrifugación y filtración. El sistema de filtración permite realizar la extracción de muchas muestras en un tiempo relativamente corto ya que últimamente se han desarrollado sistemas para la extracción de muchas muestras en un tiempo relativamente corto ya que últimamente se han desarrollado sistemas para la extracción en placa. Esto permite la extracción de 96 muestras en un poco más de tiempo de lo que se necesitaba hasta ahora para la extracción de una muestra ya que la filtración se hace simultánea en todos los pocillos de la placa.

En la actualidad se acaba de desarrollar un nuevo sistema, a punto de comercializarse en nuestro país, que parece va a reducir aún más el tiempo de extracción. Este sistema de extracción se basa en una separación magnética. Son partículas paramagnéticas recubiertas de sílice (45%) y magnetita (55%) y que permiten su utilización en un formato único o en placa y que además es de fácil automatización.

Amplificación:

En los termocicladores que se utilizan más habitualmente el producto a amplificar junto con los distintos reactivos van introducidos en tubos tipo "eppendorf" de 0,5ml o 0,2ml o bien en

placas de distinto tamaño. Existen en el mercado termocicladores que sustituyen los tubos o las placas por capilares lo cual permite reducir el tiempo total de amplificación de 3-4 horas a 10-20 minutos.

Detección del producto:

El tiempo necesario para la detección se reduce considerablemente cuando se utilizan las técnicas desarrolladas en los últimos años y que están mejorando continuamente de detección en tiempo real por fluorescencia. Esto significa que durante la PCR, una luz láser es distribuida a los 96 pocillos de una placa por fibras ópticas y la emisión de fluorescencia resultante vuelve por las fibras y es dirigida a un espectrógrafo. El resultado de las 96 muestras está disponible un minuto después de haberse completado los ciclos. Otra ventaja de este sistema es que permite el mismo tiempo, y con los mismos plazos de detección realizar PCR multiplex" ya que se pueden utilizar diferentes fluorocromos.

Automatización:

La automatización siempre es deseable cuando se analiza un número muy elevado de muestras. Además tiene la ventaja de que los volúmenes de reacción son muy pequeños lo que quiere decir que se necesitará muy poca muestra además de gastar muy pocos reactivos (hecho importante ya que algunos, como la polimerasa, son caros). En la automatización algunas de las reglas de la PCR se convierten en obsesión. Entre estas podemos destacar el evitar las contaminaciones, frecuentes en la PCR, y la necesidad de manipulaciones libres de DNAsas y RNAsas enzimas que destruyen el ADN y el ARN respectivamente. ¿Es posible automatizar la PCR desde la extracción hasta la detección?.

- Extracción: las etapas de filtración y de centrifugación son difíciles de automatizar por lo que la automatización es más clara en los sistemas magnéticos en los que ya es una realidad.
- Preparación/Amplificación: Ya se están comercializando robots que realizan la adición de los reactivos en placa al mismo tiempo que hacen las funciones de termocicladores. Las placas están evolucionando de 96 a 384 y 1536 pocillos.
- Detección de los productos amplificados: Se han automatizado diferentes sistemas de detección:
 - Carga sobre gel para electroforesis
 - Dot-blot en placa
 - Sistema de detección por fluorescencia.

Nuevo concepto de vacunas:

Todo lo visto como avance en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, tiene su aplicación en la detección de animales vacunados con las nuevas generaciones de vacunas:

- **Vacunas delectadas:** Los avances en los conocimientos de biología molecular han permitido producir vacunas con marcadores serológicos que hacen posible diferencias los animales vacunados de los animales con infección natural. Para ello se suprime del genoma un gen que codifica una proteína cuya función no es esencial. Esta cepa vacunal no inducirá anticuerpos específicos contra esta proteína, puesto que ésta ya no se expresa. Utilizando un sistema de diagnóstico para detectar esa proteína concreta y otra proteína cuyo gen no se haya eliminado podremos decir si un animal está vacunado, infectado o si es negativo. La vacuna contra la enfermedad de Aujeszky ha sido pionera en el desarrollo de vacunas delectadas pero le han seguido otras como la de la *Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR)*.
- Vacunas recombinantes:
 - Vacuna contra la rabia:* Utiliza un poxvirus recombinante de vaccinia como vector de expresión. Se inserta el gen que codifica la glicoproteína G del virus de la rabia en el genoma del virus vaccinia. Esta vacuna se administra a los zorros de Europa y a los principales reservorios del virus en EEUU, mapache, mofetas y coyotes.

□ *Vacuna contra la Peste Porcina Clásica*: De los distintos intentos de vacunas con tecnología recombinante, la que está actualmente en fase de experimentación con miras a su comercialización en un futuro próximo es una vacuna de subunidades que utiliza como inmunógeno la glicoproteína E2. Para producir esta proteína recombinante, el gen que la codifica la E2 se expresa en baculovirus. Al mismo tiempo que la vacuna, se está desarrollando una prueba de ELISA que permite detectar anticuerpos frente a otra proteína del virus de la PPC diferente de la E2, así como frente a la E2, lo que permitirá afirmar si el animal ha tenido contacto con virus de campo o ha sido vacunado.

□ Existen otras vacunas comercializadas o en fase de desarrollo que utilizan esta tecnología recombinante: *Enfermedad de Newcastle, Peste Aviar, Peste Bovina, etc....*

Para la diferenciación serológica de animales vacunados de animales infectados se usan básicamente ELISAs desarrollados con los sistemas estudiados anteriormente. Se usan ELISAs con proteínas recombinantes como antígeno. También se utilizan ELISAs que llevan anticuerpos monoclonales que compiten con los posibles anticuerpos presentes en los sueros.

Cada vez se utiliza más la PCR para la diferenciación de cepas vacunales o de campo de agentes patógenos detectados, por ejemplo PCR específica del gen de la glicoproteína gE para la diferenciación de cepas vacunales de la Enfermedad de Aujeszky.

...

...

...

...

...

...

...

...

...

Juan Manuel Gómez Pacheco.

Jefe del Dept^o. de Enfermedades Exóticas y Emergentes.
Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Córdoba.

TENCOLOGÍA ANALÍTICA EN VIROLOGÍA

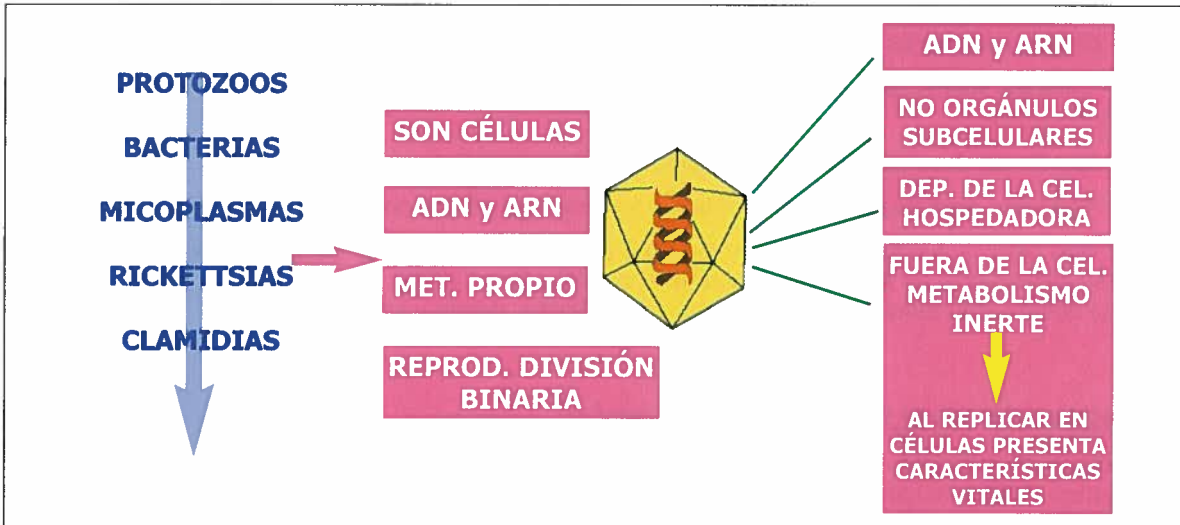
Resumen:

En el presente tema se abordan las técnicas más frecuentes empleadas en el laboratorio para el diagnóstico de enfermedades víricas. Se van a tratar sólo aquellas que suponen la puesta en evidencia del virus o alguno de sus componentes, sin tener en cuenta las técnicas que sirven para el diagnóstico vírico, basadas en la detección de anticuerpos específicos en suero, que han sido tratadas en otro tema.

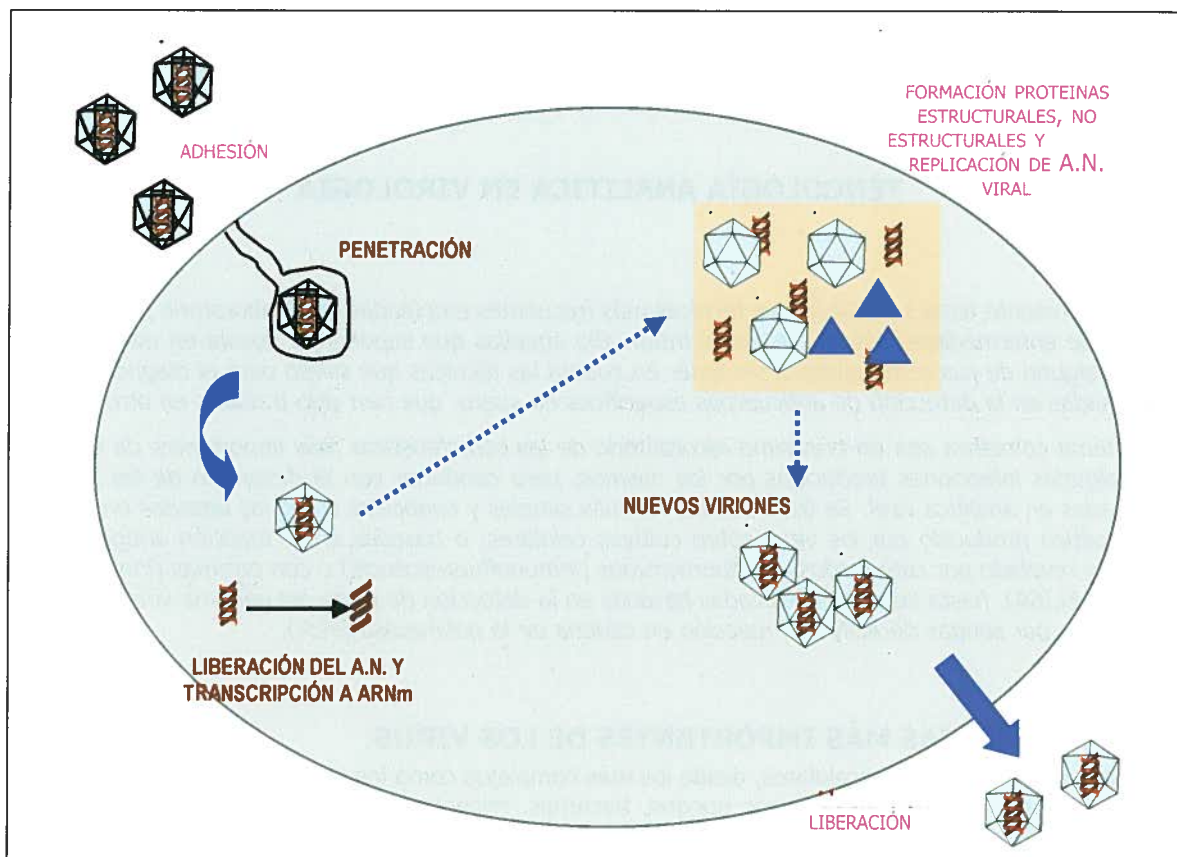
El tema comienza con un brevísimo recordatorio de las características más importantes de los virus y de algunas infecciones producidas por los mismos, para continuar con el desarrollo de las técnicas empleadas en analítica viral. Se tratan desde las más simples y conocidas como las basadas en el efecto citopático producido por los virus sobre cultivos celulares, o basadas en la reacción antígeno-anticuerpo y revelado por conjugados con fluorocromos (inmunofluorescencia) o con enzimas (inmunoperoxidasa o ELISA), hasta las más sofisticadas basadas en la detección de parte del genoma vírico, como la hibridación por sondas de ADN o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

CARACTERÍSTICAS MÁS IMPORTANTES DE LOS VIRUS.

Todos los organismos unicelulares, desde los más complejos como los protozoos, hasta los más simples como las clamidias, pasando por hongos, bacterias, micoplasmas y rickettsias, contienen en su estructura ADN como depositario de su información genética, así como ARN, y poseen su propia maquinaria metabólica para la producción de macromoléculas y energía. Estos microorganismos crecen sintetizando ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos, y se multiplican por división binaria.



Los virus por otra parte son más pequeños y simples en su estructura. Contiene sólo un tipo de ácido nucleico, ADN o ARN, pero nunca ambos en un mismo virus. Carecen de mitocondrias, ribosomas y otro orgánulo subcelular, por lo que dependen completamente de la célula que infectan para la producción de energía y síntesis proteica. Fuera de una célula sensible, una partícula vírica es inerte, pero cuando se replica en ella presenta las características de todo organismo vivo. Dentro de la célula los virus se multiplican utilizando la maquinaria de la célula que infecta, la cual pone a trabajar a su servicio con las instrucciones del material genético vírico.



Las consecuencias para la célula infectada por un virus son muy variadas, dependiendo del tipo. Estas consecuencias pueden ser las siguientes:

- 1.- *Cambios profundos metabólicos y morfológicos (ECP) que conducen a la muerte celular.*
- 2.- *Cambios ligeros que afectan sólo a la funcionalidad celular sin provocar muerte ni efecto citopático.*
- 3.- *Ningún cambio aparente (Virus integrado en el genoma).*
- 4.- *Alteración morfológica y transformación tumoral. Las células se dividen indefinidamente.*

Por otro lado, la puerta de entrada y la forma de difusión de un virus en el organismo animal, tiene una gran importancia en la analítica laboratorial de infecciones víricas, porque el conocimiento de éstas en cada enfermedad dirigirá el trabajo hacia qué se busca, donde y con qué método.

TECNOLOGÍA ANALÍTICA EN VIROLOGÍA.

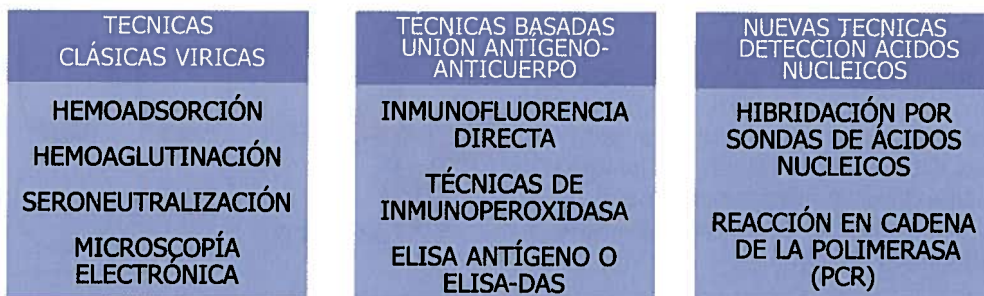
El diagnóstico de una enfermedad producida por virus, puede realizarse en algún caso por las manifestaciones clínicas, la evolución y las lesiones que produce en los animales infectados. Pero la mayoría de las veces incluso en los procesos más evidentes, se necesita la confirmación laboratorial. También podemos afirmar que en ocasiones, el análisis de laboratorio por sí solo, no es suficiente para hacer el diagnóstico de una afección vírica y hay que apoyarse en otros hechos. Existen varios ejemplos donde es imprescindible la participación de laboratorio con las técnicas que les son propias. Así tenemos como ejemplo, las situaciones del siguiente cuadro:



Las técnicas que se aplican en la analítica de enfermedades víricas, están lógicamente influidas por las características que poseen los virus en cuanto a su metabolismo, lo que supone una dificultad adicional para su aislamiento e identificación, sobretodo si se compara con las técnicas aplicadas en microbiología. Estos inconvenientes se han evitado ideando técnicas cada vez más ingeniosas y efectivas, hasta el punto de que alguna de ellas, por no decir casi todas, son aplicadas posteriormente al diagnóstico de procesos provocados por otros microorganismos como bacterias o parásitos.

La de mayor difusión en todos los centros analíticos, son las basadas en la reacción antígeno-anticuerpo con sustancias marcadas, por su rapidez y facilidad de empleo, pero con el desarrollo de las técnicas de biología molecular han aparecido algunas nuevas de gran importancia. No hay que olvidar sin embargo, las más clásicas, basadas en alguna característica particular de algún grupo de virus (como la hemadsorción, aglutinación, etc.) que aún se siguen empleando, aunque en general se han complementado o perfeccionado con otras de más reciente aparición.

Vamos a desarrollar el tema según el siguiente esquema:



TECNICAS VIRICAS CLÁSICAS.

1.- HEMADSORCIÓN

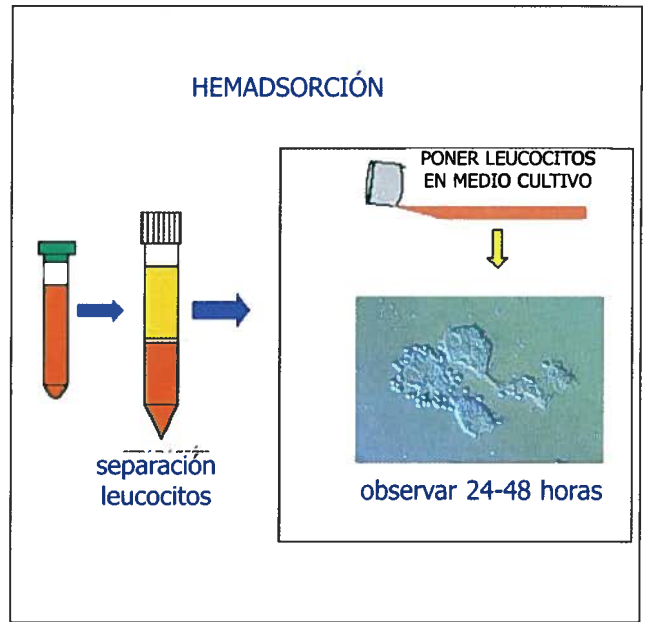
La hemadsorción, es una técnica muy empleada en el diagnóstico de la Peste porcina africana, que presenta esta propiedad, es decir la unión de glóbulos rojos a leucocitos infectados por el virus. Esta técnica no es aplicable a otros virus, pero por su importancia en el diagnóstico de PPA, merece dedicarle un tiempo.

Las propiedades hemoadsorbentes del virus PPA, fueron descubiertos y usadas como diagnóstico por MALMQUIST Y HAY ("Malmquist W.A. 1962. Haemadsortion and cytopathic effect produced by ASFV in cell cultures". Am. J. Vet. Res. 23. 241-247"). Es una prueba que aún se sigue empleando y es fundamental para diferencias PPA y PPC.

La mayoría de los virus aislados de PPA, poseen esta propiedad (salvo algunas cepas) y es un proceso muy simple, que puede realizarse en un laboratorio sin gran infraestructura. En primer lugar

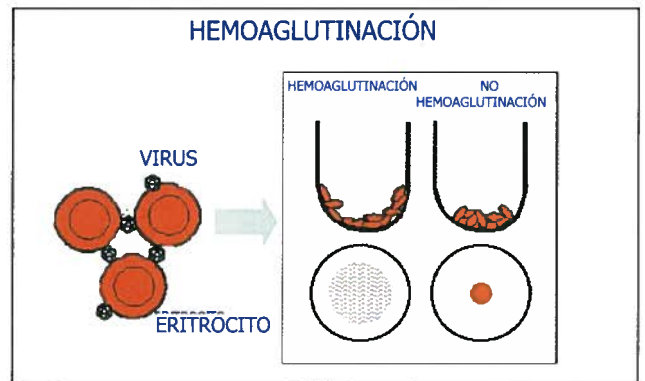
para hacer la hemadsorción, es necesario extraer sangre estéril de un cerdo, separar por centrifugación los leucocitos y cultivar los mismos en tubos o frascos, usando como medio el propio plasma de la sangre extraída. Posteriormente se inocula la muestra problema y en caso positivo a las 24-48 horas se observa la hemadsorción. Puede tratarse de una cepa no hemadsorbente y en ese caso habrá destrucción de los leucocitos y habrá que comprobar el diagnóstico por otros métodos.

Puede realizarse una modificación del procedimiento anterior, en el que si existen cerdos enfermos pueden prepararse los cultivos de leucocitos directamente a partir de la sangre de estos animales. Tiene la ventaja de que en caso positivo la rapidez es mucho mayor, ya que no hay que esperar a disponer de cultivos para hacer el inóculo.



2.- HEMOAGLUTINACION.

La técnica de hemoaglutinación aprovecha otra característica que presentan algunos virus, de aglutinar eritrocitos de diversas especies cuando se ponen en contacto con ellos en una suspensión. Entre los virus más importantes que presentan poder aglutinante, están los virus *influenza*, *parainfluenza*, *parvovirus* y algunos *picornavirus*. Este fenómeno puede ser inhibido por interacción con anticuerpos específicos hecho que puede ser usado para titulación de anticuerpos en suero.



Para buscar virus hemoaglutinantes en muestras patológicas, se utilizan exudados o macerados de órganos, que se enfrentan a suspensiones de eritrocitos de la especie que hemoaglutinen, en función de la enfermedad que intentemos diagnosticar. En el caso de la *influenza aviar*, se utilizan huevos embrionados como sustrato para realizar el aislamiento del virus a partir de macerados de vísceras de pollos sospechosos. Estos huevos se inoculan en cavidad alantoidea y tras incubarlos 48 horas se obtiene líquido alantoideo y se busca en el mismo poder hemoaglutinante.

3.- BUSQUEDA DE EFECTO CITOPATICO Y NEUTRALIZACIÓN VIRICA.

Las alteraciones visibles que producen los virus sobre los cultivos celulares inoculados, se conocen como efecto citopático (ECP). Es un fenómeno muy importante en el diagnóstico viral, porque muchos de estos son altamente específicos para un determinado virus y una determinada línea celular. Existen muchas alteraciones que se confunden fácilmente con ECP y no son consecuencia de la infección vírica, sino de otros factores como son temperaturas de incubación inadecuadas, toxicidad del medio de cultivo, etc. La visualización del ECP puede hacerse con el microscopio óptico, aunque para hacer más visibles los cambios es necesario el uso de sistemas de visión especiales (como los condensadores de contraste de fases) e incluso y más extendidos son los métodos de tinción histológicos.

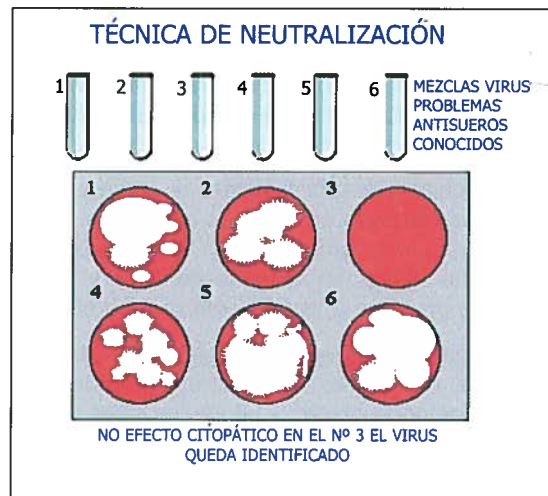
Cuando se inspecciona un cultivo inoculado, pueden observarse alteraciones en núcleo, en citoplasma o en ambos. Una de las alteraciones más importantes son la aparición de **cuerpos de inclusión**, que varían en forma, tamaño, número y tinción (acidófila o basófila). Los cuerpos de inclusión pueden ser sitios de síntesis viral, o representar acumulaciones de proteínas virales con o sin contener viriones maduros. En otros casos representan agregados cristalinos de viriones, pero también pueden ser simplemente el resultado de cambios degenerativos de la célula infectada.

Algunos virus en líneas celulares susceptibles, poseen un ECP muy típico, como es el caso de los *Herpesvirus* y algunos *Coronavirus*, entre otros. Producen la fusión de las células infectadas, por cambios en la membrana celular, originando la formación de **sincitios**. Estas células gigantes pueden presentar inclusiones citoplasmáticas, vacuolas citoplasmáticas, inclusiones intranucleares o combinación de todas las anteriores.

La observación del ECP, como técnica de diagnóstico, tiene un valor limitado, salvo en algunas enfermedades producidas por virus con ECP muy característicos en líneas concretas. Por otro lado, para que las alteraciones sean visibles, hay que realizar a veces hasta 3 pases ciegos, con el tiempo que ello conlleva, causa principal por la que la analítica laboratorial estos métodos han sido desplazadas por otros más rápidos y específicos.

NEUTRALIZACION VIRICA.

La neutralización del ECP, es un método ampliamente usado en diagnóstico virológico. Para la prueba se mezclan el virus causante del ECP con diferentes antisueros conocidos. Posteriormente se enfrentan las distintas mezclas a cultivos de células frescos. Es un método de identificar virus muy antiguo, pero muy específico y aún ampliamente usado. Debido a su gran especificidad, es a menudo usada como prueba estándar o de referencia con la cual se valoran algunas otras técnicas.



4.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

El diagnóstico de enfermedades víricas mediante el uso de la microscopía electrónica (ME) se puede realizar sin demasiadas complicaciones, salvo las derivadas de la complejidad y coste del equipo y de la necesidad de contar con personal altamente especializado.

Debido al su altísimo grado de resolución, la ME es una herramienta utilísima para visualizar alguno de los detalles más óptimos de los virus. La resolución obtenida, depende del uso de técnicas específicas de tinción, tales como la tinción negativa con sales de metales pesados o las técnicas de sombreado (con platino, carbón-platino o carbón-paladio). Las técnicas de cortes ultra y semifinos complementan los anteriores, pero son más usados para tejidos, bacterias, levaduras y orgánulos subcelulares y no para virus. Su resolución es menor por la apariencia granular de los tinciones en cortes.

Entre las ventajas que presenta la técnica tenemos:

- 1.- Se visualiza el virus
- 2.- Rapidez. Puede hacerse hasta en pocos minutos.
- 3.- Pueden identificarse algunos virus por su morfología.
- 4.- Sirve para detectar virus inactivados o de difícil cultivo.

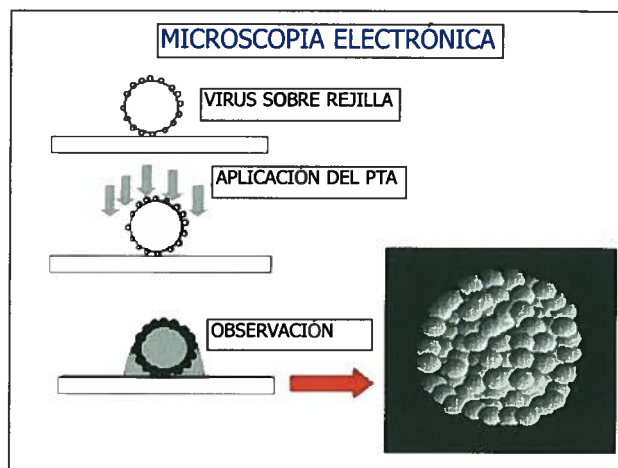
Entre los inconvenientes tiene:

- 1.- Precio y preparación técnica del personal

2.- No se puede procesar varias muestras a la vez.

3.- No es muy sensible. Necesita un número mínimo de partículas víricas.

La tinción negativa con sales del ácido fosfotúngstico (PTA) es una técnica simple y efectiva, introducida por Horne & Wildy en 1959. Las partículas biológicas son tratadas y los iones metálicos con cargas positivas, forman enlaces iónicos con macromoléculas cargadas negativamente (proteínas, glicoproteínas, ácidos nucleicos). La alta electrodensidad de estos metales, detiene el flujo de electrones, que por el contrario atraviesan fácilmente las estructuras biológicas. El colorante permanece fuera de las estructuras, pero a veces por rotura de la envuelta o la capsida, puede penetrar y revelar estructuras internas. La tinción negativa se realiza sobre rejillas especiales de cobre o níquel que se cubren con una película plástica estabilizada con carbón (Formvar[®]). Sobre ellas se deposita la muestra y posteriormente se aplica la solución con PTA. Esta técnica admite diversas modificaciones para concentrar las partículas víricas adheridas en mayor número a las rejillas. Así tenemos:



- **Ultracentrifugación sobre las rejillas:** El material de partida se clarifica por centrifugación a baja velocidad y el sobrenadante se somete a ultracentrifugación en tubos de ultracentrifugado en los que se ha colocado en el fondo las rejillas. Después se cogen éstas y se tiñen con el PTA. Es conveniente cuando la concentración vírica se sospeche pueda ser menor de 10⁶ viriones/ml. Puede hacerse sin las rejillas en el fondo del tubo y simplemente resuspendiendo el sedimento en agua destilada (que produce la lisis de células y no afecta a virus).

- **Método de difusión en agar:** En esta técnica se coloca un bloque de agar al 1% sobre un portaobjetos y se añade sobre su superficie una gota de la suspensión vírica. Sobre la gota se colocan 1 ó 2 rejillas de Formvar[®]. Cuando las sales y agua difunden en el agar, las partículas víricas quedan sobre la rejilla pudiendo teñirse a continuación.

Para virus difíciles de cultivar puede realizarse la técnica de INMUNOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA. Como su nombre indica se basa en el uso de anticuerpos específicos contra el virus que se busca, lo cual provoca la aparición de agregados. Estos agregados pueden posteriormente someterse a alguno de los métodos de concentración anteriores por ultracentrifugación o difusión en agar.

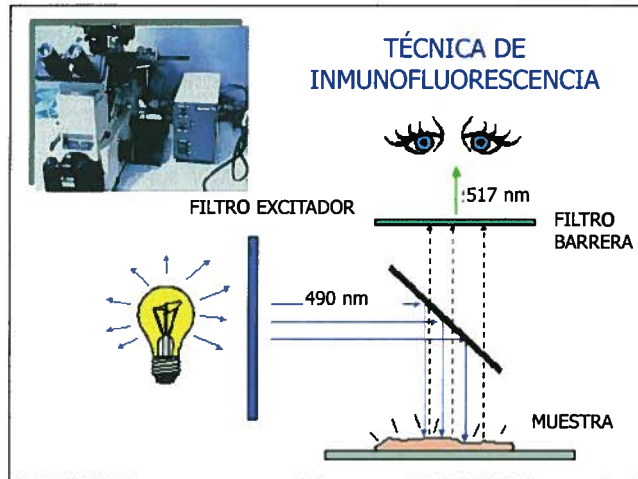
TÉCNICAS VÍRICAS BASADAS EN LA UNIÓN Ag-Ac.

1.- TÉCNICA DE LA INMUNOFLORESCENCIA.

La técnica de diagnóstico por inmunofluorescencia (IF) se basa en la posibilidad de unir anticuerpos a fluorocromos, dando lugar a compuestos fluorescentes que mantienen su actividad biológica intacta. Los fluorocromos se excitan cuando se estimulan con una luz de una determinada longitud de onda (en el espectro azul o ultravioleta). Para mantener la estabilidad, estos fluorocromos emiten una luz de una longitud de onda mayor, que es visible. La fluorescencia adquiere la máxima estimulación a 490 nm, y la longitud de onda de la luz que emite es de 517nm. Se trata de tener un microscopio con un emisor de la primera luz y un sistema de filtros que separa ambas para hacer visible la segunda. Estos microscopios son generalmente convencionales a los que se añade en lámparas especiales y sistemas de filtros para permitir la observación. Esta técnica comienza con COONS en el año 1941 (*Coons, Creek & Jones. "Immunological properties of an antibody containing a fluorescent antibody technique"*). Para algunos autores COONS no sólo es visto como el creador de la técnica de IF, sino como el padre de las técnicas

en las que se basan los métodos rápidos de diagnóstico. Así, hay que decir que fue la primera técnica en la que se usó una **fase sólida** que contenía el material de diagnóstico. Desde sus primeros comienzos no tuvo una gran aceptación y fue empleada de manera esporádica en diversos procesos. No fue hasta los años 60-70 cuando se empezó a considerar en toda su valía, sobretodo cuando fue declarada por la O.M.S. como técnica recomendada para rabia, por su rapidez y sensibilidad. (se usa aún para esta enfermedad).

Es una técnica que ha mejorado mucho en el tiempo, al aparecer reactivos de muy buena calidad, mejores métodos de conjugación y purificación y sobre todo anticuerpos monoclonales. Por otro lado la aparición de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA), han desplazado en parte a las de IF, aún que no en su totalidad, y hoy en día se siguen empleando con éxito en el diagnóstico de muchas enfermedades en medicina humana y veterinaria.



Como cualquier técnica tiene sus ventajas e inconvenientes que pueden resumirse en las siguientes:

Ventajas:

- 1.- Rapidez en la realización.
- 2.- Cuando se trabaja con tejidos permite ver la reacción y a la vez la morfología del tejido.
- 3.- Puede detectar viriones infecciosos y no infecciosos.
- 4.- Es sensible.
- 5.- Es relativamente fácil de realizar.

Inconvenientes:

- 1.- Puede dar lugar a falsas interpretaciones.
- 2.- Es equipo es costoso.
- 3.- La reacción no es permanente. Una vez observada, no pueden conservarse las muestras.

REALIZACION DE LA TÉCNICA.

La técnica admite numerosas variantes en cuanto a la muestra usada y la forma de realizar la misma. Como muestra se usan generalmente **órganos**, ya sean en frotis o en cortes con criotomo, pero también pueden usarse **células de cultivos** previamente inoculados con la muestras problema. La técnica puede detectar antígenos específicos en cultivos celulares antes de que aparezca el ECP (puede servir también para confirmar el mismo).

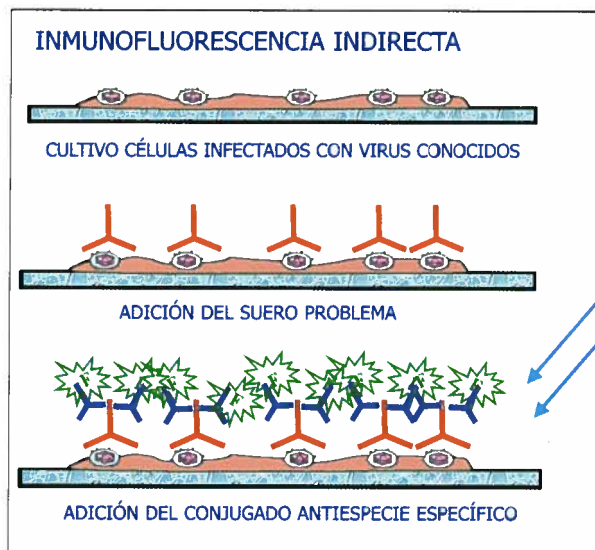
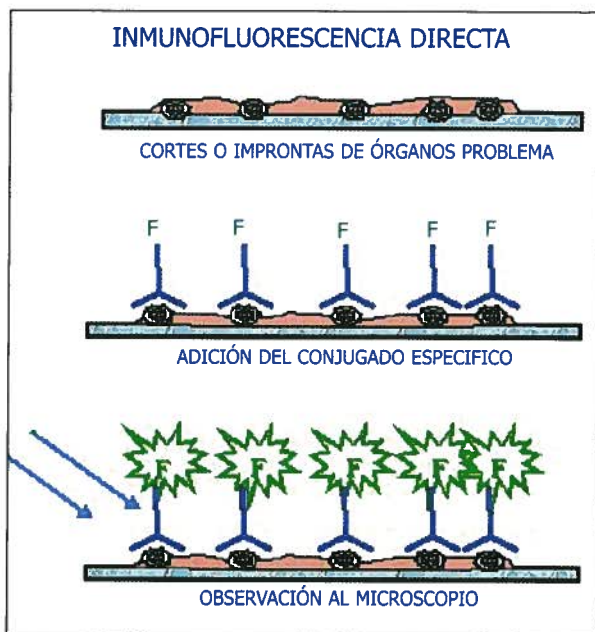
Tanto en el caso de órganos, como en el de células de cultivos, hay que proceder previamente a la tinción a la fijación de la muestra. La fijación puede hacerse con métodos físicos, como el calor, o con métodos químicos como el etanol o la acetona. Con la fijación se consigue:

- Adherir la muestra a los portaobjetos.
- Insolubilizar los antígenos.
- Facilitar la permeabilidad de la membrana celular al anticuerpo.

Método directo: El método directo se realiza en un solo paso, echando sobre la muestra problema ya fijada la solución que contiene al anticuerpo conjugado con la fluoresceína. Es muy rápida porque sólo necesita una incubación, pero tiene como mayor desventaja su menor sensibilidad y la necesidad de un conjugado diferente para cada virus que estemos buscando.

Método indirecto: Se realiza en dos pasos. En el primero se añade el anticuerpo específico contra el virus que estamos buscando (no está conjugado). En el segundo paso se añade un conjugado antiespecie contra el primer anticuerpo del primer paso. Tiene dos ventajas fundamentales, la primera es que es más sensible, porque para a cada molécula de anticuerpo primario, se unen varias del conjugado. La segunda ventaja es que no necesitamos un conjugado para cada enfermedad (solamente para cada especie en las que se obtenga el anticuerpo primario), y los conjugados antiespecie pueden obtenerse comercialmente con gran facilidad.

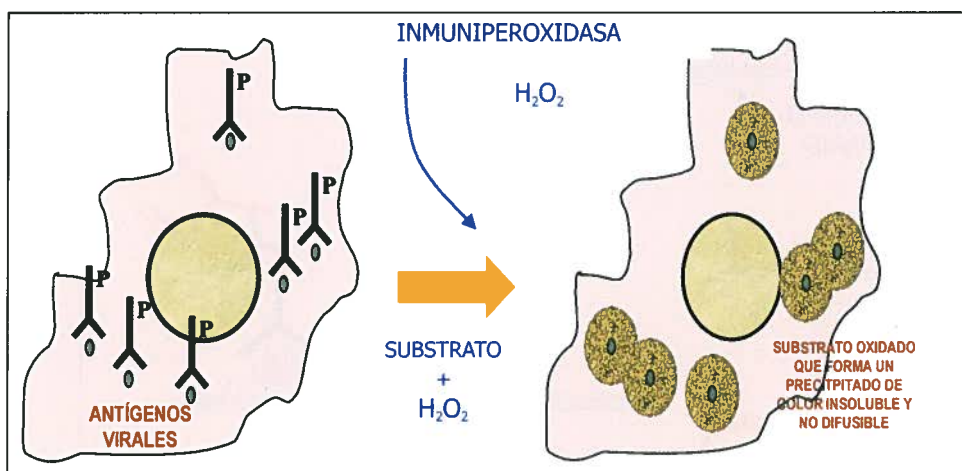
Tanto la técnica de la INMUNOPEROXIDASA, como la técnica ELISA y la técnica del RADIOINMUNOENSAYO, son desarrollos de la IF, donde lo único que cambia es el indicador. Las dos primeras las abordaremos a continuación. Con respecto al radioinmunoensayo o radioinmunoanálisis (RIA) diremos que es una técnica muy sensible, pero no se usa en absoluto como técnica rutinaria. Al contrario, esta desapareciendo prácticamente, de los pocos laboratorios de diagnóstico rutinaria que las usaban, por los inconvenientes del manejo de isótopos radioactivos. Sólo se utiliza en técnicas muy determinadas y laboratorios de referencia o investigación.



2.- TÉCNICA DE LA INMUNOPEROXIDASA.

La tinción inmunocitoquímica, es un método con sensibilidad y especificidad para localizar antígenos virales. A mediados de los años 60, los fluorocromos usados por Coons para conjugar anticuerpos fueron sustituidos por una enzima (RAM J.S., NAKANE P.K., RAWLISON D.G. & PIERCE G.B. "Enzyme-labeled antibodies for ultrastructural studies" Fed. Proc. 25:732.1966).

La primera enzima usada fue la **fosfatasa alcalina**, pero como perdía su actividad rápidamente, enseguida fue sustituida por la **peroxidasa** del rábano picante (Nakane & Pierce 1967), mucho más estable. Este método se basa en que la unión **Ag-Ac** enzima, se revela mediante la visualización de un complejo que aparece cuando el tejido se expone a una solución que contenga un substrato apropiado y peróxido de hidrógeno. La enzima reduce el peróxido de hidrógeno a agua, y el substrato se oxida, dando lugar a un precipitado de color, que es insoluble y no difusible, que queda en el lugar donde se encontraba el antígeno viral.



Este método elimina alguno de los inconvenientes de la técnica IF, de manera que:

- Las preparaciones de inmunoperoxidasa, una vez montadas son permanentes y pueden ser observadas con un microscopio óptico normal. Así se evita también la autofluorescencia.
- La peroxidasa está disponible pura, es estable después de la conjugación química, y por su pequeño tamaño penetra fácilmente en los tejidos.

Sin embargo existe un grave inconveniente:

- La peroxidasa es endógena a algunos tejidos de mamíferos, lo cual da lugar a tinciones inespecíficas que interfieren con la interpretación. Este problema puede resolverse eliminando la peroxidasa endógena pretratando los tejidos con reactivos que inactivan la enzima, pero según algunos autores, este tratamiento puede dañar los antígenos buscados.

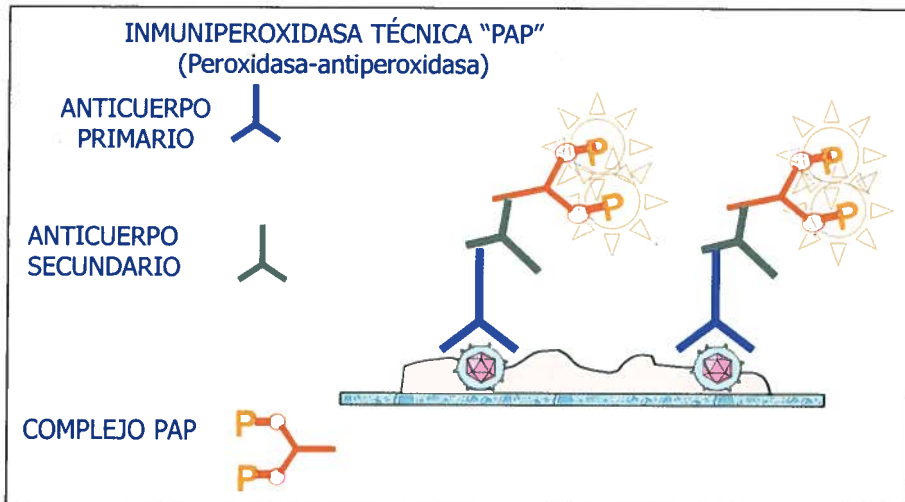
REALIZACIÓN DE LA TECNICA:

Existen al igual que en el caso de la IF, varios métodos de llevar a cabo la técnica, que son análogos, como el método directo y el indirecto. Además existen dos modificaciones.

1.- Método directo: Se realiza en un solo paso, ya que el anticuerpo específico antiviral es el que está conjugado con la enzima. Es simple y rápido, y presenta una baja tasa de reacciones inespecíficas. Como inconveniente al igual que en el caso de la IF, es el menos sensible y nos obliga a usar un conjugado para cada enfermedad.

2.- Método indirecto: Se realiza en dos pasos, usando en el segundo conjugado antiespecie, que reacciona con el anticuerpo específico añadido en primer lugar. Como ventajas, solo necesita varios conjugados antiespecie adquiridos comercialmente y su sensibilidad es hasta 10 veces mayor que la IP directa. Como inconveniente tenemos el mayor tiempo que tarda en realizarse la técnica, aunque sigue siendo muy rápida.

3.- Método PAP (peroxidasa-antiperoxidasa). En 1970, STERNBERG et al. Ponen a punto un procedimiento que no requiere conjugación química entre el anticuerpo y la enzima. La peroxidasa se une previamente a un anticuerpo antiperoxidasa por medio de una interacción típica Ag-Ac (esto evita un grave problema de esta técnica y que es cuando se une la peroxidasa a anticuerpos, el proceso de conjugación química, inactiva algunas enzimas, que sin embargo siguen compitiendo por el antígeno). El anticuerpo secundario, tiene la capacidad de unirse al anticuerpo primario y al complejo PAP, ya que ambos están obtenidos en la misma especie. El anticuerpo secundario se añade en exceso y uno de sus sitios "Fab" se une al primario y el otro sitio "Fab" al complejo PAP. Este método es mucho más sensible que los dos anteriores (hasta el doble que el indirecto), pero evidentemente más lento.



3.- TÉCNICA DE ELISA-DAS

La técnica de ELISA-DAS, es una técnica inmunoenzimática, que se utiliza para la detección de antígenos virales, en multitud de enfermedades como *Rotavirus*, *Peste Equina Africana*, *Peste Porcina Africana*, *Peste Porcina Clásica*, *Fiebre Aftosa*, entre otros. Las ventajas de esta prueba son enormes, sobre todo en situaciones de emergencia sanitaria por brotes de enfermedades graves, como la mayoría de las citadas anteriormente, del la Lista de la O.I.E. En general es una prueba de alta sensibilidad y especificidad, que se realiza de forma rápida y sencilla.

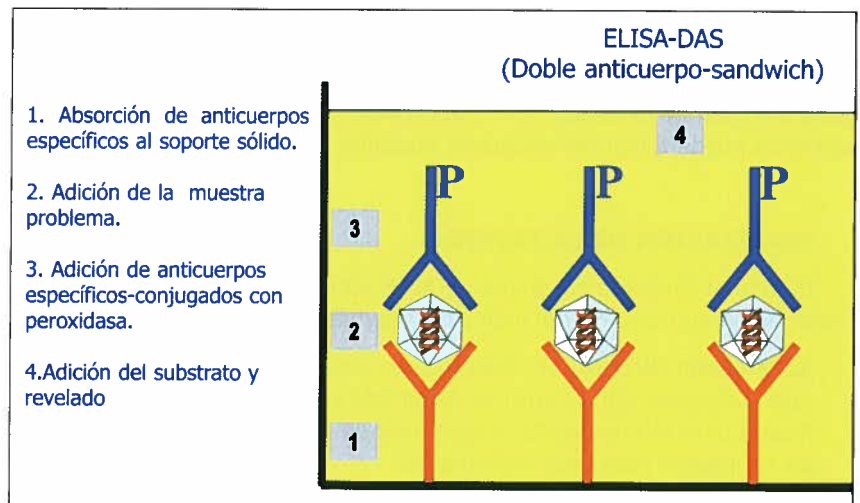
El componente principal de la reacción son anticuerpos específicos (generalmente monoclonal o mezcla de monoclonales) que se encuentran adheridos a placas de poliestireno que es la fase sólida, que cuando se añade la muestra problema, capturan los antígenos virales específicos, revelándose la reacción posteriormente mediante la aplicación de otro anticuerpo antiviral en este caso conjugado con una enzima, que tras la adición del conjugado, dará lugar a una reacción de color.

El anticuerpo de captura debe tener unas características determinadas que son la capacidad de unirse fuertemente al antígeno que estamos buscando y la capacidad de unirse al soporte sólido, sin que se produzca pérdida de reactividad. Cuando se usan anticuerpos monoclonales, pueden tener diferente afinidad el de captura que el revelador, es decir unirse a dos determinantes antigénicos diferentes del virus, pero también puede ocurrir que tengan afinidad por el mismo (Ej.: PPC-DAS, usado en el brote de Peste porcina clásica, donde ambos tenían afinidad por la glicoproteína E0, también denominada gp44/48).

Las ventajas de esta técnica son grandes y así podemos destacar:

1.- Capacidad de detección de virus a partir de muestras de un animal ante o durante la fase clínica de la enfermedad. Mucho antes que la aparición de anticuerpos específicos.

2.- Rapidez de realización (2-3 horas).



3.-No necesita un laboratorio con gran infraestructura ni personal altamente entrenado.

4.-Permite procesar gran número de muestras al mismo tiempo.

5.-Funciona con muestras en un estado de conservación, que no serían aptas para otras pruebas.

Esta prueba admite variaciones que sean ventajosas por algún motivo en función de la enfermedad que se quiera diagnosticar. Como por ejemplo tenemos el ELISA, recomendado por la O.I.E/F.A.O., como prueba de referencia para la fiebre aftosa. Esta prueba ELISA, a la vez que diagnostica la enfermedad, identifica el serotipo vírico. Para ello se tapizan diferentes filas de la placa con anticuerpos obtenidos en conejo, para cada uno de los 7b serotipos de virus FA (A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3, ASIA1). Las suspensiones de la muestra problema vírico. Para ello se tapizan diferentes filas de la placa con anticuerpos obtenidos en conejo, para cada uno de los 7b serotipos de virus FA (A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3, ASIA1). Las suspensiones de la muestra problema se añaden a todas las filas, con sus correspondientes testigos positivos y negativos. Posteriormente se añaden a la fila que corresponda sueros anti el serotipo correspondiente, obtenidos en cobaya. Por último se añade a todas las filas un conjugado anticobayo y el sustrato. Cuando la reacción aparece claramente es una gran ventaja para el diagnóstico de un brote porque permite serotipificar a la vez siendo muy grande el ahorro de tiempo, aunque en ocasiones hay que comprobar con otra técnica como la PCR que se tratará en otro apartado.

NUEVAS TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.

1.- EL ADN, ESTRUCTURA Y REPLICACIÓN.

Antes de abordar las nuevas técnicas de diagnóstico basadas en el uso y en la detección de ácidos nucleicos, es necesario hacer un repaso a la estructura y composición del ADN. El ADN es la biomolécula que contiene toda la información sobre un ser vivo. En 1953 Watson y Crick, postularon el modelo de la doble hélice, deduciendo la estructura tridimensional de ADN e inmediatamente interpretaron su mecanismo de replicación. Este descubrimiento tan brillante ha sido uno de los más significativos en la historia de la biología y condujo a comprender la función del gen en términos moleculares.

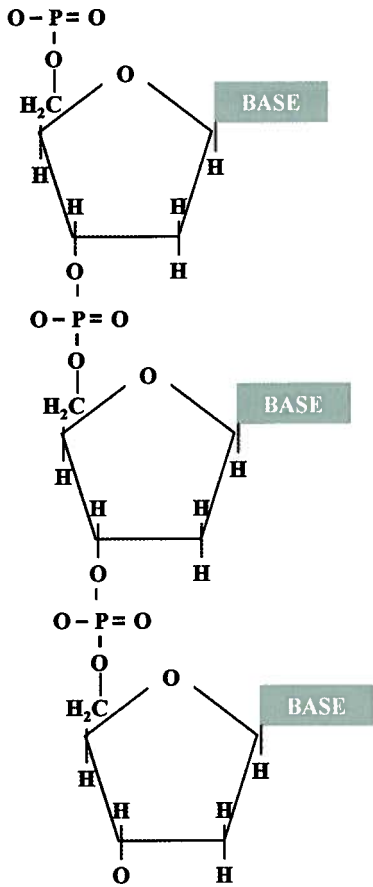
Cuanto más complejo es un ser vivo, mas complejo, de mayor tamaño y mayor numero de genes tiene se Adn. Pero incluso los más simples como los virus más pequeños, lógicamente poseen fragmentos o secuencias que les son específicas y los hacen diferentes al resto.

La molécula de ADN es muy larga, con forma de filamento, formada por un gran numero de desoxirribonucleotidos. La estructura esta formada por grupos de fosfato y azúcares con misión estructural, así como por bases púricas y pirimidínicas, que son la parte variable y las portadoras de la información genética. Está compuesta por dos cadenas helicoidales que se encuentran en torno a un eje central. Cada cadena está formada por nucleótidos unidos por enlaces covalentes.

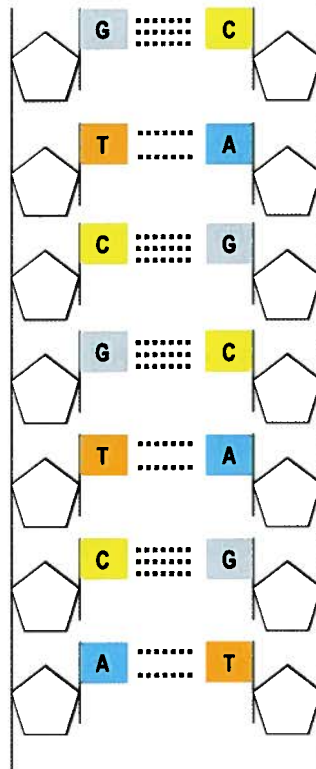
Cada nucleotido está formado por:

- una molécula de azúcar (desoxirribosa).
- Un grupo fosfato.
- Una base (púrica o pirimidínica).

El esqueleto de cada una de las cadenas del Adn, queda formado por los enlaces entre el grupo -OH unido al carbono 3' de una molécula de desoxirribosa y el grupo fosfato del carbono 5' de la molécula de desoxirribosa siguiente. Las dos cadenas del ADN son antiparalelas (una va en dirección 3'-5' y la otra en dirección 5'-3'). Las dos cadenas se mantienen unidas por los puentes de hidrógeno que se forman entre las bases de ambas cadenas, que se sitúan en el centro de la doble hélice. Estas bases son cuatro: adenina, timina, citosina y guanina (A, T, C, G) y poseen especificidad de emparejamiento, de manera que la A siempre se empareja con la T, mediante puentes de Hidrógeno (A=T) y la citosina con guanina mediante tres (C=G). Estos enlaces son los que se rompen cuando se desnaturaliza el ADN y se separa en sus dos cadenas. La adición de nuevos nucleótidos se produce en el grupo hidroxilo (-OH) del carbono 3.



Estructura parcial de una cadena de ADN.

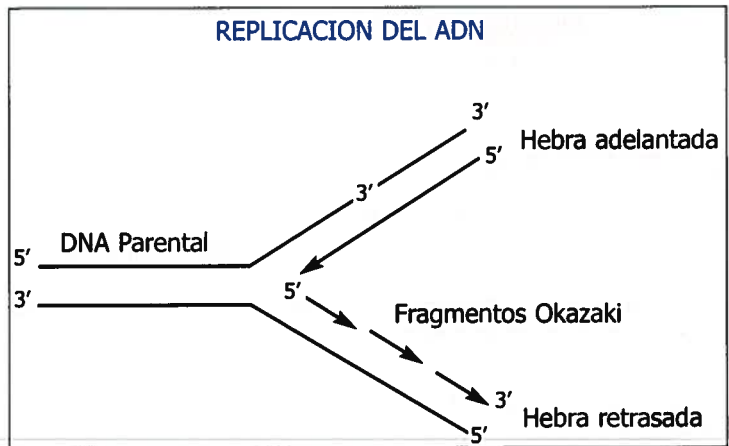


Esquema de la estructura de la doble cadena del ADN.

¿Cómo se replica el ADN?

Para la replicación del ADN, la cadena madre se abre y se colocan nuevos nucleótidos, formando dos cadenas hijas por complementariedad de bases (replicación semiconservativa). La síntesis se produce siempre desde el extremo 5' al 3'. La replicación depende de unas enzimas que se denominan ADN polimerasas, que actúan sobre el grupo OH libre del carbono 3.

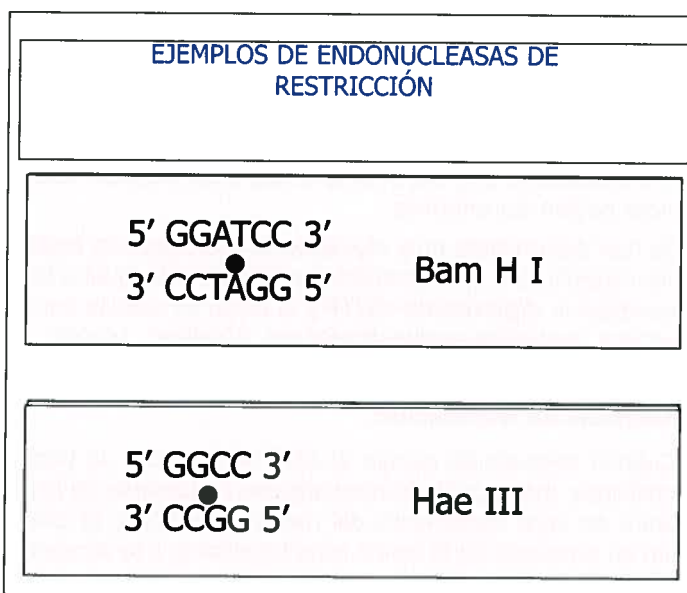
Una cadena está claro como se forma, de manera continua (**hebra conductora**), pero la otra no está tan claro a primera vista. En esta última lo que ocurre es que se forman pequeños fragmentos 5'-3' (fragmentos de **Okazaki**), que se unen posteriormente por medio de una enzima ADN ligasa (**hebra retardada**). En este proceso actúan varias enzimas, algunas de ellas con función no bien conocida. Las principales son las ADN polimerasas I, II y III y lo que si es claro, es que todas trabajan en conjunto.



2.- ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN Y CLONACION DE ADN.

Las endonucleasas de restricción, son enzimas capaces de coartar la molécula de ADN, pero no por cualquier lugar, sino que cada una de ellas tiene unos lugares muy específicos de hacerlo y siempre actúa de la misma manera. La especificidad del lugar por donde realizan el corte la de la secuencia de bases. La mayoría reconoce secuencias de 4 a 7 nucleótidos, que son palindrómicas, es decir tienen simetría rotacional binaria (se leen igual en un sentido que en otro). Estas enzimas las producen de forma natural las bacterias, para protegerse del ataque de los bacteriófagos. A continuación ponemos algunos ejemplos:

Los extremos que se producen al cortar los trozos de ADN, pueden ser complementarios de los de otras moléculas de ADN de naturaleza distinta, cortada por la misma enzima. Estas dos pueden unirse por estos extremos complementarios dando lugar a una molécula de ADN "recombinante" a partir de ADNs de origen diferente, el hecho de poder cortar y unir ADN, es importantísimo para la manipulación genética de organismos, pero también tiene valiosísimas aplicaciones en el diagnóstico como posteriormente veremos.



3.- TÉCNICA DE DIAGNÓSTICO POR SONDAS DE ADN.

Los fundamentos de las técnicas de diagnóstico virológico vistas hasta ahora se basan en el aislamiento o puesta en evidencia de los virus o sus antígenos (base de las técnicas estándar de diagnóstico viral, como IFD, IP o ELISA).

Las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos, han sido de valiosísima utilidad en el estudio de enfermedades víricas. Al principio, estos métodos tenían severísimas limitaciones por su complejidad técnica (en relación a los procedimientos tradicionales), pero la generalización de las técnicas de ampliación y el gran avance de los sistemas de revelados de las reacciones que no usan isótopos radiactivos, han hecho que estos métodos dieran el salto desde la investigación a la aplicación diagnóstica práctica, eso sí, sin gozar de la difusión, popularidad y utilidad de los otros métodos.

La base de ellas, es la gran especificidad y afinidad de las cadenas de ácidos nucleicos por otras que sean complementarias. Los fragmentos complementarios a las secuencias del ácido nucleico buscado (sonda) pueden ser marcadas de diferentes formas, de manera que pueda ser revelada la unión. Un ADN diana, puede desnaturalizarse, para hacerlo monocatenario y permitir el anillamiento con la sonda.

Las reacciones de hibridación pueden tener lugar en solución o en muestras unidas a soportes sólidos (papel de nitrocelulosa por ejemplo).

Preparación de las sondas y marcaje.

Las sondas pueden prepararse de tres formas fundamentales:

- 1.- Fragmentos de restricción del ácido nucleico vírico, pueden ser insertados en vectores de **clonaje**, tales como plásmidos bacterianos. Posteriormente son purificados y marcados.
- 2.- Si se conoce la secuencia específica viral que se quiere detectar con la sonda, ésta puede fabricarse en un **sintetizador de oligonucleótidos**, con lo cual se hace rapidísimamente y sin los problemas de la clonación.

3.- Por técnicas de reacción en cadena de polimerasa (**PCR**).

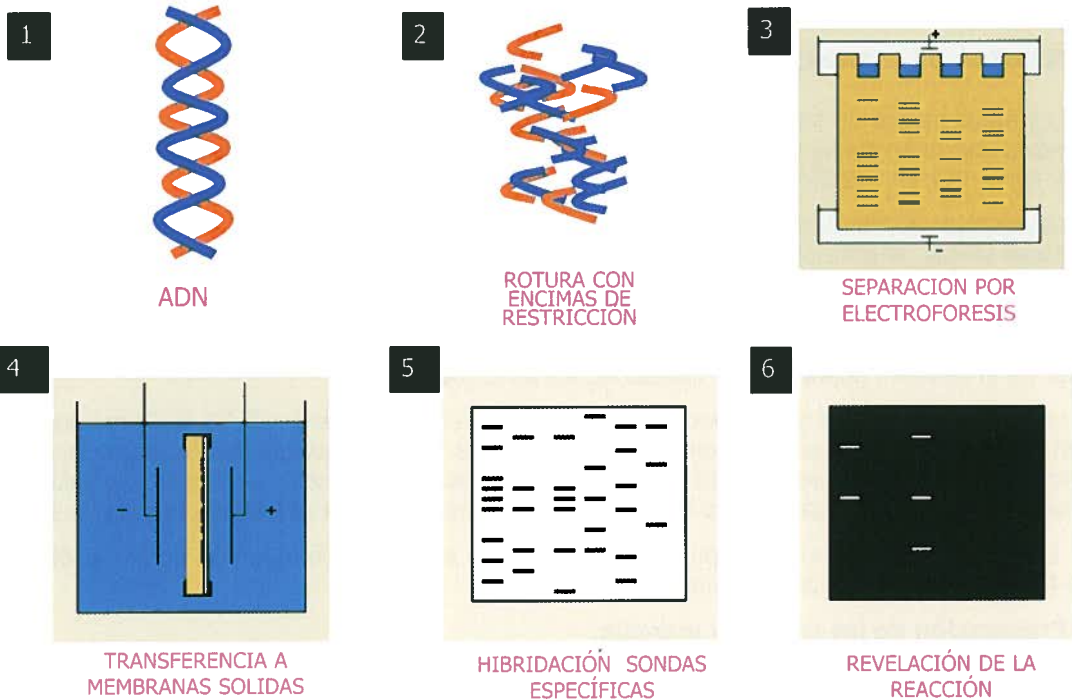
El marcaje de la sonda puede hacerse de diversas formas. Los nucleótidos pueden quitarse y ponerse en la cadena con enzimas específicas, aprovechando este proceso para incorporar nucleótidos marcados. Tradicionalmente, las sondas han sido marcadas con isótopos radiactivos como el P32. No hay que insistir en los inconvenientes de este tipo de marcaje y las enormes restricciones y controles que imponen las autoridades a los centros que las emplean. Los marcados con isótopos radiactivos, por otra parte tienen una vida media muy corta, por lo que se han buscado insistentemente otras formas de marcaje, entablándose una lucha encarnizada entre muchos laboratorios privados, ya que las ganancias económicas podían ser enormes.

Se han desarrollado muy rápidamente marcajes con biotina y también con digoxenina, que son altamente específicos y con sensibilidad prácticamente igual a los isótopos radiactivos, A las sondas de ADN se incorpora la *digoxenina-dUTP* y la unión se detecta inmunológicamente con un conjugado anticuerpo-enzima (*antidigoxenina-fosfatasa alcalina*), seguido por la adición de un sustrato que da una reacción de color.

Técnicas de hibridación.

Cuando después de extraer el ADN de un virus, se transfiere a un sustrato sólido, como papel de nitrocelulosa, éste puede desnaturalizarse y separarse de las dos cadenas mediante el aumento de temperatura en unas condiciones del medio apropiadas. Si estos fragmentos de ADN desnaturalizados se ponen en presencia de la sonda complementaria a la secuencia que queremos localizar, y se cambian las condiciones de incubación de la membrana a otras que den lugar a la renaturalización, se producirá la hibridación. Posteriormente la reacción puede ser revelada de diversas formas en función del tipo de marcaje que tenga la sonda.

TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN



Estas técnicas se denominan de diferente forma en función de la forma de realizarlas. Así tenemos:

1.-"Dot blot " o "Spot dot": Es la técnica mas simple. La muestra se traspasa directamente a una membrana de nitrocelulosa sobre la que se produce la hibridación y el revelado. Es rápida, simple y

permite ensayar un número de muestras relativamente grande. Sólo se ve una mancha y es difícil apreciar reacciones inespecíficas.

2.-"Southern blot": Fue desarrollada por E.M. Southern lo que le dio el nombre. Los pasos de los que consta esta técnica son los siguientes:

- a).- Extracción y purificación del ADN.
- b).-División del mismo con enzimas de restricción.
- c).-Separación de los fragmentos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.
- d).-Transferencia electroforética de los fragmentos separados en el gel a membranas de nitrocelulosa.
- e).-Hibridación y revelado.

3.-Northern blot: Es la misma técnica anterior pero en vez de ADN se llama así cuando se realiza con ARN.

4.-Western blot: Es el nombre que recibe la técnica de los dos puntos anteriores cuando no se realiza con ácidos nucleicos, sino con proteínas de cualquier tipo. Es le técnica de inmunoblotting donde buscamos antígenos víricos en las membranas de nitrocelulosa con anticuerpos específicos conocidos, después de hacer una separación electroforética de la muestra problema y transferencia.

4.- LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La técnica de diagnóstico por sondas de ADN, han tenido un grave inconveniente en la dificultad de encontrar en una muestra problema una secuencia específica. El límite de detección para las sondas de ácidos nucleicos más sensibles es de alrededor de 10^{-3} - 10^{-4} partículas víricas. Este límite es suficiente para detectar virus en la mayoría de muestras clínicas, tomadas en el momento apropiado y enviadas en buenas condiciones.

En el diagnóstico por la técnica de la PCR, se actúa sobre el ADN/ARN del virus que estamos buscando, para proceder a la AMPLIFICACIÓN de un fragmento elegido específico para ese virus, de forma que la detección del mismo signifique de manera inequívoca la presencia del agente, por lo tanto puede definirse como método enzimático que permite multiplicar millones de veces una secuencia de ADN específica, lo que hace infinitamente mas fácil su detección.

Esta técnica fue desarrollada por Kary Mullis y col. En 1987, y sus principios son los que rigen la replicación del ADN en lo seres vivos, es decir, la separación de las dos cadenas y mediante una de ADN polimerasa que añade nucleótidos en ambas cadenas en dirección 5'-3' se produce la síntesis de dos nuevas.

Aunque la técnica se presentó a principios de los setenta, no se perfeccionó lo suficiente hasta mediados de los 80, cuando se consiguió amplificar ADN de genes individuales a partir de una muestra de ADN total de un organismo. Este método repite determinado número de veces tres pasos que se producen en sucesión bajo condiciones controladas y variables de temperatura.

Estos son los siguientes:

- 1.- Separación de las dos cadenas de ADN (*Desnaturalización*).
- 2.-Apareamiento o *anillamiento* de los indicadores (cebadores o "primers").
- 3.-Síntesis de la cadena complementaria (*Extensión*).

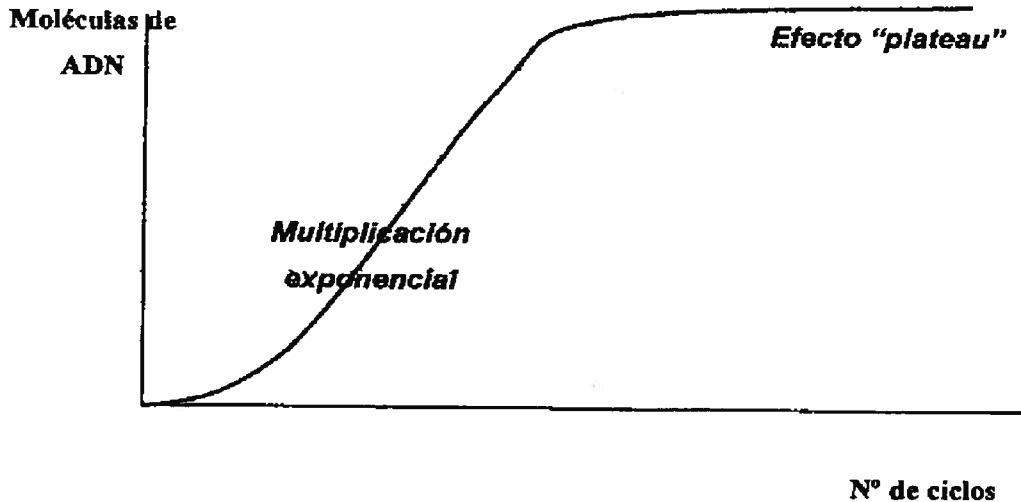
Estos tres pasos, se realizan de forma sucesiva y los tres forman un CICLO. La amplificación de una secuencia de ADN se realiza aplicando entre 20-45 ciclos, lo que da lugar a una acumulación exponencial de la secuencia diana. El número teórico de moléculas de ADN que se obtiene tras un determinado número de ciclos se calcula con la formula:

X : nº de moléculas iniciales

N = X 2ⁿ

n : nº de ciclos realizados

Esta fórmula supone una eficacia del 100% en cada ciclo, pero esto no se consigue nunca. La eficacia varía enormemente, dependiendo de multitud de factores que pueden optimizarse en mayor o menor grado. Por otra parte la amplificación llega un momento en que deja de ser exponencial (efecto "plateau") y esto se debe principalmente a una menor disponibilidad enzimática, menor eficacia de la desnaturalización del ADN y menor eficacia de la unión de los iniciadores.



Vamos a ver paso a paso la reacción y los factores que intervienen en cada uno de ellos, por una breve referencia a la preparación del ADN a partir de la muestra.

Extracción del ADN.

Para extraer el ADN del virus, hay que proceder a su lisis, que generalmente se consigue con agentes tensioactivos (Nonidet P-40, SDS, Tween 20, etc.). Existen diversos métodos que se van modificando y simplificando continuamente. Los genomas víricos están dentro de las células y basta por lo general con lisarlos en un tampón apropiado, siendo una extracción blanda muy fácil. En el caso de bacterias hay que usar protocolos más agresivos, debido a la resistencia que ofrece la pared, especialmente en algunas como micobacterias, estafilococos o clostridios.

El molde puede ser ADN o ARN que habrá que transformar en ADNc, mediante una transcripción reversa. La técnica PCR puede tolerar la presencia de impurezas en el ADN molde, pero hay que eliminar en lo posible sustancias inhibitoras de la polimerasa, como heparina, fenol, hemoglobina, SDS y otras. En general los métodos de extracción usan mezclas fenol-cloroformo y posterior precipitación con etanol o isopropanol.

• Paso 1 de la extracción: Desnaturalización del ADN.

La doble cadena de ADN de la muestra (molde) se desnaturaliza por una incubación a alta temperatura. Las dos cadenas ahora disociadas permanecerán libres en la solución hasta que la temperatura disminuya lo suficiente para permitir el nuevo apareamiento.

• Paso 2 de la reacción: Anillamiento de los indicadores.

Los indicadores, son un par de oligonucleótidos sintéticos que flanquean la región que queremos amplificar (por complementariedad de bases). Cada indicador se aparea a una de las cadenas después de separarse éstas por desnaturalización. Tienen ambos diferentes secuencias de nucleótidos y no pueden ser complementarios uno del otro. Debido a que están en exceso en relación a la cadena de ADN madre, la formación del complejo *iniciador-molde*, prima sobre la reasociación de las dos cadenas del ADN molde en los lugares donde se unen éstos cuando la temperatura baja.

Elección de los iniciadores: Para elegir los iniciadores a emplear, es necesario conocer primero algo del genoma del virus buscado, que además debe ser una secuencia característica del mismo y exclu-

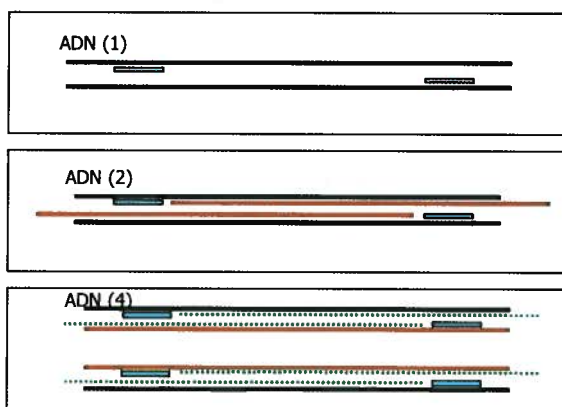
siva. Existen las llamadas "GEN BANK", donde puede consultarse prácticamente para cualquier microorganismo. Los iniciadores suelen tener un tamaño entre 18-30 nucleótidos y se pueden conseguir comercialmente, una vez indicada la secuencia de bases. Deben tener un contenido en G y C no excesivo, porque tienden a mantenerse muy unidos, no tener extremos complementarios y tener una temperatura similar de anillamiento. La concentración a la que se emplean es importante, ya que a elevadas concentraciones pueden dar lugar a la formación de productos inespecíficos que pueden confundirse con el amplificado. La posición de los iniciadores, determina el tamaño del amplificado obtenido. No existe un tamaño fijo, pero los productos largos se amplifican con menor eficiencia y os productos muy cortos pueden confundirse con dímeros de iniciadores, limitando mucho la posibilidad de distinguirlos después. Para el diagnóstico, el tamaño óptimo de amplificado es de 200-600 pb (pares de bases).

● **Paso 3 de la reacción: Síntesis o extensión.**

La tercera y última parte del proceso, es la extensión de la cadena a partir del complejo "primer-molde". Esta parte de la reacción está mediada por una ADN polimerasa, que incorpora nucleótidos en dirección 5'-3'. Los iniciadores quedan incorporados dentro del amplificado.

En relación a la ADN polimerasa, inicialmente la técnica usaba el fragmento "Klenow" de la ADN polimerasa I de E. Coli, que se usa normalmente en técnicas de la biología molecular. Este fragmento tiene actividad polimerasa y no exonucleasa, que produce la síntesis a 37°C. Sin embargo su labilidad a altas temperaturas, hacía que cuando se producía una nueva desnaturalización del ADN la enzima se inactivará, y había que añadirla de nuevo en cada ciclo. Esto hacía el proceso engorroso y daba lugar a la acumulación de enzima desnaturalizada en la muestra, además de hacer imposible la automatización del proceso. En 1988 se introdujo una ADN polimerasa, procedente de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, que podía resistir sin pérdida de actividad altas temperaturas (se denominó **Taq polimerasa**). Éste hecho simplificó mucho el procedimiento al tener que ser añadida sólo al principio del proceso.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMESARA



Esta enzima añade nucleótidos (que están también en la mezcla de reacción en forma de desoxinucleótidos trifosfato o dNTPs) y su actividad es óptima a 72°C, temperatura a la que incorpora aproximadamente 100 bases por segundo.

Todos los pasos anteriores son realizados en una mezcla de reacción tamponada donde se encuentran todos los componentes que intervienen en la reacción, es decir la mezcla estará compuesta por:

- Tampón de reacción.
- dNTPs
- Iniciadores
- Taq polimerasa
- ADN molde.

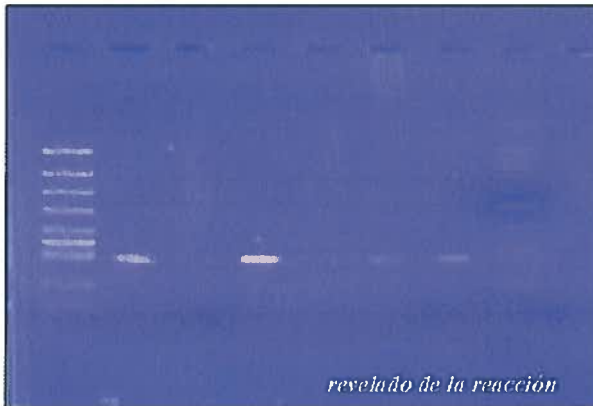
El tampón de reacción contiene Tris, Cl₂Mg, ClK y gelatina o seroalbúmina bovina (BSA). La concentración de iones Mg⁺⁺ en el proceso de la PCR es extremadamente crítica. La Taq polimerasa es igual que otras muchas polimerasas, una enzima "magnesio-dependiente" y no será activa si la cantidad de éste es muy pequeña, viéndose gravemente comprometida la amplificación si por el contrario la cantidad es muy grande.

Los ciclos de temperatura se realizan en un aparato programable, llamado **termociclador** y un ciclo típico consiste en una fase de desnaturalización a 92-96°C, seguida por una fase a 52-55°C, donde se unen los iniciadores y un tercer periodo de extensión de las cadenas a 72°C. Normalmente se realizan unos 20-35 ciclos para realizar la amplificación completa en unas 3 horas.

Revelado de la reacción

Una vez terminada la amplificación, es necesario proceder a buscar en la mezcla de reacción el amplificado, que en caso de que esté daría lugar a un diagnóstico positivo de la muestra problema. Para esto se prepara un gel de agarosa al 1-2% al que se añade bromuro de etidio, colorante que se introduce entre la doble hélice de ADN, dando lugar a un producto naranja cuando se somete el gel a la luz ultravioleta en un transiluminador.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA



Así se toma una pequeña muestra de la mezcla de reacción y se somete a una carrera en el gel, con un marcador de peso molecular de un tamaño apropiado al del amplificado buscado. Tras mirar en el transiluminador podemos apreciar la reacción positiva. En caso de aparecer el amplificado, antes se comprobaba que era el que se buscaba, mediante sondas marcadas complementarias al amplificado. Hoy en día existen otros métodos más simples y uno de los más usados es someter al amplificado a la acción de determinadas enzimas de restricción (que lo cortan siempre por el mismo sitio y da lugar a varios trozos de tamaños constantes). El producto obtenido tras realizar la fragmentación con las enzimas de restricción se vuelve a someter a una carrera en un gel de agarosa con el colorante y se buscan los fragmentos del tamaño específico para comprobar que la amplificación ha sido positiva.

APLICACIÓN DE LA TÉCNICA AL DIAGNÓSTICO Y PROBLEMAS DE LA MISMA.

La técnica de la PCR, ha evolucionado rápidamente desde su aparición y actualmente se aplica al diagnóstico de muchas enfermedades en medicina veterinaria y humana. Sin embargo, hay que puntualizar que a pesar de ser muy sensible y específica, no es la panacea, sino que sirve de complemento a las otras técnicas sin sustituirlas en ningún caso, ya que cada una tiene sus ventajas e inconvenientes, incluso la PCR.

Algunos avances recientes han facilitado su uso generalizado como son:

- Disponibilidad de métodos comerciales para aislamiento rápido de ADN o ARN a partir de muestras.
- Aparición de Taq-polimerasa recombinantes que ha hecho bajar el precio y homogeneizarla.
- Desarrollo de nuevas polimerasas que facilitan y simplifican el procedimiento de formación de un ADNc a partir de un ARN (RT-PCR por "reverse transcriptase PCR).
- Mejora continua de los protocolos y aparatos, que evitan contaminaciones y hacen la técnica más rápida y cómoda.

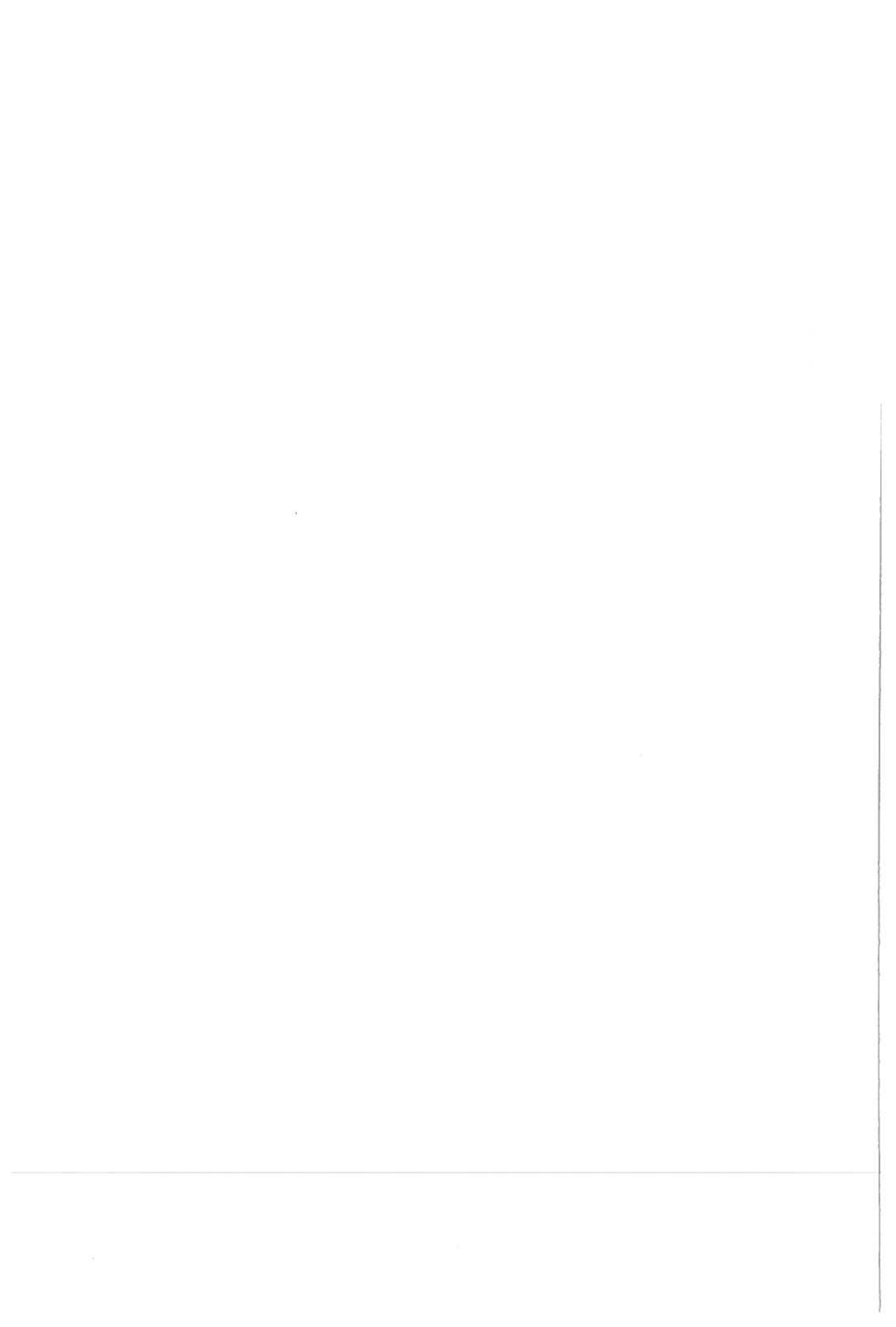
Entre los principales inconvenientes de la PCR, está la posible aparición de **falsos positivos**, debido a su enorme sensibilidad y también de **falsos negativos**, por lo que es imprescindible colocar testigos positivos y negativos cuando se hace la técnica tanto en la fase de extracción del ADN, como en la fase de amplificación.

Las causas más frecuentes de aparición de falsos positivos son:

- Contaminación por amplificadores.
- Tiempos prolongados de extensión.
- Concentraciones inadecuadas de iones Mg⁺⁺ en la mezcla.
- Concentraciones elevadas de Taq polimerasa.
- Elección errónea de iniciadores.

Las causas más frecuentes de aparición de falsos negativos son:

- Extracción defectuosa del ADN.
- Existencia de inhibidores de la enzima como heparina, SDS e incluso polvo de talco.



Beatriz Pasamontes de Barrio.

Asesor Técnico Veterinario.

Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Córdoba.

TÉCNICAS DE AISLAMIENTO VÍRICO.

Resumen:

Ya que muchas de las EDOs, son de origen vírico, el aislamiento de virus es una de las técnicas laboratoriales más importantes para el diagnóstico de estas enfermedades animales. El aislamiento vírico se basa en el cultivo de virus en alguno de los tres sustratos posibles, como son los animales de experimentación, los huevos embrionados y los cultivos celulares.

Un **VIRUS** es un producto celular genéticamente autónomo, pero metabólicamente dependiente de una célula hospedadora para su replicación, proceso que ocurre a expensas de esa célula. El virus selecciona su célula hospedadora o *célula diana*, pero requiere la presencia de moléculas específicas en la membrana de la célula llamadas Receptores celulares, para su unión y penetración (o *endocitosis*).

Los virus son estructuras muy simples formados por un núcleo de ácido nucleico (ARN o ADN), una envoltura proteica o cápside y una capa final lipoproteica que no todos la tienen llamada envoltura pericapsidal. Esta última envoltura la adquieren de la membrana celular, durante su maduración.

Los virus sólo pueden tener dos tipos de simetrías : helicoidal e icosaédrica.

Si queremos saber que virus es el causante de una enfermedad, es imprescindible su cultivo fuera del animal enfermo o **aislamiento**; para ello se utilizan 3 tipos de sustratos: animales de experimentación, huevos embrionados y cultivos celulares. Tras el aislamiento del virus podemos llegar hasta su **identificación**, averiguando el subtipo, sus propiedades antigénicas, composición bioquímica, etc..

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

La inoculación de virus en animales de experimentación fue el primer procedimiento para el aislamiento de virus. Su uso se restringe a lo absolutamente necesario y cumpliendo la legislación vigente (R.D. 223/1988), de protección de animales de experimentación.

Los inconvenientes de su uso son:

- Problemas de infección cruzada.
- Problemas de virus latentes.
- Alto coste y necesidades de espacio.
- Legislación cada vez más restrictiva.

Las especies más frecuentemente usadas son: ratones, cobayas, hámster, conejos, gallinas, monos, etc.

La inoculación de animales de laboratorio produce signos visibles de la enfermedad, que son los que habrá que cuantificar: lesiones macro- y microscópicas, síntomas y respuestas inmunes. Estas respuestas también dependen de la dosis inoculada, vía de inoculación y virulencia del agente.

Las diferentes vías de inoculación son: intracerebral, peritoneal, oral, nasal, intravenosa, subcutánea, intramuscular e intrauterina.

HUEVOS EMBRIONADOS.

Un gran número de virus animales y humanos pueden propagarse en diferentes estructuras de los huevos embrionados, debido a su sensibilidad a los virus. Su uso tiene grandes ventajas respecto a otros sustratos:

- Se consiguen y manejan fácilmente y con un equipo sencillo y barato.
- Gran sensibilidad a la acción de los virus.
- Tras su inoculación la replicación vírica tiene lugar en 2-3 días, excepcionalmente en 5-7 días.
- Medio teóricamente estéril.

La calidad del huevo es muy importante, ya que un huevo en malas condiciones podría intervenir en el diagnóstico de la enfermedad. Por tanto los huevos deben venir de granjas con garantías de limpieza y fertilidad (80-90%), las condiciones de las aves de campo no son controlables y suelen conllevar infecciones víricas como la Leucosis aviar y bacterianas como la salmonelosis.

El equipo necesario para la incubación de los huevos embrionados es sencillo, básicamente con un incubador de temperatura y humedad controladas y un ovoscopio nos arreglaríamos. Las condiciones de incubación son:

- Humedad.....40-70%.
- Temperatura.....37,5-38°C.

En el momento de meterlos en el incubador se les marcará la fecha. Si el incubador no es automático, los huevos se girarán al menos 2 veces al día, preferiblemente 4 veces. En ocasiones los huevos embrionados no se inoculan inmediatamente, entonces los almacenaremos a 15-18°C hasta su uso.

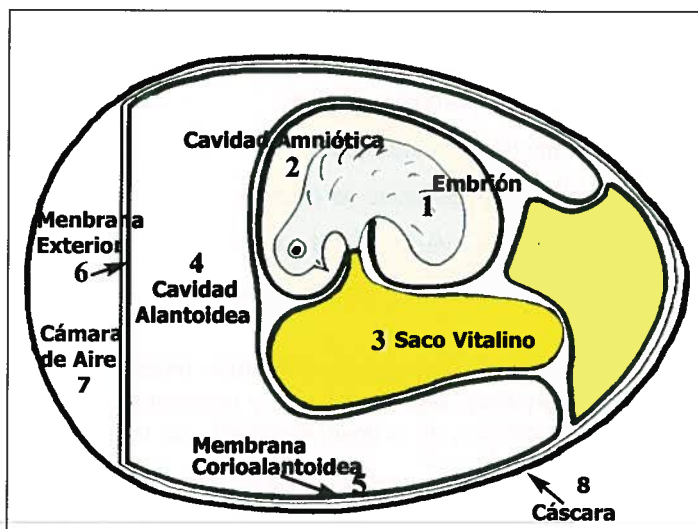
Tras 3-5 días de incubación, se observarán a través del ovoscopio para descartar los huevos no fértiles o bien los que tengan el embrión muerto. La segunda transiluminación se hará al ser inoculados a los 6-12 días, según el tipo de virus inoculado y la vía de inoculación.

La perforación de la cáscara previa a la inoculación se hace con un pequeño taladrador en forma de disco y posteriormente se sella con una mezcla formada por 2 partes de parafina sólida y 1 de vaselina, todo ello precalentado a 54°C.

Al terminar el periodo de incubación tras la inoculación del virus se abre el huevo ayudándonos de unas tijeras y placas de Petri estériles, para recoger el contenido. Los fluidos se analizarán por técnicas diagnósticas como hemadsorción ELISA, fijación de complemento, etc. Si se produce la muerte temprana del embrión, después de la inoculación, suele deberse al trauma de ésta o a infecciones secundarias bacterianas, normalmente acompañadas de mal olor.

La estructura de un huevo embrionado es la siguiente:

- 1.- Embrión.
- 2.- Cavity amniótica con líquido amniótico.
- 3.- Saco vitelino (Yema).
- 4.- Cavity alantoidea. (Clara o albúmina)
- 5.- Membrana corioalantoidea.
- 6.- Membrana exterior.
- 7.- Cámara de aire.
- 8.- Cáscara.



VÍAS DE INOCULACIÓN DE LOS HUEVOS EMBRIONADOS:

- > Vía amniótica: en huevos de 7-11 días, inoculación de 0,1-0,2 ml., con la jeringuilla en dirección al embrión, con cuidado de no atravesarlo. Ej. Virus Influenza.
- > Vía alantoidea: en huevos de 9-12 días, con 0,1-0,2 ml. De inóculo, poniendo la jeringuilla en dirección paralela a la cavidad alantoidea. Ej. Virus de Newcastle.
- > Vía saco vitelino: en huevos de 6 días, con 0,2-0,3 ml. De inóculo, atravesando la cáscara por la cámara de aire y llegando al centro del huevo. Ej. Virus de la Encefalitis.
- > Vía intravenosa: en huevos de 11 días aproximadamente, con 0,02 ml. De inóculo, localizando la vena en la cavidad alantoidea e inoculando en dirección al fluido sanguíneo. Ej. Lengua Azul.

Relación de virus cultivados en huevos embrionados, sus diferentes vías de inoculación y las lesiones desarrolladas.

VIRUS	PRE-INCUB	VÍA INOC	POST INCUB	TIPO DE LESIÓN
Influenza	8-11 días	av.amnióti	2-3 días	hemoaglutinación.
Newcastle	9-11	cav.alantoidea	2-4	HA y muerte del embrión
		memb c-a	3-6	lesión en memb c-a
				HA y muerte del embrión
Aujeszky	10	memb. C.a.	3-7	lesiones memb.c.a.
Herpesvirus	10	memb.c.a.	3	lesiones memb.c.a.
				a veces muerte embrión
Encefaliti	11	vitelo	3-4	lesiones memb.c.a.
				y muerte embrión
Lengua Azul	10	intravenoso	3	muerte embrión.

CULTIVOS CELULARES.

Las técnicas de cultivos celulares se introdujeron en 1940 y se extendieron a los laboratorios de todo el mundo hacia 1950 y como resultado se descubrieron multitud de virus, fue entonces cuando la Virología tomó cuerpo y se independizó de la Microbiología.

El uso de cultivos celulares es una técnica muy usada en diferentes disciplinas, no sólo para el estudio en sí de las células, sino el estudio de la Biología molecular y sobretodo lo que más nos interesa ahora es que es el diagnóstico virológico.

La lista de los distintos tipos celulares que se pueden emplear es bastante extensa:

– Elementos del tejido conectivo como:

- fibroblastos
- tejido óseo: hueso y cartílago.
- tejido cardíaco, muscular, epitelial sacado de órganos como el bazo, riñón, hígado, vejiga, piel y pulmón.

– Células neuronales.

– Células endocrinas de la pituitaria y las adrenales.

– Melanocitos.

– Células sanguíneas, como los leucocitos.

– y muy diversos tipos de células tumorales.

Fuente del Tejido:

Embrión/Adulto

Normalmente los cultivos derivan de tejidos embrionarios, ya que sobreviven y proliferan mejor que los de tejidos adultos. Esto refleja el menor nivel de especialización y la presencia de precursores de la replicación en los tejidos embrionarios.

Los tejidos adultos generalmente tienen mayor crecimiento pero a la hora de disgregarlos tienen mayor dificultad, por lo que la iniciación y propagación del cultivo es más dificultosa.

Normal/Neoplásico.

Los tejidos normales ofrecen menor capacidad de propagación que las células tumorales, a las que se les puede dar más nº de pases.

Los cultivos de células más usados en virología son de 3 tipos:

- Cultivos de células primarias y secundarias.
- Cultivo de órganos y tejidos.
- Líneas celulares continuadas o establecidas.

Cultivo de células primarias y secundarias.

Para la obtención de células lo primero que necesitamos es el órgano donante previamente elegido; por ejemplo embriones de pollo, órganos de embriones bovinos, etc. El órgano será troceado y tratado con **tripsina** o con **EDTA**, que es una enzima proteolítica que individualiza las células que forman parte de los tejidos. Las células en dispersión serán cultivadas en recipientes estériles y crecerán en monocapa, perdiendo su arquitectura histológica y a menudo sus propiedades bioquímicas.

Si volvemos a dispersar este cultivo, despegando las células y creciéndolas en un nuevo recipiente, estaremos haciendo un subcultivo de células o pase y obtendremos así un **cultivo celular secundario**, formado por células diploides, ya que se dividen en réplicas idénticas.

Estos cultivos celulares secundarios tienen la ventaja de que pueden ser congelados en Nitrógeno líquido y perdurar así por más tiempo.

Un tipo de cultivo primario es el cultivo de **leucocitos**, usados por ejemplo para cultivar el virus de la PPA, que sólo se replica en macrófagos porcinos (leucocitos maduros). El vPPA produce en los leucocitos el efecto de hemadsorción y posterior efecto citopático o destrucción celular. Los cultivos de leucocitos no se podrán subcultivar, ni tampoco congelar.

Cultivo de órganos y tejidos.

Obtenidos directamente de órganos y tejidos animales pero sin el uso de tripsina, por lo que mantienen a diferencia de los cultivos primarios, su integridad histológica y bioquímica. Su mayor desventaja es que no pueden ser propagados o subcultivados.

Líneas Celulares Continuas.

Ocasionalmente algunas células pueden sobrevivir y tener un crecimiento ilimitado aparentemente, y son dichas células las que establecen los cultivos continuos. Estas líneas celulares se mantienen con medios de cultivo enriquecidos con sueros y otros aditivos.

Las líneas celulares se pueden mantener casi indefinidamente, ya que pueden congelarse en Nitrógeno Líquido a -196°C .

Otras líneas celulares se obtienen de células tumorales, oncogénicamente transformadas, siendo buenas para tal fin por no contener inhibidores de crecimiento por contacto.

Efecto Citopático.(ECP).

Muchos virus producen ECP o lisis en las células donde se replican, debido a las degeneraciones y los desarreglos que les causan en el metabolismo celular.

Los ECPs son típicos de un virus o grupo de virus, pudiendo ser focal o difuso (sobretudo los virus con envuelta).

El ECP puede tener lugar en células individualmente, afectando al núcleo, al citoplasma o a ambos. Los virus con propiedades de fusionar células dan lugar a sincitios (parecido a una red formada por las células infectadas) y células gigantes con vacuolas, numerosos núcleos y cuerpos de inclusión. Otros virus producen grupos de células apiñadas o con forma redondeada o alargada, o bien células arrugadas flotando sobre el tapiz celular.

Existen virus que antes de producir ECP, se pueden evidenciar por otra clase de fenómenos como:

- HEMADSORCIÓN: fenómeno por el cual los eritrocitos se adsorben o unen a la membrana de las células infectadas. Ej: vPPA.
- AGLUTINACION: propiedad de algunos virus de aglutinar y sedimentar los eritrocitos. Ej.: parvovirus y virus Influenza aviar.

Ya sabemos que en el diagnóstico virológico, el desarrollo de un temprano ECP nos alerta de la presencia de virus, pero ¿Cómo calculamos la cantidad de virus?.

La cantidad de virus infecciosos o **TÍTULO VÍRICO**, puede medirse estableciendo la máxima dilución de inóculo que puede dar lugar a ECP en el 50% de los cultivos inoculados (o animales muertos). Se establece así el número de **DOSIS INFECTANTES DE CULTIVO DE TEJIDO; TCDI₅₀/ml**.

La adaptación de los virus a los cultivos "in vitro", no siempre ocurre al primer pase, sino en sucesivos pases.

El ensayo que mide la capacidad infectiva de un virus se llama **MÉTODO DE REED and MUENCH (1938)**, consistente en inocular diluciones sucesivas 1/10 del virus y cuantificar en porcentaje los cultivos con ECP y aplicar la fórmula:

$$\frac{\% \text{ con ECP} > 50\% - 50\%}{\% \text{ con ECP} > 50\% - \% < 50\%}$$

TECNICAS DE CULTIVO.

¿Qué células debemos elegir?. Para ello debemos tener en cuenta:

- La naturaleza del trabajo y el tipo de virus que vamos a cultivar.
- Tiempo de duración del proyecto. Si va a durar por ejemplo 2 meses, podremos usar cultivos primarios y secundarios para poder usarlas durante 8-10 pases.
- Cantidad de células necesarias: cada tipo celular tiene su característica capacidad de multiplicación (curva de crecimiento).

La capacidad de multiplicación de cada tipo celular viene definido por su **RATIO o Tasa de división**, el cual nos indica el número de recipientes de igual volumen a los que pueden subcultivarse cada recipiente inicial. Ej.: 1:2.

- Unas buenas prácticas de laboratorio son básicas para la obtención de unos óptimos resultados. Por ejemplo es fundamental no usar nunca dos líneas celulares diferentes al mismo tiempo, o bien hacerlo en cámaras diferentes, usando medios, sueros y recipientes perfectamente diferenciados, evitando así posibles contaminaciones cruzadas.

- Otro factor a tener en cuenta es la planificación del trabajo a lo largo de la semana y en periodos vacacionales para que no interfieran en la atención de los cultivos.

MEDIOS DE CULTIVO.

La elección del medio de cultivo la define el tipo de células empleadas.

Los medios de cultivo tienen 4 componentes básicos: medio base, suero, aditivos y sistema buffer, cada uno de ellos con igual importancia y con variedad de posibilidades de combinación.

1.- MEDIO BASE. Su elección es la más fácil, ya que sus fórmulas están detalladas.

Los más comunes son : MEM= minimal Esential Medium Eagle.

Medio 199

Medio Dulbecco

Medio McCoy

Modificación de Glasgow

Preparados con Sales de Earle o Sales de Hank.

La presentación de los medios de cultivo pueden ser en polvo o en líquido concentrados 10x o en polvo.

2.- SUEROS. Es una fuente de nutrientes muy enriquecida y su adición al medio es básica en la etapa de crecimiento del cultivo celular. Pueden ser de distintas especies como de caballo, ternera, etc. La obtención de estos sueros es delicada ya que no pueden contener anticuerpos y virus no específicos que inhiban las células.

El suero de ternera y el suero fetal bovino son muy recomendables ya que están libres de gamma-globulinas.

3.- ADITIVOS. según la formulación del medio de cultivo elegido se necesitarán más o menos aditivos, siempre en condiciones de asepsia.

– **Aminoácidos no esenciales**, para enriquecer el medio.

– **L-Glutamina:** no suele incluirse en los medios líquidos debido a su inestabilidad en solución a temperaturas elevadas, por encima de -10°C . Su concentración de uso es de 2mM.

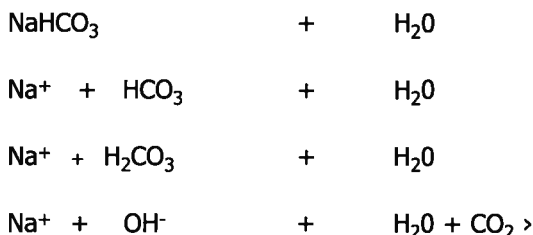
– **Antibióticos:** que inhiben el crecimiento de bacterias, mycoplasmas, rickettsias y clamidias y a los que no son sensibles los virus. Los más usados para los medios de cultivo son:

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACION	INHIBEN .
Penicilina	200UI/ml.	Gramm+
Streptomycin	0,1 mg/ml	Gramm+
Kanamicina	0,1 mg/m	Gramm+y – y Mycoplasmas
Nistaina	50UI/ml	hongos y levaduras
Gentamicina	0,1 mg/m	Gamm+y -

4.- SISTEMA BUFFER. Todos los medios de cultivo líquidos llevan como tampón Bicarbonato (NaHCO_3), si son medios en polvo se les añadirá una vez reconstituidos.

El pH óptimo para el crecimiento celular es de 7,2 – 7,4 y el NaHCO_3 , tendrá una concentración final de 0,85 gr/l.

El bicarbonato sódico se disocia según esta ecuación



Puede verse como el CO₂, regresa a la atmósfera incrementando el pH ya que también aumentan los iones hidroxilo HO⁻. Esta reacción se puede controlar con un aporte artificial de CO₂ en la atmósfera, desplazando la reacción otra vez hacia arriba, evitando que el CO₂, abandone el medio de cultivo.

Los recipientes donde se cultivan células pueden ser cerrados o abiertos, se usarán unas soluciones contacto con la atmósfera de la estufa. Según sean sistemas cerrados o abiertos se usarán unas soluciones más o menos ricas en NaHCO₃.

Sales de Hank: De baja concentración en NaHCO₃, para equilibrar o tamponar sistemas cerrados.

Sales de Earle: de alta concentración en NaHCO₃, para equilibrar o tamponar sistemas abiertos a una atmósfera rica en CO₂ (5%).

MATERIAL PARA CULTIVAR CELULAS.

El material de los recipientes donde vamos a crecer las células influye en la capacidad de crecimiento del cultivo.

Si es de vidrio: no suele ser tóxico y las células se adhieren muy bien. Pero hay que ser muy exigente con su limpieza y desinfección.

Si es de plástico: puede producir toxicidad; es muy útil y cómodo por ser de un solo uso, evitándonos contaminaciones debidas a una mala esterilización del material, aunque a la larga sale más caro.

EQUIPO AUXILIAR.

El instrumento principal del equipo es una cámara de flujo laminar donde se trabaja en condiciones de esterilidad, ya que el aire que entra es previamente filtrado y el que sale también por si se manejan virus peligrosos. La cabina de flujo laminar no equivale a un seguro contra las contaminaciones y debe acompañarse con un manejo aséptico. La habitación donde montemos la infraestructura necesaria para los cultivos celulares tiene que ser cómoda y fácil de limpiar. El resto del equipo necesario se compone de un baño termostático, un microscopio invertido, congelador de -80°C, estufa de CO₂ y una bombona con Nitrógeno Líquido.

5.- PRINCIPALES LÍNEAS CELULARES.

El gran avance de los cultivos celulares ha sido establecer una gran colección de ellos. La mayor colección con acceso libre al público es la American Tissue Culture Collection (ATCC), con más de 500 tipos celulares. Cada tipo celular tiene su número ATCC y su información correspondiente: nombre, origen, medio de crecimiento, ratio, morfología, nº de pasajes que soporta y susceptibilidad a virus.

A su vez la lista se divide en los tres grandes grupos de tipos de cultivos: primarios, secundarios y continuos.

Los principales cultivos usados en nuestro laboratorio son:

a) CULTIVOS PRIMARIOS.

Embrión de pollo de 8 días de gestación.....virus *Influenza* y *Gumboro*.

Riñón, pulmón, testículo de embrión bovino.....IBR, BVD.

Embrión de ratón de 17 días y de riñón.....EVP, F.V.Rift, *Enc.Equina*.

b) Algunos tipos de CULTIVOS SECUNDARIOS

<u>TIPO</u>	<u>FUENTE</u>	<u>RATIO</u>	<u>NºPASES</u>	<u>VIRUS</u>
BP	PALATINO BOVINO	1:3	20	IBR, BVD ENTEROVIRUS
BT	TRAQUEA EMBR.BOVINO	1:2	35	IBR, BVD

(Los dos con morfología fibroblástica).

c) Algunas LÍNEAS CELULARES ESTABLES.

<u>TIPO</u>	<u>FUENTE</u>	<u>RATIO</u>	<u>MORFOL</u>	<u>NºPASES</u>	<u>VIRUS</u>
MDBK	Riñón Bovino	1:8	Fibrobl.	100	IBR, BVD
BHK-21	Mezcla riñones De hámster	1:25	Fibrobl.	50	RABIA AUJESZKY INFLUENZA PORC. PEA y F.V. RIFT
HL	Hígado humano	1:15	Epitelial	200	V. POLIO ADENOVIRUS
HeLa	Carcinoma cerv. Humano	1:40	Epitelia	100	V.POLIO ADENOVIRUS
VERO	Riñón de mono Verde Africano	1:10	Fibrobl	120	PPA PEA
MS	Riñón de mono	1:10	Fibrobl	100	PPA PEA
PK15	Clón de cel. de Riñón de cerdo	1:20	Fibrobl.	120	PPC PPA PARVOVIRUS
RK13	Riñón de conej	1:10	Epitelial	50	EXANTEMA VESIC RINONEUMONITIS RUBEOLA

OBTENCIÓN, MANEJO Y CONSERVACION.

Un cultivo celular primario comienza eligiendo el animal y el órgano adecuado. Se anestesia al animal intraperitonealmente o intramuscularmente, con aguja hipodérmica, usando 40-80 mg/Kg de pentobarbital, bien 0,1 – 0,5 mg/Kg Atropina, 3 mg/Kg Diacepán. Si se anestesia ratones vía inhalatoria se puede aplicar éter etílico, anhídrido carbónico y oxígeno al 50%. Luego se limpia la piel con alcohol de 70°. Con el material estéril se extrae el órgano, se coloca en una placa de Petri y se corta en trocitos de 1-3 mm², se lavan con solución salina pH 7,3 con antibióticos, precalentando a 37°C y se retira todo el tejido conectivo y los posibles coágulos que se formen.

Luego se vuelve a lavar bien repetidas veces con solución salina, y un 10% de Tripsina, para disgregar en lo posible las células.

Después de centrifugar se resuspende el sedimento en medio de crecimiento precalentado, ya tenemos la suspensión celular para cultivarla y crecerla. Pero para ello es fundamental contar el número de células para llevarlas luego a la concentración deseada. Esto se consigue diluyendo un poco del sedimento celular en Tripán azul (que es un colorante vital que tinte solo las células muertas) y añadiendo con una pipeta Pasteur un pequeño volumen a la Cámara de Contaje (Cámara de Neubauer).

La Cámara de Neubauer tiene una cuadrícula dividida en 9 cuadros grandes por una triple línea blanca, con un área de 1 mm². A su vez el cuadrado central se divide en 25 cuadraditos, subdivididos en 16 pequeños cuadrados. Al colocar un cubreobjetos sobre la cámara, la profundidad obtenida es de 0,1 mm.

Por tanto, el volumen total de cada cuadro grande será:

$$VOL = 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1\text{mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 0,0001 \text{ cm}^3 = 10^{-4} = 0,1 \text{ mm}.$$

Contar el número de células de los cuadraditos de las cuatro esquinas: las células muertas y por tanto pintadas de azul no se cuentan; tampoco las que toquen las líneas superior y derecha. Las células que toquen las líneas inferior e izquierda y las del interior de los cuadraditos se contarán.

Nº de cél./ml de la suspensión diluida = $104 \times N/4$

Nº de cél./ml de la suspensión sin diluir = $104 \times N/4 \times Y$

N=nº células contadas

Y=dilución en Tripán azul.

Una vez averiguado el nº de células que tengo lo siguiente es llevarlas a una concentración de 200.000 cel/ml, concentración óptima de inicio de un cultivo.

Finalmente las repetiremos en los frascos elegidos y las incubaremos en estufa de 37°C y atmósfera controlada del 5% de CO₂.

Una buena relación de volúmenes y superficies de cultivo es:

Superficie	Tripsina	Medio	Lavar con
25 cm ²	2 m	10 ml	5 ml
75 cm ²	3 ml	45 ml	5 ml
150 cm ²	5 m	100 ml	10 ml

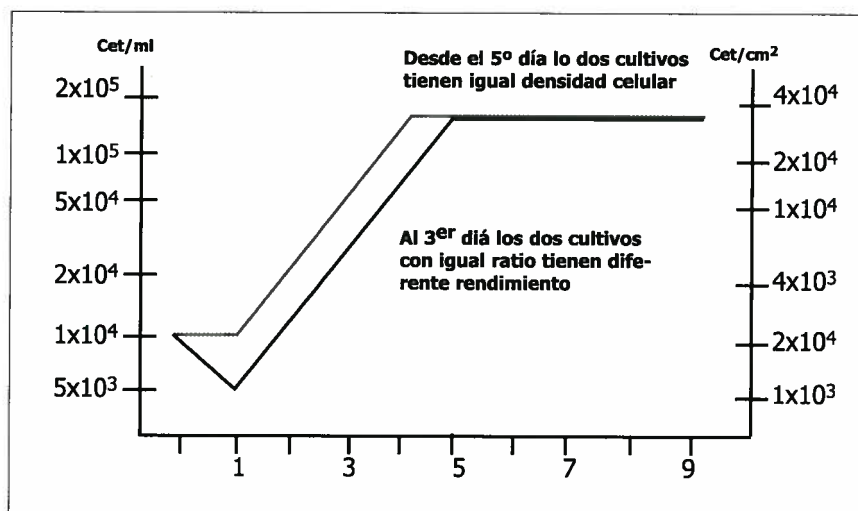
CURVA DE CRECIMIENTO.

En el crecimiento de los cultivos celulares se observan 2 fases de crecimiento en el periodo de 2-24 horas.

1.- Crecimiento exponencial (o fase logarítmica).

2.- Poco crecimiento (fase de crecimiento 0) que comienza cuando las células empiezan a confluir.

Cada tipo celular se caracteriza por su curva de crecimiento que nos da información sobre su potencial reproductivo, por lo que su subcultivo se hará en un periodo determinado.



CONTROL DE CALIDAD DE LOS CULTIVOS CELULARES.

Lo primero que debemos hacer al descongelar células del Nitrógeno líquido es controlar si están infectadas por *Mycoplasmas*. Para ello se inoculan en medios enriquecidos y se incuban a 37°C, durante 3 semanas. Las placas donde haya colonias de *Mycoplasmas* se vuelven a cultivar en medio enriquecido pero en atmósfera anaerobia. A las 3 semanas se examina al microscopio para ver los *Mycoplasmas*.

Otra manera más sencilla es cultivar las placas durante 5 días y luego fijarlas para hacerles una fluorescencia.

E.J. Díaz Dueñas.

Inspector Veterinario de la O.C.A. de Ronda (Málaga)

TECNOLOGÍA ANALÍTICA EN MICROBIOLOGÍA.

INTRODUCCIÓN.

DESCRIPCIÓN DE LA INTERVENCIÓN.

En consonancia con el título dado a esta intervención, parece buena alternativa empezar la misma con la definición del término "microbiología", de sus dos objetivos: el material constituido por los propios microorganismos, y el formal, que define y estudia las características de los primeros, según los recursos tecnológicos de la época. Sigue una esquemática visión de la evolución de la microbiología en sus aspectos más relacionados con la medicina. Todavía en la primera parte, de carácter introductorio, se describen una serie de términos de carácter básico, que bastante a menudo se usan de forma intercambiada en la conversación y literatura medico-veterinarias.

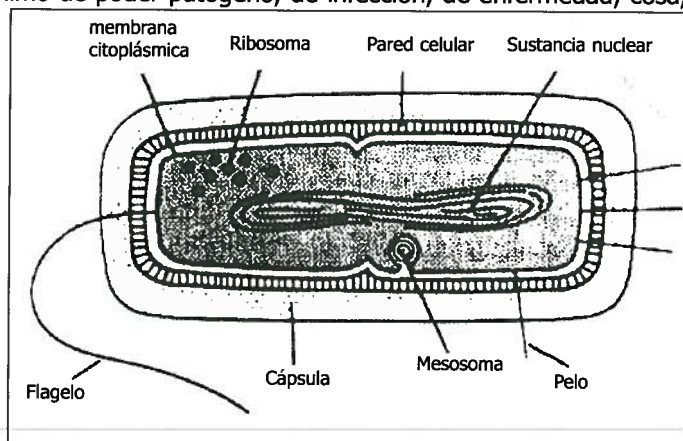
La segunda parte consiste en una exposición de las principales técnicas utilizadas de forma rutinaria, por cualquier laboratorio convencional de microbiología clínica, entendiéndolas de forma aislada, sino como componentes del proceso cíclico y global que supone el diagnóstico. Es decir, el procesamiento primario de las muestras, la detección de microorganismos en montajes directos o en preparaciones teñidas, su recuperación y crecimiento en medios de cultivo, la determinación de las características morfológicas y bioquímicas de los aislamientos significativos, su posterior identificación, y la realización final de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana si es que ha lugar.

La tercera y última parte, está constituida por la descripción de una serie de técnicas analíticas no convencionales, basadas en recientes avances biotecnológicos. Estas técnicas posibilitan la identificación rápida, de microorganismos patógenos recuperados en cultivos convencionales, y la detección de determinantes antigénicos específicos, directamente sobre muestras clínicas. El propósito de este capítulo es simplemente repasar estas "nuevas" técnicas con la mirada puesta en el futuro, cuando las placas de Petri y los medios de cultivo convencionales, parecen estar colocados, de forma irremediable, en la lista de especies en peligro de extinción.

MICROBIOLOGÍA: DEFINICIÓN Y DESCRIPCIÓN. EVOLUCIÓN.

Los microorganismos, constituyen el objeto material de la microbiología. Vulgarmente el término microorganismo, microbio bacteria es sinónimo de poder patógeno, de infección, de enfermedad, cosa, por otra parte, sólo cierta en determinadas ocasiones; en las demás podemos considerar a los microorganismos como saprófitos y, en general, beneficiosos, ya que intervienen en los grandes ciclos geoquímicos y destruyen innumerables sustancias de desecho, que llegaría a impedir procesos vitales si se acumularan sobre la tierra.

Nada más lejos de mi intención que intentar exponer en 150 minutos la bondad de los microbios, ni siquiera su historia, su morfología, fisiología, bioquímica, o sus múltiples interacciones con la sanidad



animal humana en general . Creo que a nadie se le escapa, que ésta intervención, y cualquier otra de características semejantes, solo expone una ínfima parte de un conjunto de datos en explosión exponencial. Es solo una imagen acerca de cómo es la microbiología, ahora, no de cómo puede ser dentro de 5 horas, 5 días o 5 años, ni siquiera dentro de 5 minutos.

Todas las ciencias han evolucionado en el transcurso del tiempo, los conocimientos presentes se han ido edificando las teorías y descubrimientos acaecidos tiempo atrás. En microbiología, quizá más que en otras disciplinas, se establecen varias épocas bien marcadas, que comienzan con el descubrimiento del microscopio óptico, gracias al cual pudieron visualizarse por primera vez los microorganismos. Desde entonces, y aún en la actualidad, se confunden con frecuencia Bacteriología y Microbiología ; el título se ésta intervención es un buen ejemplo de ello. Así, es frecuente ver, sobre todo en determinados ambientes (facultades, laboratorios, hospitales...), la identificación de ambos términos. Ello se debe a que las bacterias han sido desde el principio el grupo mejor conocido, sin embargo, hay otros grupos de seres microscópicos, tal y como veremos más adelante, que quedan englobados dentro del reino de los Protistas, y que son también objeto de estudio por parte de la microbiología.

Ya en la mitad del siglo pasado (XIX) se conocía con bastante exactitud la morfología de algunos grupos microbianos, tales como las algas unicelulares, algas azules o cianofíceas, levaduras, hongos. Protozoos y bacterias. Basados principalmente en este conocimiento morfológico, los científicos de la época agruparon a aquellos microorganismos dentro de los dos grandes reinos de seres vivos considerados en aquel momento, el reino animal y el reino vegetal. Igualmente, hacia finales del siglo XIX, había sido eliminado con métodos experimentales, el mito de la generación espontánea, y se conoció desde entonces, que los microorganismos eran la causa de las enfermedades infecciosas. Si bien las técnicas actuales permiten una evaluación más directa de la virulencia y patogenicidad de los distintos microorganismos considerados patógenos, pareciendo que los postulados de Koch quedan obsoletos, las presunciones fundamentales de estos postulados, todavía sirven como base para vincular de manera inequívoca los microorganismos con las enfermedades que causan. Estos postulados, junto con el advenimiento de medios de cultivo sólidos, que permitieron la recuperación y el aislamiento de los microorganismo en cultivos puros, requirieron el uso previo de una nomenclatura estandarizada por la que pudieran identificarse con exactitud, los aislamientos que se realizaban.

Así, desde hace poco más de 100 años, los sistemas han evolucionado hasta colocar a los microbios en un esquema lógico y coherente: grupos taxonómicos basados, además de en la morfología, en la filogenia, la fisiología, la bioquímica y más recientemente, la genética (composición de las bases e hibridación del ADN, hibridación del ARN ribosómico.

TERMINOLOGÍA USUAL.

Tal y como referíamos al inicio de esta exposición, existen una serie de términos (taxonomía, clasificación, identificación...) que a menudo se usan incorrectamente de forma intercambiable en la literatura médica.

La **taxonomía**, es la rama de la biología relacionada con la clasificación de todos los microorganismos vivientes. **Clasificación**, es la división sistemática de microorganismos en grupos relacionados basados en características similares, e incluye la **clasificación en especies** como el nivel menor y más definitivo de división, clasificación en especies que se hace sólo una vez cuando se clasifica la cepa tipo de un microorganismo, si bien puede reclasificarse cada tanto. **Identificación** es el proceso por el cual se confirma que un microorganismo desconocido pertenece a un grupo taxonómico previamente establecido. Por ende, el proceso de identificación de un microorganismo desconocido en el laboratorio no debe denominarse clasificación en especies. **Nomenclatura** es la asignación de nombres a los grupos taxonómicos, siguiendo reglas internacionales. Se utiliza el sistema binomial clásico de Linneo, siendo los niveles o rangos taxonómicos utilizados en el actual Manual de Bergey, de tipo jerárquico.

Si bien filum o división, subfilum, clase, subclase, orden, suborden y superfamilia son órdenes descendentes de grupos taxonómicos dentro de los reinos animal y vegetal superiores, familia, tribu, género y especie son los niveles usados con mayor frecuencia para los protistas (tercera rama mayor que incluye algas, hongos, protozoarios, cianofíceas y bacterias).

Así, una **especie bacteriana**, es un grupo de cepas que comparten muchas características comunes. Las cepas son descendientes de un aislamiento en cultivo puro, representando la **cepa tipo** el ejemplo permanente de la especie que ostenta el nombre de referencia. El nombre de la especie a menudo refleja un aspecto morfológico o característica bioquímica del microorganismo, o puede hacer referencia a un personaje famoso. Todas las especies son asignadas a un **género**, que habitualmente está bien definido en forma morfológica y bioquímica; sin embargo, a menudo existe subjetividad entre los microbiólogos en cuanto a que constituye exactamente un género y una especie. Los géneros a su vez se asignan a **tribus y familias**, cada una de las cuales posee aspectos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos generales.

Debido a que los fenotipos pueden cambiar, o pueden descubrirse caracterizaciones bioquímicas adicionales, que impidan que un microorganismo conserve una denominación previa, continuará habiendo cambios de nombre, para consternación de microbiólogos veterinarios y estudiantes en general. Sin embargo, el estudio actual de determinantes genéticos, basados en homología de ADN y estudios relacionados, debería permitir una taxonomía más estable, con cambios de nombres menos frecuentes en el futuro. No hemos de olvidar que, tal y como lo plantearon Staley y Krieg "Las clasificaciones bacterianas deben estar hechas para los microbiólogos, no para las entidades que se están clasificando; las bacterias en general, muestran poco interés en la cuestión de su clasificación!".

CÉLULAS, SERES Y ORGANISMOS. REINOS Y REPÚBLICAS.

En un principio y de acuerdo con su organización intracelular, las células de todos los seres vivos son eucariotas y procariotas.



Por otra parte, y a diferencia de los VEGETALES SUPERIORES Y ANIMALES, los PROTISTAS son organismos indiferenciados que no poseen tejidos especializados ni sistemas orgánicos. Ahora bien, dentro de éstos, existen microorganismos que presentan entre sí diferencias tan acentuadas como puedan tenerlas con los seres vivos superiores. Un grupo está constituido por formas celulares más diferenciadas y denominadas eucariotas (seres con núcleo verdadero), que incluyen a algas (poseen clorofila y paredes celulares), hongos (con paredes celulares y sin clorofila) y protozoos (sin clorofila, ni paredes celulares). Finalmente, las más primitivas, las procariotas (seres con núcleo primitivo), que integran a unidades estructurales de cianofíceas o algas azules y bacterias.

Los seres procariotas son ya conocidos desde hace mucho tiempo. En el siglo pasado, Fernando Cohn había establecido una relación entre Cianobacterias y Eubacterias, y las agrupaba por su propiedad de multiplicación binaria. Más recientemente, Eduardo Chatton (1932) profundizó en su estudio, manteniendo dicha unión, y además desarrolló los conceptos de Procariotas y Eucariotas, basándose en la estructura célula

CARACTERES	C.PROCARIOTICAS	C.EUCARIOTICAS
Nucleoplasma limitado por una membrana	-	+
Nucleolo	-	+
Número de cromosomas	1	>1
Reproducción	asexua	sexual o asexualC
División nuclear mitótica	-	+
D-aminoácidos,a.diaminopimélico y a.muránico	+*	-
Ribosomas citoplasmicos	70S	80S
Retículo endoplásmico	-	+
Mitocondrias	-	+i
Cloroplastos	-	+
Aparato de Golgi	-	+
Corriente citoplasmática	-	+
Membrana citoplasmática	generalmente sin esteroles	con esteroles
Orgánulos con membrana	-	+

*Excepto en micoplasmas y clamídias
i Plantas y algas.

En la octava edición del Manual de Bergey, se agrupaba a todos los procariotas conocidos en dos grandes divisiones:

- -División I: Cianobacterias.
- -División II: Bacterias (eubacterias o bacterias verdaderas).

Y clasificaba a las bacterias en 19 partes.

En los últimos años, el estudio del sistema genético bacteriano a nivel molecular, para establecer la homología entre el ADN de las células, ha dado lugar a grandes avances en la taxonomía bacteriana.

Uno de estos estudios es la determinación de la composición de bases de ADN, características de cada especie y que se expresa como porcentaje molar guanina-citosina (G+C), y adenina-timina (A+T). Si dos bacterias tienen relaciones de base desiguales (diferencia de contenido de G+C superior al 10%) no se pueden considerar afines. Basándose en la diferencia o afinidad de la relación G+C entre las bacterias se han creado nuevos géneros y cambiado bacterias de un género a otro.

Los métodos de hibridación molecular relacionan la compatibilidad, la homología del ADN de dos microorganismos. En determinadas condiciones experimentales, se separan las cadenas de ADN bicatenario en dos moléculas monocatenarias, que se recombinan con las de otra bacteria, en el caso de que sus secuencias de bases sean complementarias.

Basándose en el coeficiente de homología en la secuencia de bases de ADN, se introdujeron ciertos cambios en la clasificación bacteriana de la octava edición del Manual de Bergey. Esta edición del Manual ("Bergey's Manual Systematic Bacteriology". Vol 1, 1984 y Vol 2, 1986), divide el reino Procaryotae en cuatro divisiones:

- División 1: Gracilicutes.
- División II: Firmicutes
- División III: Tenericutes.
- División IV: Mendosicutes.

DIVISION I: "**Gracilicutes**" (del latín gracilis, que significa fino, delgado). Comprende a las bacterias con pared celular rígida o semirrígida, que contienen glucopéptido y presentan reacción negativa a la tinción de Gram.

DIVISIÓN II: "**Firmicutes**" (del latín firmus, fuerte). Esta división incluye a las bacterias con pared celular rígida o semirrígida, que contiene glucopéptido y con reacción positiva a la tinción de Gram.

DIVISIÓN III: "**Ternericutes**" (del latín tener, blando): En esta división están incluidas las bacterias que carecen de pared celular.

DIVISION IV: "**Mendosicutes**" (del latín mendosus, que significa poseedor de alguna imperfección). Esta división, comprende bacterias filogenéticamente anteriores a las divisiones I, II y III. Incluye a la clase Archaeobacteria, formada por bacterias cuya pared carece de ácido murámico. A esta clase pertenecen las bacterias termoacidófilas, metanógenas y las halobacterias estrictas.

PAPEL PRIMARIO DEL LABORATORIO.

Aplicando pues distintos y variados criterios, los microorganismos se clasifican, tras obtener un nombre final de género y especie, en los grupos taxonómicos ya comentados.

El papel primario del laboratorio de microbiología clínica, consiste en proporcionar a los veterinarios, identificaciones oportunas y exactas, de los microorganismos recuperados de muestras clínicas, y en facilitar información sobre la susceptibilidad relativa a las cepas patógenas a los distintos agentes antimicrobianos. Estas tareas ayudan a los veterinarios en el diagnóstico y control de la enfermedad infecciosa. Los datos microbiológicos obtenidos, son igualmente de gran valor, de cara a proporcionar información epidemiológica que permita definir los orígenes de los procesos en estudio.

En este contexto, la práctica de la microbiología clínica es en esencia compleja, y se complica aún más, por la existencia de datos de base en constante expansión, y cambiantes. Los directores y supervisores de los laboratorios deberán prestar una atención constante, a la evolución de nuevas tecnologías que puedan proporcionar resultados más fiables, más rápidos y de menor coste. Deberá mantenerse igualmente, una línea de comunicación bidireccional entre los laboratorios y el personal veterinario de O.C.A.s, A.D.S.G., profesionales en ejercicio libre, etcétera, ya que la taxonomía evoluciona, la patología infecciosa animal sufre constantes cambios, y lo que es de suma importancia, la interpretación de los informes de laboratorio se modifica.

TECNICAS ANALITICAS CONVENCIONALES PARA EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO.

REVISION ESQUEMÁTICA DEL CICLO DIAGNÓSTICO.

De forma general, habremos de entender el diagnóstico de una enfermedad de etiología infecciosa, no ya como la emisión de un juicio basado la mayoría de las veces en simples apreciaciones individuales de carácter clínico, sino como el resultado de una secuencia de etapas cíclicas (recolección, procesamiento, análisis, informe e interpretación), en las que el laboratorio juega un papel primordial, pero ciertamente condicionado, a efectos prácticos, por las etapas previas y posteriores a su intervención concreta, esto es, la recolección y toma de muestras, y la interpretación de los informes emitidos.

El ciclo diagnóstico comienza con la existencia de un colectivo o de un individuo, que presenta signos o síntomas que pueden sugerir la presencia de una enfermedad infecciosa de etiología bacteriana. Si la anamnesis y el examen físico practicado por el Veterinario en los animales sospechosos sugieren una infección, puede estar indicada la realización de cultivos u otros procedimientos analíticos en el laboratorio de microbiología clínica.

Para ello, se tomarán las **muestras** oportunas, en los envases adecuados, etiquetándose e identificándose de forma general con los datos del animal muestreado, su localización geográfica, día y hora de

recolección y el tipo de muestra que se remite. No solamente es importante que los tipos de muestras remitidos sean los adecuados para cada caso, sino también que su número, su volumen o cantidad unitarios, su identificación y su método de recogida, conservación y transporte sean los correctos. Es en tal caso cuando se consigue que los resultados laboratoriales sean representativos y fiables, y cuando, por lo tanto, pueden resultar de utilidad a sus peticionarios.

Posteriormente, las peticiones requeridas por el Veterinario habrán de transcribirse a un **formulario** o modelo más o menos estandarizado de envío de muestras. En el caso de enfermedades infecciosas, la remisión al laboratorio de un **historial clínico** que acompañe a las muestras es de crucial importancia para el correcto desempeño de las funciones asignadas al mismo. Estos informes o historiales sirven para encauzar los exámenes laboratoriales, con lo que se obtiene un claro beneficio en tiempo, dinero y eficacia. También permiten una adecuada valoración de los resultados analíticos, posibilitando así la formulación de observaciones y recomendaciones apropiadas a cada caso. En definitiva, el personal que trabaja en el propio laboratorio se beneficia de toda esta información, a través de un aumento de sus conocimientos y de su experiencia, incrementando así su capacidad de resolución de nuevos problemas. Los modelos estandarizados para la cumplimentación de estos historiales clínicos pueden solicitarse a cada laboratorio.

Una vez recibida la muestra en el laboratorio, la información que figura en el formulario e historial clínico, se registra en una terminal informática o libro ad hoc. Las muestras se examinan visualmente y, según su naturaleza y la petición cursada por el veterinario, pueden prepararse montajes y frotis para exámenes microscópicos diversos. Las observaciones realizadas hasta el momento podrán informarse o no, dependiendo del carácter definitivo de los resultados. La información obtenida hasta este momento, puede usarse, en ocasiones, para establecer un diagnóstico presuntivo e instituir distintas pautas de control.

Las muestras que requieren la identificación definitiva de bacterias potencialmente patógenas habrán de procesarse aún más. Para ello se eligen uno o más medios de cultivos y cada uno se inocula con una pequeña parte de las muestras sospechosas. Se hacen siembras en placas de agar para aislamiento de colonias, y se colocan en una incubadora con la temperatura y ambiente apropiados para maximizar el crecimiento de las colonias bacterianas.

Después de un periodo de incubación dado, se examinan las placas, pudiendo hacerse en algunos casos identificaciones microbianas presuntivas. Se haría un informe final si pudiera darse una respuesta definitiva en ese momento. De no ser así, el informe final deberá demorarse, mientras se efectúan subcultivos y pruebas adicionales para identificar el microorganismo de forma definitiva.

Cada paso de este ciclo debe completarse, con exactitud, precisión y los más rápidamente posible. Obsérvese que el laboratorio está directamente involucrado en sólo una parte del ciclo, sin embargo, y al hilo de lo comentado en un principio, al estar condicionado por etapas previas y posteriores a éste, pensamos que sus directores y responsables deberían asumir la responsabilidad de todas las fases del ciclo diagnóstico, asegurando, en la medida de lo posible, que las muestras son recogidas y transportadas, de forma correcta al laboratorio. De este modo, y con el asesoramiento pertinente, los resultados de los cultivos podrían interpretarse con exactitud y aplicarse al cuidado de la ganadería afectada.

TECNICAS GENERALES.

VISUALIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS. TÉCNICAS DE EXAMEN MICROSCÓPICO.

EL MICROSCOPIO. TIPOS.

La observación de los microorganismos y de sus estructuras celulares es difícil porque: 1) son generalmente de muy pequeño tamaño y 2) son transparentes a la luz visible. Estas dos propiedades físicas han sido decisivas para el desarrollo de nuevos instrumentos diseñados con el fin de proporcionar una mejor definición de células eucariotas y procariotas, aumentando por un lado el **poder resolutivo** y contrastando por otra parte la transparencia de la célula mediante el aumento de **contraste**.

El ojo humano por otra parte es capaz de discriminar diferencias en longitudes de onda (color) y en la intensidad de luz visible. La mayoría de células y componentes celulares son transparentes a la región visible del espectro, con excepción de algunos pigmentos, por lo general más comunes en las células vegetales, que absorben la luz de ciertas longitudes de onda (sustancias coloreadas). La baja absorción de luz de la célula viviente se debe a su alto contenido en agua. Pero aún después de desecados, sus componentes presentan muy escaso contraste. Un medio de contrarrestar esta limitación es emplear colorantes que tiñen selectivamente los distintos microorganismos o sus distintos componentes estructurales, introduciendo de este modo diversos compuestos que absorben longitudes de onda determinadas y específicas.

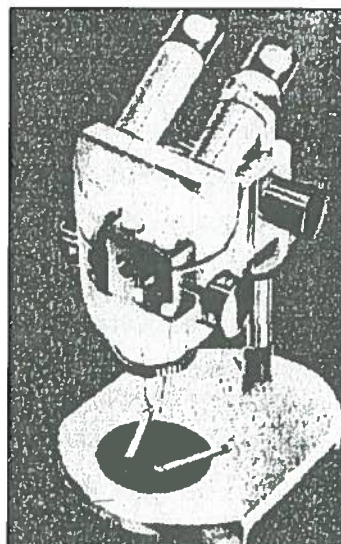
Según el principio en que se funda cada microscopio para ampliar las imágenes podemos hablar de microscopios de luz, electrónicos y de difracción de rayos X (de aplicación práctica en biología molecular en estudios de ácidos nucleicos y proteínas).

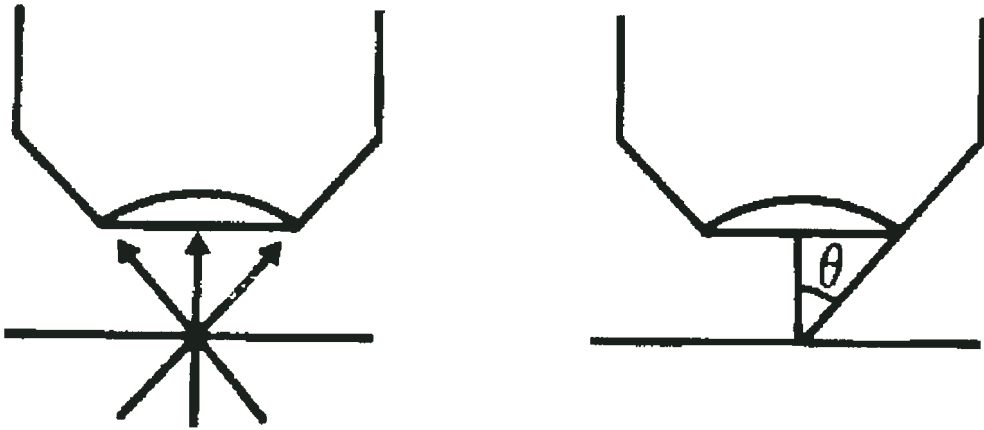
Entre los primeros, microscopios de luz, se distinguen varios tipos, siendo los más relevantes en microbiología clínica los microscopios ópticos de campo claro, de contraste de fases, de campo oscuro, de luz ultravioleta y de fluorescencia. Igualmente habremos de considerar en este apartado clasificatorio la microscopía de interferencia y de Nomarsky (detectan variaciones continuas en el índice de refracción de estructuras celulares) y la microscopía de polarización, que utiliza la luz polarizada para detectar anisotropía.

Otra clasificación más sencilla es la de microscopios simples, que son aquellos que utilizan una sola lente (lupas, cristales de aumento...) y microscopios compuestos, formados por dos lentes, una situada cerca del ojo, denominada ocular, y otra, cercana al objeto, denominada objetivo.

En la superficie de cada lente hay un número y un signo (X) marcado. El **aumento** total del microscopio viene dado por el resultado de multiplicar el aumento del ocular por el del objetivo. Generalmente, los oculares utilizados en Microbiología son de (10 X), es decir, 10 aumentos; en cambio, los objetivos pueden variar desde (10 X), (20 X), (40 X), (64 X), (100 X) y (120X), en algunos casos, por tanto, como máximo se podrá observar a un microorganismo aumentado 1.000-1.200 veces. Si se sustituye el ocular por uno de mayor aumento (15 X) o (20 X), sólo se conseguiría una mayor amplitud, pero no un mejor poder de resolución.

En el microscopio óptico, así como en cualquier otro tipo de microscopio, el **poder de resolución**, que es la capacidad del instrumento para dar imágenes distintas de puntos situados muy cerca uno del otro en el objeto observado, depende de la longitud de onda (λ) y de la apertura numérica del objetivo (AN). El **límite de resolución**, que se define como la distancia mínima que debe existir entre dos puntos para que puedan ser discriminados como tales, es: $L.R. = 0,61 / AN$, siendo la apertura numérica: $AN = n \times \sin q$, donde n es el índice de refracción del medio y q el ángulo de apertura. Es importante recordar que el límite de resolución es la inversa del poder de resolución, de manera que cuanto mayor sea éste, menor será el límite de resolución.





Puesto que el seno de q no puede exceder de 1, y el índice de refracción de los mejores materiales ópticos no puede ser superior a 1,6 usando aceite de inmersión, la máxima AN de las lentes es de alrededor de 1,4 (cuando el objetivo está separado del objeto por el aire, su apertura numérica no será mayor de 1). Con estos parámetros es fácil precisar que el límite de resolución del microscopio no excede de los 1700 \AA ($0,17\text{mm}$) usando luz monocromática de $\approx 4000 \text{ \AA}$ (violeta). Con luz blanca, el límite de resolución se sitúa en torno a los 2500 \AA ($0,25\text{mm}$). Siendo AN limitada ($\approx 1,4$), resulta evidente que la única manera de incrementar el poder resolutivo, consiste en utilizar longitudes de onda menores. En este caso, sin embargo, las lentes de vidrio ya no son más transparentes y se hace necesario introducir otros medios de refracción. Por ejemplo, con radiaciones ultravioleta, de 2000 a 3000 \AA , se usan lentes de cuarzo u óptica de reflexión y la resolución aumenta de esta forma al doble, llegando a 1000 \AA ($0,1\text{mm}$) el límite de resolución.

MICROSCOPIOS DE LUZ (ÓPTICOS).

■ De campo claro.

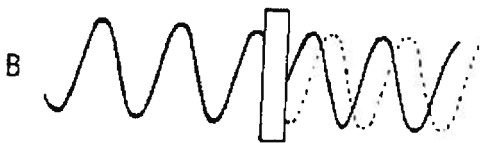
Consta, además de dos tipos de lentes (oculares y objetivos), de un sistema productor de luz y de un condensador situado debajo de la platina, que tiene por función el concentrar el haz luminoso sobre un punto del portaobjetos.

El condensador, que puede subir o bajar a voluntad, debe estar lo más alto posible cuando se trabaja a gran aumento, y alejado de la platina cuando se trabaja a menos aumentos.

■ De contraste de fases.



A) Efecto de un material transparente y no absorbente de mayor índice de refracción que el medio, introduciendo un cambio de fase (retardo).



B) El mismo objeto, pero más grueso, ocasiona retardo o cambio de fase pero más pronunciado.



C) Efecto de un objeto transparente y absorbente. Provoca un retardo, pero también una disminución de la amplitud (intensidad).

En 1953, se concedió el premio Nobel de Física a Fritz Zernicke, por la invención del microscopio de contraste de fases. Esta técnica, al igual que las de interferencia, se basan en que, aún cuando las estructuras biológicas son sumamente transparentes a la luz visible, introducen cambios de fase en las radiaciones que las atraviesan. En la figura se indican los efectos de un material transparente (A-B) y de un material absorbente, sobre un rayo.

En A, la onda atraviesa un material con un índice de refracción diferente del que tiene el medio. Al atravesar el objeto, la amplitud de la onda, no cambio, pero la velocidad se altera. Si el índice de refracción en el material es mayor, ocurre una demora o retardo, que también se denomina cambio de fase. Después de salir el rayo, la velocidad se restablece, pero el retardo subsiste. Este retardo involucra un cambio de fase que puede ser medido en fracciones de longitud de onda. El cambio de fase aumenta proporcionalmente a la diferencia entre los índices de refracción del objeto y del medio, y al grosor del objeto.

En este microscopio, la diferencia de fase se adelanta o se retarda _ de longitud de onda, de manera que el retardo producido por las estructuras se magnifica. De este modo, los pequeños cambios de fase que se producen en el objeto son ampliados y transformados en cambios de amplitud (intensidad). El objeto transparente aparecerá entonces con distintos tonos de gris que dependen del producto entre el espesor del objeto y las diferencias entre los índices de refracción del objeto y del medio.

La microscopía de fase se usa en la actualidad como método de rutina en la observación de microorganismos vivos sin teñir, y es particularmente útil en la observación de detalles finos (estructuras submicroscópicas).

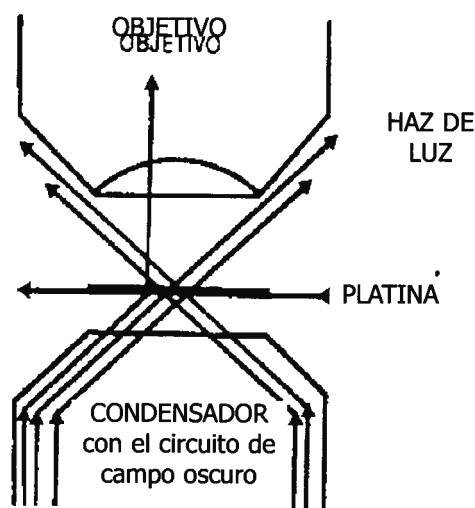
■ De campo oscuro.

La microscopía de campo o fondo oscuro, también denominada ultramicroscopía, esta basada en el hecho de que la luz se dispersa en los límites entre los diversos materiales que poseen diferentes índices de refracción (interfases). El instrumento consiste en un microscopio en el cual el condensador común se halla reemplazado por uno que ilumina el objeto oblicuamente. Con el condensador de campo oscuro no entra luz directa en el objetivo. De esta forma sólo la luz difractada en un objeto (microorganismo) se dirige y penetra en el objetivo. Así, los objetos extraordinariamente pequeños, al desviar la luz, pueden observarse como imágenes brillantes sobre un fondo oscuro. Si en el campo examinado no hay ninguna partícula de distinto índice de refracción, se verá todo oscuro.

Por medio de este instrumento pueden descubrirse, pero no resolverse, estructuras menores que las que se visualizan con el microscopio óptico de campo claro. La demostración de estructuras por debajo del límite de resolución, se aplica también a otros tipos de microscopios ópticos, y en particular a los que usan óptica de contraste de fases. Teóricamente, una estructura de sólo 50 Å, es decir, 40 veces menor que el límite de resolución puede ser detectada siempre que tenga bastante contraste en relación con el fondo en que se halla.

■ De luz ultravioleta.

La capacidad, el poder de resolución depende en parte, tal y como hemos visto, de la longitud de onda empleada, aumentando la primera cuando la segunda disminuye. Según esto, y como la luz ultravioleta tiene menor longitud de onda que la visible ($\lambda_{\text{ultravioleta}} = 0.18-0.4\mu\text{m}$ y $\lambda_{\text{visible}} = 0.4-0.7\mu\text{m}$), el microscopio que la incorpora prácticamente duplica el poder de resolución respecto al de campo claro. Al ser las radiaciones ultravioleta invisibles para el ojo humano, las imágenes deben recogerse en la foto tubos que las transmitan a una placa fotográfica o que las conviertan en imágenes televisivas. Sin embargo, la principal aplicación de la luz ultravioleta se utiliza en el microscopio de fluorescencia.



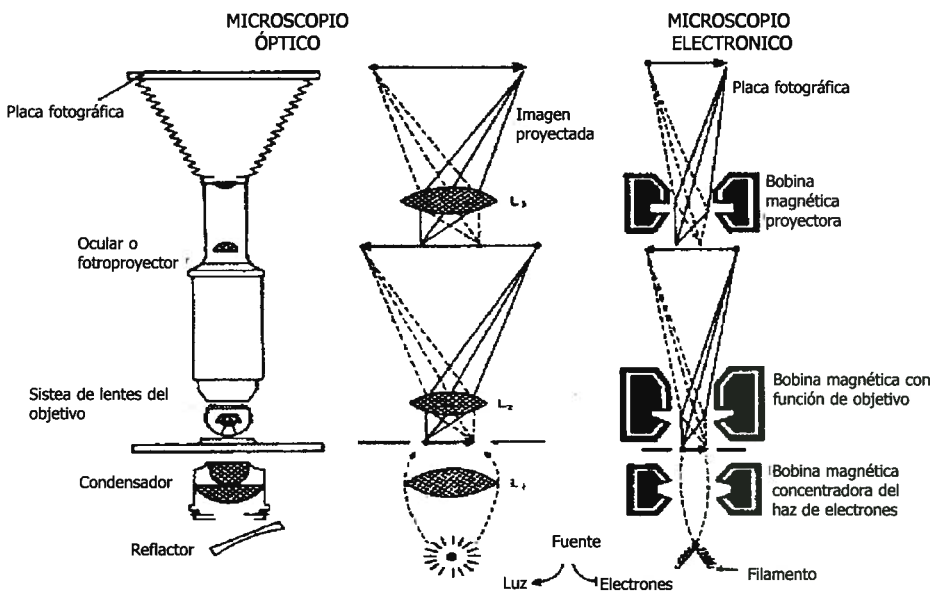
■ De fluorescencia.

Algunas sustancias son capaces de absorber la energía de las ondas ultravioletas y volverla a emitir como ondas visibles de mayor longitud. A estas sustancias se les denomina fluorescentes y al fenómeno, fluorescencia. Entre las sustancias fluorescentes cabe destacar el naranja de acridina, actualmente empleada para visualizar bacterias en campos donde hay poco número, o la auramina, cuya utilización facilita enormemente la observación de extensiones sospechosas de contener gérmenes del género *Mycobacterium*.

Es notable el avance que para la Inmunología representó este tipo de microscopio, ya que, utilizando técnicas inmunológicas, directas (anticuerpos marcados) e indirectas (antisuero marcado), sirven para poner de manifiesto determinados microorganismos o antígenos específicos.

MICROSCOPIOS ELECTRÓNICOS.

La microscopía electrónica es la técnica de elección en el estudio de ultraestructuras. Los electrones emitidos dentro de un tubo al vacío, son acelerados y posteriormente desviados por campos electromagnéticos que actúan como si fueran lentes ópticas (condensador, objetivo, proyector). La imagen se visualiza sobre una pantalla fluorescente, estando producida por la dispersión de los electrones al chocar con los núcleos atómicos presentes en el objeto. La dispersión depende del espesor del objeto, de la concentración de átomos y especialmente del número atómico. La mayoría de los elementos biológicos no tienen un número atómico suficientemente elevado como para producir la dispersión de los electrones, utilizándose por esta razón átomos pesados que actúan como "colorantes" electrónicos al aumentar el contraste. En este microscopio, como en los ópticos, el poder de resolución depende de la longitud de onda ($\lambda = 0.05\text{Å}$) y de la apertura numérica. El límite de resolución alcanzado es de 3 a 5 Å y el aumento puede llegar a un millón de veces o más. Debido a la naturaleza del microscopio electrónico y de la materia orgánica, mayoritariamente compuesta por carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno, elementos dotados de poca capacidad para desviar los electrones, se requieren técnicas especiales con el fin de obtener el adecuado contraste de las imágenes de la muestra con el fondo. Así solamente se visualizan preparaciones muy delgadas, como cortes ultra finos de bacterias teñidas con sustancias especiales como sales de elevado peso molecular (ácido ósmico, uranio, lantano, plomo...) que dispersan bien los electrones (tinciones negativas con una sal de un metal electrón denso).



Como cualquier partícula existente en el medio, detiene fácilmente el paso de los electrones, la observación se realiza colocando la muestra en un tubo donde existe el vacío. Todo esto limita bastante los tipos de muestra a examinar, siendo su utilización casi nula en la rutina diagnóstica de un laboratorio de microbiología clínica.

Los cortes gruesos e incluso las células vivas son susceptibles de ser estudiados con microscopía electrónica de **alto voltaje**. La microscopía electrónica de **barrido** (scanning) permite obtener una vista de la superficie del objeto utilizando los electrones secundarios emitidos.

TÉCNICAS DE EXAMEN MICROSCÓPICO. TINCIONES.

El examen microscópico es el primer paso para el estudio de muestras bacteriológicas. Es un examen, la mayoría de las veces orientativo, que llega a proporcionar una serie de datos de gran utilidad, como son: la presencia o ausencia de bacterias, su morfología, motilidad y características tintoriales generales o de estructuras particulares. También permite observar la reacción celular existente en las muestras patológicas.

Existen dos técnicas generales para el examen microscópico: preparaciones sin teñir (en fresco) y preparaciones coloreadas.

A) EXAMEN MICROSCÓPICO EN FRESCO.

Es una técnica de fácil realización, en la que el producto a examinar se sitúa ente porta y cubreobjetos, pudiendo observarse las bacterias presente en la muestra, su abundancia, motilidad y morfología. Si el material procede de un cultivo en medio sólido se emulsionará en una gota de agua destilada o en solución fisiológica. Si el material de procedencia es líquido se depositará directamente entre porta y cubre.

La observación se realiza, en general, con objetivo de (40 X) y (100 X) en microscopio de campo claro, manteniendo el condensador a la altura adecuada (bajado normalmente) con el fin de lograr el contraste idóneo, ya que un exceso de luz hará que determinadas estructuras, de índice de refracción muy bajo, pase inadvertidas. La microscopía de contraste de fases y de campo oscuro, facilita mucho la observación en fresco. Resumiendo:

TÉCNICAS PARA EXAMEN DIRECTO DE MUESTRAS EN FRESCO:

1.- MONTAJE SALINO:

Se utiliza para la determinación de la actividad biológica de microorganismos, incluyendo motilidad, reacciones frente a ciertas sustancias químicas o reactividad serológica con antisueros específicos.

a) Examen con campo oscuro.

Utilizado en la visualización de ciertos microorganismos delicados que no son visibles en campo brillante y que se tiñen con gran dificultad. Particularmente útil para demostrar espiroquetas en materiales biológicos, en especial orina, que se sospecha que contiene especies de *Leptospira*.

b) Procedimiento de la gota pendiente:

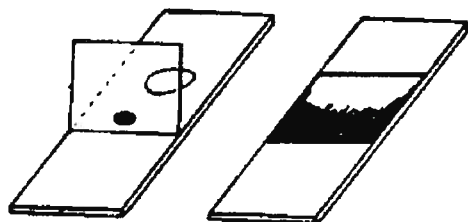
Utiliza un portaobjetos de vidrio grueso con un pocillo cóncavo central. Tiene igual propósito que el anterior, aunque existe menor distorsión por el peso del cubreobjetos y puede lograrse un campo de foco más profundo en la gota. En general esta técnica se usa para estudiar la motilidad de las bacterias.

2.- PREPARADO CON TINTA CHINA O NIGROSINA (GRANULOSA).

Se emplea en el examen microscópico de las cápsulas de múltiples microorganismos. Los finos granulos de la tinta china o nigrosina dan un fondo semiopaco contra el que pueden verse las cápsulas claras. No debe hacerse demasiado espesa la emulsión de contraste en tinta china, ya que puede bloquearse totalmente la luz transmitida.

3.-TÉCNICA DOBLE:

Se disponen en el centro de un porta objetos, y a 1 cm. Aproximadamente de distancia, una gota del producto a examinar y una gota de menor tamaño se tinta china de gránulos finos, libre de contaminación bacteriana (pipeta capilar). Se coloca encima un cubreobjetos. De un lado la preparación queda como un montaje salino sin tinta china, y de lado opuesto, aparece el fondo completamente negro que se hace imposible cualquier observación. Es en la zona intermedia del cubreobjetos, zona donde los dos líquidos se mezclan, donde se realiza la observación. Para ello, el fondo de la preparación debe ser gris oscuro. Las bacterias aparecen más claras con mayor o menor refringencia, y la presencia de cápsulas se traduce en halos claros rodeando los cuerpos bacterianos, dando la impresión de agujeros luminosos. El montaje se examina con el microscopio de campo claro, usando en primer lugar el objetivo de (10 X) para una evaluación general (localización de un fondo gris oscuro en la interfase de ambos líquidos), el objetivo de (40 X) para la localización de los microorganismos sospechosos, y el objetivo de inmersión habitual para la confirmación de las sospechas.



4.- MONTAJE CON YODO:

De uso frecuente en parasitología, los montajes con yodo habitualmente se emplean junto con montajes salinos cuando se examina materia fecal u otros materiales en busca de protozoarios o huevos de helmintos intestinales.

5.- MONTAJE CON HIDRÓXIDO DE POTASIO (KOH).

Utilizado como ayuda para detectar elementos micóticos en material mucoso espeso o en muestras que contienen material queratinoso, como escamas de piel, uñas o pelo. El KOH disuelve la queratina de fondo, poniendo de manifiesto los elementos micóticos.

B) EXTENSIONES COLOREADAS.

Las técnicas de coloración, indispensables en el estudio de muestras bacteriológicas, permiten la diferenciación de microorganismos de distinta reacción frente a determinados colorantes, y la observación de ciertas estructuras celulares.

Las tinciones consisten en preparados acuosos u orgánicos de colorantes o grupos de colorantes, que imparten una variedad de colores a los microorganismos, tejidos vegetales y animales, y a otras sustancias de importancia biológica. La introducción de tinciones a mediados del siglo XIX representa, en gran medida, el fundamento de los principales avances que se han producido en microbiología clínica y en otros campos de la microscopía diagnóstica durante los últimos 100 años. Casi todos los colorantes biológicamente útiles son derivados de alquitrán mineral (o de hulla). La estructura química fundamental de muchos de ellos es el anillo de benceno, estando compuestos por 2 o más anillos bencénicos conectados por uniones químicas bien definidas y asociadas con la producción de color que se denomina cromóforos. La intensidad del color de un colorante, es proporcional al número de radicales cromóforos existentes en el compuesto.

Los colorantes pueden utilizarse además para demostrar funciones de microorganismos mediante las técnicas denominadas supravitales, como indicadores de desviaciones de pH en medios de cultivo, o como indicadores de oxidorreducción para demostrar la presencia o ausencia de condiciones anaerobias debido a su alta afinidad por el hidrógeno. Cuando están ocupados todos los sitios moleculares que pueden unirse a hidrogeno, el colorante está en su estado reducido, y en general es incoloro, denominándose compuesto Leuco. Examinando este concepto desde una posición opuesta, un colorante retiene su color sólo mientras su afinidad por el hidrógeno no está totalmente satisfecha. Dado que el oxígeno en general posee mayor afinidad por el hidrógeno que muchos colorantes, el color es retenido en presencia de aire. Esto permite utilizar ciertos colorantes como el azul de metileno, como un indicador de oxidorreducción en un medio anaerobio (jarra para el cultivo de gérmenes anaerobios), ya que el indicador

permanece incoloro sólo en ausencia de oxígeno.

Preparación de los frotis: extensión, secado y fijado.

Extensión:

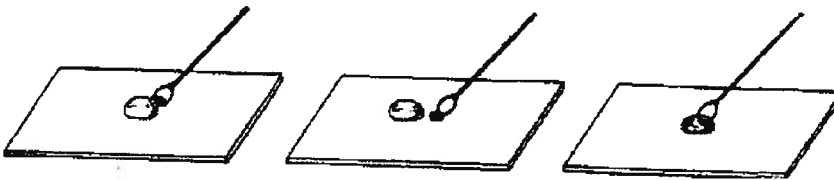
La forma de realizar esta técnica depende del producto a examinar:

■ PRODUCTO LÍQUIDO:

Se deposita una pequeña cantidad del material en el centro de un portaobjetos, extendiéndolo con un asa de siembra hasta conseguir una capa fina y homogénea.

■ CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO:

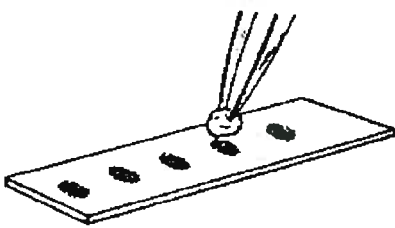
Depositamos una gota de agua o solución salina fisiológica en un portaobjetos y suspendemos en ella una colonia o porción de la misma, procedente de cultivos jóvenes. Emulsionamos y extendemos hasta conseguir una capa fina y homogénea.



■ EXUDADO:

Se extiende directamente sobre el portaobjetos la muestra recogida con la torunda, procurando que quede una capa fina y homogénea. Con el fin de conservar la morfología celular y la agrupación bacteriana es conveniente dar un movimiento de rotación a la torunda, conforme se vaya deslizando sobre el portaobjetos.

■ ÓRGANOS:



Seccionamos un pequeño fragmento del órgano o víscera en cuestión y lo cogemos con unas pinzas adecuadas, manteniendo libre la superficie de corte. Procedemos seguidamente a la aplicación de la superficie de corte sobre el portaobjetos, presionando suavemente y repitiendo este gesto a intervalos regulares a lo ancho o a lo largo del porta.

Secado y Fijado:

El secado se realizará preferentemente y siempre que sea posible a la temperatura del laboratorio; es rápido siempre que el portaobjetos esté perfectamente desengrasado, y el frotis sea fino y homogéneo. En un porcentaje muy elevado de casos, la mala calidad de una preparación microscópica se deriva de un secado excesivamente enérgico que altera constituyentes estructurales bacterianos (la pared en particular). Ambas acciones se pueden realizar simultáneamente. Para ello calentamos ligeramente la parte inferior del porta. Esta operación, además de secar, sirve para fijar, ya que coagula las proteínas plasmáticas de los microorganismos y los adhiere al portaobjetos.

También se puede realizar la fijación con alcohol (metílico absoluto, etílico absoluto o de 95°, mezcla a partes iguales de alcohol-éter). Para ello cubrimos la preparación durante dos o tres minutos, escurrimos y secamos a temperatura ambiente. Esta opción es útil si el extendido es rico en materiales histicos.

1.- Coloraciones simples.:

Son aquellos que utilizan un solo colorante y tienen por misión poner en evidencia la morfología bacteriana. En síntesis consiste en recubrir la superficie bacteriana con una solución de un colorante en alcohol y agua, siendo generalmente de carácter básico (cristal violeta, fucsina fenicada básica, azul de metileno).

2.- Compuestas o diferenciales.:

Caracterizados por utilizar más de un colorante, su misión es poner de manifiesto diferencias entre microorganismos o partes de ellos, De forma general utilizan un colorante básico o primario, un mordiente, un decolorante y un colorante de contraste o contratinción. Aunque existen múltiples métodos de tinciones compuestas, vamos a referirnos aquí a los métodos de coloración usados de forma rutinaria: *Tinciones de Gram, Stamp y Ziehl-Neelsen/Kinyoun.*

3.- Tinciones especiales.:

De empleo mucho más limitado, en unos casos pretenden aumentar el grosor bacteriano (impregnación con sales de plata-Fontana Tribondeau para spiroquetas y flagelos -) y en otros, visualizar estructuras celulares, como flagelos (Tinciones de *Leifson* y de *Rhodes*), cápsulas (Tinción de *Hiss*), esporos (Coloración de *Möller*, Tinción de *Wirtz-Conklin*).

4.- Fluorescentes.

Los colorantes fluorescentes son sustancias capaces de unirse a los microorganismos y emitir fluorescencia al ser iluminados con luz ultravioleta (absorben la energía de las ondas ultravioletas y la vuelven a emitir como ondas visibles de mayor longitud). Las dos principales son la tinción de *naranja de acridina*, que permite la observación de microorganismos en el examen directo de la muestra o en caldo de cultivo, siendo particularmente útil cuando existen pocos microorganismos o cuando la observación es difícil debido a la presencia de restos celulares, y la *tinción de auramina*, utilizada para la visualización de microbacterias especialmente en aquellos laboratorios que procesan un gran número de muestras, ya que la visualización es más cómoda que con la de Ziehl Neelsen. Con microscopio de fluorescencia, las células bacterianas se ven amarillo verdosas contra un fondo oscuro cuando se usa permanganato de potasio como contratinción. El uso del procedimiento de fluorescencia facilita el análisis de los frotis, en particular cuando se usa un objetivo de (25 X), ya que proporciona un aumento suficientemente bajo como para rastrear amplios campos microscópicos, pero suficientemente alto como para ver los rayos de fluorescencia (lámina 1-3N). Puede utilizarse una mayor magnificación para confirmar los objetos sospechosos observados con el objetivo de (25 X).

Debe hacerse hincapié en que ni la tinción de auramina ni la de fluorocromo auramina son técnicas fluorescentes de carácter inmunológico (antígeno-anticuerpo), sino uniones físico-químicas directas del colorante a la pared celular rica en lípidos.

1.-TINCIÓN DE GRAM:

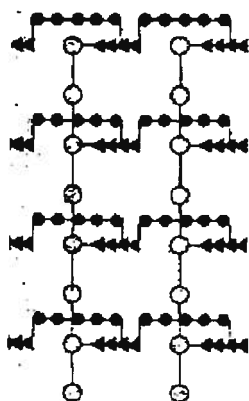
Elaborada por Hans Christian Gram en 1884, es la más empleada en bacteriología como tinción diferencial usada para demostrar las propiedades tintoriales de bacterias de todos los tipos. Teniendo en cuenta que la propiedad de grampositividad depende de la naturaleza y composición química de la pared bacteriana, habremos de tener siempre presente, que las características tintoriales pueden ser atípicas en cultivos muy jóvenes, viejos, muertos o en degeneración.

Durante más de un siglo las bacterias han sido clasificadas como gram-negativas o gram-positivas, dependiendo de su reacción con la tinción de Gram. La base de esta distinción empírica radica en las diferentes clases de paredes celulares de unos y otros microorganismos.

El cristal violeta (violeta de genciana) sirve como tinción primaria, uniéndose a la pared celular bacteriana después del tratamiento con una solución débil de yodo (Iugol) que sirve como mordiente para la unión del colorante (los mordientes son sustancias que facilitan la coloración de las bacterias, ya sea combinándose con la pared y recubriéndola con una especie de laca sensible a la acción del colorante, o bien reforzando la acción de estos últimos). Algunas especies bacterianas, debido a la naturaleza química

de su pared, tienen la capacidad de retener el cristal violeta aún después del tratamiento con un decolorante orgánico, como el alcohol etílico al 95% o la mezcla de éste a partes iguales con acetona. Las bacterias que retienen el colorante se ven azul/negro cuando se observan con el microscopio y se denominan grampositivas. Ciertas bacterias, pierden la tinción primaria con cristal violeta cuando son tratadas con el decolorante, quizá debido al alto contenido lipídico de su pared celular. Estas bacterias decoloradas captan la contratinción con safranina y se ven de color rojo cuando se observan con el microscopio, denominándose gramnegativas. Estas reacciones con la tinción de Gram, cuando se observan junto con los distintos tipos morfológicos y disposiciones de células bacterianas, pueden usarse para efectuar identificaciones presuntivas.

Bacterias grampositivas:



Rodeadas de una pared celular espesa, de grosor variable entre 150 A* y 800 A, 500 A* de anchura, típicamente compuestas de **péptido-glucano y ácido teicoico**. La macromolécula determinante se denomina péptido-glucano porque consta de moléculas peptídicas y de azúcares (glúcidos), estando las cadenas lineales polisacáridas unidas entrecruzadamente por péptidos cortos. El péptido-glucano está ligado entrecruzadamente de forma extensa, dando lugar a una sola y enorme molécula con la forma de un saco. La pared celular aislada tiene la misma forma que la bacteria que ha envuelto previamente.

El péptido-glucano consta de tres unidades repetitivas:

Un disacárido de N-acetilglucosamina (NAG) y ácido-acetilmurámico (NAM), en enlace B-1-4 glucosídico.

Un tetrapéptido de L-alanina, D-glutamina, L-lisina y D-alanina.

Un puente peptídico de pentaglicina que se enlaza entrecruzadamente a los residuos de NAM sobre filamentos diferentes del polisacárido.

Bacterias gramnegativas:

Su pared celular tiene aproximadamente unos 100 Å, de espesor, un elevado contenido en lípidos (11 a 20%) y el aspecto de una membrana simple.

En la capa rígida más interna hay una cantidad relativamente pequeña de glucopéptido, pero en la parte externa se encuentra una gran cantidad de un lipopolisacárido (LPS), a menudo identificado como endotoxina (fracción lipídica denominada Lípido A).

2.-TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN7KINYOUN:

El fundamento de esta técnica diferencial, se basa en la propiedad del la **ácido-alcohol resistencia** de algunos microorganismos del orden Actinomycetales (*Mycobacterium, Nocardia* y *Actinomyces*), propiedad descubierta por Ziehl y Neelsen en 1882, y debida al elevado contenido lipídico de estas bacterias, fundamentalmente fosfolípidos, ceras y ácidos micólicos (ácidos grasos, no saturados de cadena larga que se presentan de forma esterificada ligados al polisacárido superficial, o de forma libre extractable-glicolípidos-; forman el denominado factor cordón).

Utiliza como colorante básico la carbolfucsina. El mordiente utilizado puede ser calor o un detergente activo de superficie, tergitol, para la variante en frío de Kinyoun. Como decolorante se utiliza alcohol-clorhídrico al 3% y como colorante de contraste o contratinción el azul de metileno.

Es necesario pues, un tratamiento especial con el mordiente para que la tinción primaria, carbolfucsina, atraviese el material céreo de los bacilos acidorresistentes. En la técnica convencional de Ziehl-Neelsen, una vez que se ha cubierto la superficie del frotis con carbolfucsina, se pasa la llama de un mechero Bunsen o un algodón impregnado de alcohol, hacia adelante y hacia atrás por debajo del portaobjetos; el frotis se calienta hasta que se desprendan vapores, deteniéndose siempre antes de que hierva. La modificación de Kinyoun se denomina "método en frío", porque utiliza un detergente activo de superficie, en lugar de calor. Cualquiera de estos métodos es satisfactorio. Ambos mordientes, consiguen

que la carbofucsina penetre profundamente y pueda resistir tanto la acción decolorante del alcohol-ácido como la contratinción posterior con azul de metileno, apareciendo los bacilos acidorresistentes de color rojo sobre un fondo azul.

3.-TINCIÓN DE STAMP.

De especial importancia en el estudio microscópico de productos patológicos relacionados con síndromes de mortalidad perinatal en rumiantes. Se utiliza para poner en evidencia gérmenes frecuentemente difíciles de colorear con las técnicas habituales, estos es, especies de *Brucella* y *Chlamydia*.

Los frotis utilizados han de fijarse muy suavemente con calor, preferentemente con chorros de aire caliente-secador- en lugar de una llama, o incluso no fijarse. El colorante de base está compuesto por fucsina fenicada diluida extemporáneamente a 1/5 en agua destilada. Como decolorante se utiliza una solución de ácido acético al 0,3% durante 2 segundos, y como contratinción una solución acuosa de azul de metileno al 1%, durante el mismo tiempo.

Los gérmenes del género *Brucella* y los corpúsculos infectantes intracitoplasmáticos de *Chlamydia psittaci* aparecen rojos, y las células azules cuando se observan a inmersión.

CULTIVO DE BACTERIAS.

CONDICIONES DE CULTIVO

Para estudiar las reacciones metabólicas y fisiológicas de las bacterias, es necesario cultivarlas en medios artificiales, consistentes en mezclas de sustancias que proporcionan, en forma asimilable, todos los elementos necesarios para su óptimo crecimiento y multiplicación.

Composición del medio.

Los medios de cultivo deben incluir los elementos esenciales para la vida bacteriana:

- Fuentes de nitrógeno y carbono.
- Elementos minerales como fósforo, azufre, calcio, magnesio y hierro (nutrientes esenciales).
- Factores de crecimiento que por sí solas son incapaces de sintetizar, como aminoácidos, vitaminas, ácidos grasos, bases púricas y pirimidínicas (nutrientes preformados).
- Factores estimulantes, o de arranque, como los hidratos de carbono, o la sangre.

pH.

Cada microorganismo tiene un rango de pH dentro del cual es posible su crecimiento, y dentro de éste, un valor óptimo bien definido en el que la multiplicación celular alcanza la tasa máxima. La mayor parte de las bacterias de interés veterinario crecen mejor a un pH neutro o ligeramente alcalino (6,8 a 7,6), que es el pH de casi todos los humores orgánicos y tejidos de los mamíferos, aunque algunas exigen un pH específico distinto.

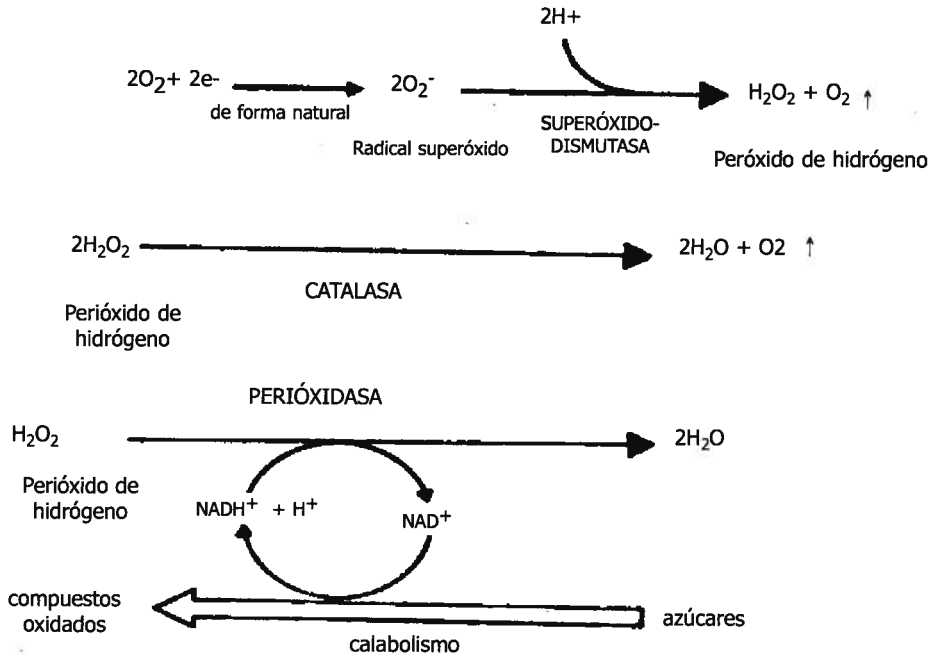
Durante el crecimiento bacteriano, se excretan sustancias orgánicas que alteran el pH del medio. Los aminoácidos se comportan como buenos tampones, y de hecho, se hallan presentes en multitud de medios complejos de laboratorio que contienen extractos de tejidos vivos o líquidos orgánicos (sangre, suero...), de ahí que en la mayoría de los medios artificiales de laboratorio, no sea necesario añadir tampones artificiales con el fin de mantener el pH adecuado.

Presión osmótica.

Debido a la composición de la pared celular bacteriana, los gérmenes se adaptan bien a las variaciones de la presión osmótica; sin embargo, in vitro, los medios de cultivo se preparan en condiciones de isotonía.

Potencial redox.

Está en relación con el tipo respiratorio de cada bacteria, así como con la capacidad para detoxificar los radicales tóxicos de oxígeno. Cuando el oxígeno se disuelve en un líquido, produce diversos iones, como el radical tóxico superóxido (O₂⁻). De igual manera, como consecuencia del metabolismo en presencia de oxígeno, también se forma peróxido de hidrógeno (H₂O₂). De aquí, que las células capaces de crecer en presencia de oxígeno, deben estar provistas de un sistema para convertir en atóxicas estas formas perjudiciales del oxígeno. Los microorganismos consiguen esto produciendo enzimas que escinden las moléculas tóxicas: superóxido-dismutasas, catalasas y peroxidasas.



■ **Aeróbios estrictos. (Obligados)**

Únicamente pueden crecer en presencia de oxígeno.

Dentro de esta categoría se encuentran todos los hongos filamentosos y sólo unas pocas bacterias.

Elaboran grandes cantidades de catalasas y superóxido-dismutasas sumamente activas.

Realizan un metabolismo de tipo respiratorio utilizando únicamente el oxígeno como aceptor final de electrones (o de H).

■ **Aeróbios / Anaerobios facultativos.**

Crecen lo mismo en presencia que en ausencia de aire (oxígeno). En el laboratorio, los anaerobios facultativos suelen cultivarse en condiciones aerobias, pero pueden crecer en ausencia completa de oxígeno y en todas las concentraciones intermedias de éste.

Todas las levaduras y gran número de bacterias se incluyen en esta categoría, siendo muy frecuentes los patógenos anaerobios facultativos.

Mantienen el crecimiento mediante la energía aportada, bien por fermentación (los electrones pasan finalmente a un aceptor orgánico; el oxígeno no interviene en los procesos fermentativos), bien por metabolismo de tipo respiratorio, utilizando el oxígeno (respiración aeróbica) o iones inorgánicos distintos (nitrato o sulfato), como aceptores terminales de electrones del proceso respiratorio (respiración anaeróbica).

■ Microaerófilos.

Son microorganismos aerobios estrictos, pero incapaces de crecer en una atmósfera que contenga el porcentaje de oxígeno existente en el aire (20%).

Solamente un corto número de bacterias son microaerófilas, pero algunas de ellas son patógenas de importancia para los animales, tales como las especies de *Actinomyces* y *Campylobacter*. Viven en cavidades del organismo y en tejidos que exhiben reducida concentración de O_2 . El cultivo en el laboratorio generalmente se lleva a cabo en medios líquidos o sólidos que contienen aproximadamente un 6% de oxígeno (sistemas de Gas-Pack) o bien utilizando medios semisólidos en tubo que contengan del 0,1 al 0,4 % de agar (el agente gelificante evita que el oxígeno se mezcle libremente por todo el tubo; el O_2 puede difundir únicamente a partir de la superficie y de este modo, el medio se estratifica en un gradiente de oxígeno cuya capa más rica en oxígeno es la superficie).

Los microaerófilos no toleran la concentración de oxígeno normal en la atmósfera por poseer una capacidad limitada para detoxificar las formas tóxicas de O_2 .

Poseen un metabolismo estrictamente respiratorio en el que el O_2 es el único aceptor de electrones (o H) utilizado.

■ Anaeróbios estrictos.

Incapaces de crecer en presencia de aire, al ser tóxicas para ellos las más ínfimas cantidades de oxígeno.

Solamente unos pocos tipos de microorganismos son anaerobios estrictos. Los tipos más conocidos de interés veterinario se hallan en tres géneros: *Bacteroides*, *Clostridium* y *Fusobacterium*. En los animales sanos, se encuentran ambientes anaerobios en la cavidad oral (entre dientes y encías) y en el intestino, donde los microorganismos anaerobios facultativos consumen la totalidad del oxígeno disponible.

Carecen de capacidad para eliminar las formas tóxicas del oxígeno (la mayoría carecen de superóxido-dismutasa). En el laboratorio han de cultivarse en medios reducidos de forma artificial y en atmósferas carentes de oxígeno. Para ello se añaden al medio agentes reductores como el tioglicolato o ditiotreitól (equilibran el potencial redox en un estado de reducción correcto) y se utilizan atmósferas anaerobia utilizando generadores de H_2 y de CO_2 (GasPack), en los que el H_2 reacciona con el O_2 , en el interior del recipiente cerrado herméticamente para formar H_2O (catalizador químico), reduciendo de esta forma el O_2 gaseoso.

Si bien algunos anaerobios estrictos son capaces de respirar en anaerobiosis, los de importancia veterinaria mantienen el crecimiento a partir de la energía procedente de los procesos fermentativos.

Hidratación:

La presencia de agua es indispensable para el crecimiento bacteriano, por lo que deberá estar presente en los medios de cultivo en cantidad suficiente.

Temperatura:

La mayoría de los microorganismos de interés veterinario poseen una temperatura óptima de crecimiento comprendida entre 35-37°C (TEMPERATURA CORPORAL DE LOS MAMÍFEROS). Los microbiólogos clasifican a estas bacterias como mesófilas (temperaturas óptimas desde 28-38°C), integrando esta categoría la mayoría de los microorganismos conocidos, si bien, algunas tales como especies de los géneros *Listeria*, *Yersinia*, etc., siguen creciendo bien a temperatura ambiente (25°C).

Atmósfera:

Algunas bacterias necesitan para su óptimo desarrollo la presencia de ciertos ambientes gaseosos, siendo el más utilizado el anhídrido carbónico en proporciones que varían del 3 al 10%.

En el laboratorio, dichos microorganismos inician su crecimiento y se reproducen más rápidamente cuando en la atmósfera en la que se halla el medio aumenta la concentración de CO₂ (la atmósfera terrestre contiene aproximadamente un 0,03%). Este fenómeno es típico de algunos patógenos de importancia veterinaria (*Brucella*, *Mycoplasma*...).

Para ello, se cultivan en una *estufa de anhídrido carbónico*, utilizando CO₂, comprimido para sustituir aproximadamente el 5%, 7% o 10% del aire interior. Clásicamente se introducían los medios inoculados en un recipiente que contenía una vela (*recipiente de vela*) y después de cerrar el recipiente, se dejaba que la vela ardiese hasta apagarse, este método hace disminuir el oxígeno disponible y eleva la concentración de CO₂, hasta un 3% aproximadamente.

PROCEDIMIENTO.

Después de haber recibido una muestra para cultivo en el laboratorio de microbiología y haber llevado a cabo los procedimientos descritos hasta ahora (registro de la información acompañante, visualización macroscópica y examen de las muestras remitidas, análisis microscópico de las mismas...) deben tomarse una serie de decisiones de cara a recuperar e identificar los microorganismos que pueden estar presentes. Para ello:

- Se eligen los medios de cultivo (primarios) apropiados para el tipo de muestra remitida, la petición del veterinario y/o las presunciones patológicas apuntadas más probables.
- Se determina la temperatura y atmósfera de incubación para recuperar todos los microorganismos de significado potencial patógeno.

Posteriormente, habrá de precisarse cuál o cuáles de los aislamientos recuperados en medios primarios requiere una mayor caracterización, y si son necesarias pruebas de susceptibilidad a antibióticos una vez que se conoce la identidad del microorganismo. Aunque para la toma de estas decisiones, a menudo complejas, existen una serie de pautas, no puede ni debe esperarse que un enfoque único sirva para cubrir las necesidades de todos los laboratorios y contextos de la práctica clínica veterinaria. Sin embargo, existen principios básicos que habrán de aplicarse como punto de partida.

Para ello, es totalmente necesario aliviar a los laboratorios de microbiología veterinaria del excesivo trabajo sin importancia clínica que a menudo se lleva a cabo. Los días del "pancultivo" han de terminar, o lo que es lo mismo, el pedido indiscriminado de cultivos de la totalidad de muestras remitidas al laboratorio. Igualmente, deberá prescindirse desde el primer momento de las muestras procedentes de animales poco representativos, sin descripción alguna, las más de las veces, de los cuadros clínicos supuestamente patológicos, o con descripción de síntomas vagos o mal definidos, tales como fiebre, tristeza, muerte súbita, etc., sin más información al respecto.

Con frecuencia, se solicita al laboratorio una evaluación microbiológica de un conjunto de microorganismos de carácter comensal o contaminante, a menudo con solicitud expresa para la realización de pruebas de susceptibilidad a la totalidad de microorganismos recuperados, sin existir justificación razonada por parte del peticionario. La decisión de hasta dónde procesar las muestras debe basarse en un cabal conocimiento de los dominantes patológicos concretos y de las relaciones huésped-parásito aplicables en cada caso. Se trata de poner en práctica aquello que Barlett denomina "CONTROL DE PROCESAMIENTO", es decir, "limitar el procesamiento e informe de muestras a la producción de información predeciblemente útil".

TRASPASO DE MUESTRAS CLÍNICAS. MEDIOS DE CULTIVO.

El traspaso de muestras a los medios de cultivo apropiados se efectúa en una parte separada del área de recepción y aceptación de muestras, normalmente bajo o dentro de cabinas con flujo de aire laminar. Si bien en la mayor parte de laboratorios todas las muestras potencialmente infecciosas (zoonóticas), se marcan con una etiqueta o señal especial de bioriesgo, la mejor política consiste en manipular todos los especímenes como si fueran altamente infecciosos, utilizándose de forma obligatoria guantes de goma en su manipulación.

Habrá de tenerse muy en cuenta, que los errores cometidos durante esta etapa del ciclo diagnóstico pueden invalidar toda la experiencia aplicable a la lectura e interpretación de los cultivos. A menudo microbiólogos y tecnólogos experimentados no llegan a establecer un diagnóstico definitivo, o se hace de forma incorrecta, debido a una deficiente manipulación o a una selección inadecuada de los medios y condiciones de cultivo para una muestra dada. Es por ello, que deberán hacerse todos los esfuerzos posibles, para destinar personal bien entrenado, y bajo supervisión estricta, al procesamiento primario de muestras, siendo aconsejable incluir cartillas e instrucciones apropiadas en manuales de trabajo para el uso del personal en cuestión.

Debido a que no existe un medio de cultivo universal que cubra las necesidades de todas las bacterias, la elección del medio de cultivo a utilizar se realiza a partir de las necesidades nutritivas y de las características de hábitat natural del que se recuperan los microorganismos.

Según el fin al que est n destinados, los medios de cultivo se clasifican en:

- Medios selectivos.
- Medios de enriquecimiento.
- Medios de diferenciación.
- Medios de identificación.
- Medios de multiplicación.
- Medios de conservación.

Medios selectivos.

Son aquellos que se utilizan para inhibir por completo el crecimiento de bacterias distintas de la que se quiere aislar y que est n presentes en la muestra. La selectividad del medio se consigue por la adición de sustancias como las sales biliares (inhiben a las formas cocáceas grampositivas), azida s dica(sólo permite el crecimiento de los cocos grampositivos, incluidos en el grupo enterococos) o distintos quimioterápicos (antibioticos, sulfamidas, nitrofuranos...), individualmente o en asociaciones.

Medios de enriquecimiento.

Favorecen el crecimiento de algún tipo de bacterias que se encuentra en forma minoritaria en una mezcla de varios grupos bacterianos. Un ejemplo son los caldos selenito y tetratiolato, que se utilizan para aumentar significativamente el número de Salmonella existente en una muestra, o los caldos de enriquecimiento para especies de Mycoplasma.

Medios diferenciadores.

Utilizados para favorecer el crecimiento de algún tipo de bacteria que da positiva alguna propiedad bioquímica cuando est  presente en una mezcla. El resultado de la acción bacteriana sobre el medio permite, como su nombre indica, diferenciar claramente aquellas colonias bacterianas que dan positiva la reacción bioquímica, de aquellas otras que se comportan de forma inerte.

Medios de identificación.

Son aquellos que se utilizan para estudiar la acción de un solo tipo de bacterias frente a un determinado sustrato. Se diferencian de los medios citados con anterioridad, en que se siembran con bacterias pertenecientes a un solo clon.

Medios de multiplicación.

Son aquellos que poseen una composición determinada y óptima para el grupo de bacterias a las que va destinado, y que permitirá un máximo de aumento celular bacteriano en un mínimo de tiempo. Son medios utilizados en la industria, en la preparación de vacunas, de antibióticos, etc.

Medios de conservación.

Son aquellos cuya composición favorece el mantenimiento de los microorganismos que en él se siembran y que posteriormente se conservan de +2 a +4 C. Algunos medios de conservación incluyen glicerol y se guardan en congelador a -20 C. Estos medios de conservación han sido prácticamente desplazados por la liofilización.

Existe una variación de los medios de conservación que son los **medios de transporte**, cuya finalidad es mantener en estado viable, aunque sin reproducción (o mínimamente), los microorganismos presentes en una muestra, permitiendo con posterioridad recuperar incluso a los que está minoritariamente presentes. Actualmente los medios de transporte más utilizados son: el medio Stuart, el medio de Amies y el medio de Cary-Blair.

Hay medios de cultivo que pueden agruparse en más de uno de los apartados expuestos (selectivos y diferenciadores, de enriquecimiento y selectivos, etc.). Según su consistencia se diferencian en **líquidos** (caldos) y **sólidos** (agares -2%). Existen también medios **semisólidos**, que son aquellos que incluyen poca cantidad de agar (0,35-0,5%) y que generalmente se utilizan en estudios de motilidad.

Actualmente, en el comercio existe un gran número de medios de cultivo deshidratados que facilitan en gran manera la labor de los laboratorios de microbiología, y que garantizan una buena calidad de funcionamiento. Ello no es óbice para establecer una serie de **controles** antes de considerarlos aptos para su uso. A saber:

- CONTROL DE ESTERILIDAD:

Se efectúa incubando algunas placas (5%), escogidas del lote al azar durante dos días a 35°C y cinco días a temperatura ambiente.

El resto de las placas se guarda en refrigerador a 4°C, y sólo se utiliza si el grupo control muestra ausencia de cualquier tipo de crecimiento después de los siete días.

- CONTROL DE CALIDAD:

Se realiza para comprobar que el medio contiene aquellos componentes que le caracterizan. Para las comprobaciones se utilizan por lo menos dos gérmenes distintos, uno que crece sobre el medio, o da positiva una determinada prueba, y otro que no crece, o la da negativa.

- CONTROL DE CADUCIDAD:

Para ponerlo en práctica es necesario que el momento de empaque se rotule en algún lugar visible de la placa, la fecha de preparación, además del nombre del medio. De esta manera se podrá saber en todo momento el tiempo que falta para llegar al límite de su utilización. Este tiempo oscila de forma general, entre 2-3 semanas cuando se conserva en nevera a 4°C sin bolsa de plástico, y 2 meses cuando se introducen además en bolsas de plástico cerradas.

Entre los varios cientos de medios de cultivo comercialmente disponibles, además de numerosas fórmulas "personales" informados en la literatura. Sólo es necesario un pequeño número para su uso diario. Por lo general se utilizan placas de agar. La inoculación de caldos para recuperación primaria de microorganismos debe limitarse a aquellas muestras en las que la recuperación de sólo unos pocos microorganismos con una baja concentración puede ser significativa, o cuando estos constituyen el único objeto de estudio.

Dentro de los **medios no selectivos** (medios sin inhibidores que avalan el crecimiento de muchos microorganismos encontrados en laboratorios clínicos) el agar con 5% de sangre de carnero, es el utilizado con más frecuencia, estando incluido en la batería de medios de aislamiento primarios virtualmente para todas las muestras clínicas. El agar sangre puede a su vez hacerse selectivo mediante el agregado de uno o más antibióticos o ciertas sustancias químicas (Kanamicina-vancomicina, colistina-ácido nalidixico, alcohol feniletílico...).

TÉCNICAS DE INOCULACIÓN.

El equipo necesario para la inoculación primaria de muestras es relativamente simple. Se aconseja un alambre de Nichrome o platino, con una punta en asa o recta, y el otro extremo insertado en un mango cilíndrico para su uso sencillo o asas desechables estériles.

La suerprfivie de **medios de agar en placas de Petri** puede inocularse con la muestra por medio de varios métodos. La inoculación primaria puede hacerse con un asa, hisopo y otro dispositivo adecua-

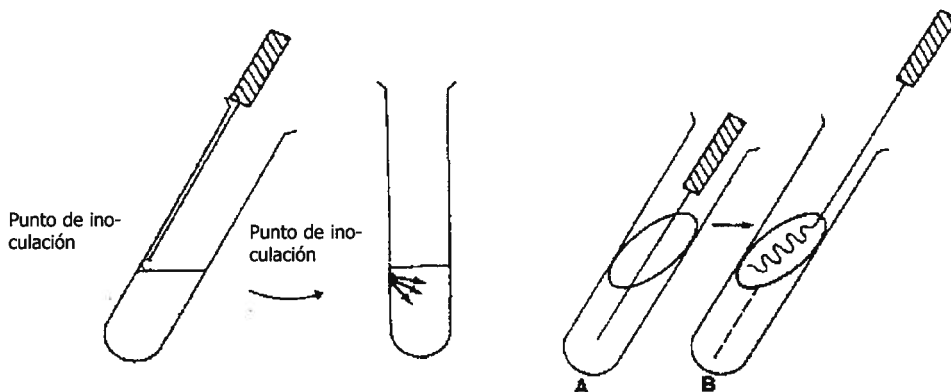
do. Una vez hecho el inóculo primario, puede usarse un alambre en asa o recto para diseminar el material en los cuatro cuadrantes de la placa. El inóculo se disemina con un movimiento hacia atrás y hacia delante en cada cuadrante girando 90°. El asa o alambre debe esterilizarse y enfriarse entre cada diseminación hacia un cuadrante. El propósito de esta técnica consiste en diluir el inóculo en forma suficiente en la superficie del agar, como para que sea posible obtener colonias aisladas. Posteriormente las colonias aisladas pueden subcultivarse de forma individual en otros medios, con el objeto de obtener aislamientos puros que pueden estudiarse en medios diferenciales.

Los medios **líquidos en tubo** se inoculan inclinando éste un ángulo de aproximadamente 30°, tocando con un asa de inoculación la superficie interna del vidrio, exactamente por encima del punto donde la superficie del medio forma un ángulo agudo. Cuando el tubo se vuelve a colocar en posición vertical, el área de inoculación queda sumergida en el medio.

Los **agares en pico de flauta** (planos inclinados) se inoculan de la siguiente forma:

- Primero se atraviesa el fondo del agar con el alambre recto de inoculación.
- Luego se retira con un movimiento en S sobre la superficie del plano inclinado, diseminando el inóculo.

Cuando se inocula **agar semisólido** en tubo para pruebas de motilidad, es importante que el alambre de punta recta con el que se inocula sea retirado a lo largo del mismo camino que se usó para atravesar inicialmente el medio. Un movimiento en abanico puede dar como resultado un patrón de crecimiento a lo largo de la línea de entrada, que puede interpretarse erróneamente como motilidad bacteriana.



De forma general, los medios de rutina que se utilizan en un laboratorio de microbiología veterinaria y la lista de microorganismos que no se recuperan, a menos que se pidan específicamente, deben publicarse en un manual. De este modo, los veterinarios pueden saber cuando es necesario informar al laboratorio que el probable microorganismo causal, no está cubierto por los medios de cultivo usados de rutina. A su vez, el laboratorio debe ampliar el número de medios para muestras en las que puedan aparecer microorganismos nutricionalmente dependientes o exigentes. Dado que cada tipo de muestra hasta cierto punto es único, la selección posterior de medios dependerá en todo momento del espectro de microorganismos patógenos que puedan hallarse en la misma, de acuerdo con los procesos patológicos presumibles apuntados y la experiencia del propio microbiólogo.

INCUBACIÓN.

Independientemente de que la mayoría de microorganismos se integren en la categoría de mesófilos (28-38°C), el laboratorio deberá proporcionar las distintas temperaturas óptimas necesarias para el crecimiento de la totalidad de aislamientos clínicos previstos, siempre dentro de los recursos disponibles.

Muchos de estos microorganismos crecen a 35°C; por ende, si se dispone de una sola incubadora, deberá mantenerse a 35°C. Hemos visto igualmente que el crecimiento de muchos microorganismos se

incrementa en una atmósfera enriquecida con CO₂. Si sólo se dispone de una incubadora con aire ambiente sin anhídrido carbónico, los tubos y placas para cultivos pueden colocarse en una jarra con una vela consumiéndose, llevando a continuación a la incubadora. A la inversa, puede mantenerse un medio con aire ambiente en una incubadora con CO₂, colocando los cultivos en una jarra de transporte con una tapa bien ajustada (una jarra o cámara anaeróbica resulta adecuada).

Pensamos, de acuerdo con la experiencia adquirida, que sólo en muy contadas ocasiones, la disponibilidad de una sola incubadora, puede comprometer la capacidad de un laboratorio para recuperar la mayor parte de las bacterias clínicamente significativas. En grandes laboratorios en los que es posible disponer de diversas temperaturas de incubación, la recuperación de microorganismos puede ser más rápida y el aspecto de las colonias más real, pero sin otras ventajas. Es probable que la prevención de una amplia fluctuación de la temperatura sea el factor más importante de cara a lograr una incubación satisfactoria. Incluso si los cultivos se incuban a temperatura ambiente, debe tenerse la precaución de que los tubos y placas estén protegidos de corriente de aire frío, o caliente, que puedan producir considerables variaciones de la temperatura. Por el mismo motivo, la temperatura de las incubadoras debe controlarse con sumo cuidado, con no más de $\pm 0,5-1^{\circ}\text{C}$ de fluctuación de un día para otro. Las incubadoras deben protegerse o ubicarse de forma tal que los interruptores de control no puedan ser movidos con facilidad accidentalmente.

El control de la humedad dentro de la incubadora también es importante. Muchos microorganismos crecen al máximo cuando la humedad es de un 70% o superior, y los medios de cultivo tienden a deteriorarse con mayor rapidez cuando se permite una desecación indebida. La mayor parte de las incubadoras fabricadas tienen reservorios de agua incorporados, por medio de los cuales es posible regular la humedad en la cámara; si no se cuenta con una incubadora de este tipo, pueden colocarse recipientes abiertos con agua destilada en los estantes para que proporcionen humedad a través de la evaporación. También deben revisarse las incubadoras de forma periódica por la posibilidad de derrames inadvertidos, que puedan causar contaminaciones, o la acumulación de sustancias químicas procedentes de reactivos que puedan inhibir el crecimiento bacteriano.

SEPARACION. AISLAMIENTO BACTERIANO.

La obtención y mantenimiento de cultivos puros son exigencias imprescindibles para cualquier microbiólogo que quiera estudiar las propiedades o los efectos sobre el medio de un tipo concreto de microorganismo. Los postulados de Koch, tal y como se ha visto con anterioridad, exigen la utilización de cultivos puros para establecer la relación causa-efecto entre un determinado microorganismo y una infección. Sin embargo, la obtención en la práctica de cultivos puros no es frecuente. Por ello, los microbiólogos han de emplear bastante tiempo y esfuerzo purificando determinados tipos de microorganismos, siendo este el propósito de ciertas técnicas de inoculación en placa y del empleo de medios selectivos y de enriquecimiento fundamentalmente.

A partir de las observaciones iniciales, el microbiólogo debe evaluar el crecimiento de las colonias y decidir qué procedimientos adicionales son necesarios. Esta evaluación se realiza:

- Observando las características y el número relativo de cada tipo de colonia recuperado en medios de agar.
- Determinando la pureza, coloración de Gram y morfología de las bacterias de cada tipo de colonia.
- Observando los cambios existentes en el medio que rodea las colonias, y que reflejan actividades metabólicas específicas de las bacterias recuperada

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LAS COLONIAS.

La evaluación de las características macroscópicas de las colonias habitualmente se lleva a cabo por medio de la inspección visual del crecimiento bacteriano en la superficie de las placas de agar.

La valoración de los cultivos primarios después de 24 a 48 horas de incubación, requiere una considerable habilidad. La interpretación de cultivos primarios es una práctica especializada que debe adquirirse trabajando con un microbiólogo bien entrenado y que por lo general, sólo se domina tras muchos meses o años de experiencia. La inspección de cultivos se lleva a cabo sosteniendo la placa en una mano y observando la superficie del agar en busca de crecimiento bacteriano. Cada placa debe estudiarse con cuidado ya que las bacterias inicialmente recuperadas de muestras a menudo están en cultivos mixtos y pueden presentarse varios tipos de colonias. Colonias puntiformes de bacterias que crecen lentamente pueden pasarse por alto entre colonias más grandes, en particular, si el crecimiento tiene tendencia a diseminarse sobre la superficie de la placa.

Durante el examen, las placas deben inclinarse en diversas direcciones, con una iluminación directa brillante, de modo que la luz se refleje desde varios ángulos. Se recomienda el uso de una lupa o microscopio para disección como ayuda para detectar colonias diminutas o inmaduras y observar mejor sus características (imprescindible para colonias de *Mycoplasma*). Las placas de agar-sangre también deben examinarse desde detrás de la placa para detectar reacciones hemolíticas en el agar.

Como particularidades de las colonias bacterianas, útiles para su caracterización y posterior identificación, se encuentran las que se exponen a continuación:

■ Características morfológicas.

Las siguientes son algunos de los términos usados para describir la morfología de las distintas colonias.

- Tamaño: diámetro en mm.
- Forma: puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide, como huso...
- Elevación: plana, sobreelevada, convexa, pulvinada (en forma de cojín), umbonada, umbilicada....
- Margen (borde de la colonia): entero, ondulante (cabeza de medusa; *B. Anthracis*), lobulado, lacerado, filamentoso, rizado...
- Color: blanco, amarillo, negro, marrón, anaranjado...
- Densidad: opaca, translúcida, transparente...
- Consistencia: mantecosa, viscosa, membranosa, quebradiza...

■ Reacciones en medios de agar:

Hemólisis en agar-sangre:

- Alfa (α): aclaramiento parcial de sangre alrededor de las colonias con coloración verde del medio; contorno de los eritrocitos intacto.
- Beta (β): zona de aclaramiento total de sangre alrededor de las colonias; lisis completa de eritrocitos.
- Gamma (γ): ningún cambio del medio alrededor de la colonia; no hay lisis de los eritrocitos ni coloración verdosa del medio (*Bacillus Anthracis*).

Producción de pigmentos:

- Pigmentos hidrosolubles que colorean (difunden) el medio.
- Piocianina (azulado-verdoso, soluble en agua y cloroformo; (*Pseudomonas aeruginosa*)).
- Pigmentos fluorescentes: (fluorescina hidrosoluble; *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens*).
- Pigmentos no difusibles limitados a las colonias (*Staphylococcus*).

Reacciones en agar-yema de huevo:

- Lecitinasas: zona de precipitado en el medio que rodea a las colonias.
- Lipasa: "capa perlada", película iridiscente en las colonias o inmediatamente alrededor de ellas, visible con luz reflejada.
- Proteolisis: zona clara rodeando las colonias.

Cambios en medios diferenciales:

Se incluyen diversos colorantes, indicadores de pH y otros muchos ingredientes en los medios de cultivo diferenciales, que sirven como indicadores de actividades enzimáticas y ayudan a interpretar aislamientos bacterianos.

Si bien son difíciles de describir objetivamente, los olores producidos por la acción de ciertas bacterias pueden resultar útiles para una orientación de los microorganismos involucrados. Ejemplo de microorganismos que poseen olores distintivos incluyen especies de *Pseudomonas* (jugo de uva, olor afrutado), especies de *Proteus* (chocolate quemado), especies de *Clostridium* (olor fecal o pútrido)...

La inspección inicial de colonias de cara a su posterior identificación es una de las bases del diagnóstico microbiológico. La evaluación de estas características sirve para seleccionar otros medios y pruebas diferenciales apropiadas para completar la identificación de las diferentes bacterias aisladas en cultivos primarios.

EXAMEN CON TINCIÓN DE GRAM.

Las impresiones preliminares, basadas en la observación de las características de las colonias, pueden confirmarse estudiando frotis con tinción de Gram. El frotis teñido debe examinarse microscópicamente usando un objetivo de inmersión en aceite. Además de la reacción a la tinción de Gram de las células bacterianas, otras tres características habrán de ser tenidas en cuenta: Tamaño y forma de las células bacterianas, disposición espacial de éstas (formación de racimos y cadenas de cocos grampositivos, disposición de bacilos grampositivos en caña de bambú...) y presencia o ausencia de estructuras u organelas específicas (esporas, gránulos metacromáticos...).

Con la información obtenida a partir de las colonias bacterianas y los frotis con tinción de Gram de las células, el microbiólogo puede avanzar en la identificación de los aislamientos primarios, sin perder nunca de vista que la información recabada hasta este momento tiene el carácter de "sugerencia", de "presunción". El microbiólogo debe aprender rápidamente a no confiar sólo en el examen de Gram, ya que las reacciones a la tinción, tal y como se comentó anteriormente, pueden ser variables, sobre todo en cultivos muy jóvenes, viejos, degenerados o muertos. Además, la disposición espacial de las células bacterianas puede ser menos pronunciada en colonias tomadas de una superficie de agar, que en frotis hechos a partir de cultivos en caldo. Deben tenerse muy en cuenta estas variabilidades cuando se evalúan preparados con tinción de Gram.

PRUEBAS RÁPIDAS DIRECTAS SOBRE COLONIAS SELECCIONADAS.

Estas observaciones e interpretaciones iniciales de placas de cultivos deben utilizarse para determinar si el microorganismo recuperado debe ser identificado aún más y si es necesario efectuar pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos. Si bien hasta cierto punto estas determinaciones deben basarse en observaciones de cultivos individuales, pueden utilizarse ciertas pautas para reducir la cantidad de trabajo innecesario y costoso.

Así, pueden realizarse una serie de pruebas rápidas directas sobre colonias seleccionadas. En muchos casos, un aislamiento puede identificarse hasta un nivel clínicamente útil sobre la base de estas evaluaciones solamente. En una era de estricta moderación de costos, es imperativo que los microbiólogos apliquen su capacidad de observación y usen unas pocas características selectivas para identificar de manera presuntiva especies bacterianas, toda vez que sea posible. Si se hacen cuidadosas correlaciones clínicas (¡Historia clínica fundamental!), en muchos casos esta información puede resultar suficiente.

Entre las pruebas directas que pueden realizarse se encuentra la prueba de la catalasa, de la coagulasa en portaobjeto, prueba de indol directa, prueba de citocromooxidasa, prueba MUG...

En definitiva, determinar cuando identificar por completo y cuando efectuar pruebas de susceptibilidad antibiótica a los aislamientos bacterianos procedentes de muestras clínicas, es un arte que se aprende con la experiencia, y que se pone en práctica por medio de una cuidadosa correlación con los síndromes clínicos correspondientes.

DIFERENCIACION. IDENTIFICACION.

De forma general se siguen una serie de criterios clásicos en la identificación bacteriana: morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, patogénicos e inmunológicos. Complementan estos criterios y ayudan en la obtención de claves diferenciales los estudios sobre el serotipo, fagotipo y antibiograma, y las aportaciones de la genética molecular, cociente guanina-citosina en la composición de bases del ADN y las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos. Estas líneas filogenéticas han proporcionado un gran avance en taxonomía bacteriana, aunque su utilización práctica en el laboratorio carece de interés.

El desarrollo práctico en el laboratorio se realiza mediante la utilización de esquemas y tablas de identificación bacteriana, en los que se describen la mayoría de especies, agrupadas por características taxonómicas. De forma habitual, la caracterización final de un aislamiento bacteriano desconocido a nivel de género y especie, se lleva a cabo estudiando ciertos sistemas enzimáticos que son únicos para cada especie y que sirven como marcadores de identidad. En el laboratorio, estos sistemas enzimáticos se investigan inoculando una pequeña porción de una colonia bacteriana bien aislada, en una serie de medios de cultivo que contienen sustratos específicos e indicadores químicos para detectar, cambios de pH o la presencia de subproductos específicos. El microbiólogo clínico debe elegir conjuntos apropiados de características diferenciales, que permitan la identificación de cada grupo de bacterias. Para la identificación final en cualquier grupo dado, se dispone de varias docenas de características para elegir.

Los resultados de estas reacciones bioquímicas diferenciales se unirán al conjunto de datos obtenidos a partir de las técnicas previas realizadas y que, complementadas o no con pruebas serológicas específicas, conforman las bases sobre las que se asienta el proceso de identificación realizado en el laboratorio de microbiología clínica:

- 1). Características de crecimiento:
 - a). Rapidez.
 - b). Morfología en medios de cultivo sólidos y líquidos.
 - c). Condiciones atmosféricas y temperatura de incubación óptimas.
- 2). Características microscópicas de las colonias.
- 3). Reacción a la tinción de Gram.
- 4). Morfología celular.
- 5). Motilidad.
- 6). Presencia o ausencia de esporas.
- 7). Reacciones bioquímicas diferenciales.
- 8). Pruebas serológicas para la detección directa de antígenos de grupo, tipo, etc.

SISTEMAS DE IDENTIFICACIÓN MANUALES.

Los sistemas para identificación y asignación de nombres a microorganismos son computerizados o manuales. Antes de hablar de la derivación y aplicación de los sistemas de codificación numérica, vamos a ver dos esquemas manuales de identificación bacteriana que aún se usan: la matriz en tablero de ajedrez y los diagramas secuenciales ramificados o dicotómicos.

Matriz en tablero de ajedrez.

En estas matrices, los números de los cuadros que se intersectan representan el porcentaje de cepas de diversas especies bacterianas (columnas horizontales) que son positivas o reactivas para cada característica estudiada (columnas verticales). En general, una reacción se considera positiva si el 90% o más de las cepas es reactivo, negativa si el 10% o menos de las cepas no produce un resultado y variable (V) si un 11-89% de las reacciones es positivo.

La capacidad para determinar las reacciones positivas y negativas para las diversas características evaluadas en este tipo de sistema de identificación, da como resultado un alto grado de exactitud diagnóstica. La principal desventaja de la matriz en tablero de ajedrez, es lo tedioso que resulta comparar punto por punto las diversas reacciones con aquellas obtenidas en los medios de prueba, y elaborar los patrones que mejor encajan con un género, especie o biogrupo específico.

Diagramas secuenciales ramificados.

Durante la década de 1960, se idearon diagramas secuenciales para reducir el hastío de la lectura de matrices en tablero, y para facilitar la probable identificación bacteriana rastreando una serie de puntos de ramificación positivos y negativos, en un algoritmo dicotómico.

Con el advenimiento de instrumentos automatizados y sistemas de identificación basados en estudios informatizados de las diversas características a evaluar, hoy en día los diagramas secuenciales se usan con menor frecuencia en los laboratorios clínicos.

Un problema con los diagramas secuenciales ha sido el potencial de inexactitud si la reacción en un punto de ramificación dado es incorrecta, mal interpretada o resultado de las reacciones de un cultivo mixto. Muchos diagramas secuenciales están elaborados para repetir ciertas especies en determinadas uniones, con el objeto de dar cabida a reacciones que pueden ser de menos del 100% o variables. Sin embargo, esta protección incorporada no siempre es aplicable a reacciones que son mal interpretadas por el ojo humano o por un sistema de detección automatizado. Este potencial para errores se ha minimizado, hasta cierto punto, haciendo además que las diversas especies posibles dentro del grupo de bacterias definidas por las observaciones iniciales, estén listadas en los diferentes puntos de ramificación, hasta haber evaluado suficientes características como para llevar a cabo la identificación de una sola especie.

SISTEMAS DE IDENTIFICACIÓN AUTOMÁTICA.

Automatización en microbiología.

Se ha dicho que la Microbiología es una ciencia que se practica manualmente, y que difícilmente se cambiará el asa de siembra por el botón de arranque de un instrumento. A pesar de que hasta el momento resulta cierto, cada día van introduciéndose y perfeccionándose más los equipos especializados que permiten determinar la identificación del germen y su sensibilidad a los antibióticos y quimioterápicos.

Son varios los sistemas instrumentales, automáticos o semiautomáticos, basados en sistemas de codificación numérica que han ido apareciendo, fundamentados en los procedimientos físico-químicos más dispares. Así, lo que empezó con sencillas técnicas fotométricas de transmisión de luz, se ha ido complicando con la introducción de las técnicas de impedancia eléctrica, de microcalorimetría, de bioluminiscencia, o de radiometría.

El propósito de estos métodos, es disminuir el trabajo del personal y facilitar la lectura final. Algunos, además, rebajan considerablemente el tiempo de ejecución de la prueba (antibiogramas en tres-cinco horas) y/o permiten, gracias a un sistema computerizado, establecer estudios epidemiológicos con los datos introducidos.

Por el momento, estos sistemas quedan reservados para los laboratorios que procesan un número considerable de muestras. En los pequeños laboratorios se descarta de momento tal posibilidad, pues al elevado costo inicial del sistema hay que sumar el de cada prueba, que es todavía, superior al de los métodos ordinarios.

Sistemas de codificación numérica.

La identificación de numerosas familias y grupos de bacterias se ha visto facilitada por el uso de sistemas instrumentales automatizados basados en códigos numéricos.

Característica	Reacción	Conversión binaria
ONPG	+	1
Arginina	+	0
Lisina	+	1
Omitina	-	0
Citrato	+	1
Sulfuro de Hidrógeno	-	0
Ureasa	-	0
Triptófano deaminasa	-	0
Indol	-	0
Voges-Proskauer	+	1
Gelatina	+	1
Glucosa	+	1
Manitol	+	1
Inositol	-	0
Sorbitol	+	1
Ramnosa	-	0
Sacarosa	+	1
Melibiosa	-	0
Amigdalina	+	1
Arabinosa	-	0
Oxidasa	-	0

Un **código numérico** es un sistema mediante el que las diversas características identificadoras de las bacterias se traducen a una secuencia numérica representativa de una o más especies bacterianas. Los códigos numéricos están basados en un conjunto de **números binarios** que representan cada reacción: números binarios compuestos de dos valores, "1" para reacciones positivas y "0", para reacciones negativas. Este enfoque puede ilustrarse usando la secuencia de características de la tira API 20E, como punto de referencia a partir del cual las reacciones positivas/negativas se convierten en números binarios. Si los números binarios resultantes se leen de arriba hacia abajo y se disponen de forma horizontal, se obtiene un número binario de 21 dígitos (10101000011111010100).

Si bien los ordenadores están fabricados para recibir bits de datos a partir de los cuales calculan resultados significativos, la mente humana no puede manipular eficazmente la lógica binaria; por ello, para resultar útiles, los códigos binarios complejos (de múltiples dígitos), deben convertirse en sistemas matemáticos más simples y comprensibles. La conversión del sistema binario en un sistema numérico de ocho dígitos (**octal**) sirve para este propósito.

Binario	Fórmula de conversión	Octal
	$0 + 0 + 0 =$	0
+	$0 + 0 + 1 =$	1
- + -	$0 + 2 + 0 =$	2
+ + -	$0 + 2 + 1 =$	3
- - +	$4 + 0 + 0 =$	4
+ - +	$4 + 0 + 1 =$	5
- + +	$4 + 2 + 0 =$	6
+ + +	$4 + 2 + 1 =$	7

Para comprender la conversión del número binario en octal, imaginemos una serie de tres bombillas eléctricas. Mediante el encendido y apagado de diferentes luces, es posible un total de 8 combinaciones (2^3), cada una de las cuales puede representarse por uno de 8 números del 0 al 7. Si todas las luces están apagadas, (-), la combinación (- - -) es equivalente al octal 0. Si sólo la bombilla izquierda está encendida (+), la combinación (+ - -), es equivalente al octal 1. El octal 2 está representado por el patrón binario (- + -), y así sucesivamente hasta completar los equivalentes octales de las ocho combinaciones posibles.

Para convertir números binarios más complejos, como el obtenido de las reacciones con API 20E, de 21 dígitos, en sus equivalentes octales, se procede de la siguiente manera:

1.-Se divide el número binario en subgrupos de tres:

101010000111101010100 101 010 000 111 101 010 100

2.-Se convierte cada subgrupo de tres dígitos en su equivalente octal usando la fórmula ya indicada en el ejemplo de la serie de tres bombillas eléctricas.

101 (5) 010 (2) 000 (0) 111 (7) 101 5 010 2) 100 (1).

El número 5207521 es, para cualquier persona, mucho más fácil de recordar y de introducir en un ordenador. Sin embargo, debe recordarse que el número 5207521 representa una serie de 21 características de identificación usadas en el estudio de una especie bacteriana desconocida. Estos derivados octales se conocen **como números de biotipos** (perfiles), es decir, una representación numérica de una serie de características fenotípicas expresadas por y únicas para una especie bacteriana en particular.

Todos los fabricantes que actualmente tienen sistemas automáticos o semiautomáticos, de identificación en el mercado, así como los diseñadores de numerosos sistemas manuales, publican registros de códigos numéricos en los cuales cientos de números de biotipos corresponden a una o más especies bacterianas únicas para ese número. Por ejemplo, el mensaje para el número de biotipo 5207521, de "especies de Serratia:<<muy buena identificación>>", indica que pueden informarse especies de Serratia. Esta evaluación se basa en un cálculo informatizado de muchos datos de base, derivados de las reacciones de cientos de microorganismos de prueba, que toma en consideración los valores de probabilidad absolutos, valores relativos de probabilidad entre la primera y otras elecciones (otros géneros) y el número de pruebas efectuadas.

En esta lista queda implícito que no se informe ninguna de las especies para el biotipo 5207521, sin efectuar pruebas adicionales. Las cifras de frecuencia listadas con cada uno de los nombres de especies (en el ejemplo anterior, 171245 para S. Marcesens) indican el número de cepas elegidas al azar que deben examinarse para encajar con exactitud el número de biotipo correspondiente. Esta cifra no indica de manera directa el porcentaje relativo de probabilidad de que una de las especies listadas pueda ser la correcta, de modo que quien emplea el sistema no puede determinar cuán viable podría ser una de las elecciones.

En la actualidad los registros de códigos listan porcentajes de probabilidades de mucha mayor utilidad para las decisiones diarias en el laboratorio. Así, cualquier identificación con una probabilidad de 0,900 o más puede ser informada, las que están cerca de 0,900 pueden identificarse fácilmente con una o dos pruebas adicionales, y aquellas con una probabilidad muy baja, probablemente puedan descartarse.

Los sistemas actuales presentan las posibles identificaciones bacterianas junto con el porcentaje de frecuencia de cada biotipo o especie concreta, de forma explícita (con los porcentajes de probabilidad) o implícita en un sistema de mensajes ("identificación excelente", "identificación aceptable", etc.) y las pruebas adicionales específicas requeridas para la identificación completa de cada una de las especies listadas.

Sin embargo, es más útil si el microbiólogo experimentado conoce con exactitud la probabilidad de que un aislamiento desconocido represente cierta especie (historia clínica, información anexa a muestras...), luego de lo cual, es posible efectuar evaluaciones más precisas que las denominadas "excelentes" o "dudosas" por el sistema informático. De igual manera, debe señalarse que todas las respuestas obtenidas de identificaciones automatizadas, representen o no una confianza $\geq 90\%$, deben interpretarse junto con la información previamente obtenida referente a la morfología de las colonias, reacciones en diversos medios de aislamiento, morfología celular con tinción de Gram, reacciones bioquímicas, etc., y como se ha dicho anteriormente, con el contexto e historial clínico.

Cuando se producen resultados poco coherentes, puede ser necesaria la visualización de los tubos, cámaras o microcúpulas donde han tenido lugar las reacciones. En muchos casos, la interpretación visual de ciertas reacciones puede ser diferente de la detectada por los instrumentos, y en algunas ocasiones, el número de biotipo (perfil) recalculado puede indicar una identificación bacteriana alternativa que esté mucho más de acuerdo con observaciones preliminares y suplementarias.

Debe señalarse finalmente, la posibilidad de que un microorganismo posea varios números de biotipo, por la existencia de una o más reacciones variables. De esta manera, la designación de una especie bacteriana por medio de varios números de biotipo, puede tener valor epidemiológico en el reconocimiento de la aparición de grupos de aislamientos similares (igual número de biotipo) en un contexto práctico dado. De esta forma, sería posible rastrear los agentes que causan brotes en rebaños de una o varias explotaciones hasta un origen común.

SISTEMAS INSTRUMENTALES (AUTOMÁTICOS O SEMIAUTOMÁTICOS). REVISIÓN GENERAL.

En la actualidad, en muchos laboratorios clínicos es casi una práctica estándar usar uno o más sistemas instrumentales para la identificación de ciertos grupos de microorganismos. Muchos de los sistemas han estado en uso durante una década o más, tiempo suficiente como para que la mayoría de los microbiólogos superaran la renuencia inicial a abandonar los métodos acostumbrados tradicionales. Mejoras del diseño de los sistemas informáticos, del software desarrollado (Apple Iie, MS-DOS, Windows...), y de los dispositivos periféricos de lectura específicos, la inclusión de sustratos alternativos o adicionales y los cambios en los reactivos para mejorar la especificidad y sensibilidad de las reacciones bioquímicas, han servido para corregir las inexactitudes de los sistemas iniciales.

Amplias y numerosas pruebas realizadas en laboratorios diagnósticos y de investigación, han demostrado una correspondencia del 95% o superior entre muchos sistemas instrumentales de identificación y los métodos convencionales. Así, los sistemas instrumentales han hallado una amplia aceptación en los laboratorios de microbiología clínica por los siguientes motivos:

- 1. Su exactitud ha resultado comparable a la de los sistemas tradicionales de identificación.
- 2. La mayoría de los sistemas poseen una larga vida útil (de 6 a 12 meses) en su apartado fungible, con lo que se minimiza el problema del vencimiento de los medios.
- 3. Los sistemas requieren sólo un mínimo de espacio para almacenamiento e incubación.

- 4. Alguno de los sistema son tanto o más fáciles de usar que los métodos convencionales. La inoculación es simple, las reacciones en general son claras y la disponibilidad de archivos informatizados y hace que la identificación final resulte sencilla y exacta.

De igual manera, deben señalarse ciertas desventajas potenciales:

- 1. Costo relativamente alto: los sistemas instrumentales pueden ser más costosos, según el volumen y la selectividad de uso. Resultan efectivos para el costo sólo si son necesario aproximadamente 10 medios diferenciales o más para la identificación de un aislamiento bacteriano. En algunos laboratorio el uso de estos sistemas puede ser menos costoso que los medios convencionales, si se considera costo adicional del control de calidad, el envejecimiento de los medios de cultivo y el potencial siempre presente de contaminación ambiental con el uso de medios convencionales.
- 2. Reentrenamiento del personal: La necesidad de entrenar al personal en el uso de estos sistemas, es cada vez menos problemática a medida que aumenta su empleo en los laboratorios clínicos. Sin embargo, alguna de las pruebas diferenciales en un sistema dado pueden no ser familiares para los técnicos que hayan sido entrenados para el uso de sistemas convencionales. Además, puede requerirse tiempo adicional para lograr la experiencia necesaria en la interpretación de reacciones que no son claramente positivas o negativas.
- 3. Flexibilidad de uso: Muchos de los sistemas comercializados requieren el empleo de un grupo específico de pruebas diferenciales para identificar un grupo dado de bacterias. Algunos están diseñados de modo tal que deben llevarse a cabo todas las pruebas. Muchos microbiólogos prefieren usar sólo un numero mínimo de pruebas diferenciales para identificar microorganismos que muestran aspectos de colonias y microscópicos altamente característicos en los medios de aislamiento primario.

La decisión de utilizar uno de los sistemas y cual a elegir, son cuestiones de preferencia personal. Antes de seleccionar un sistema, debe considerarse la facilidad de inoculación, la capacidad para seleccionar sólo las características a evaluar, la manipulación requerida para agregar reactivos después de la incubación y la disponibilidad de dispositivos informatizados de codificación numérica.

TECNICAS PARTICULARES-ESPECIALES.

SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA.

El papel fundamental del laboratorio de microbiología clínica consiste en brindar información con la cual los veterinarios puedan diagnosticar y tratar enfermedades infecciosas. Las piezas de información más importantes son:

- 1. Determinar si hay un agente etiológico de naturaleza infecciosa presente.
- 2. Identificar el patógeno específico.
- 3. Precisar que antimicrobiano brindará tratamiento adecuado.

Esta última prioridad surgió de uno de los avances médicos más grandes de este siglo: el descubrimiento del primer antibiótico en 1929 por el médico escocés Alejandro Fleming (*Staphylococcus*, *Penicillium rubrum...notatum*). El antibiótico desconocido de Fleming, que luego se denominó penicilina, anunció el advenimiento de la era antibiótica moderna.

Aunque estos nuevos antibióticos eran verdaderamente "drogas maravillosas" en el momento de su introducción, pronto aparecieron cepas bacterianas resistentes. El optimismo inicial, que hizo pensar que los antibióticos pondrían fin a la infección bacteriana, dio paso a la comprobación notoria de que la susceptibilidad persistente de un microorganismo es, desafortunadamente, la excepción más que la regla. Las pruebas de susceptibilidad llegaron a ser una necesidad práctica.

EL ANTIBIOGRAMA.

Los primeros estudios in vitro sobre la sensibilidad bacteriana a los antibióticos, sólo ofrecían apreciaciones cualitativas, sin ningún rigor científico, declarando al microscopio como sensible o resistente, según que su crecimiento fuera inhibido o no por unas arbitrarias concentraciones del fármaco.

En la actualidad, el antibiograma es una técnica perfectamente estandarizada que permite, in vitro, definir claramente los conceptos de sensibilidad y resistencia, relacionándolos con lo que ocurre in vivo. La discusión actual creemos que debe plantearse, no en cuánto a la fiabilidad general de la técnica, sino en cuanto a su aplicación. En otras palabras, en determinar cuando deberán realizarse pruebas de susceptibilidad a los microorganismos recuperados de muestras clínicas. Evidentemente no todos los aislamientos deberán estudiarse, aún cuando el veterinario haya efectuado la solicitud usual de "cultivo y antibiograma". No deberían estudiarse aquellos microorganismos cuya susceptibilidad sea conocida y comprobada, ni los considerados contaminantes, ni cuando se recuperan más de tres especies. De igual manera, es norma básica y estricta en microbiología el no efectuar un antibiograma con mezclas de gérmenes, ni directamente del producto patológico.

Destacar por último, que las pruebas de susceptibilidad antibiótica pretenden ser una guía para el veterinario que las solicita, no una garantía de la eficacia del agente antimicrobiano. Los factores que determinan el resultado de un proceso infeccioso son complejos, y en la mayoría de los casos, no pueden ser enfocados en las pruebas realizadas in vitro. Un veterinario que recibe los resultados de una prueba de susceptibilidad conoce un grupo de drogas que inhibieron el crecimiento del agente patógeno bajo condiciones cuidadosamente definidas en el laboratorio. Para efectuar una selección racional del antibiótico más apropiado necesita, por lo menos, otras dos piezas de información:

1. La farmacocinética del agente antimicrobiano, incluyendo el nivel máximo que puede esperarse en el sitio de infección y la rapidez con la cual disminuirá, es decir, su vida media.
2. Cualquier dato clínico de respuesta in vivo de aislamientos semejantes en situaciones similares.

TIPOS DE ANTIBIOGRAMAS.

Según las **necesidades respiratorias** de los microorganismos, se pueden diferenciar los estudios de sensibilidad a los antibióticos y quimioterápicos en dos grupos, que utilizan distinta metodología para su realización:

- a. Antibiogramas para gérmenes aerobios.
- b. Antibiogramas para gérmenes anaerobios.

En ambos grupos, el estudio de sensibilidad se realiza incorporando el antimicrobiano al medio de cultivo. Atendiendo a la forma en que se efectúa dicha incorporación y la fase del medio, se clasifican en:

a.-Antibiograma por dilución:

- En medio líquido. Permite investigar la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB).
- En medio sólido: Permite investigar la CMI que en este caso coincide con la CMB.

b.-Antibiograma por difusión:

- En medio sólido: Relaciona el resultado con la CMI.

■ **Antibiograma aerobio:**

Los estudios de sensibilidad en ambiente aerobio (gérmenes aerobios estrictos, microaerófilos y anaerobios facultativos) son los únicos que se efectúan sistemáticamente en la mayoría de laboratorios clínicos de microbiología veterinaria, y a ellos dedicaremos nuestra atención.

Hemos de tener muy en cuenta que a partir de la mayoría de muestras de campo recibidas en el laboratorio, se aislarán frecuentemente varios microorganismos distintos, siendo difícil a veces interpretar cual es el agente etiológico, o a cual hay que dar valor patológico. Se deduce por lo tanto, que el microbiólogo deberá ser un perfecto conocedor de la flora normal existente en las distintas localizaciones orgánicas de las distintas especies y de la que posee carácter contaminante, con el fin de diferenciarla del verdadero patógeno, que no siempre será el microorganismo predominante.

■ Metodología general:

En las últimas décadas, el mayor progreso en las pautas de laboratorio para las pruebas de susceptibilidad, provino del desarrollo de procedimientos normalizados que han sido adoptados ampliamente. Es en extremo importante ajustarse a estos protocolos recomendados si se desea obtener resultados reproducibles. El Comité Nacional para la Normalización de los Laboratorios Clínicos (NCCLS-National Comité for Clinical Laboratory Standards.) publica normas para estas y otras pruebas. Las siguientes son algunas de las facetas más importantes de las pruebas de susceptibilidad que han sido estandarizadas:

■ Medio de cultivo:

Debe cumplir una serie de condiciones:

- a). Ser de amplio espectro nutritivo, para que permita el crecimiento de la mayoría de microorganismos.
- b). Ser de pH estable (7,2-7,4) y no sufrir oscilaciones por acción de los microorganismos sobre los componentes del medio; la acidez favorece la actividad de beta-lactámicos y tetraciclinas, y la alcalinidad la de amiglicósidos y macrófilos.
- c). No debe contener inhibidores de antimicrobianos: peptonas, fosfatos, NaCl, sales de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺, P.A.B.A., suero sanguíneo o sangre, glúcidos.

El medio de cultivo que mejor cumple las anteriores condiciones y que es apto para cualquier tipo de antibiograma aerobio es el de MUELLER-HINTON, utilizado en forma de caldo o en forma sólida (agar).

Inóculo:

Se prepara sembrando cuatro o cinco colonias iguales procedentes de un cultivo joven, en 5 ml. De caldo Mueller-Hinton o Trypticase Soja, e incubando de dos a seis horas a 35°C hasta que el crecimiento produzca una ligera opacidad. Entonces, visualmente, se ajusta con solución salina o con el caldo utilizado, hasta una turbidez análoga al 0,5 de McFarland (densidad de la población bacteriana de aproximadamente 10⁸ unidades formadoras de colonias -UFC- por ml.).

Si las circunstancias lo precisan, también se puede obtener el inóculo deseado, suspendiendo directamente, en 5 ml. De solución salina estéril, algunas colonias iguales, homogeneizando (no incubación), y ajustando la turbidez finalmente hasta el 0,5 de McFarland. En cualquier caso, la suspensión bacteriana una vez preparada debe sembrarse antes de veinte minutos.

Incubación:

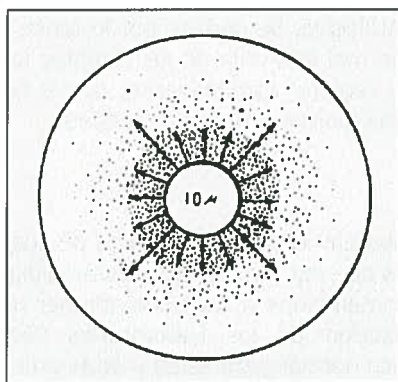
Atmósfera: El agar o caldo se incuba en una incubadora con aire ambiente. No debe utilizarse una incubadora con CO₂, para pruebas de rutina, puesto que el ácido carbónico formado en la superficie del agar o del caldo puede disminuir de pH.

Temperatura/Tiempo: De manera rutinaria, 35°C durante 16-20 horas.

Control de calidad:

Cada laboratorio debe tener seleccionadas algunas cepas propias o pertenecientes a colecciones internacionales, de sensibilidad conocida, para que le sirvan periódicamente de control interno de calidad introduciéndolas periódicamente en la rutina del laboratorio.

■ Antibiograma por difusión en medio sólido.



Es el de más fácil ejecución y prácticamente el que se realiza rutinariamente en la mayoría de los laboratorios. El método no determina la CMI directamente, sino que la relacionan mediante curvas de concordancia (regresión), con el diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano.

Principio básico del método:

Tan pronto como el disco impregnado con una concentración determinada de antibiótico, se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el agua es absorbida por el papel de filtro y el antibiótico difunde al medio que lo rodea de forma que a medida que aumenta la distancia del disco, se produce una reducción logarítmica de la concentración del antibiótico. Si la placa ha sido previamente inoculada con una suspensión bacte-

riana, se producirá un crecimiento simultáneo de bacterias en la superficie del agar, en aquellas localizaciones donde la concentración del antibiótico difundido es insuficiente para inhibir dicho crecimiento. Por el contrario, el área en la que se alcanza una concentración de antibiótico suficiente para inhibir el crecimiento, aparece como un círculo marginado bien definido de ausencia de crecimiento, con el disco formando el centro del círculo, si la prueba ha sido realizada correctamente. La concentración de antibiótico difundido en la interfase de crecimiento e inhibición se conoce como **concentración crítica**. Esta concentración se aproxima a la CMI y se relaciona con la medida (diámetro en mm.) de la zona de inhibición mediante curvas de regresión.

La técnica se basa en el **método de Bauer-Kirby**, modificado por el NCCLS, siendo aceptada como el método estándar para la realización de las pruebas de susceptibilidad por difusión en discos.

Particularidades:

Medio de cultivo.

En la técnica de disco-placa es especialmente importante la utilización de agar Mueller-Hilton, ya que el diámetro del halo de inhibición está íntimamente relacionado con la velocidad de difusión del antimicrobiano y la rapidez de crecimiento superficial del germen.

Cualquiera que sea la dimensión de la placa utilizada, ha de quedar el medio con un espesor de 4mm. De profundidad. Las placas, una vez preparadas, pueden guardarse por espacio de una semana en nevera (+4°C), pero si este tiempo ha de prolongarse, es necesario incluirlas en envolturas de plástico para disminuir la desecación. Antes de utilizarlas es necesario incubarlas en posición invertida, en estufa a 35-37°C, o dejarlas a temperatura ambiente hasta que alcancen la del laboratorio.

Preparación del inóculo. Inoculación:

El diámetro del halo de inhibición guarda proporción inversa con la concentración del inóculo bacteriano; es por esto que se debe estandarizar su preparación, para que produzca después de una incubación a 35°C durante 16-20 horas un crecimiento casi confluyente. Dicha estandarización se consigue por comparación con el patrón 0,5 de McFarland ya descrito.

Para la inoculación se sumerge un hisopo de algodón estéril en la suspensión microbiana, eliminándose el exceso haciéndolo rotar sobre la pared del tubo. El escobillón así preparado se pasa por la superficie del agar en múltiples direcciones, con el fin de sembrar uniformemente el medio de cultivo, dejándolo secar por espacio de diez minutos. Otra forma de realizar el inóculo consiste en inundar superficialmente el medio con 2 ml. Del inóculo, retirando el exceso con una pipeta de Pasteur y dejando que se absorba el líquido superficial a temperatura ambiente durante veinte minutos.

La RED DE VIGILANCIA DE RESISTENCIAS ANTIBIÓTICAS EN BACTERIAS DE ORIGEN VETERINARIO (VAV), recomienda en sus informes realizar, de la suspensión en solución salina 0,5 de

McFarland (10^8 UFC/ml) una dilución entre 1/100 (10^6 UFC/ml) y 1/200 (5×10^5 UFC/ml), inundar la placa de Mueller-Hinton durante 2-3 minutos con 2 ml. De la dilución de uso, dejándola secar tras vaciarla durante 5-10 minutos y colocar posteriormente sólo 5 discos de antibióticos por placa.

Colocacion de discos:

El microbiólogo debe escoger los discos que contengan aquellos antimicrobianos que sean útiles frente al microorganismo aislado, y que penetren, difundan y se distribuyan de forma óptima en los tejidos donde se localiza la infección.

Los discos utilizados, que son de papel estéril y contienen cantidades valoradas de antibióticos o quimioterápicos, se mantienen en refrigerador a $+4^{\circ}\text{C}$, excepto de derivados beta-lactámicos, que se almacenan a -20°C para evitar que pierdan potencia, guardándose sólo en nevera aquellos que se vayan a utilizar en un periodo breve de tiempo (aproximadamente una semana).

La colocación se efectúa individualmente mediante pinzas flameadas o con la ayuda de un dispensador múltiple, asegurándose posteriormente de que mantienen un perfecto contacto con la superficie del medio. Por placa de 9 cm. De diámetro pueden utilizarse de cinco a ocho discos.

Antes de incubar, dejaremos reposar las placas a temperatura ambiente durante unos siete minutos (no más de diez minutos) para que los discos hagan una predifusión.

Limitaciones del metodo:

La prueba de Bauer-Kirby, brinda información útil en la mayor parte de los casos. Existen, sin embargo, unas pocas limitaciones precisas. La prueba debe aplicarse sólo a especies bacterianas, que han sido totalmente evaluadas. Es sólo apta para gérmenes de crecimiento rápido. Los microorganismos de crecimiento lento dan, en el caso de ser susceptibles, unos halos mayores de lo normal y sin correlación con su CMI; en cualquier caso, un crecimiento alrededor del disco (resistencia) es siempre significativo. No deben testarse igualmente bacterias que necesiten nutrientes especiales o que requieran CO_2 .

Interpretación de los resultados:

El tamaño de la zona que se observa en una prueba de difusión en disco no tiene significado por sí mismo. Las normas interpretativas dadas por el NCCLS, derivan de una correlación entre las medidas de las zonas, y las CMI de aquellas especies aptas para ser estudiadas mediante el método de difusión en discos. Tal correlación la proporciona una curva de regresión.

Para ello, se prueban un gran número de cepas mediante las técnicas de dilución en caldo (determinación de la CMI) y de difusión en discos. Los resultados de ambas pruebas se representan mediante un punto en el gráfico, delimitando la totalidad de puntos una línea de regresión claramente definida. Una vez que esta línea está establecida, puede inferirse un resultado de CMI aproximada para cualquier diámetro de zona. En el ejemplo de la figura, un tamaño de zona de inhibición de 18 mm. Corresponde a una CMI de $6, \mu\text{m/ml}$.

Así, un agente antimicrobiano que produce un diámetro de zona mayor de 18 mm, tendría teóricamente una CMI menor de $6,25 \mu\text{m/ml}$, y el microorganismo será considerado susceptible; a la inversa, uno que produjera una zona menor de 18mm. Sería considerado resistente. En la práctica real, las curvas de regresión no están tan claramente definidas, y puede establecerse una zona de 2 a 4 mm, donde no es posible determinar si el microorganismo es susceptible o resistente. Los microorganismos que producen una zona de inhibición en este rango se consideran de susceptibilidad intermedia. En estudios realizados por Bauer, Perry y Kirby, demostraron por primera vez que las cepas bacterianas probadas frente a un antibiótico dado, tienden a caer en las categorías resistente o susceptible; sólo un pequeño porcentaje (5% o inferior) cae en el rango de intermedio. Así, si un laboratorio informa un alto porcentaje de intermedios, deberá reexaminar el procedimiento.

TECNOLOGÍAS NO <CONVENCIONALES> PARA EL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

Son notorias y evidentes las consecuencias e implicaciones que sobre el diagnóstico y la profilaxis de las enfermedades infecciosas en general, está teniendo el avance de la denominada biotecnología, o lo que es lo mismo, el avance integrado de la tecnología de bioquímica, microbiología, virología, inmunología e ingeniería genética. En lo referente al diagnóstico, los progresos de esta tecnología innovadora, plasmados principalmente en la aplicación de pruebas rápidas de identificación, de técnicas de anticuerpos monoclonales, P.C.R., y sondas moleculares, abre nuevas perspectivas de un diagnóstico, que, además de sensible y específico, habrá de caracterizarse por la rapidez y sencillez. Es indudable que esta tecnología aplicada al diagnóstico rutinario de enfermedades infecciosas animales, no se ha generalizado, pero en un futuro muy próximo será cuestión de considerar en cuanto se consiga su simplificación técnica, y sobre todo, un coste asequible.

En lo que respecta a las enfermedades de etiología bacteriana, se están desarrollando con rapidez una serie de tendencias diagnósticas sobre la base de procedimientos de identificación microbiológica no dependientes del crecimiento y de detección directa de productos enzimáticos o determinantes antigénicos directamente sobre muestras o sobre medios de cultivo mediante análisis cromatográfico.

IDENTIFICACION RÁPIDA DE AISLAMIENTOS PROCEDENTES DE CULTIVOS.

Los capítulos previos de esta presentación se han centrado en la práctica de la microbiología de laboratorio convencional, es decir, la detección de microorganismos en montajes directos o en preparados teñidos, su recuperación y crecimiento en medios de cultivo, la determinación de las características morfológicas y bioquímicas de aislamientos importantes, y la realización de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana sobre patógenos potenciales.

En la década pasada, se desarrollaron varios métodos para acortar el tiempo de evaluación de las características bioquímicas y de la identificación de especies bacterianas desconocidas recuperadas de cultivos. En contraposición con el uso de medios de cultivo diferenciales convencionales, que con frecuencia requieren muchos días para llegar a un resultado observable, hoy se dispone de varios sistemas mediante los cuales es posible efectuar la caracterización de bacterias en minutos, o en pocas horas.

PRUEBAS DE SUSTRATO ENZIMÁTICO CROMOGENICO.

Los sustratos enzimáticos químicos, en general desecados o deshidratados en cúpulas plásticas u otras cámaras, son utilizados para la identificación rápida de bacterias desconocidas. Cuando se agrega una suspensión de células bacterianas a la cámara de reacción, el sustrato es hidrolizado por enzimas preformadas de la bacteria desconocida y el resultado es un producto coloreado de forma directa, o un subproducto que puede ser detectado por el agregado de un reactivo que desarrolla color.

Durante años se utilizaron sustratos cromogénicos seleccionados, como la prueba de la tira de papel para detectar actividad citocromooxidasa, para suplementar sistemas de identificación bacteriana convencionales. Sin embargo, muchos fabricantes comercializan sistemas multitest, lo que permite la identificación de colonias bacterianas recuperadas en medio de agar en 2-4 horas. También, se ha venido utilizando combinaciones de pruebas convencionales y de sustratos cromogénicos individualizados en sistemas automatizados y semiautomatizados. Por ejemplo, el sistema Vitek NHI Card (Vitek Systems, Inc., Hazelwood; MO), actualmente está disponible para la identificación y diferenciación de especies de *Neisseria*, *Moraxella*, *Haemophilus*, etc. Vitek también dispone de una tarjeta ANI, que incluye sustratos cromogénicos enzimáticos agregados a reactivos bioquímicos convencionales para la identificación de varias especies de bacterias anaerobias.

La metodología es muy simple, basta preparar una suspensión bacteriana densa (estándar número 5-6 de McFarland) en solución salina que se inocula en el sistema preparado que contiene el sustrato, se incuba a 37°C durante 2-4 horas y se procede a su lectura visual o instrumental.

Algunos de los grupos de enzimas más investigados son las aminopeptidasas, esterasas-lipasas y glicosidasas.

- Aminopeptidasas:

La reacción se basa en la liberación enzimática de la β -naftilamina o para-nitroanilina fluorescentes. El resultado positivo se manifiesta por una fluorescencia azul bajo la luz de Wood (360nm), o adquiriendo una coloración salmón al añadirle unas gotas del reactivo Fast violet (es negativo si toma el color violeta).

Algunos ejemplos de aminopeptidasas son la leucil-aminopeptidasa, γ -glutamil-aminopeptidasa, pirrolidonil aminopeptidasa, propil-aminopeptidasa, metionil-aminopeptidasa, etc.

- Estearasas-Lipasas:

El procedimiento se basa en la liberación enzimática de β -naftol fluorescente a partir de un β -naftil ácido graso no fluorescente.

Dos ejemplos de enzimas incluidos en este grupo son el caprilato-estearasa y miristato-estearasa-lipasa.

- Glicosidasas:

Existen multitud de sustratos que son afectados por las glicosidasas bacterianas dando nitrofenol, lo que confiere a la suspensión de microorganismos una coloración amarilla.

Entre los ejemplos clásicos de glicosidasas está la β -galactosidasa, que posee como sustrato al ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido), y que viene utilizándose con carácter complementario de métodos convencionales desde hace años. Otros enzimas de este grupo son los siguientes: α -galactosidasa, α -fucosidasa, α -glucosidasa, β -glucuronidasa, etc.

VENTAJAS:

Los métodos basados en sustratos enzimáticos poseen las siguientes ventajas sobre los convencionales.

- 1.- Basados en reacciones de enzimas preformadas, no dependen del crecimiento; por lo tanto, los resultados se alcanzan con mayor rapidez (en 2-4 horas).
- 2.- Los hechos bioquímicos son bien definidos y los resultados son de fácil interpretación.
- 3.- Las reacciones son menos susceptibles a las influencias ambientales, y en general, están libres de errores de observación o experimentales.
- 4.- La producción enzimática está más estrechamente relacionada con el genotipo de los microorganismos y, por lo tanto, es estable y predecible.
- 5.- En general, las pruebas son sensibles, y con frecuencia, los hechos bioquímicos pueden ser cuantificados con exactitud.

LIMITACIONES:

Aunque la bioquímica de las reacciones colorimétricas derivadas de las reacciones de estos sustratos enzimáticos variados es simple, deben reconocerse ciertas restricciones a este tipo de pruebas.

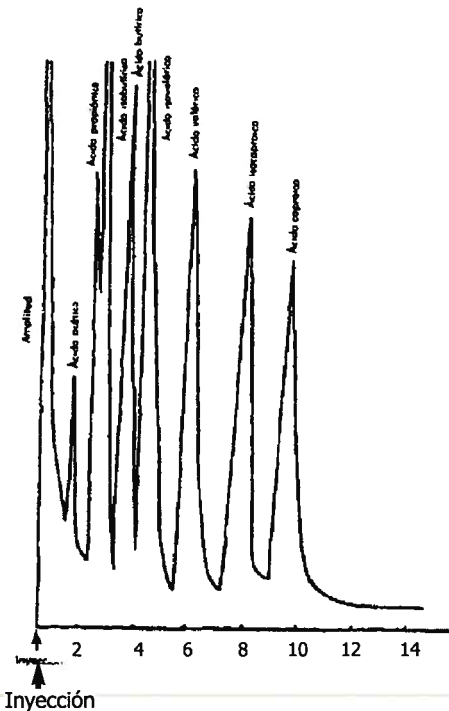
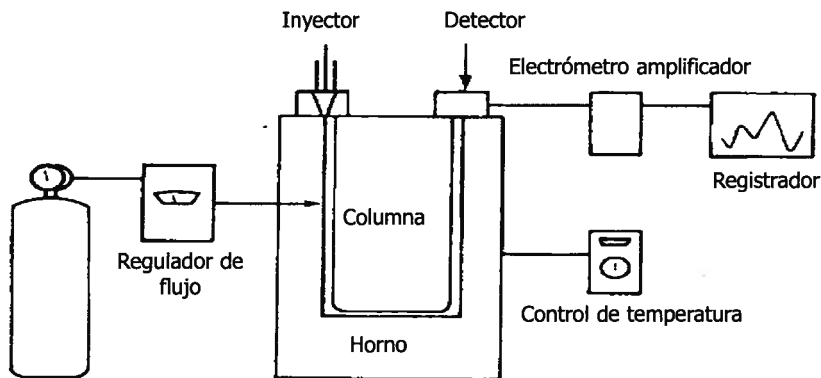
- 1.- La exactitud de las reacciones depende de la concentración inicial del sustrato y del sistema buffer utilizado.
- 2.- La cinética enzimática, los índices de reacción y la accesibilidad del sustrato a los sitios de actividad pueden variar.
- 3.- La sensibilidad de ciertas pruebas puede estar limitada a concentraciones enzimáticas intracelulares; así el índice de reacción puede variar con la densidad del inóculo.
- 4.- La actividad enzimática puede variar entre distintas cepas dentro de la misma especie.
- 5.- La inestabilidad de los reactivos durante el almacenamiento puede llevar a reacciones equívocas o falso-positivas.

6.- La edad del inóculo y el medio de cultivo utilizado pueden afectar la expresión de ciertas actividades enzimáticas.

Casi todos estos problemas pueden ser resueltos, en mayor o menor medida, mediante una cuidadosa atención a cada paso del procedimiento y un seguimiento estricto de las instrucciones del fabricante cuando se utilizan sistemas comerciales. Con la práctica suficiente, los sistemas de sustratos cromogénicos alcanzan una sensibilidad y especificidad superior al 95% y a menudo brindarán una identificación bacteriana positiva en menos de 4 horas. Los equipos de sistemas informatizados ofrecen ventajas adicionales al poder establecer bases de datos a partir de las cuales es posible efectuar las identificaciones con rapidez y eficacia considerables, así como la realización de estudios epidemiológicos.

ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO GASEOSO.

El análisis de los productos metabólicos mediante cromatografía en gas-líquido (CGL) es un método práctico y económico, que puede ser llevado a cabo con facilidad por el personal de los laboratorios clínicos. Los productos metabólicos, liberados en el medio durante el crecimiento, constituyen características clave para la identificación de las bacterias anaerobias y de muchas anaerobias facultativas.



Como ya se mencionó, los aerobios o anaerobios facultativos usan la respiración aerobia generalmente para obtener energía a partir de la glucosa, pero además, son capaces de obtener energía mediante reacciones fermentativas y procesos respiratorios anaerobios. Algunos anaerobios obligados, además de la fermentación, también usan la respiración anaerobia para obtener energía. Los productos procedentes del metabolismo fermentativo producidos por estas bacterias varían entre los diferentes géneros, utilizándose sus patrones de fermentación para su agrupamiento taxonómico. Estos metabolitos bacterianos, como ácidos grasos de cadena corta, aminas, alcoholes, etc., pueden extraerse con facilidad de los medios de cultivo con solventes acuosos y orgánicos. Posteriormente estos productos se separan mediante la utilización de varias sustancias extractoras de los productos metabólicos, que se analizan mediante CGL.

El principio subyacente de la CGL es lograr un equilibrio entre la absorción de los compuestos entre dos fases, una móvil y otra estacionaria. En la CGL, la fase móvil es un gas inerte (helio, nitrógeno o argón) que se agrega a la muestra volatilizada para ser analizada. A la temperatura operativa del cromatógrafo, la fase estacionaria es líquida. Se coloca una

columna de vidrio capilar en una sustancia inerte (sílice o celite) cubierta con un líquido volátil, inerte, como carbowax o metilsilicona.

Cuando la muestra volatilizada se inyecta en la corriente del transportador de gas, los diferentes compuestos se distribuyen entre las dos fases, según la afinidad de cada uno de ellos por la fase líquida. Los compuestos con baja afinidad pasan con rapidez a través de la columna y se detectan primero; aquellos con mayor afinidad emergen al final. El tiempo que emplea un compuesto en salir de la columna se conoce como **tiempo de retención**, una constante utilizada para identificar compuestos específicos cuando se comparan con los tiempos de retención estándares conocidos.

Aunque el enfoque CGL, ha sido utilizado generalmente para la identificación de gérmenes anaerobios obligados, también se utiliza para la identificación de otros microorganismos, sobre la base de la detección de los siguientes productos:

- Especies de *Pseudomona*: propiónico, isobutírico, isovalérico, glutárico.
- Especies de *Bacillus*: ácidos grasos iso y anteiso.
- Especies de *Brucella*: ciclopropanos.
- Especies de *Mycobacteriae*: productos de clivaje del ácido micólico

DETECCIÓN DIRECTA DE ANTÍGENOS.

Aunque el uso de sustratos cromogénicos y CGL ha disminuido el tiempo necesario para efectuar la identificación definitiva de los microorganismos recuperados en cultivo, han emergido con relativa rapidez una serie de técnicas que precinden de los cultivos y cuyo objetivo es la detección directa de los antígenos, enzimas, ácidos nucleicos y otros productos microbianos en los líquidos y muestras orgánicas. Los equipos y reactivos de que se dispone actualmente permiten evitar las 18 o más horas del ciclo de crecimiento microbiano, o bien, efectuar identificaciones en el mismo día cuando los microorganismos son recuperados de medios de cultivo convencionales, mediante ensayos inmunológicos directos de las bacterias y/o sus productos.

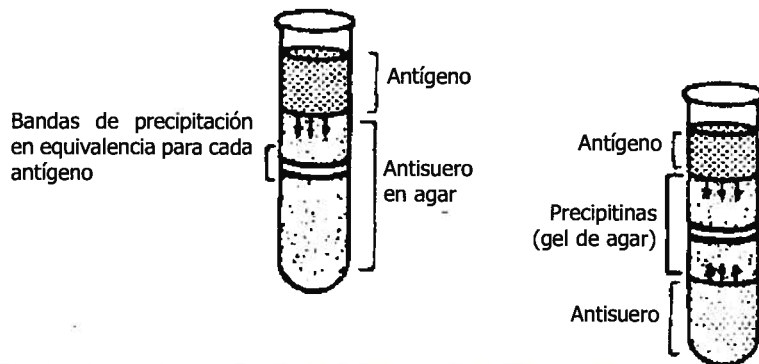
La siguiente es una muy breve revisión de algunas de las tecnologías básicas en inmunología, ya vistas con detalle a lo largo del presente curso, utilizadas en numerosos laboratorios de microbiología clínica en el diagnóstico de enfermedades de etiología bacteriana.

REACCIONES DE PRECIPITACIÓN:

Las reacciones de precipitación se realizan en sistemas de prueba que permiten la difusión libre de antígeno (soluble) y anticuerpo, uno frente a otro. En un punto crítico de la interfase, donde se alcanzan zonas de equivalencia, se produce la agregación visible de complejos antígeno-anticuerpo. Es clásica en microbiología veterinaria la reacción de termo precipitación descrita por Ascoli en 1911, para la detección de antígenos solubles de *Bacillus Anthracis*.

Inmunodifusión en tubos:

Simple: En el sistema de difusión único, el antisuero se incorpora en el agar en la porción inferior del tubo. Una muestra líquida, que contiene el antígeno o antígenos problema a detectar se coloca sobre la superficie del agar. A medida que los antígenos difunden en el agar, se forman líneas de precipitación en zonas donde las condiciones

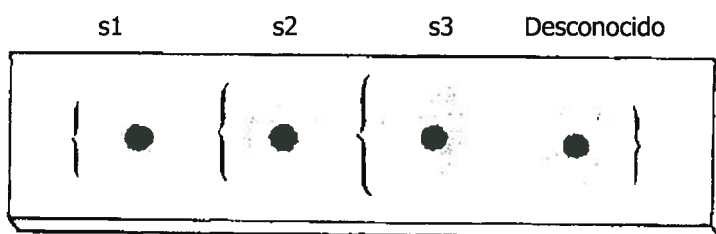


para las reacciones antígeno específico-anticuerpo son óptimas.

Doble: Similar al anterior, excepto que el antígeno y el anticuerpo, ambos en fase líquida, están separados por un tapón de agar neutro, en el que difunden ambos. Igualmente, se forman líneas de precipitación en los puntos donde las condiciones para la interacción específica antígeno-anticuerpo son óptimas. Una modificación simple de inmunodifusión doble es la realizada en placas o portaobjetos cubiertos con agar donde la muestra que contiene un antígeno desconocido puede ser probada mediante la colocación del anticuerpo complementario en el pocillo opuesto.

Inmunodifusión radial:

En los sistemas radiales, la muestra que contiene el antígeno complementario en estudio, se coloca en receptáculos (pocillos) excavados en placas de agar que contienen anticuerpos específicos, dejándosele difundir libremente. Se forma un anillo de precipitación alrededor del receptáculo de la muestra, cuyo diámetro es directamente proporcional a la concentración del antígeno que contiene. La cuantificación exacta del antígeno en la muestra puede calcularse mediante la comparación de su diámetro con los de una serie de antígenos estándares de concentraciones conocidas.



Una preocupación en la realización de los procedimientos de precipitación es reconocer la posibilidad de reacciones falso-negativas debido a fenómenos de zona (prozona o poszona). Si el anticuerpo está en exceso respecto del antígeno disponible (es decir, en concentraciones excesivas), se produce una reacción falso-negativa (prozona) porque, al estar ocupados todos los sitios de unión del antígeno (exceso de anticuerpos) no se forman los enrejados moleculares (complejos de precipitación) que tornan visible el precipitado. Por el contrario, las reacciones de poszona se producen cuando el antígeno está en exceso y sólo se forman pares individuales de antígenos y anticuerpo (dímeros solubles) al no formarse igualmente el enrejado que origina el precipitado, cuando de manera óptima el antígeno y anticuerpo específicos alcanzan una zona de equivalencia.

REACCIONES DE AGLUTINACIÓN:

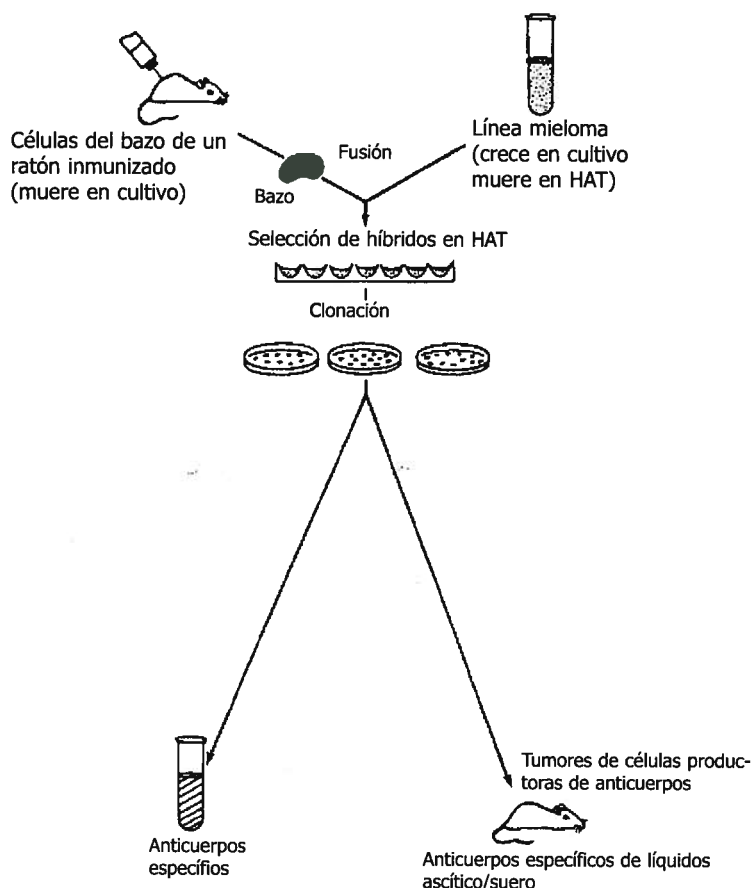
La aglutinación puede definirse como la agregación específica de partículas (bacterias, eritrocitos, coloides sintéticos) cubiertas con anticuerpos o antígenos. Estos últimos están unidos a la superficie de las partículas mediante fuerzas eléctricas intramoleculares o por uniones químicas covalentes. La aglutinación de las partículas transportadoras se produce como resultado de una reacción secundaria (indirecta), que representa la respuesta inmune, en contraposición con las técnicas de precipitación, donde los antígenos solubles y los anticuerpos interactúan directamente para producir líneas o bandas de precipitación visibles.

El anticuerpo reviste, física o químicamente, la superficie de las partículas. Si en la muestra problema se encuentra el antígeno tipo-específico, se forman enrejados interconectados. Las partículas de látex recubiertas de anticuerpo sirven como base de varios sistemas comerciales utilizados en medicina humana fundamentalmente, para la detección directa de bacterias y antígenos bacterianos en líquidos corporales. Así, para la detección de antígenos estreptocócicos en muestras de hisopado faríngeo en 10 a 60 minutos, según el sistema utilizado, para la detección directa de antígenos de los microorganismos causantes de meningitis (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Cryptococcus neoformans*) en 15 minutos.

ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Los intentos de purificar antígenos para reducir la heterogeneidad de los antisueros ha sido una consecuencia natural de los principios y técnicas serológicas descritas en su momento. Rara vez se encuentran moléculas de antígenos con un solo epítipo; más bien, pueden existir cientos, o aún miles, de determinantes antigénicos potenciales sobre una superficie celular.

Cuando estas moléculas antigénicas con múltiples determinantes (X) se inyectan en un animal, se estimula un número igual de clones linfocíticos (X). Aunque cada clon produce un anticuerpo específico, el resultado final es una mezcla de moléculas de anticuerpo altamente heterogénea, cuya especificidad y afinidad son, con frecuencia, desconocidas y difíciles de controlar de lote a lote. Cuando estos antisueros policlonales se utilizan en sistemas de pruebas bacterianas, a menudo se producen reacciones cruzadas porque los determinantes antigénicos son compartidos por diferentes especies o porque puede producirse mutaciones en la evolución de epítopes, lo suficientemente cercanos en especificidad, como para reaccionar positivamente.



Así, a medida que evolucionaba la ciencia de las pruebas serológicas, se esperaba que la disponibilidad de un anticuerpo que poseyera un alto grado de homogeneidad molecular con una estrecha especificidad para un único epítipo antigénico, sin reacciones cruzadas, resolvería muchos de los problemas encontrados con el uso de anticuerpos policlonales. De forma gradual, anticuerpos monoclonales altamente específicos, producto de un clon único de células linfoides, surgieron como un subproducto de las investigaciones en la tecnología del hibridoma, y la fusión celular, conducidas por Kohler y Milstein. Debido a este descubrimiento, actualmente es posible aislar líneas de linfocitos de un solo clon, que producen moléculas de anticuerpos únicas. La principal contribución no fue que pudiera aislarse una línea única productora de anticuerpos monoclonales, sino que estos linfocitos de ratón pudieran fusionarse con

las células del mieloma del ratón, para producir células híbridas con dos propiedades inherentes de suma importancia: la capacidad de producir anticuerpos monoespecíficos (adquiridos de los linfocitos de origen) y la facultad de crecer de forma permanente en cultivo, regalo de "inmortalidad", transmitido por las células del mieloma. De este modo, ahora es posible producir anticuerpos individuales monoclonales de forma continua y casi ilimitada.

Una vez afianzada la tecnología de producción masiva de anticuerpos monoclonales, han sido producidos frente a innumerables antígenos de relevancia clínica y/o epidemiológica. Sus aplicaciones se han tornado tan numerosas que es prácticamente imposible citarlas en detalle, y los microbiólogos se ven obligados a realizar consultas frecuentes para determinar cual de los nuevos desarrollos puede ser usado en su laboratorio clínico en una prueba diagnóstica concreta. Los anticuerpos monoclonales, producidos por epítomos específicos de una amplia variedad de virus, bacterias (incluyendo micobacterias), parásitos y hongos, son tratados ampliamente en la literatura médica y veterinaria reciente.

Muchos de los sistemas comerciales que usan fluorescencia directa y ensayos enzimáticos utilizan conjugados de anticuerpos monoclonales. Además de la detección directa de antígenos microbianos, los anticuerpos monoclonales se están usando con frecuencia creciente, para la identificación de toxinas fundamentalmente entéricas (por ejemplo las producidas por especies de *Shigella*, especies de *Campylobacter*, *Escherichia Coli* y especies de *Vibrio*). Este enfoque, apuntado anteriormente, introduce una forma nueva de ver la relación entre los microorganismos y las enfermedades infecciosas. En lugar de pensar en términos de un microorganismo-una enfermedad, el giro es ahora, hacia la comprensión de ciertos factores de virulencia en relación con la etiología de determinados complejos sintomáticos. A saber, puede ser más importante determinar si una toxina entérica es la causa de una diarrea hiperosmótica, que si la toxina es producida por especies de *Shigella*, *E. Coli*, especies de *Vibrio*, etc., pasando a tener este último aspecto una importancia secundaria.

INMUNOENSAYOS EN FASE SÓLIDA.

Los inmunoensayos en fase sólida, una extensión de los principios básicos ya comentados, se refieren a la unión de antígenos o anticuerpos a una serie de sustancias sólidas, tales como cúpulas de microtúbulos de poliestireno, cuentas plásticas y de metales ferrosos. En las técnicas de radioinmunoensayo, el marcador es un isótopo radiactivo; en los métodos de inmunoensayo enzimático (ELISA), es una enzima, peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina fundamentalmente. Los principios fundamentales han sido ampliamente comentados e ilustrados a lo largo del curso.

Los inmunoensayos enzimáticos nacieron de la necesidad de eliminar las desventajas y los riesgos que supone la utilización de radioisótopos en los laboratorios clínicos. Las técnicas ELISA se desarrollaron inicialmente en Europa, donde el uso de compuestos radiactivos está limitado y controlado de manera estricta. En este aspecto, no sólo superan las precauciones necesarias para el manejo de sustancias radiactivas, sino que también evitan ciertos problemas técnicos inherentes al rápido deterioro de los reactivos marcados o vencidos. Se han desarrollado equipos de pruebas comerciales para detección de antígenos, fundamentalmente de naturaleza viral, tanto en medicina humana como veterinaria. La detección de antígenos bacterianos se ha desarrollado fundamentalmente en medicina humana (*Neisseria gonorrhoeae* -Gonozyme-, *Chlamydia trachomatis* -Chlamydiazyme-, etc.).

Las técnicas inmunoenzimáticas, cuyas ventajas y aplicaciones han sido ampliamente expuestas en intervenciones precedentes, poseen una característica que las hace especialmente interesantes de cara al futuro, su versatilidad, demostrable por sus diversas aplicaciones adicionales. Este método puede utilizarse para detectar una serie de factores o determinantes de patogenicidad de innumerables organismos, responsables últimos de la virulencia de los mismos (factores enteroinvasivos, endotóxicos, adhesivos, exotoxinas...). Es probable que estas aplicaciones constituyan el preludeo a una era futura, cuando la microbiología diagnóstica pueda orientarse más a la determinación de ciertos factores de virulencia, individuales o comunes a un grupo de bacterias, que a la identificación exacta de la especie del microorganismo causal (*E. Coli*, *Cl. Perfringens*, *Cl. Botulinum*, etc.).

TECNOLOGÍA DE LA INMUNOFLUORESCENCIA.

La inmunofluorescencia brinda una alternativa a los demás ensayos de carácter inmunitario como un medio para establecer el diagnóstico de enfermedades bacterianas, micóticas, parasitarias y virales, al detectar y localizar antígenos microbianos. Con esta técnica, el anticuerpo específico se conjuga con compuestos fluorescentes, resultando en un rastreador sensible con reactividad inmunológica inalterada. El conjugado se agrega a las células o tejidos sobre un portaobjetos y se fija a los antígenos complementarios específicos, formando un complejo inmune estable. Los materiales no reactivos se retiran mediante el lavado, y después del secado, la preparación se observa con un microscopio de fluorescencia. Los antígenos unidos específicamente a los anticuerpos fluorescentes se detectan como objetos verdes o naranja-amarillo brillantes contra un fondo oscuro.

Algunas de las aplicaciones más comunes para la inmunofluorescencia es el diagnóstico de enfermedades infecciosas de etiología bacteriana son la detección directa de antígenos de *Chlamydia*, *Mycobacteria*, *Mycoplasma*, etc. El progreso continuo en el desarrollo de fluorocromos mejorados, de conjugados monoclonales y/o policlonales, de instrumental y de tecnologías microscópicas, ha aumentado considerablemente la sensibilidad y especificidad de las técnicas de inmunofluorescencia en general, lo que brinda a los laboratorios la posibilidad de detectar múltiples agentes causales de enfermedades infecciosas.

En la detección de antígenos bacterianos, pueden usarse técnicas de fluorescencia directa e indirecta. En el **procedimiento directo**, el conjugado se aplica sobre el material examinado, dejándolo reaccionar durante 30-45 minutos en un ambiente húmedo a 35°-37°C. Después de una serie de pasos para dejar el preparado libre de interferencias de fondo, se seca al aire y se monta para su observación en un microscopio de fluorescencia.

En el **procedimiento indirecto**, el material en examen se cubre con suero inmune en exceso dirigido contra el antígeno, dejándolo reaccionar durante 30 a 45 minutos a 35-37°C. El espécimen se lava posteriormente con solución salina con buffer fosfato y se le hace reaccionar con un antisuero marcado contra la especie de inmunoglobulina utilizada en la reacción inicial. Después de lavarlo para dejar el fondo libre, la observación de fluorescencia microscópica indica presencia del antígeno.

El método directo es simple y rápido de realizar, con pocas reacciones inespecíficas; sin embargo, es menos sensible. El método indirecto, es más sensible y da una fluorescencia más brillante; no obstante, es menos específico, sujeto a reactividad cruzada creciente.

OTROS: SONDAS DE ADN, P.C.R., R.E.A.

Hemos visto a lo largo de esta exposición, que uno de los avances más considerables experimentados en taxonomía bacteriana ha radicado en la incorporación de criterios genéticos a los esquemas de clasificación taxonómica. Así, los estudios de hibridación de ADN y ARN ribosómico, junto con los de composición de bases, han determinado cambios notables en la clasificación bacteriana en la década de los 80.

De igual manera que la renaturalización del ADN ha servido de base para demostrar a la relación genética de fragmentos de ADN obtenidos de diferentes microorganismos, se han desarrollado en un pasado reciente procedimientos y técnicas, que basadas en el mismo fundamento biológico, permiten localizar secuencias de bases específicas en un segundo fragmento de ADN. Esta aplicación es la base de la tecnología de las sondas de ADN utilizadas en diagnóstico mediante el proceso conocido como hibridación del ADN.

La generalización de las técnicas de amplificación de ADN (clonación mediante plásmidos "quiméricos", fabricación mediante sintetizadores de oligonucleótidos y fundamentalmente, las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa) y el gran avance de los sistemas de marcaje y revelado no radiactivos (biotina-avidina/peroxidasa y digoxinina-antidigoxenina/fosfatasa alcalina) han posibilitado la utilización de las técnicas de hibridación de ADN en general y de sondas de ADN en particular en el diagnóstico laboratorial de procesos de etiología vírica fundamentalmente, tanto de origen humano como animal.

Su aplicación, sin embargo, en el diagnóstico de enfermedades producidas por bacterias no ha sido exitosa. Plantean una serie de inconvenientes, de tipo técnico y económico fundamentalmente, que dificultan grandemente su utilización rutinaria en el laboratorio de microbiología clínica, sin que ello menoscabe su extraordinario potencia diagnóstico y sus inmejorables expectativas de futuro también es esta disciplina.

A lo largo del curso en general, y en el día de hoy en particular, se han expuesto de forma amplia y brillante los fundamentos biológicos y tecnológicos de este grupo de técnicas. Se ha descrito la preparación y marcaje de las sondas de ADN, las técnicas de hibridación empleadas ("Dot blot" o Spot dot, "Southern Blot", "Northern blot" y "Western Blot"), las etapas repetitivas básicas que conforman la reacción en cadena de la polimerasa ADN, etc. Nos han mostrado las herramientas utilizadas en su realización, describiéndonos endonucleasas de restricción, ligasas, transcriptasas inversas, polimerasas de origen bacteriano (fragmento "Klenow" de la ADN, Polimerasa I de E. Coli, "Taq Polimerasa" de la bacteria termófila **Thermus aquaticus**), etc....

Los buenos resultados obtenidos en el diagnóstico de enfermedades virales potencian la orientación y el desarrollo de este grupo de técnicas hacia las enfermedades bacterianas, tanto en medicina humana como en medicina veterinaria. Esto posibilita que innumerables fabricantes estén desarrollando, fabricando y comercializando métodos diagnósticos (sondas y P.C.R.;, fundamentalmente) a veces carentes de la calidad y fiabilidad necesarias. Todo esto junto con la rapidez con que se modifica este campo por nuevos adelantos tecnológicos plantea como imprescindible el que los microbiólogos deban buscar y consultar en la literatura médica reciente, además de mantener una conexión constante con las compañías fabricantes, solicitando información fiable de sus productos, a la vez que demostraciones prácticas en el contexto laboratorial y diagnóstico en que pretendan utilizarse antes de su adopción, normalmente como complemento de otras técnicas tradicionales, mas que como alternativa de sustitución.

De forma general habremos de prestar especial atención a los siguientes aspectos:

Las técnicas a adoptar deberán ser lo más rápidas y lo menos engorrosas posibles. La vida media de almacenamiento de los reactivos deberá ser lo suficientemente amplia para permitir su utilización en los laboratorios de diagnóstico. Los fabricantes deberán desarrollar productos que usen reactivos con una vida media de almacenamiento prolongada. Deberán igualmente disminuir el tiempo de detección (aceleración de los índices de reacción) y aumentar la sensibilidad de los procedimientos con el fin de evitar falsos positivos. De igual manera, deberán mantener la sensibilidad y especificidad cuando se aplican de forma directa a ciertos tipos de muestras (heces, orina, exudados, leche...). Las sondas muestran uniones inespecíficas inaceptables con materiales extraños en las muestras "sucias". La extracción del ADN bacteriano necesita de protocolos más eficaces que eliminen la posible presencia de sustancias inhibitoras de la polimerasa, tanto de procedencia exógena como endógena. En la actualidad, los protocolos de extracción son muy agresivos debido a la resistencia que ofrece la pared bacteriana, sobre todo en bacterias positivas a la tinción de Gram (micobacterias, estafilococos, clostridios, etc.).

Independientemente del elevado potencial diagnóstico que para Bacteriología presentan de cara a un futuro muy reciente, ya en la actualidad presentan una serie de ventajas sobre las técnicas convencionales dignas de tener en cuenta.

- Pueden detectar partículas microbianas o proteínas aún después de que el microorganismo no sea viable, lo que torna menos rigurosos el manejo y el transporte de la muestra.
- Estas tecnologías se adaptan en particular, para su utilización en estudios de campo que requieren investigaciones epidemiológicas y procedimientos de rastreo en gran escala, de suma importancia en los métodos de control y erradicación de enfermedades infecciosas.
- La detección de secuencias específicas de genes (genes de enterotoxinas en E. Coli) puede realizarse con un alto grado de sensibilidad en presencia de altas concentraciones de DNA heterólogo.

Las aplicaciones prácticas generales que podrían estar disponibles próximamente en los laboratorios de diagnóstico serían las siguientes:

- Procesamiento en lotes de un gran número de muestras en estudios epidemiológicos a gran escala para la investigación y detección de portadores crónicos, o en el estudio de especies bacterianas implicadas en brotes de enfermedades infecciosas.
- Detección directa de factores codificados genéticamente en aislamientos de cultivos o en muestras clínicas:
 - Enterotoxinas de *E. Coli*.
 - Toxinas estafilococias alimentarias.
 - Genes de resistencia antibiótica.
 - Propiedades invasoras y factores de virulencia de especies que normalmente no son patógenas (*S.epidermidis*).
- Detección de agentes patógenos que se encuentran en gran número en muestras clínicas, pero que son difíciles de cultivar en medios artificiales: micoplasmas, micobacterias (*M.ulcerans*), clamidias, leptospiras...
- Detección de gérmenes presentes en las muestras en cantidades muy reducidas (*Salmonella*).

CONCLUSIONES.

Los fabricantes de productos para laboratorios clínicos nunca han tenido mayor inventiva que ahora en el desarrollo de sistemas, instrumentos y reactivos para la detección más rápida y precisa de microorganismos en muestras clínicas, o para la identificación de gérmenes recuperados en cultivos, Nada indica que este ritmo vaya a disminuir en los años venideros. La disponibilidad de tiras de reactivos casi mágicas, instrumentos de autolectura y aplicaciones informáticas basadas en sistemas de codificación numérica, de procedimientos de hibridación cada vez más sencillos y fiables, la posibilidad de producir, gracias a las técnicas de P.C.R., y de hibridación de linfocitos, grandes cantidades de reactivos monoespecíficos idénticos y su continuo aprovisionamiento, anuncian una era en la que el conocimiento de los principios básicos de la microbiología no se consideraría importante. A menudo se oye en los laboratorios que el Vitek, el Auto-Bac, el sistema tal o el sistema cual, identificó el microorganismo como "X". No sólo se ha personalizado a estos instrumentos, sino que con frecuencia, se consideran infalibles.

Como ya se comentó, ninguno de estos sistemas se aproxima al 100% de sensibilidad y especificidad, y la microbiología clínica deberán seguir siendo practicada por microbiólogos con un profundo conocimiento de las enfermedades infecciosas y de los microorganismos productores, de su estructura, fisiología, capacidad patógena, actividad bioquímica, mecanismos de resistencia, etc.

Las experiencias recientes con la B.S.E., la existencia de enfermedades inmunosupresoras (S.R.R.P.), los cambios en la etiología y epizootiología de las enfermedades infecciosas, con la presencia cada vez más frecuente de procesos pluricausales, de infecciones mixtas y subclínicas, las modificaciones significativas que están experimentando, especialmente en la frecuencia de presentación y formas clínicas, las enfermedades clásicas producidas por una causa única (*fiebre aftosa, rabia, enfermedad de Newcastle, pestes porcinas...*) indican que el arte de la microbiología será aún más desafiante en los años por venir.

Cada microbiólogo debe ver los nuevos desarrollos en la detección, recuperación e identificación de los microorganismos con prudencia, y seleccionar sólo aquellos productos que se desempeñen con aceptable exactitud, debiendo prevalecer por encima de cualquier otro principio, la cuidadosa correlación clínica de los resultados con la patología investigada, si realmente se desea evitar el mal manejo y la aplicación de procedimientos incorrectos en el control de los procesos investigados. Esto requiere un conocimiento básico amplio de los principios de la microbiología y de las enfermedades infecciosas, un estado de alerta constante frente a los factores que comprometen los valores altamente predictivos de los resultados de laboratorio, y una comunicación abierta y permanente entre los microbiólogos y sus colegas veterinarios.

BIBLIOGRAFÍA.

Alton, G.G.; Carter, G.R.; Kibor, A.C.; Pesti, L.: "Veterinary diagnostic bacteriology. A manual of laboratory procedures for selected diseases of livestock" F.A.O. Roma, 1990.

Alvarez, M.V.; Boquet, E.; de Fez, M.I.: "Manual de Técnicas de Microbiología clínica". Editorial Garsi. Madrid 1988.

American Society for Microbiology: "Manual methods for general bacteriology". Ed. ASM. Washington, DC 20006, 1981.

Bourdon, J.L. et Marchal, N.: "Techniques Bactériologiques". DOIN Editeurs. París, 1973.

Burows, W.: "Textbook of Microbiology". W.B. Saunders. Co. Filadelfia, Londres y Toronto, 1973.

Buttiaux, R.; Beerens, H.; Tacquet, A.: "Manuel de Techniques Bactériologiques". Flammarion Médecine-Science. París, 1974.

Carpenter, P.L.: "Microbiology". W.B. Saunders. Co. Filadelfia, Londres y Toronto, 1977.

Carter, G.R.: "Fundamentos de Bacteriología y Micología Veterinaria". Editorial Acribioa S.A. Zaragoza, 1989.

Casal Román, M.: "Microbiología clínica de las enfermedades por micobacterias (Tuberculosis, Lepra y Micobacteriosis)* M. Casal Román – 1990.

Davis, B.D.; Dubelcco, R.; Eisen, H.N.; Ginsberg, H.S. y Wood, W.D.: "Tratado de Microbiología". Salvat Editores S.A. Barcelona, 1971.

Dujarric de la Riviere, R.: "Pasteur, extrait de ses oeuvres". Gouthier Vilars. París, 1967.

Gastón de Iriarte y Sánchiz, E.: "Microbiología: Técnicas, controles y análisis clínicos" Editorial Augusta S.A. Barcelona, 1975.

Jones, T.C.; Hunt, R.D.: "Veterinary Pathology". Lea & Febiger. Philadelphia, 1983.

Kauffmann, F.: "Classification of bacteria". Munks Gaard. Copenague, 1975.

Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Dowell, V.R.; Janda, W.M.; Sommers, H.M.; Winn, W.C.: "Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas Color". Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires (Argentina), Madrid (España), 1992.

Krieg, N.R. y Holt, J.G. (editor) "Bergey's manual of suystematic bacteriology". The Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1984.

Locquin, M.; Langeron, M.: "Manual de Microscopía". Editorial Labor. Barcelona, 1985.

Mac Faddin, J.F.: "Biochemical tests for identification of medical bacteria". Williams & Wilkins. Baltimore, 1976.

Pumarola, A.; Rodríguez-Torres, A.; García Rodríguez, J.A.; Piedrola-Angulo, G.: "Microbiología y Parasitología Médica". Editorial Salvat. Barcelona, 1988.

Rodríguez, G.; González, G.; Mariño, O.C.: "Manual de Técnicas en Microbiología". I.C.A. Subgerencia de Investigación. División de Ciencias Veterinarias. Bogotá, 1978.

Sebald, M.; Tacquet, A.; Bricout, F.: "Técnicas en Bacteriología I. Aerobios". Editorial JIMS. Barcelona, 1977.

Sebald, M.; Tacquet, A.; Bricout, F.: "Técnicas en Bacteriología II. Anaerobios. Micobacterias. Virología". Editorial JIMS, Barcelona, 1977.

Séculi Brillas, J y Perelló Olivella, B.: "Patología y Clínica del Ganado Porcino". Dpto. Creaciones de P. Neosán. Barcelona, 1980.

Woolcock, J.B.: "Infección bacteriana e inmunidad de los animales domésticos". Editorial Acribia. Zaragoza, 1984.

Juan Jorrín Novo

Investigador-Colaborador.
CIFA "Alameda del Obispo". Córdoba.

TECNOLOGÍA ANALÍTICA EN PARASITOLOGÍA.

Resumen:

El laboratorio de Parasitología cumple tareas de apoyo diagnóstico en el Sistema de Sanidad Animal. Su misión específica es el aislamiento de parásitos en sus diferentes localizaciones orgánicas y nichos ecológicos, su identificación y establecimiento de la relación causal con un brote de enfermedad transmisible determinada.

La identificación zoológica y taxonómica tradicional sigue siendo el instrumento fundamental del diagnóstico parasitológico. El conocimiento científico de los taxones parasitarios, de su biología, zoogeografía y modelos epidemiológicos de contagio son herramientas imprescindibles auxiliares para el conocimiento del espectro parasitario en nuestro entorno.

La toma de muestras es una de las principales fuentes de error diagnóstico. Una adecuada coordinación y asunción de funciones dentro de los diferentes operadores del sistema de Sanidad Animal, asegura una adecuada intervención sobre la aparición de un brote de enfermedad transmisible.

Una tabla sintética sobre las enfermedades parasitarias de declaración oficial según la diferente normativa nacional e internacional afectada, junto con las principales especies susceptibles, vectores y áreas de distribución es presentada. Asimismo se exponen diferentes técnicas de rutina parasitológica empleadas por el autor durante su etapa en el Laboratorio de Sanidad Animal de Córdoba (1989 a 1996) y completada por la enumeración de diferentes técnicas usadas en el diagnóstico de parasitosis de importancia veterinaria.

INTRODUCCION.

Dentro del sistema de Sanidad Animal (fig. 1), el Laboratorio y en este caso el área de Parasitología tiene asignada una única misión: el diagnóstico de enfermedades parasitarias transmisibles en nuestros animales domésticos.

Para ello el Laboratorio de Diagnóstico Parasitológico debe de aplicar conocimientos y metodología científica (Parasitología) encaminados hacia el **aislamiento, identificación y cuantificación** en sus diferentes habitats (microhabitats en casos) de los parásitos animales.

Un **parásito animal**, es todo organismo animal, que utiliza obligatoriamente la materia y/o energía de otro animal, para el necesario desarrollo de su ciclo vital y que es capaz de producir enfermedad detectable en este último.

Las principales características que definen a un parásito del resto de organismos son:

- Reino Animal (Eucariota) diferencia con microorganismos patógenos (virus, bacterias, hongos, etc.).
- Generalmente de menor biomasa que el organismo que lo alberga (hospedador). En caso contrario (mayor biomasa) la utilización de materia y energía por parte del organismo ajeno supondría la extinción de este, siendo el caso típico de la relación de predación.
- La relación biológica es antagónica, "robo" de materia y/o energía traducida por el parásito y reacción defensiva (inmune) por parte del hospedador, todo ello a diferencia de la relación de simbiosis.
- La interacción parásito-hospedador produce una reacción patológica (enfermedad) en este último. Esta característica nos ayuda a diferenciar los fenómenos relativos del Parasitismo y de la

Parasitosis, sobre la base de la demostración de la relación causal entre un parásito y la reacción (Enfermedad ó patología) producida en su hospedador.

El **Aislamiento** se define como toda tarea previa encaminada a la obtención de especímenes simples aptos para su identificación y cuantificación.

Son técnicas de aislamiento la necropsia parasitológica, la preparación de extensiones ó frotis de tejidos, las diferentes técnicas de concentración, etc.

El diagnóstico parasitológico propiamente dicho, se divide de forma general en dos tipos: directo e indirecto:

DIAGNOSTICO DIRECTO.

Observación del parásito o de sus estructuras características. Identificamos parásitos en virtud de cómo se muestran ante nuestros ojos y a diferencia de otros patógenos, los cuales son identificados a través de reacciones interpretadas de diferente forma (crecimiento en cultivo, bioquímica, reacciones de cultivo celular, etc.).

Según la metodología y resultados obtenidos la identificación puede ser:

- a) Zoológica y Taxonómica tradicional.
- b) Técnicas de detección de **ADN** (PCR).
- c) Técnicas de detección de Proteínas (Blotting).
- d) Serológicas. ELISA Directo, Inmunofluorescencia Directa.

La **identificación tradicional** es la asignación de un organismo desconocido dentro de una clasificación previamente establecida y siguiendo criterios zoológicos y taxonómicos.

A cada organismo vivo se le asigna un nombre único por el sistema de Nomenclatura Binomial [Nombre Científico, compuesto por la denominación de género (cursivas y 1ª letra en mayúsculas, y especie en cursivas)]. El nombre de la especie se halla seguido del nombre del zoólogo que describe en primer lugar las especies y le da el nombre científico, ejemplo: *Hippobosca equina Linnaeus, 1758*.

La taxonomía es el procedimiento reglado para clasificar organismos y compararlos (análisis discriminante del organismo problema frente a taxones descritos) y sobre la base del grado de semejanza fenotípica. Dicho trabajo requiere el uso de al menos un Microscopio y Lupa (Estereomicroscopio). El procedimiento de clasificación a partir de caracteres (variables morfológicas) se realiza normalmente a través de claves de identificación.

Un taxón parasitario es una agrupación de organismos afines sobre la base de unos caracteres (variables) que lo hacen diferente de otro grupo parasitario a un nivel dado. Por ejemplo al nivel de Clase el taxón INSECTA es diferenciable de ARACHNIDA, por la presencia a ausencia en sus fases adultas de antenas, número de patas, alas o sus rudimentos, etc.

De esta forma los parásitos animales pueden ordenarse de acuerdo a su forma en agrupamientos ("Clusters") de acuerdo con las descripciones y variaciones dadas para cada organismo y de acuerdo con un procedimiento reglado por la Comisión de Nomenclatura Zoológica.

En la mayoría de los casos es posible la identificación zoológico-taxonómica: el genotipo del parásito se traduce en fenotipo visible microscópicamente y diferenciable en el ámbito de especie y lo que es más importante ese fenotipo casi con toda seguridad se halla descrito por otro autor (Ver Cordero del Campillo et al. Índice- Catálogo de Zooparásitos Ibéricos, 2ª Ed., Universidad de León, 1984).

Un ordenamiento patrón de los parásitos de importancia veterinaria (Tabla 1), debe de ser tenido en cuenta a la hora del diagnóstico, debido a que la morfología determina su clasificación zoológica, las técnicas laboratoriales a aplicar en cada caso (tinción en los protozoos, aclaramiento en los metazoos, etc.) y en último los patrones generales de sus ciclos biológicos, hábitos e incluso modos de acción patógena.

DIAGNOSTICO INDIRECTO.

En este caso lo que se observa no es el parásito, sino la reacción producida en el hésped.

Bioquímico:

A través de las alteraciones de componentes orgánicos moleculares atribuibles directamente a la acción de un parásito, como por ejemplo el nivel de proteínas en sangre en las infestaciones por *Fasciola* (típico papo en la oveja), aumento del pepsinógeno plasmático en Ostertagiosis por aumento del pH del cuajar y fallo en la transformación del pepsinógeno plasmático en pepsina, Hemoglobinuria en Haemosporina, etc

Este tipo de diagnóstico debe de ser realizado con cuidado, porque en casos la reacción detectada no es típica de un agente dado y sí de un grupo amplio de organismos. Su utilidad debe de centrarse en seguimiento del curso de enfermedades parasitarias previamente identificadas y sobre rebaños controlados.

Inmunológico:

Detección de **respuesta inmune específica** frente a un organismo parásito. Su principal valor viene determinado por su aplicación en grandes colectivos y utilidad en campañas de diagnóstico sobre grandes poblaciones (PAVE p. ej.) y el de ser no destructivo (sobre el animal en vivo).

En la teoría el diagnóstico serológico de las parasitosis sigue los mismos principios y procedimientos que los aplicados para la detección de cualquier anticuerpo o reacción celular frente a proteína de organismo vivo.

En la práctica dichos principios poseen unas limitaciones principalmente técnicas, que condicionan la obtención de una prueba útil para su aplicación en estudios de campo aplicados a grandes poblaciones de animales domésticos:

Complejidad antigénica de los parásitos. Por definición un parásito pertenece al reino animal y en muchos casos Metazoos. Problemas en la detección de proteína inmunógena.

Que la respuesta inmune detectada y medida sea específica, esto es que se deba al parásito en cuestión y no a otro organismo en menor o mayor grado relacionado. En muchos casos la detección de proteína que induce inmunidad detectable, no es específica de un único taxón u organismo (comunidad antigénica).

En otros casos el parásito no induce una respuesta inmune homogénea o incluso dicha respuesta no es detectable (evasión del sistema inmune, tripanosomas, Esquistosomas).

Que dicha respuesta sea cualitativamente igual durante el tiempo de parasitación.

Que dicha respuesta sea valorable con un grado de enfermedad determinado.

Que dicha respuesta no sea la misma en individuos de las mismas características y sin desarrollo de la enfermedad, aspecto muy frecuente en parasitosis como es la toxoplasmosis donde la prevalencia de la enfermedad detectada serológicamente es muy amplia.

Una vez identificada la proteína adecuada específica para el diagnóstico, el principal problema al cual se enfrenta el laboratorio es la producción de dicha proteína. Para ello debe de tenerse en cuenta que dicho antígeno debe de obtenerse en cantidad suficiente como para abastecer una campaña de diagnóstico determinada. Los medios de obtención de proteína son:

- a) **Cultivo:** Desarrollado suficientemente en protozoos del tipo Sarcostigophora (*Trichomonas foetus*, *Trypanosoma*).
- b) **Animal de experimentación:** por ejemplo la rata para *Trypanosoma equiperdum* y *Toxoplasma gondii*.
- c) **Animal susceptible:** En este caso se mantiene la infección/infestación del parásito sobre una especie susceptible, normalmente la misma con el objeto de disponer de la fase evolutiva del parásito, por ejemplo producción de merozoitos de Piroplasmida.

En metazoos, la obtención de antígeno queda limitada por la posibilidad de cultivar tanto "in vitro" como "in vivo" el organismo en cuestión, o lo que es lo mismo la posibilidad de cerrar el ciclo evolutivo en condiciones experimentales y durante "n" generaciones, todo ello se halla limitado comprensiblemente por la complejidad del ciclo biológico del parásito y por los estrechos mecanismos de interdependencia de este con su organismo hospedador, difícilmente reproducibles en cultivo laboratorial, como por ejemplo de *Sarcoptes scabiei*.

De esta forma es posible el cultivo de fases evolutivas de parásitos temporales (Insecta) por cultivo de imagos en laboratorio o de larvas de miasis (*C. Hominivorax*) sobre medios proteicos (carne, suero, etc.). Igualmente es posible la obtención de antígeno secretor-excretor para ELISA a partir de la obtención de larvas *I de Hypoderma spp.* (Hipodermidas) a partir de exófagos (*H. lineatum*) y raquis (*H. bovis*), de bovinos parasitados durante el verano y otoño temprano.

DESARROLLO DE MODELO ZOOGEOGRAFICO Y EPIDEMIOLOGICO DE LAS PARASITOSIS.

De igual forma el conocimiento del modo de vida de los parásitos, de la interrelación de estos con sus hospedadores (Especificidad Parásito-Hospedador) y con el medio (Distribución en el espacio geográfico) son herramientas imprescindibles para la aplicación eficaz de la Parasitología en el Laboratorio y para el establecimiento de modelos epidemiológicos de la enfermedad

De esta forma es posible extraer información valiosa del entorno geográfico, climático y zoogeográfico en el cual nos desenvolvemos (Figura 2).

La comunidad Autónoma Andaluza se localiza en la zona 36° y 38° 45' latitud norte, con un clima de transición templado a subtropical y temperaturas medias entre 9°C en Invierno y 28.5 °C en verano y una pluviosidad de 500-700 mm anuales. Todo ello determina la presencia de una flora y fauna características. La delimitación de Faust de las diferentes zonas zoogeográficas de la tierra define a nuestro entorno como región Palearctica, subregión Mediterránea. La característica situación intermedia entre zonas zoogeográficas palearctica y Etiópica (limitada por una temperatura media de 20°C (35° latitud Norte) determina que se compartan fauna (Parásitos y Hospedadores) con zonas subtropicales (p. ej. *Culicoides spp.* transmisores de PEA, Argasidae afines a *Ornithodoros erraticus* vector de la PPA) y que determinados parásitos poco específicos puedan traspasar nichos ecológicos vehiculados por hospedadores que se adaptan fácilmente a nuestra zoogeografía. Igualmente en miasis traumáticas *C. Hominivorax* ha sido capaz de traspasar la región Neártica americana (Gusano Barrenador del Nuevo Mundo) y producir brote en Libia.

De esta forma, por ejemplo la distribución geográfica de la Hipodermosis Bovina queda limitada entre 25°-60° N y *Culicoides spp.* transmisores de la Peste Equina Africana (Diptera, Ceratopogonidae) no sobrepasan las latitudes correspondientes a la mitad sur de la Península Ibérica.

Por otro lado es posible la representación en un modelo espacial de los diferentes factores que intervienen en la epidemiología de las parasitosis: Medio ambiente (zona geográfica y climática), Hospedadores y ciclo evolutivo del parásito (fig. 3), de tal forma que cada una de las fases evolutivas de un parásito (P) ligado a un medio ambiente determinado, puede diseminarse a otro siempre que las condiciones del medio y hospedadores susceptibles sean afines a sus condiciones originales.

DIAGNOSTICO OFICIAL

El diagnóstico parasitológico en todo laboratorio oficial se halla encuadrado dentro de una disciplina diagnóstica determinada por la función asignada (apoyo dentro del sistema de sanidad animal), por la confidencialidad de sus resultados, por las técnicas a aplicar (estandarizadas en el caso de enfermedades de declaración obligatoria, ver Boletín de la OIE) y por la diferente normativa y ámbito de aplicación.

La Oficina Internacional de Epizootias (OIE), clasifica las enfermedades transmisibles por claves (Listas A, B, C) y Código Zoonosario Internacional (CZI). Dichas listas de la OIE establecen una grada-

ción en cuanto a importancia sanitaria, socioeconómica y para el comercio mundial de las enfermedades infectocontagiosas al igual que se da normativa para su notificación e informes periodicos (arts. 1.2.0.2 y 1.2.0.3 del CZI).

Es importante resaltar que las parasitosis directas (no vectoriales) se hallan dentro de los grupos B y C, lo que habla no del potencial patógeno de los parásitos sino de los especiales mecanismos adaptativos de este último y del principio de conservación de su nicho ecológico, en este caso hospedador, al cual se halla íntimamente ligado. Por otro lado en zonas tropicales y subtropicales las parasitosis son obstáculos insalvables para el establecimiento de una ganadería rentable (Tripanosomiasis ligadas a *Glossina* spp. en África; Gusano Barrenador en Centroamérica.). Por otro lado brotes epizooticos de importancia en la última década, como es la Peste Equina se hallan irremediablemente ligados a la presencia de su vector *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae). La Peste Porcina Africana en régimen de cría extensiva se halla íntimamente ligada a la presencia de sus reservorios salvajes, el jabalí y el chinchorro *Ornithodoros erraticus* (Acarina, Argasidae), verdaderos fondos de saco epidemiológicos de la enfermedad.

A través de la normativa comunitaria se hallan regladas las enfermedades transmisibles en el entorno europeo. De esta forma el R.D. 2459/1996 sobre enfermedades de declaración obligatoria, establece un listado de enfermedades de declaración obligatoria en la U.E, en España, y aquellas sujetas declaración anual. Igualmente en el Art. 6.2 del R.D. 2491/94 de protección frente a zoonosis, se enumeran aquellas enfermedades de especial transcendencia para la sanidad pública.

Por su *vigencia actual* (estamos próximos al cincuentenario de su promulgación), la Ley de Epizootias de 1952 y Reglamento de Epizootias (Decreto de 04/02/1955), establecen asimismo la normativa de aplicación para las enfermedades transmisibles en nuestros animales domésticos y zoonosis más frecuentes. Es obvio reconocer que dicha reglamentación se halla superada una vez España se halla integrada en organizaciones supranacionales y a la vez, enfermedades parasitarias importantes en España en aquellos tiempos (p. ej. Durina, Trichomoniasis Genital Bovina) se hallan erradicadas, lo que magnifica la necesidad de adecuación de una nueva ley a los tiempos y conocimientos actuales de las enfermedades infectocontagiosas.

Como regla general dicha norma no debe de en ningún caso olvidarse y su aplicación en casos puntuales puede de ser necesaria, por ser una norma que refleja solo y exclusivamente una realidad, aunque lejana, de nuestro territorio nacional.

De esta forma la Ley y el reglamento establecen enfermedades de declaración oficial (Art. 3a, 3b, 4 Ley Epizootias); Zoonosis con medidas complementarias (Art. 7 del Reglamento de Epizootias).

En la tabla 2 se sintetizan los principales aspectos de las enfermedades parasitarias de declaración obligatoria y aquellas de importancia veterinaria.

Desde el punto de vista formal (Oficial) y en relación con la prescripción diagnóstica solicitada por los servicios veterinarios comarcales y el resultado final de la investigación parasitológica, el Laboratorio emite tres tipos de diagnóstico:

- **Diagnóstico Asertivo.** Cuando el agente identificado y sus niveles corresponden con la prescripción diagnóstica (Ej. Trichomoniasis Genital Bovina). En este caso el laboratorio emite dictamen negativo o positivo a una prueba diagnóstica solicitada.
- **Diagnóstico Diferencial.** Cuando el agente identificado y sus niveles corresponden con la clínica y epidemiología del proceso, sin que previamente se halla sospechado sobre su causalidad (Ej. (Aborto ovino, Toxoplasmosis). En este caso supone un diagnóstico alternativo a la principal prescripción diagnóstica.
- **Diagnóstico Complementario.** En enfermedades polietiológicas, nos especifica sobre la asociación de parásitos con otros patógenos (Síndrome Diarrea Neonatal, *Cryptosporidium parvum*).

Es en este punto donde los "Servicios Veterinarios Oficiales" toman un papel preponderante, ya que tienen asignada la misión de establecer un diagnóstico clínico preliminar, esto es acotar la indicación diagnóstica, toda vez que el conocimiento del brote en su zona de aparición y del entorno epidemiológico y antecedentes, obra exclusivamente en condición de conocimientos técnicos y proximidad. El éxito

en el diagnóstico correcto de un brote de enfermedad se halla directamente relacionado con la pericia de los servicios veterinarios oficiales.

ENVIO DE MUESTRAS.

La toma y envío de muestras es uno de los factores más importante y que influyen en la calidad diagnóstica. Se halla influida por una serie de factores, los cuales probablemente con un valor aditivo, determinan gran parte del Error Diagnóstico (E_d). Este último y en casos extremos determina la aparición de los denominados "falsos negativos" y "falsos positivos". Un claro ejemplo de falso negativo sería la ausencia de aislamiento de *Trichomonas foetus* en moco vaginal en muestras tomadas 24 horas antes del cultivo y mantenidas a temperatura ambiente, otro caso sería la ausencia de hallazgo de Garrapatas (Ixodidae) en un cadáver recogido un tiempo excesivo tras la muerte del animal. Por el lado contrario un falso positivo sería el hallazgo de huevos de en tránsito, o contaminación adicional de Acaridae (*Tyrophagus spp.* p. ej.) en las heces y dictamen de acariasis gastrointestinal, todo ello motivado por la toma de heces contaminadas con formas exógenas presentes en el medio ambiente.

La definición de muestra idónea es aquella que refleja en mayor grado la condición del animal enfermo (bioquímica, espectro y nivel de parasitación, etc.). El animal vivo y enfermo obtiene un valor de error de envío de muestras nulo. Por otro lado condicionados diferentes generalmente de tipo técnico y de posibilidad de difusión en el transporte y recepción de muestras, aconsejan la realización de la necropsia "in situ", la adecuada toma y remisión de muestras, remisión del informe epizootiológico y prescripción diagnóstica. Tareas que deben de ser asumidas por los servicios veterinarios oficiales comarcales.

TECNICAS DIAGNOSTICAS EN PARASITOLOGIA.

Sería largo describir la innumerable cantidad de técnicas diagnósticas y sus variantes, máxime para un curso de estas característica y duración. El objetivo primordial es la obtención de conocimientos mínimos básicos, los cuales tratados con cuidado permitan minimizar el referido error diagnóstico.

Se omiten en este caso las técnicas de aislamiento de parásitos en el medio ambiente, debido a la duración de esta conferencia, y el innumerable listado de técnicas a emplear remitiendonos en este caso a la literatura especializada. Una enumeración simple de las técnicas parasitológicas para cada enfermedad queda reflejada en la tabla 3.

Las técnicas quedan limitadas principalmente por el tipo de fuente diagnóstica (muestra), siendo principalmente dos, Animal vivo y/o enfermo: diagnóstico "in vivo" y Animal muerto: necropsia parasitológica y pruebas complementarias.

NECROPSIA PARASITOLÓGICA:

Etapas primordiales en el diagnóstico parasitológico. Se define como el conjunto de técnicas de naturaleza reglada y sistemática, encaminadas a la detección de parásitos y/o lesiones presuntivas en sistemas orgánicos, su aislamiento y preparación previa para su identificación y/o valoración por técnicas diversas.

Por su prescripción (solicitud) diagnóstica la necropsia parasitológica se clasifica en: Ciega: Ausencia de prescripción diagnóstica y/o antecedentes presuntivos y Dirigida: solicitud de diagnóstico delimitada por el clínico, patólogo y/o epidemiólogo.

La necropsia parasitológica debe de efectuarse según un método repetitivo y ordenado, según el modelo de realización de la necropsia tradicional, por sistemas orgánicos y microhabitats completos (piel, digestivo, Pulmonar, etc.). La alteración de los pasos ó método puede llevar a la pérdida de información, a veces primordial para la determinación causal de la enfermedad.

De la misma forma cada taxón parasitario requiere unas técnicas diferentes, las cuales se traducen fundamentalmente en los protocolos de aislamiento y preparación para su determinación microscópica.

1.- PROTOZOOS.

- a) Examen directo contenido en órganos cavitarios (trofozoitos sensibles a la temperatura) por medio de bastoncillo de algodón. (Ejemplo trichomoniasis paloma).
- b) Tinciones específicas sobre improntas, extensiones, raspados.
- c) Fijación para Histopatología (PBS- Formol 10%). En órganos cavitarios el fijador debe de inyectarse en la luz e incluir la porción en el conservante.

2.- HELMINTOS.

- 1.- Apertura de la luz (Hígado, Pulmón, Intestino, etc.). Recogida, lavado (sol. Fisiológica) y tamizado del contenido. Recogida de sedimento.
- 2.- Raspado mucosas gastrointestinales.
 - 2.1.- Digestión Péptica, 37 °C, 24 h.
 - 2.2.- Metodo De Williams. Incubación de mucosas en agua 37°C, 5h. Raspado de la mucosa y tamizado (50_m).
- 3.- 1 y 2 Sedimento final sobre placa de Petri de aprox. 140 mm Ø. Examen posterior en Estereomicroscopio.
- 4.- Aclarado y Montaje bajo cubreobjetos (normalmente en Lactofenol). Utilización de montajes semipermanentes como es el Líquido de Hoyer (es aclarante).
- 5.- Fijación y conservación de metazoos: Etanol, 2-Propanolol (Alcohol Isopropílico) ó PVL (Alcohol Polivinílico) al 70 %.

3.- ARTROPODOS.

Dípteros voladores: Matar con eter etílico ó Cianuro potásico. Este último debe de mezclarse con yeso higroscópico, se debe de evitar los vapores al adicionar agua, muy peligroso.

Artrópodos no voladores: Normalmente son fijados en solución alcoholica (Etanol, 2-Propanolol) al 70 %, optativamente se añade glicerina 5-10 % y Cloroformo en ejemplares coloreados. El uso de soluciones con metanol y ácido acético, permite el estiramiento de las patas de ácaros y su correcta visualización al microscopio.

El examen microscópico de artrópodos grandes, debe de realizarse en seco y bajo lupa. Es adecuada la utilización de una aguja fina sobre un soporte que nos permita el cambio de orientación espacial de la muestra.

Acaros y dípteros pequeños, montaje en agua glicerinada, lactofenol, líquido de hoyer, Bálsamo de Canadá, bajo cubre (excavado en casos).

TECNICAS DIAGNOSTICAS ESPECIFICAS.

COPROLOGIA.

Recogida de heces:

- 1) Directamente del recto, uso de guantes de plástico (Animales mayores); Cucharilla/Termómetro (animales menores);
- 2) 2) del suelo , heces recientes, evitar contaminación con formas de vida libre y pérdida de formas parasitarias presentes (heces no recientes). La recogida en diferentes periodos del día evita de alguna forma la eliminación discontinua en el tiempo y recogida en diferentes dias los periodos de prepatencia de la enfermedad.

Conservación de las heces:

Etanol 70 %, MIF (Mertiolate Yodo Formol), PVA (Alcohol Polivinílico). Solo indicado para búsqueda de trofozoitos de *Sarcocystis* gastrointestinales en heces diarreicas. Imposibilita

el coprocultivo y obtención de formas diagnósticas (Ooquistes esporulados, L3 de Strongylida gastrointestinales...).

EXAMEN MACROSCOPICO.

En caso de presencia de nematodos o porciones de cestodos (proglotis) Lavado de heces (parásitos visibles macroscopicamente): sol. Salina 0.85 %. Filtrado tamiz (≤ 1 mm). Aislamiento en placa de petri sol. Salina.

Aclarado nematodos: Fijación según Bouin, Lactofenol (paso previo por alcohol isopropílico 70 %).

Coloración trematodos y proglotis cestodos. Carmin láctico; Carmin acético.

EXAMEN MICROSCÓPICO.

Examen directo (Muestras recientes).

Examen de trofozoitos móviles de protozoos. Dilución en solución fisiológica (CINa 0.85 %, Ringer, PBS...) atemperada, examen idóneo en contraste de fases. Adición de Lugol para contrastar los quistes de protozoos (gránulos de almidón) en caso de uso de campo claro. Técnica poco útil en parasitaciones débiles.

Tinción diferencial protozoos

- 1) *Hematoxilina*- Férrica de Heidenhain; Tricrómica de Wheatley. Trofozoitos sarcomastigophora.
- 2) *Giemsa*. Los derivados de la tinción de Romanovsky, incluida la tinción rápida comercial, proveen de un método rápido y amplio para la detección de protozoos cuya pared exterior sea parcialmente permeable al colorante. El secado de la preparación (extensión ó impronta) se realiza adecuadamente en estufa (60 °C, 1-2 horas). La preparación fijada con metanol (hasta 25 min.) puede conservarse en ambiente seco y refrigeración por largo tiempo. Dicha técnica en general no provee de una tinción diferencial de las estructuras de los protozoos intestinales, pero su utilidad además de en hematología se halla fuera de toda duda.
- 3) *Ziehl-Neelsen modificado*. Dicha técnica similar a la utilizada para la detección de Mycobacterias, utiliza como decolorante una solución ácida (CIH 0.1 %) y como colorante de contraste verde malaquita. Su utilidad estriba en la tinción diferencial de *Cryptosporidium parvum*, agente causal de diarrea en individuos inmunoincompetentes, como es el caso de la diarrea de los rumiantes en la primera semana de edad.

CONCENTRACIÓN.

1) MIFC:

Sustituir el éter (explosivo) por acetato de etilo. Util para protozoos Sarcomastigophora (mayormente en carnívoros y hombre). Utilizado para examen en fresco de *Cryptosporidium parvum* proveniente de heces esteatorreicas (rumiantes lactantes). En este último caso una tinción posterior no da resultados satisfactorios.

2) Flotación.

Se fundamenta en que las formas parasitarias, no necesariamente aquellas intestinales ó pulmonares, tienen una densidad específica. Al enfrentarlas con una solución de mayor densidad estos ascienden a la superficie pudiendo ser de esta manera aislados y visualizados por métodos diversos.

Las soluciones normalmente empleadas son CINa sobresaturada (1.2 gr/ml); sacarosa (1.2-1.3 gr/ml); yoduro mercuriato potásico (1.44 gr/ml). La utilización simultánea de soluciones de diferente densidad (CINa, IhgK) nos provee de un método suficiente para el aislamiento de ooquistes de coccidios, huevos de trematodos y nematode digestivos y huevos/larvas de 1er estadio de nematodos pulmonares.

Procedimiento general (cuantitativo).

- 1) Mezclar en vaso de toma de muestras (tipo orina), 10 gr de heces con agua y hasta 100 ml (dil. 1/10). Homogeneizar (minibatidora de aspas, 2.000 rpm, 20-30 seg.). Filtrar por gasa de malla y escurrir la gasa.
- 2) Completar el volumen hasta 100 ml, homogeneizar y dejar sedimentar durante 30 min (Opcional centrifugación, 500 G, 1-2 min.).
- 3) Decantación y repetir paso anterior hasta sobrenadante se halle claro.
- 4) Homogeneizar y recoger sobre 2 tubos de centrifuga 10 ml de suspensión (1 gr de heces). Centrifugar.
- 5) Mezclar sedimento con solución de CNa 1.2 (tubo 1) y IHgK (1.44) hasta 6 ml (dil 1/6).
- 6) Homogeneizar y por medio de pipeta de plástico con bulbo de 3 ml, llenar ambos compartimentos de la cámara de McMaster. Examinar al microscopio (máximo 200 aumentos totales).
- 7) En cada caso se examinan 2 compartimentos x 1 cm² de superficie x 0.15cm altura=0.30 cm³ ml de dilución 1/6 de heces y por tanto el número total de formas por gramo de heces (fgh) se obtiene por la fórmula:

$$FGH = \text{N}^{\circ} \text{ FORMAS OBSERVADAS} \times 6 \text{ ml SUSPENSIÓN} / 0.30 \text{ ml} / 1 \text{ gr HECES.}$$

La sensibilidad de la técnica (observación de una única forma) de = 20 formas por gramo de heces.

Nota: La sensibilidad puede modificarse, la única limitación es la turbidez y/ó opacidad de la suspensión. La solución de IhgK es corrosiva para los elementos metálicos del microscopio, igualmente es tóxica (contiene Mercurio), por lo que no debe de evitarse su eliminación hacia la red de saneamiento público, puede reciclarse o debe de ser tratada por centros de eliminación no contaminante para el medio.

La utilización de soluciones hiperdensas puede colapsar formas parasitarias, por ejemplo colapsamiento de huevos de *Fasciola* y ulterior hundimiento y pérdida de estos. Sin embargo es un medio eficaz para la detección de formas parasitarias que muchas veces no se detectan en flotación con CNa (*trichuris*, *Dicrocoelium*, L1 de nematodos pulmonares, etc.).

Flotacion cualitativa.

- 1) Repetir 1) a 4) del procedimiento cuantitativo
- 2) Adicionar solución saturada hasta 6 ml y homogeneizar, añadir mas solución hasta formar menisco convexo sobre el borde del tubo.
- 3) Aplicar cubreobjetos (20x20 mm). Dejar reposar en gradilla y posición vertical hasta 45 min.
- 4) Recoger cubre verticalmente. Examinar al microscopio.

Sedimentación (Huevos de trematodos, Larvas de vermes en heces no recientes).

- 1) Mezclar 10 gr de heces con 500 ml de agua ó suero salino(dil 1/25). Tamizar.
- 2) Dejar reposar (30 min). Decantar y repetir paso anterior hasta que el sobrenadante se halle claro.
- 3) Resuspender el sedimento en 50 ml de agua (dil 1/5). Homogeneizar y recoger en tubo de centrifuga 10 ml de suspensión (2 gr de heces).
- 4) Centrifugar, eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 5 ml de agua (dil. 2/5).
- 5) Homogeneizar y observar una gota de suspensión (aprox. 0.05ml, 0.02 gr) al microscopio bajo cubre de 24x32 mm (0.1 ml = 0.05 gr de heces) al M.O campo claro.

Sensibilidad de la técnica: 50 fgh.

La sedimentación clásica en copa para la observación de huevos de trematodos (*Fasciola*) especialmente es una técnica poco sensible y tediosa, solo útil en eliminaciones altas de huevos en heces. En la zona mediterránea la fasciolosis es generalmente subclínica y limitada por la presencia de su hospedador intermediario (*L. truncatula*), siendo muy difícil (por no decir imposible) la detección de huevos de *fasciola* por la sedimentación clásica.

COPROCULTIVO.

En placa de petri de 90 mm, 7-10 días a 25 °C. Ooquistes Eimeriidae: (Dicromato K 2.5 %). Huevos de Strongylida (previo a la técnica de Baerman). Establecer una consistencia adecuada de las heces y mantener la humedad constante, se puede mantener la humedad si colocamos el coprocultivo en placa de petri de 160 mm con solución sobresaturada (p. ej. ClK mantiene la humedad relativa alrededor del 90 %).

Tras un tiempo medio de 1 semana (comprobar por examen previo), aunque existen notables diferencias entre especies el coprocultivo de coocidios se somete a flotación, y examen microscópico. Las larvas de 3er estadio de Strongylida gastrointestinales son recogidas a través del **aparato de Baerman** e identificadas al microscopio.

Un método de coprocultivo y aislamiento de larvas es el de **Harada-Mori**. Consistente en la aplicación de las heces sobre un trozo de papel de filtro de medidas adecuadas y su introducción en tubo de ensayo con agua, de tal forma que las heces quedan cubiertas hasta su mitad. La recogida de larvas del fondo del tubo y tras incubación se realiza por medio de pipeta pasteur.

CULTIVO PROTOZOOS INTESTINALES.

Dichas técnicas no son rutinariamente empleadas en laboratorios de parasitología animal, debido a que las formas interesadas, amebas, ciliados y flagelados gastrointestinales, poseen escaso valor como agentes de enfermedades parasitarias en nuestro entorno y objeto de estudio en parasitosis humanas en zonas tropicales. Así por ejemplo para el cultivo de *Entamoeba histolytica* se utiliza el medio bifásico siguiente: Fase sólida: Suero estéril de caballo (80 °C, 1 h.). Fase líquida Albúmina – Ringer. Incubación 37 °C (22 °C en poiquiloterms).

EXAMEN DE SANGRE

Venosa. Envío con anticoagulante (heparina: 100 UI/ml; EDTA: 0.1 ml/10 ml de sangre; Citrato Na: 1.5 ml/ 15 ml de sangre).

Parasitemias (fase febril). Tropismo de formas infestantes por capilares cutáneos y según el comportamiento de ciclos de gestión del vector (nocturno o diurno).

Examen Directo.

- 1) Técnica de extensión fina: Porta desengrasado. Secado al aire. Fijación Metanol 3 min.
- 2) Gota gruesa: Desfibrinación. No fijar. Secar al aire o en cámara. Hemólisis en agua destilada (de grifo sirve). Secado y fijación posterior.

Envío de ambas muestras en un solo porta. Tinción Giemsa ó panóptico rápido (en este caso no fijar con metanol).

Concentración.

Larvas de vermes: (Knott modificado). 1 ml de sangre + 5 ml de solución Formol 5%-Ac. acético glacial+ sol. Alcohólica saturada de Violeta de genciana (95:5:2). Centrifugar y examinar el sedimento. Las filarias y formas migrantes de nematodos (p. ej. Trichinella quedan coloreadas.

Tripanosomas:

- a) Sangre + Citrato Na (1:1). Centrifugar 150 G x 10 min. Sobrenadante 900 G x 10 min. Examinar sedimento. Teñir (Giemsa) en caso necesario.
- b) Microhematocrito de Woo. Los tripanosomas se concentran en la interfase plasma-eritrocitos.

DETECCION DE ECTOPARASITOS

1) Animal vivo.

Raspado cutáneo. Difícil hacerlo bien. Problema: 1) existencia de parásitos y su número 2) Recogida de material. 3) Profundidad del raspado Tradicionalmente utilizado para el diagnóstico de la sarna, mayores resultados para la detección de micosis cutáneas. Adecuado para Demodicosis (ácaros den-

tro de folículos y glándulas accesorias). El raspado debe de aglutinarse , p. ej. Glicerina. Envío en solución de alcohol al 70%.

Alternativo: Aspirado superficie (*Psoroptes* y forma noruega de *Sarcoptes scabiei*).

2) Sobre el cadaver.

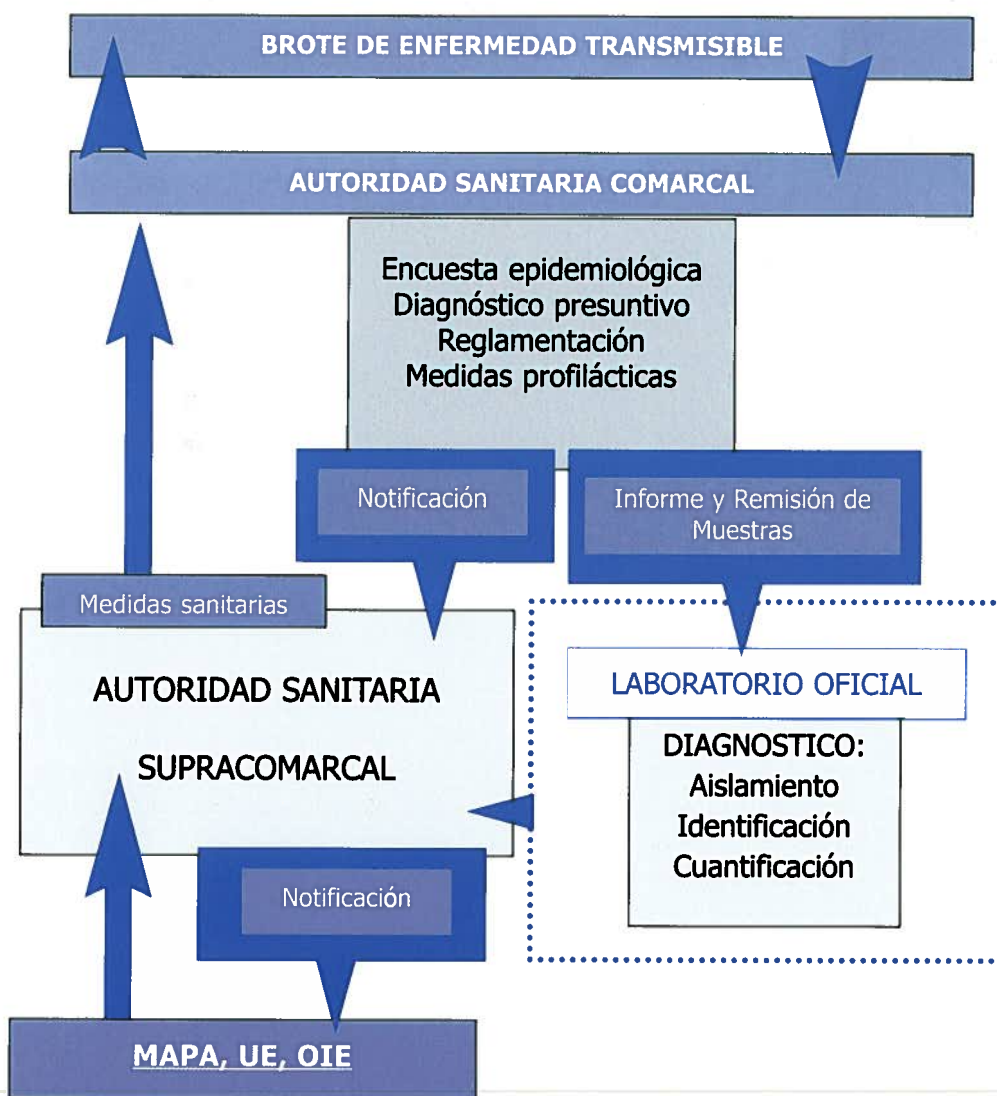
Un método eficaz para el aislamiento de ectoparásitos no voladores de la piel, es la disección de porciones de esta (incluida dermis) y maceración en KOH 10% a temperatura ambiente durante 18 h., transcurridas las cuales se raspa la epidermis, que se desprende fácilmente. El material recogido puede ser sometido a lavado, conservación en alcohol de 70°, o incluso flotación en Sacarosa D=1.18-1.2 gr/ml en tubo ó McMaster para la identificación de las formas presentes.

LIQUIDOS Y SECRECIONES ORGANICAS

Linfa: Punción de ganglio linfático e inyección de sol. Salina. Masaje y recogida de líquido. Examen directo y/ó tinción del contenido.

Orina: Sedimentación, Centrifugación (650-1500 G). Examen directo.

Figura 1. Sistema de Sanidad Animal. interrelación entre los diferentes operadores. Misión específica del Laboratorio de Diagnóstico Oficial en Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO_s).



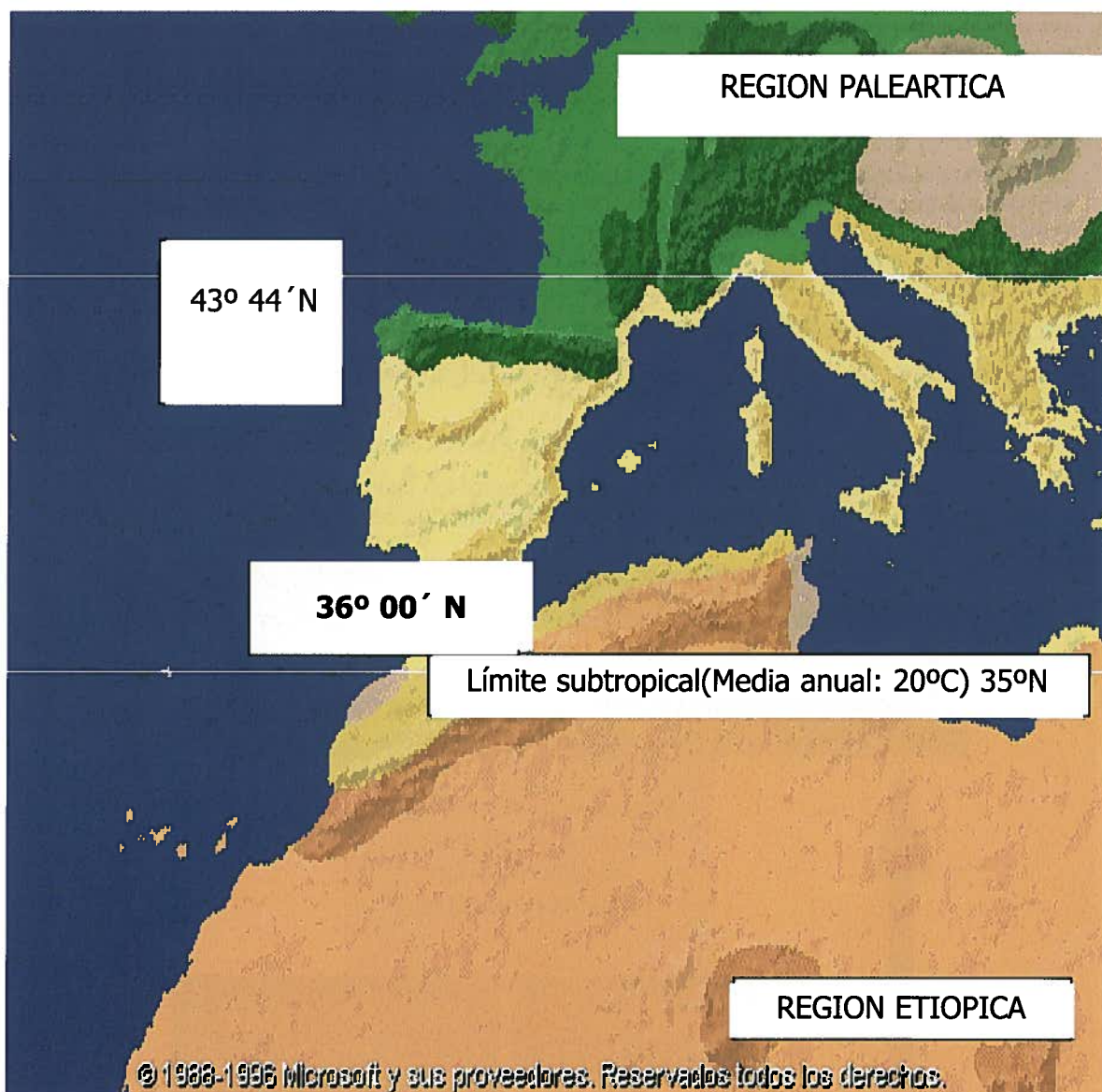


Fig. 3 MODELO EPIDEMIOLÓGICO
PARASITOSIS INTESTINALES

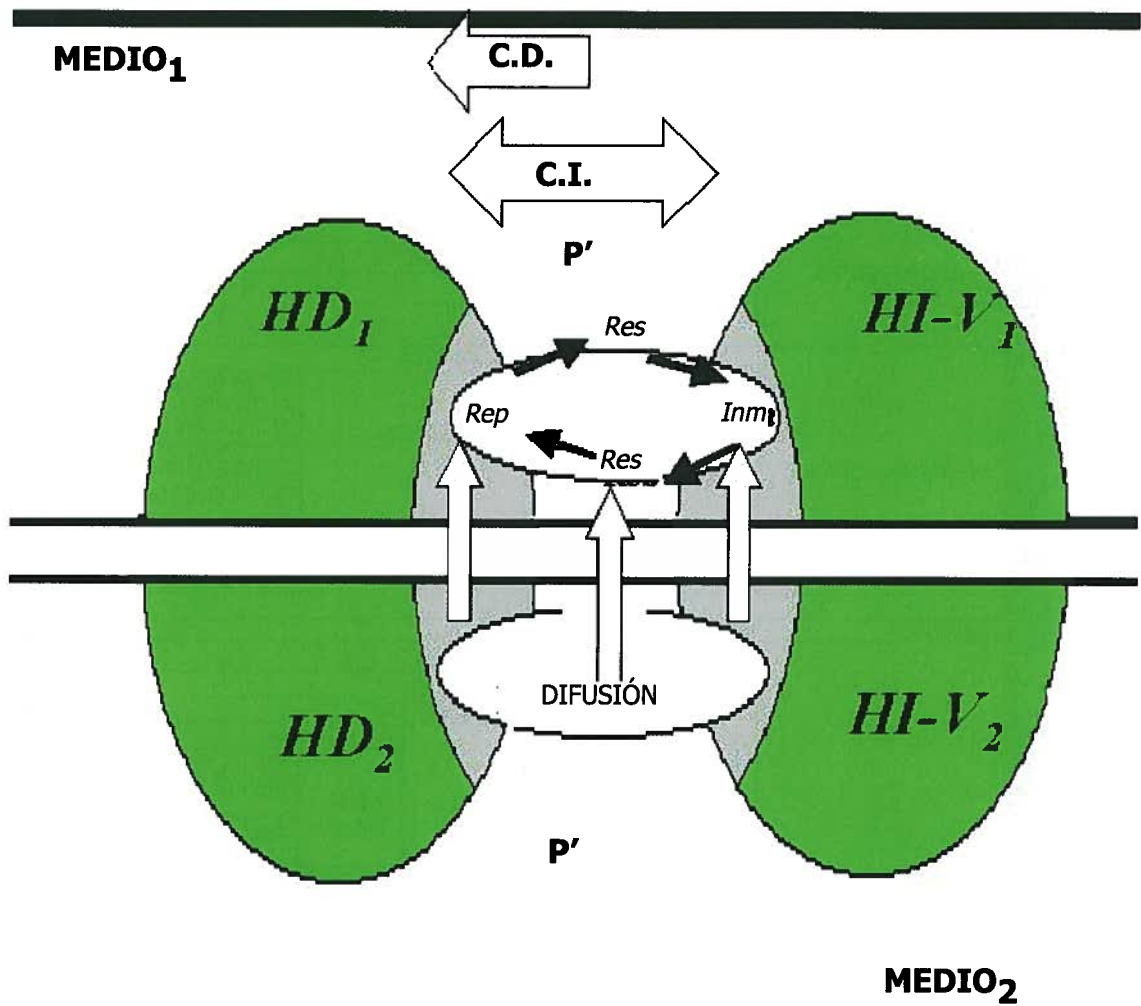


Tabla 1. Principales taxones parasitarios de importancia veterinaria (Reino Animal, Subreinos Protozoa y Metazoa).

	PHYLUM	SUBPH Y-LUM	CLASE	SUB CLASE	ORDEN	SUB ORDEN	FAMILIA	GENERO			
P R O T O Z O O S	SARCOMAS- TIGOPHORA	MASTIGOPHORA			KINETOPLASTIDEA		TRYPANOSOMATIDAE <i>Trypanosoma, Leishmania</i>				
					TRICHOMONA-DIDA		<i>Trichomonas</i> <i>Tritrichomonas</i>				
		SARCODINA					<i>Entamoeba</i> <i>Mallphigamoeba</i>				
	APICOMPLEXA			COCCIDIA		EIMERIINA			EIMERIIDAE		
						HAE- MOSPO- RINAE	PLASMODIIDAE <i>Haemoproteus</i>				
				PIROPLASMIA		BABESIIDAE THEILERIIDAE					
	CILIOPHORA							<i>Balantidium</i>			
	M E T A Z O O S	PLATYHELMINTES		TREMATODA	DIGENEA			FASCIOLIDAE DICROCOELIIDAE			
				EUCESTODAE		ANOPLOCEPHALIDEA					
		NEMATHELMINTHES		NEMATODA		TAENIIDAE			<i>Taenia</i> <i>Echino</i> <i>Coccus</i>		
ASCARIDIDA											
STRONGYLIDA						METASTRONGYLIDAE PROTOSTRONGYLIDAE DICTYOCAULIDAE					
						STRONGYLIDAE TRICHOSTRONGYLIDAE					
ENOPLIDA						TRICHINELLIDAE					
SPIRURIDA		FILARIIDAE									
ACANTHOCEPHALA											
ANNELIDA		HIRUDINEA						<i>Limnatis</i>			
ARTHROPODA		INSECTA		MALLOPHAGA							
				SIPHUNCULATA							
				SIPHONAPTERA							
				DIPTERA		BRACHYCERA					
						NEMA- TOCERA		CULICIDAE			
								CERATOPOGONIDAE <i>Culicoides</i>			
				PSYCHODIADE <i>Phlebotomus</i>							
				CYCLORRAPHA							
				ARACHNIDA		ACARINA		ASTIG- MATA		SARCOPTIDAE PSOROPTIDAE DEMODECIIDAE	
								METAS- TIGMATA		IXODIDAE ARGASIDAE	
PROS- TIGMATA		<i>Acarapis</i>									
PENTASTOMIDA		LINGUATULIDAE									

Tabla 2. listado de enfermedades parasitarias sometidas a control oficial y/o de importancia veterinaria.

2.1. Protozoos.

LISTA (1/2/3)	DENOMINACION	AGENTE	HD/HI	VECTOR	ORGANO	DISTRIB
B/C/-	Tripanosomiasis	<i>T. vivax</i> <i>T. brucei.</i>	Bovidae	<i>Glossina</i>	Sangre	Trop/Su b-trop
B/C/An	Surra	<i>T. evansi</i>	Equ., Bov.	Díptera hem.	Sangre	Subtrop
B/B/DO	Durina	<i>T. equiperdum</i>	Equ.		Reprod	Mundial
-/-ES ZMC	Leishmaniasis	<i>L. donovani</i>	Perro, H.	<i>Phlebotomus</i>	Visceral	Trop- Sub-trop
B/C/ ES	Trichomoniasis	<i>T. foetus</i>	Bov.		Reprod	Mundial
B/C/ES	Babesiosis equina	<i>B. equi/caballi</i>	Equ.	Ixodidae	Sangre	Mundial
B/C/ES	Babesiosis bovina	<i>Babesia spp</i> (<i>B. bovis</i>)	Bov			
B/C/ES	Theileriosis	<i>Theileria</i> (<i>T. annulatta</i>)			organico, Sangre	
-/-ES	Piroplasm. ovina	<i>Babesia/Theileria</i>	Ov.	Ixodidae	Sangre	Mundial
-/ZC/	Toxoplasmosis	<i>T. gondii</i>	Gato/Mamif , H		Organico Reprod	Mundial
-/ZC/-	Sarcocystosis	<i>Sarcocystis</i>	Carn/Mamif , H.		Musc, SNC	Mundial
-/ZC/-	Cryptosporidiosis	<i>C. parvum</i>	Mamif, H.		Gast.Int	Mundial
-/-ES	Coccidiosi Aviar	<i>Eimeria spp.</i>	Aves		Gast.Int	Mundial
-/-ES	C. hepática	<i>Eimeria stiedae</i>	Co		Hepatico	Mundial
-/ZC/-	Balantidiosis	<i>Balantidium coli</i>	Po, , H.?		Gast.Int	Subtrop
-/ZC/-	Amebiasis	<i>E. histolytica</i>	Po?, H.		GI	Trop/Sub -trop

(1) Listas OIE.(A, B ó C). (2) R.D. 2459/1996 (A: Decl. Obligatoria U.E.; B: Declaración obligatoria en España; C: Enfermedades sujetas a declaración anual; ZC: Zoonosis de Comunicación obligatoria a la UE (R.D. 2491/94). (3) Ley y Reglamento de Epizootias: DO: Declaración oficial (Art. 3ª Ley Epizootias); ES: Enfermedades que deberan de figurar en las Estadísticas Sanitarias; ZDO: Zoonosis de Declaración Oficial; ZMC: Zoonosis con medidas complementarias.

2.2. Helmintos

LISTA (1/2/3)	DENOMINACION	AGENTE	HD/HI	VECTOR	ORGANO	DISTRIB
-/-/ ES	Fasciolosis	<i>Fasciola hepatica</i>	Herb, H.	<i>L. Truncatula</i>	Hepat	Mundial
-/-/ES	Dicrocoeliosis	<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	Herb, H.	<i>Zebrina.(1)</i> <i>Formica(2)</i>		
-/ZC/- B/C,	Esquistosomiasis	<i>Schistosoma Bovis</i>	Rum, H.	<i>Bulinus sp</i>	Art.	Trop-Subtr.
ZC/ ES	Equinococosis/ Hidatidosis	<i>Echinococcus (E. graulosus)/Hidátide</i>	Carn(Perro) /Mam, H.		Organico	
B/C/ ES, ZMC	Cisticercosis	<i>Taenia saginata/ Cisticercus Bovis</i>	H/Bo, H.		Musc	
B/C/ ES, ZMC	Cisticercosis	<i>Taenia solium/ C. cellulosa</i>	H/Po, H.			Mundial
-/-/ ES	Coenurosis	<i>Taenia multiceps/ Coenuro cerebrialis</i>	Carn/Ov,H.		SNC	
-/-/ ES	Estrongilos Gastrointestinal	<i>Strongylida</i>	Mam		GI	
-/-/ ES	Estrongilos pulmonar	<i>Dyctiocaulus spp</i> <i>Protostrongylidae</i> <i>Metastrongylus spp.</i>	Bo, Ov, Ca Ov, Ca Suidae	<i>Caracoles terrestres</i>	Pulm Pulm	Mundial
/-/ ES	Habronemiasis cutánea.	<i>Habronema muscae</i>	Equ	<i>Musca , Stomoxis</i>	Piel/Est.	
B/B,ZC/ ZDO	Trichinellosis	<i>Trichinella spiralis</i>	Po, Mam, H.		Musc,S NC	
-/-/	Ascariidosis Porcina	<i>Ascaris suum</i>	Po/H?,		Gen; GI	

2.3. Artropodos.

LISTA (1/2/3)	DENOMINACION	AGENTE	HD/HI	ORGANO	DISTRIB
B/B/-	Miasis (Nuevo Mundo)	<i>Cochliomyia hominivorax</i>	Mam, H.	<i>Piel (Gusanera).</i> <i>Miasis obligada</i>	SubTrop-Neart
B/-/	Miasis (Viejo mundo)	<i>Chrysomya bezziana</i>			
-/-/	Miasis (Viejo mundo)	<i>Wohlfahrtia magnifica</i>			<i>Miasis facultativa</i>
C/-/ES	Hypodermosis (Barros)	<i>Hypoderma Bovis, H. Lineatum</i>	Bo.	<i>SNC, ORG, Piel</i>	Subtrop-Templ
-/-/	Oestrosis (Modorra)	<i>Oestrus ovis</i>	Ov	<i>Cav.Nasal, SNC</i>	Subtrop-Temp
-/-/ ES	Sarna caprina	<i>Sarcoptes scabiei var. caprae</i>	Ca, H	<i>Piel</i>	Mundial
B/C/ ES	Sarna equina	<i>Sarcoptes scabiei var. equi.</i>	Equ, H	<i>Piel</i>	Mundial
-/-/ ES	Sarna Porcina	<i>Sarcoptes suis</i>	Suidae	<i>Piel</i>	Mundial
C/-/ ES	Sarna ovina	<i>Psoroptes ovis</i>	Ovino	<i>Piel</i>	Mundial
-/-/ ES	Sarna conejo	<i>Psoroptes cuniculi</i>	Conejo	<i>Pab. Auricular</i>	Mundial
B/C/ ES	Acariasis Abejas	<i>Acarapis woodi</i>	A. mellifera	<i>Tráquea</i>	Mundial
B/B/-	Varroasis	<i>Varroa jacobsoni</i>	Apis spp.	<i>Sup.corp/ Celdas cría</i>	Mundial

Tabla 3. Técnicas de Diagnóstico laboratorial de las diferentes enfermedades parasitarias.

AGENTE	DIAGNOSTICO
<i>Trypanosoma spp.</i> (Sanguinícolas)	ED Sangre. Concentración en citrato Na. Microhematocrito de Who. Giemsa.
<i>T. equiperdum</i>	Clínica (sífilis equina). ED y Giemsa exudado placas edematosas (fase aguda) y exudados genitales y/ó Sangre-fluidos corporales (generalización y fase crónica). Inoculación en rata de laboratorio. Serología: RFC-IFI (Weybridge).
<i>Leishmania spp.</i>	Clínica. Giemsa (Bazo, médula ósea, gánglios) Cultivo Promastigotes (Fase en H.I). Serología: IFI, ELISA, Aglutinación Directa.
<i>T. foetus</i>	Clínica y Antecedentes: Bovino extensivo, monta natural, infertilidad. ED secreciones (picos de presencia de trichomonas) vaginales y lavado pre-pucial. Contrastación con lugol. Giemsa. Cultivo [Caldo -Glucosa-Suero (BGPSM, GBS..)]. Serología: Test intradérmico (Kerr). ELISA Trapping; Aglutinación en latex. Dto. Diferencial: <i>Campylobacter foetus</i> var. <i>venerealis</i> .
<i>Babesia spp.</i>	Clínica. Giemsa (fase febril). Dto. Diferencial <i>Anaplasma</i> spp. ELISA; IFI.
<i>B. equi/caballi</i>	RFC(Exportación USA)
<i>Theileria spp.</i>	Cuerpos Azules de Koch (SER). IFI
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Clínica (Síndrome Diarrea Neonatal). Histopatología. Examen de heces y raspado/contenido intestinal (Ileon). IFD Concentración: Etil-Acetato, examen y recuento (hemocitómetro) en campo claro. Típicos ooquistes (zoitos y cuerpo residual visibles en contraste de fases/interferencias). Hasta 109 oghx gr heces. Tinción: Ziehl-Neelsen modificado (acidoresistentes). Dto. Diferencial: levaduras ácidoresistentes.
Coccidios	Especie-específicos. Histopatología. <i>Eimeria stiedae</i> : Macroscópico (hígado) y ED lesiones. Flotación: Examen de heces. Cuantificación McMaster (D= 1.2 gr/ ml). Coprocultivo Dicromato K 2.5 %.Claves morfológicas ooquistes esporulados.
<i>T. gondii</i>	<u>HOSPEDADOR DEFINITIVO: Coccidios (Ooquistes).</u> HOSPEDADOR INTERMEDIARIO: Clínica. Examen lesional cotiledones. Histopatología. IFD. Serología IFI, RFC., cinética de anticuerpos (descartar infección subclínica o anticuerpos residuales). Dto. Diferencial con <i>C. Psittaci</i> (Aborto enzootico) y <i>Coxiella burnetti</i> (raro)
<i>Sarcocystis</i>	HOSPEDADOR DEFINITIVO: Coccidios (Esporcistos). HOSPEDADOR INTERMEDIARIO: Histopatología; Digestión artificial (Clorhidropéptica = <i>Sarcocystis</i> spp.; Tripsina: Integridad quiste, específico);/Serología.
<i>Besnoitia sp.</i>	HOSPEDADOR DEFINITIVO (Gato)= Coccidios (Ooquistes). HOSPEDADOR INTERMEDIARIO (Rum). Clínica: Forma cutánea producidas por quistes (alopecias, induración engrosamientos cutáneos). Forma aguda (febril): Giemsa sangre detección de merozoitos libres (raro). Forma crónica: Histopatología cutánea y conjuntiva esclerótica).

AGENTE	DIAGNOSTICO
<i>Balantidium coli</i> / <i>E. histolytica</i>	ED heces o raspado Intestinal. Grueso afectado, morfología típica. Concentración MIF. Cultivo: Suero-Ringer (balantidium), Suero-Albúmina-Ringer (Entamoeba).
<i>Malpighamoeba mellificae</i>	Clínica. detección de formas vegetativas y quistes en contenido intestinal. Dto. Diferencial con <i>Nosema Apis</i> (infección conjunta frecuente). <i>Nosema apis</i> : Identificación esporas en heces y contenido intestino mio. Dto. Diferencial con <i>Malpighamoeba mellificae</i> , confusión células de levadura, esporas de hongos, cuerpos caláreos.
<i>Fasciola hepatica</i> / <i>Dicrocoelium dendriticum</i>	Clínica y Epidemiología (Zonas de alta humedad con presencia de <i>Lymnaea truncatula</i> en <i>Fasciola</i>). Necropsia (hígado). Montaje microscópico. Sedimentación/flotación (D= 1.44 gr/ml).
<i>Schistosoma Bovis</i>	Necropsia: Venas mesentéricas fundamentalmente. Heces: Sedimentación en glicerina 0.5 %. Concentración Etil-Acetato.
<i>Echinococcus</i> (<i>E. granulosus</i>)/Hidátide	HOSPEDADOR DEFINITIVO: Coprología. HOSPEDADOR INTERMEDIARIO: Necropsia. Disección quiste (¡peligro!) Prueba de viabilidad: Células flamíferas en fresco, tinción supravital. Serología. Interpretación cuidadosa (membrana del quiste)
<i>Taenia spp</i>	HOSPEDADOR DEFINITIVO: Coprología. HOSPEDADOR INTERMEDIARIO: Necropsia. Disección quiste, compresión entre placas y examen protoescolex.
Strongylida gastrointestinales	Necropsia y Aislamiento. Montaje y examen microscópico. Coprología. McMaster. Coprocultivo (Placa petri) y Baerman (Larvas de tercer estadio). Coprocultivo y aislamiento según Harada-Mori (Alternativo).
Strongylida Pulmonares.	Necropsia y Aislamiento (hasta bronquiolos). Montaje y examen microscópico. Coprología. McMaster. Baerman (Larvas de primer estadio, protostrongylidae y <i>Dyctiocaulus</i>).
<i>Habronema muscae</i>	<u>ED Exudado heridas (Larvas).</u> <u>Resto = Strongylida.</u>
<i>Trichinella spiralis</i>	Triquinoscopia (pilares diafragma) Digestión artificial. (Clorhidro-pépsica). Tipificación diagnóstico por R.D. 1728/1987
Ciclorrapha	Adultos: Captura, Claves morfológicas. Larvas (Miasis): Morfología LIII. Conservación EtOH 70 %.
Nematocera	Todas las fases: Captura (parásitos temporales). Conservación EtOH 70 %.
<i>Sarcoptes scabiei</i>	Raspado cutáneo; Aspirado; Aclarado (KOH/Lactofenol). Histopatología
<i>Psoroptes spp.</i>	Raspado placas serosas, Fosa infraorbitaria (infestación residual), ELISA (<i>Psoroptes ovis</i>).
Argasidae	Captura mecánica, trampas Anhídrido carbónico. Claves morfológicas.
Ixodidae	Captura /técnica de la manta, extracción piel. Migración postmortem.
<i>Acarapis woodi</i>	Disección traqueal/Corte fino. Aclarado (HOH, Láctico). Diagnóstico diferencial otros <i>Acarapis</i> (<i>A. externus</i> , <i>A. dorsalis</i>).
<i>Varroa jacobsoni</i>	Celdas de cría. Extracción alcoholica en adultos. Folios con glicerina en piqueras.

ED= Examen Directo. IFD. Inmunofluorescencia directa; IFI: Inmunofluorescencia Indirecta; RFC: Reacción fijación de complemento.

Enrique Jesús Villalba Montoro.
Jefe Dpto. Microbiología y Parasitología.
Laboratorio de Sanidad y Producción Animal.
Córdoba.

MICOBACTERIAS Y MICOBACTERIOSIS. EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA DE TUBERCULOSIS.

INTRODUCCIÓN.

La tuberculosis (TB) es hoy día, la principal causa de muerte en adultos debida a un solo agente infeccioso en el mundo, siendo la tercera en niños, por detrás de diarreas y patologías agudas respiratorias. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado unas tasas de morbilidad y mortandad para la especie humana, en el periodo transcurrido desde 1988 hasta 1999, de 88 millones y 30 millones de personas, respectivamente, con una mayoría de casos en los países en vías de desarrollo. Un gran número de estos países, son incapaces o presentan un bajo número de notificaciones, debido a la precariedad de sus sistemas sanitarios. Según el informe emitido por **Kochi** para la OMS en 1991, alrededor de un tercio de la población mundial podría estar infectada por micobacterias de carácter tuberculoso.

Se estima que para este año la incidencia a nivel mundial se incrementará en 10,2 millones y morirán 3,5 millones de personas (más un millón de niños), lo que representa unas tasas de aumento del 36% y 39% respectivamente, desde 1990. Del total de estos casos, el 38,7% se producirán en el Sudeste Asiático, un 22% en la zona del Pacífico Oeste (exceptuando Japón, Australia y Nueva Zelanda), un 20% en África (especialmente zona subsahariana), el 8,5% en la franja este del mediterráneo, un 6,3% en América (excepto EEUU y Canadá), el 2% en la Europa del Este (incluidos los estados independientes de la antigua URSS) y por último un 2% en el conjunto formado por la Europa Occidental, EEUU, Canadá, Japón, Australia y Nueva Zelanda. El ratio (incidencia de nuevos casos por 100.000 habitantes) oscila desde un 24 en el mundo occidental, hasta 247 en el Sudeste Asiático o el 293 de África.

Datos presentados por la FAO en 1995 indicaban que de los aproximadamente 1300 millones de bovinos existentes en el mundo en esa fecha, un tercio se localizaba en áreas con tuberculosis erradicada, otro tercio en zonas donde la enfermedad está muy extendida aunque se desconoce su incidencia y el resto en áreas de alta incidencia. Globalmente se estima una prevalencia mundial del 5%, lo que equivale a más de 60 millones de bovinos afectados. En los países en vías de desarrollo la TB animal se distribuye ampliamente y no se aplican o son insuficientes las medidas de control previstas. Raramente se practica la pasteurización, favoreciendo los contagios por la vía digestiva.

En los países industrializados, los programas de control y erradicación de la TB animal, junto a la pasteurización de la leche por la industria, han reducido drásticamente la incidencia de la enfermedad producida por *Mycobacterium bovis*, tanto en el ganado como en humano. Dichos programas se basan generalmente en estrategias de diagnóstico y sacrificio. Sin embargo, la limitación de los test diagnósticos en las fases de menor prevalencia, unido a la presencia en determinadas regiones de reservorios salvajes o la actuación de otras micobacterias interfiriendo en el diagnóstico, -entre otros factores-. Han disminuido sobremanera la eficacia de dichos programas en algunas zonas, provocando un estancamiento e incluso el resurgimiento de la tuberculosis animal y humana. El diagnóstico laboratorial de tipo bacteriológico en estos casos es necesario, ya que permite un conocimiento exacto de la etiología al confirmar o descartar que los resultados de la tuberculina positivos sean debidos a *M. bovis* o a infecciones simples o mixtas en las que participan otras micobacterias, principalmente *M. avium* y en menor medida *M. tuberculosis*. En segundo lugar y no menos importante, con el conjunto de aislamientos obtenidos en una región podemos elaborar mapas epidemiológicos, aplicando técnicas de ingeniería genética que evalúan los polimorfismos del genoma de esta micobacteria.

La TB es uno de los principales agentes oportunistas en pacientes infectados por el virus HIV. El impacto de la pandemia de Sida sobre la TB ha sido tan significativo que tal asociación fue denominada por **Chretien (1990)** como "El dúo maldito". Mientras que una persona infectada de TB tiene un 10%

de posibilidad para desarrollar clínica tuberculosa, el riesgo aumenta al 50% en pacientes HIV+. Este mayor riesgo, unido a un periodo de incubación mas corto, han conducido a la aparición de algunos brotes de TB, como los descritos en New York (Rieder, 1994), que obligaron a las autoridades durante el periodo 93-95 al internamiento y tratamiento forzoso de 150 pacientes afectados de tuberculosis poli-resistentes con antecedentes de rechazo de terapia. La TB VIH asociada ha pasado de ser sólo un 4% del total de casos en 1990, hasta alcanzar el 14% (1,4 millones) para este mismo año. Resulta significativo que el 80% de esta cantidad se sitúen repartidos por igual entre África subsahariana y Sudeste Asiático, donde constituyen un problema sanitario de primera magnitud. No olvidemos que los movimientos migratorios más o menos controlados provenientes de estas zonas, son un claro riesgo de entrada de nuevas cepas con perfiles de patogeneidad y/o antibioresistencia desconocidos.

Parece estar reconocido que *M. bovis* es menos virulento que *M. tuberculosis* para el hombre y que la infección entre humanos es rara. Sin embargo, si esta aparente diferencia en la virulencia es el resultado de diferencias en la respuesta inmune defensiva de los individuos, la inmunosupresión-VIH-inducida podría estar cambiando este patrón de conducta, como lo demuestra la aparición cada vez mas frecuente de infecciones por *M. bovis* en estos pacientes. La resistencia intrínseca de *M. bovis* a la pirazinamida, uno de los fármacos de primera elección en la TB humana, podría limitar severamente la eficacia de los tratamientos de TB causada por esta bacteria.

Recientes datos publicados por la OMS en New England Journal of Medicine revelan que la resistencia a los fármacos contra la tuberculosis se está incrementando en todo el planeta. Este estudio, desarrollado en 35 países por la OMS entre 1994 y 1997, en colaboración con la "Unión Internacional contra la Tuberculosis y las Enfermedades Pulmonares", establece la aparición y expansión del SIDA como uno de los motivos principales del resurgimiento de la TB, ya que en muchos de los infectados por el VIH han surgido variantes resistentes que luego han contagiado a otras personas. Los porcentajes más altos de resistencia se han encontrado en la antigua Unión Soviética, República Dominicana, Argentina y el Sudeste Asiático, variando desde un 9% en pacientes sin historial de tratamiento previo hasta el 36% en aquellos que si lo había recibido. La infección VIH no parece causar "per se", fenómenos de resistencia, pero acelera sobremanera su difusión en comunidades susceptibles.

Teniendo en cuenta factores como la emigración, el turismo intercontinental y el comercio a escala mundial es factible que muchas variantes resistentes de la TB aparezcan en el mundo occidental . Como añadido, la OMS ha advertido sobre el riesgo de contagio de TB en aviones, donde recomienda que se instalen filtros de aire de la máxima eficacia, al tiempo que recuerda que 1400 millones de individuos se sube cada año en un avión, Toda persona aquejada de TB debe abstenerse de viajar en ellos mientras esté infectada, según la OMS.

MICOBACTERIAS: CONCEPTO Y TAXONOMÍA.

Según la última edición del Manual Bergey de Sistemática Bacteriana, el género *Mycobacterium* es el único dentro de la familia *Mycobacteriaceae*, la cual está encuadrada en el orden Actinomycetales, que incluye también los géneros *Corynebacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*. Todos ellos conforman el llamado grupo CNM.

Los requisitos básicos que debe ofrecer una bacteria para incluirse en el género *Mycobacterium* son: Alcohol-ácido resistencia, no formar esporas, conidios o cápsulas, ser inmóvil (carecen de flagelos), aerobia, Gramm positiva. Su morfología es la de bacilos rectos o curvados, presentando a veces forma cocobacilar, filamentosa o ramificada. El tamaño del soma bacteriano es de 0,2-0,6 x -10µm. El contenido en G+C es del 61-71 mol%.

Una característica singular de estos microorganismos es la elevada riqueza en lípidos de su pared bacteriana, que alcanza el 40%, a diferencia de las bacterias Gram positivas (5%) y Gram negativas (20%). Esta propiedad les permite crecer formando colonias hidrofóbicas sobre medios sólidos, o como filamentos de tipo fúngico en los caldos, de ahí su denominación con el prefijo griego "myco"-hongo. Además, la gran riqueza lipídica explica sus propiedades patógenas e inmunológicas y es la causa de su especial resistencia a la decoloración con soluciones de ácidos y alcoholes. Esto último es la base de los

métodos de tinción, entre los cuales el más conocido es el de Ziehl-Neelsen, por el cual se tiñen con un primer colorante básico que es retenido al someterlas a decoloración posterior con HCL 3% en etanol. Las micobacterias pueden ser teñidas con colorantes fluorescentes (auramina, rodamina),

De entre los lípidos, los micósidos de superficie (glucolípidos y peptidoglucolípidos) determinan los caracteres de las colonias, la especificidad serológica y la sensibilidad a los bacteriófagos. Se considera que cooperan en asegurar la supervivencia de las bacterias en el interior de los macrófagos. Las capas superficiales de ácidos micólicos ramificados de cadena larga y sus ésteres constituyen la mayoría de los lípidos de la pared bacteriana. En gran parte, la ácido-resistencia depende de estos componentes. Su síntesis es inhibida por la isoniazida. La cera D, autolisado de *M. tuberculosis*, contiene elementos de todas las fracciones de la pared celular, tiene actividad adyuvante, activa los macrófagos, estimula sobre todo las respuestas inmunes mediadas por células, incluida la alergia, de tipo retardado e induce la formación de granulomas. Uno de sus constituyentes, el "Cord Factor" o factor cuerda (6-6' dimicilil trealosa), inmoviliza los neutrófilos, actúa como adyuvante, induce respuestas granulomatosas y provoca una ruptura de las mitocondrias que ocasiona alteraciones de la respiración celular. A pesar de esta denominación, no se ha probado su relación con el crecimiento en forma de cuerda de las micobacterias.

Las micobactinas son aminas de la pared celular que intervienen en la captación del hierro. Están presentes en todas las micobacterias, con la excepción de *M. avium subsp paratuberculosis*. La existencia de pigmentos carotenoides en algunas micobacterias (en las cromógenas frente a las no cromógenas) y su dependencia de la luz (las fotocromógenas frente a las escotocromógenas) sirve, como veremos a continuación como criterio de clasificación.

En la actualidad han sido descritas más de 70 especies diferentes incluidas en la lista de nombres bacterianos del ICBS (International Committee on Systematic Bacteriology), las cuales pueden ser agrupadas de diferentes maneras según la característica que se valore.

En primer lugar podemos dividir las micobacterias de interés médico según el primitivo esquema de **Runyon**, basado en la pigmentación (positiva a la luz, fotocromógena; positiva a la oscuridad: escotocromógena, negativa: no cromógena) y en el tiempo de crecimiento óptimo, según se produjese en más de 7 días (lento) (grupo I-fotocromógenas-; grupo II-escotocromógenas-; grupo III -no cromógenas) o menos de 7 días (rápido) (grupo IV). En 1990, Casal adaptó esta clasificación, actualizándola a todas las especies conocidas hasta la fecha. De esta manera el grupo IV quedaba estructurado de la siguiente forma: grupo IV-fotocromógenas-: grupo V -escotocromógena-; grupo VI -no cromógenas-. Otro criterio más simple estaría basado en el mayor o menor grado de patogenicidad, dividiendo las micobacterias en patógenas y apatógenas. Relacionando esta premisa con el esquema clásico de Runyon, sobre un 15% de las especies de rápido crecimiento se han relacionado con enfermedad humana o animal. Por el contrario, un 78% de las de crecimiento lento están implicadas en algún tipo de proceso morboso. Las micobacterias apatógenas se aíslan del medio ambiente pero nunca de lesiones orgánicas. Su importancia radica en la posibilidad de que interfieran en las pruebas diagnósticas al sensibilizar al hombre y animales.

Por su capacidad de crecer en medios de cultivo inertes, todas las especies son cultivables, con la excepción de *M. leprae*, que ha de replicarse mediante inoculación en la almohadilla plantar de ratón (ensayos de rutina) o en el armadillo de 9 bandas, donde por su mayor sensibilidad puede multiplicarse en gran número con el fin de obtener antígeno reactivo para test cutáneos.

Algunas especies de micobacterias presentan una gran similitud entre ellas, al estar filogenéticamente muy próximas entre sí, con porcentajes de homología determinados por hibridación ADN-ADN entre el 20 y el 60%. Constituyen lo que se denomina un **Complejo**. Debemos señalar que porcentajes mayores del 60-70% permiten la estimación de dos microorganismos como pertenecientes a una misma especie.

Dentro del género *Mycobacterium* han sido establecidos los siguientes Complejos:

- **Complejo *M. tuberculosis***. Constituido por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, la cepa BCG de *M. bovis* y el reciente nuevo taxón *M. canetti*.
- **Complejo *M. avium-intracellulare***: *M. avium*, *M. avium subsp paratuberculosis* y *M. intracellulare*.

- **Complejo *M. fortuitum*:** *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. peregrinum* y *M. abscessus*.
- **Complejo *M. parafortuitum*:** *M. parafortuitum*, *M. auron*, *M. dierboferi*, *M. neoaurum* y *M. vaccae*.
- **Complejo *M. terrae*:** *M. terrae*, *M. nonchromogenium* y *M. triviale*.
- **Complejo *M. scrofulaceum*:** *M. scrofulaceum* y *M. simiae*.
- **Complejo *M. gordonae*:** *M. gordonae*, *M. szulgai* y *M. asiaticum*.
- **Complejo *M. Kansaii*:** *M. Kansaii* y *M. gastris*.

La taxonomía clásica se ha basado en el estudio de los caracteres fenotípicos, tales como el perfil de crecimiento o la medida de ciertas reacciones bioquímicas, como manifestación de su perfil enzimático. Mas aún, el análisis de los caracteres fenotípicos a nivel molecular (patrón antigénico, perfil de ácidos grasos, detección de enzimas, porcentaje G+C), e incluso el propio estudio genético-molecular (homología ADN-ADN, PCR), ofrecen la posibilidad de establecer las relaciones filogenéticas bacterianas entre individuos de forma rigurosa. Sobre esta base, especies integradas en un mismo complejo como *M. bovis* y *M. tuberculosis*, han sido consideradas "artificialmente" como especies distintas desde hace más de un siglo, siguiendo criterios más clínicos que taxonómicos, ya que la similitud de sus ADN es del 98%. Desde el punto de vista genético, y por tanto taxonómico, los bacilos tuberculosos de los mamíferos (Complejo *M. tuberculosis*) serían variantes de una sola especie, *M. tuberculosis*: variantes humana, bovina y murina.

Las micobacterias resisten la exposición durante 30 minutos a las soluciones de NaOH 1N o de HCL 1N, hecho éste que se aprovecha para eliminar los agentes contaminantes de las muestras. Asimismo, son resistentes a varios agentes antimicrobianos, colorantes bacteriostáticos y muchos desinfectantes. Los desinfectantes fenólicos son los más eficaces, siendo el fenol 5% el producto de elección para la desinfección de utensilios y superficies de trabajo. Le siguen en efectividad los aldehídos (formol), halogenados (hipoclorito sódico, povidona yodada). Carbanilidas y clorhexidina. De otro lado, resisten la desecación y sobreviven largo tiempo en el suelo. Son sensibles a la luz solar, radiaciones UV y a la pasteurización.

MICOBACTERIOSIS.

Como se ha referido con anterioridad, se conocen más de 70 especies diferentes de micobacterias, muchas de las cuales causan enfermedad en el hombre y animales. Desde un punto de vista clínico-médico, las micobacterias son divisibles en 3 grupos (Granje y Collins, 1983).

- 1.- **Los patógenos obligados.** Principalmente el *Complejo M. Tuberculosis* y *M. leprae* en la especie humana; *Complejo M. tuberculosis* (fundamentalmente *M. bovis*) junto al *Complejo M. avium* (*M. avium* y *M. avium subsp. Paratuberculosis*) en patología animal.
- 2.- **Especies que normalmente son de vida libre (micobacterias ambientales)**, pero pueden causar infecciones oportunistas e interferir en pruebas diagnósticas.
- 3.- **Especies que nunca o raramente provocan enfermedad.**

Las principales enfermedades producidas por algunas de las especies integradas en los dos primeros grupos son las siguientes:

TUBERCULOSIS HUMANA.

Debida fundamentalmente a *M. tuberculosis* (Koch, 1882) y en menor medida a *M. bovis* (Smith, 1886)(Karlson y Lessel 1970), *M africanum* (Castets y cols. 1969) y al reciente nuevo taxón *M. canetti* (Soilingen y cols. 1997), aislado inicialmente por Canetti en 1969. *M. tuberculosis* posee una estruc-

tura genética escasamente variable entre diferentes aislados, incluso obtenidos de diferentes continentes. Esto contrasta con su antigüedad, cifrada en 15.000-20.000 años, según estudios paleogenéticos, y la evidencia paleopatológica de su existencia en Egipto hace más de 5.000 años, en Europa 2.500 años a.C., e incluso en la América precolombina, a través del ADN detectado sobre lesiones pulmonares en momias peruanas con 1.000 años de antigüedad. Las características fenotípicas, la relación entre sus antígenos y la homología de los ADN (98-100%) de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, sugiere que ambos compartieron un mismo ancestro, debiendo ocurrir un fenómeno de especialización tras la domesticación del ganado hace 8.000-10.000 años.

Existen dos variantes mayores de *M. tuberculosis*—el tipo original descrito por Koch, virulento para el cobaya y extendido por todo el mundo—, y una 2ª variante recientemente descrita en el sur de la India y entre algunas etnias en Asia, atenuada para dicho animal, *M. africanum* es una especie heterogénea de características intermedias entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Han sido reportadas dos grandes variantes geográficas (tipo I y II)(Collins y cols. 1982), **M. bovis** ofrece dos variantes, la cepa clásica y la denominada BCG (Bacilo Calmette Guerin), cepa atenuada a partir de un cultivo patógeno de *M. bovis*, pero con características claramente diferenciadas del resto del complejo *M. tuberculosis*.

La TB se adquiere normalmente por inhalación de microgotas de unos 5mm que transportan unas pocas micobacterias, eliminadas con la tos por enfermos bacilíferos. El pulmón es el principal órgano afectado, aunque también pueden estar afectados los nódulos linfáticos, médula, riñón, sistema reproductor, intestino, piel y sistema nervioso central. La multiplicación de las micobacterias en el sitio de implantación conduce a la formación de una pequeña lesión llamada "foco de Ghon". El drenaje linfático conduce al transporte y multiplicación bacteriana en los ganglios regionales, produciendo su consiguiente afección. El conjunto formado por el foco de Ghon y los nódulos linfáticos afectados se denomina "Complejo Primario".

La TB causada por *M. bovis* es clínicamente indistinguible de la originada por *M. tuberculosis*. Globalmente supone alrededor del 3% del total de casos en humana (2,1% de las formas pulmonares y 9,4% de las extrapulmonares). En países donde no se ha controlado la *TB bovina*, un gran número de casos en personas jóvenes se deben al consumo o manipulación de leche sin pasteurizar procedente de vacas tuberculosas, manifestando linfadenopatía cervical, lesiones intestinales y TB crónica en la piel (lupus vulgaris). En regiones donde ha sido erradicada la TB del ganado, sólo un 1% de casos tienen su origen en *M. bovis* como reactivación de lesiones en fase de latencia.

El hombre y los primates no humano presentan bastante resistencia frente a *M. avium*, a no ser que estén gravemente comprometidos por el SIDA o alguna enfermedad boncopulmonar preexistente.

TUBERCULOSIS ANIMAL.

Producida por *M. bovis* en ungulados y carnívoros domésticos y salvajes, *M. avium* (Chester, 1901) en aves y *M. microtti* (Reed, 1957) en ratón campestre. De los más de 20 serotipos encuadrados en el complejo *M. avium-intracellulare*, solo los serotipos 1 y 3 son bacilos tuberculosis aviarios, *M. tuberculosis* puede transmitirse desde el hombre, aunque es menos virulento para la mayoría de especies animales, excepción hecha con el perro y primates no humanos.

M. bovis tiene la capacidad de infectar a un amplio rango de hospedadores. La enfermedad afecta primordialmente al ganado bovino, mientras que otras especies como la cabra, el cerdo, perro y gato alcanzan una susceptibilidad intermedia. En el extremo opuesto se sitúa la oveja, que parece manifestar cierta resistencia a la infección, tal como ocurre con los équidos. También se han descrito infecciones en papagayos y aves de rapiña. Entre otros animales silvestres, señalar principalmente los rumiantes (cérvidos, cabras, cebú, bisonte, búfalo, llama) y otros casos descritos en jabalí, lince, conejo, liebre, rata. Oryx, zorro, hurón, focas y elefante, así como en primates no humanos y felinos reclusos en parques zoológicos, tales como leones, tigres y leopardos. El test de Tuberculina no es efectivo en la mayoría de estas especies. Por esta razón, está siendo investigado el empleo de la vacunación como método de control en estas poblaciones.

Especial atención merecen dos especies silvestres: el tejón (*Meles meles*) y la zarigüeya (*Trichosurus vulpecula*). Ambos son considerados como reservorios y fuente de contagio de *M. bovis* en la especie bovina y hoy en día representan un problema para la erradicación de la TB bovina en Gran Bretaña e Irlanda, así como Nueva Zelanda, respectivamente. Concretamente en Gran Bretaña, un informe emitido por Sir John Krebs (**Krebs** y cols, 1997) a petición del gobierno británico, concluía que el tejón contribuye al mantenimiento de la TB bovina. Actualmente se desarrolla un estudio de campo distribuido en 30 áreas de 10Km² (10 tripletes de 3 áreas cada uno), donde se están desarrollando planes de eliminación de tejones con distinta intensidad, para poder establecer el grado de implicación de esta especie en la epidemiología de la TB bovina. Se esperan obtener los primeros resultados válidos a partir del año 2.002 (**Bourne** y cols, 2000).

M. bovis, es más virulento para los animales que *M. tuberculosis*. La TB clínica es una enfermedad debilitante que se caracteriza por adelgazamiento progresivo, apetito errático, fiebre irregular y, a veces, por síntomas localizados, como son un aumento del tamaño de los ganglios linfáticos, tos y diarrea. En los bóvidos, la infección suele concentrarse en el tracto respiratorio, las tonsilas y sus ganglios regionales, así como en las cavidades serosas, caracterizándose por la formación de granulomas nodulares conocidos como tubérculos. Cualquier territorio orgánico puede verse afectado, pero las lesiones se observan preferentemente en nódulos linfáticos (sobre todo bronquiales, mediastínicos y retrofaríngeos), pulmón, intestino, hígado, bazo, pleura y peritoneo. En el ciervo, estudios experimentales sugieren que la región tonsilar es un punto clave de infección primaria, debido a que los nódulos retrofaríngeos mediales, que drenan este área, están lesionados con frecuencia (**Cassidy** y cols, 1999). La infección de la ubre es rara (<2%), pero tiene claras repercusiones para la salud pública.

Estudios recientes han demostrado que la dosis infectiva guarda una estrecha relación con la gravedad de la enfermedad. Así, inoculaciones intratraqueales o intranasales de 10⁵-10⁶ ufc, originan múltiples lesiones difusas en el tracto respiratorio, y en ocasiones, TB clínica. Por el contrario, parece que la mayoría de infecciones naturales se inician con bajas dosis de *M. bovis* y en estas primeras semanas de infección cuando la excreción de micobacterias es más constante (**Morrison** y cols, 2000).

La infección por *M. avium* en bovino, generalmente es subclínica. Se presentan abortos, a veces de forma repetida, que podrían ser consecuencia de la localización de la bacteria en la pared uterina.

LEPRA HUMANA.

Causada por *M. Leprae* (**Hansen**, 1880, **Lehman** y **Neuman** 1896). Es la segunda enfermedad micobacteriana del hombre, con 6,5 millones de personas afectadas en 1994. En los roedores también puede producir infecciones limitadas. El armadillo de nueve bandas es sensible tanto a la infección natural como a la experimental.

Su cuadro clínico varía desde las formas lepromatosas, con multiplicación bacteriana abundante y lesiones poco circunscritas gobernadas por una discreta reacción inflamatoria, a la forma tuberculoide, donde las bacterias son escasas pero la respuesta inflamatoria celular es muy intensa. En esta fase se producen lesiones nerviosas que originan anestesia, parálisis, distrofia, deformidad y mutilación, en un curso que se prolonga durante años o décadas.

PARATUBERCULOSIS O ENFERMEDAD DE JOHNE DE LOS RUMIANTES.

Provocada por *M. avium* subsp. *Paratuberculosis* (anterior *M. paratuberculosis*) (**Bergey** y cols. 1923). Se trata de una infección crónica intestinal que afecta a un amplio número de especies, destacando especialmente los rumiantes domésticos (vaca, cabra, oveja, camello, llama, búfalo) y salvajes (ciervo, gamo, corzo, muflón, antílope, etc), donde dicha bacteria origina en adultos jóvenes un cuadro clínico típico, caracterizado por diarrea y adelgazamiento. También se ha aislado en especies monogástricas como el caballo, perro y cerdo, e incluso la gallina, produciendo infecciones sin desarrollo del cortejo clínico referido, aunque sumamente interesantes por su posible papel reservorio. Algunos investigadores cuestionen su relación con la enfermedad de Crohn humana, dada la similitud existentes con cepas

de crecimiento lento micobactina-dependientes aisladas en algunos pacientes así como la reacción serológica demostrada en estos frente a dichas cepas.

OTRAS MICOBACTERIOSIS.

De enorme auge en la actualidad, en especial en la especie humana, debido a la acción del *Complejo M. avium* como patógeno oportunista pulmonar en pacientes infectados por el virus HIV. A continuación describimos las principales Micobacteriosis secundarias en patología animal:

- **Lepra del gato y otras micobacteriosis felinas.** Es una infección nódulo-ulcerosa de la piel debida a una micobacteria no tuberculosa que se señala como procedente de Nueva Zelanda, Australia, Gran Bretaña, Holanda y Oeste de Norte América. Podría estar relacionada con micobacterias oportunistas de rápido crecimiento (Grupo IV de Runyon), así como con *M. lepraemurium*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. xenopi*, *M. ulcerans* y *M. thermoresistibile*.
- **Enfermedad parecida a la lepra en roedores.** Causada por *M. lepraemurium* (**Marchoux y Sorel**, 1912). A diferencia de *M. leprae*, éste puede cultivarse sobre medios inertes.
- **Linfangitis ulcerosa de los bóvidos por micobacterias.** Son lesiones cutáneas nódulo-ulcerosas, sobre todo en la parte distal de las extremidades y en la zona ventral del tronco. Se parecen a los tubérculos y es típico que contengan bacterias ácido-resistentes no cultivables. Su principal interés radica en las posibles reacciones falsas positivas en la prueba de tuberculina.
- **Linfadenitis en cerdos:** Provocada por *M. avium*.
- **Linfadenitis en ciervo:** Producida por *M. avium* y *M. bovis*.
- Micobacteriosis de peces y animales pioquilotermos. Causadas principalmente por *M. marinum* (patógenos para peces), *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare* y *M. xenopi*.
- **M. sylvaticum** ha sido aislado en palomas silvestres. Comparte algunos rasgos con *M. avium* y *M. avium subsp. Paratuberculosis*.

EL LABORATORIO BACTERIOLOGICO DE TUBERCULOSIS.

Cada administración, ya sea de salud pública como de sanidad animal ha de determinar según sus necesidades que nivel ha de alcanzar el servicio de diagnóstico laboratorial de tuberculosis. Tanto en países desarrollados como en aquellos en vía de desarrollo, han sido propuestos diversos sistemas de acuerdo a la complejidad diagnóstica que ofrezcan, y a lo largo de la historia podemos citar los del Servicio de Laboratorios de Salud Pública del Reino Unido (1966), el del Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta (1993), el de la Sociedad del Tórax Americana (1983) o el descrito por **Mitchison** (1982). Todos coinciden con el criterio definido por la OMS en 1993, de clasificar los laboratorios de acuerdo al riesgo de exposición a los agentes biológicos. Según esto, distinguimos 3 tipos de laboratorios de tuberculosis, según el nivel de contención alcanzado:

1.- Laboratorio de TB nivel 1:- Son generalmente habitaciones simples o parte de otro laboratorio en un escalón primario. Su trabajo se restringe a la toma y/o recepción de muestras, así como al envío de éstas a un laboratorio de nivel superior. Se encargan del almacenamiento y distribución del material utilizado en la toma de muestras. No realizan ningún examen bacteriológico específico.

2.- Laboratorio de TB nivel 2: Estas unidades son mayores que las anteriores, aunque son parte de un laboratorio de microbiología o patología mas complejo. El trabajo incluye el examen microscópico de preparaciones (tinción de improntas y cultivos) y en algunos, el cultivo de especímenes, aunque en la mayoría, estos cultivos son enviados a un laboratorio de grado superior para su incubación e identificación, en el caso de existir en la estructura. Este laboratorio necesitará como mínimo una estufa de incubación aeróbica, refrigerador y si es posible, cámara de flujo laminar de alta seguridad biológica y centrífuga refrigerada. Si han de procesarse las biopsias o muestras de tejidos, se requerirá un digesto Stomacher. El autoclave es imprescindible, pero puede estar situado en otra sala próxima. Es esencial la facilidad para el lavado de manos, tanto dentro como fuera de este habitáculo.

Según Casal (1991), entre los cometidos habituales de esta unidad tendríamos:

- Coordinador de laboratorios de nivel 1
- Adiestramiento del personal de nivel 1 y 2
- Recepción y procesamiento de muestras (Ziehl-Neelsen y Fluorocromos).
- Descontaminación y siembra.
- Envío correcto de cultivos a nivel 3
- Pruebas preliminares de identificación.
- Control bacteriológico de tratamiento y fichero de enfermos (en humana)
- Estadística bacteriológica de su zona.

3.- Laboratorio de TB Nivel 3: Estos laboratorios más especializados examinan preparaciones y cultivos de micobacterias. Algunos pueden no hacer nada más que esto y envían los cultivos a otros laboratorios N3 que continúan la identificación hasta el nivel de especie y realizan (en clínica humana) los ensayos de susceptibilidad antibiótica. El mayor grado de especialización lo alcanzan aquellos laboratorios dedicados a la investigación y/o formación, así como los laboratorios referencia, que pueden contar con una unidad especial dotada de instalación radioactiva (sistema radiométrico BACTEC).

El diseño de estos laboratorios se hará tendente a proteger a los trabajadores de la inhalación de aerosoles. Contrario a la creencia general entre los administradores sanitarios, ingenieros y arquitectos, los laboratorios N3 no necesitan sofisticados y caros sistemas de acondicionamiento de aire para conseguir la denominada "presión negativa". De hecho, muchos de los problemas y fallos de las cabinas de seguridad biológica en los nuevos laboratorios se atribuyen directamente a incorrectos gradientes de presión, a la vez que exponen a los trabajadores de otro lugar a riesgos frente a agentes aerógenos. En un laboratorio N3 debe producirse durante el tiempo de trabajo una extracción continua de aire fuera del edificio, a través de la cabina de flujo laminar de seguridad biológica y de un simple extractor situado en la pared o ventana. De esta forma, se establece un gradiente de presión proveniente del pasillo o de los laboratorios anexos, dirigido hacia la sala de nivel 3, y finalmente, fuera del edificio. Pese ello, resulta prudente en unidades N2 y N3, como medida añadida de protección personal, el uso habitual en todas las operaciones de mascarillas de protección individual. Todo laboratorio N3 tendrá al menos 5 áreas de trabajo bien definidas.

- Compartimento de recepción de muestras.
- Zona de trabajo en cabina de seguridad biológica.
- Area de tinciones con pila de desagüe.
- Area de microscopía, preferiblemente en la parte menos iluminada de la habitación, sobre todo se realiza fluorescencia.
- Zona limpia, donde se anotarán datos y registros.

Obviamente, deberá reservarse espacio en la planta para la restante equipación necesaria, como son la centrifuga refrigerada, estufa de incubación aeróbica, frigorífico, homogeneizador de tejidos (si fuera necesario), grifo lavamanos (independiente del fregadero de tinciones), cubeta para material desechable y armarios independientes para instrumental, reactivos y ropa de vestir.

Aunque la mayoría de las administraciones en países desarrollados son partidarias, debido a la legislación sobre riesgos laborales y exposición a agentes biológicos, que el trabajo con material tuberculoso se lleve a cabo en laboratorios de nivel 3, esto no siempre es práctico en los países en vías de desarrollo. La normativa española que regula esta materia es la Ley 31/95 sobre "Prevención de Riesgos Laborales" y el R.D. 664/1997 sobre "Protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes virológicos durante el trabajo". El artículo 3 del R.D., clasifica los agentes biológicos (bacterias y afines, virus y parásitos) en 4 grupos de peligrosidad creciente (1, 2, 3, 4), en función de que causen enfermedad en el hombre y/o colectividad y en la existencia de

un tratamiento o profilaxis eficaz. Según estos criterios, el Anexo II relaciona aquellos agentes biológicos adscritos a los grupos 2, 3 y 4. De entre ellos, citaremos a continuación las micobacterias contempladas por este R.D. y su grupo de pertenencia:

- *Mycobacterium africanum* (grupo 3) – vacuna disponible.
- *Mycobacterium avium intracellulare* (grupo 2).
- *Mycobacterium bovis* (excepto la cepa BCG)(grupo 3) –vacuna disponible-.
- *Mycobacterium chelonae* (grupo 2).
- *Mycobacterium fortuitum* (grupo 2)
- *Mycobacterium Kansaii* (grupo 2).
- *Mycobacterium leprae* (grupo 3).
- *Mycobacterium malmoense* (grupo 2).
- *Mycobacterium marinum* (grupo 2).
- *Mycobacterium microti* (grupo 3 –normalmente no infeccioso por el aire-.
- *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* (grupo 2).
- *Mycobacterium scrofulaceum* (grupo 2).
- *Mycobacterium simiae* (grupo 2).
- *Mycobacterium szulgai* (grupo 2).
- *Mycobacterium tuberculosis* (grupo 3) –vacuna disponible-.
- *Mycobacterium ulcerans* (grupo 3) –normalmente no infeccioso a través del aire.
- *Mycobacterium xenopi* (grupo 2).

Aunando la normativa española (R.D. 664/1997), las especificaciones de la OMS y de otras organizaciones (**Comisión de la UE, 1990**), describimos en la tabla siguiente las medidas de contención que deben reunir los laboratorios TB N2 y N3:

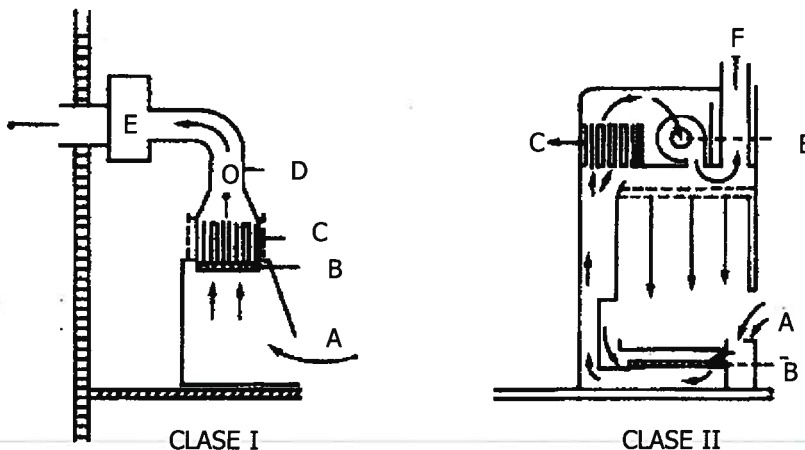
MEDIDAS DE CONTENCIÓN	NIVELES DE CONTENCIÓN	
	TB NIVEL 2	TB NIVEL 3
Lugar de trabajo separado del resto de actividades del laboratorio	No	Si
Zona de registro y anotación de datos independiente	No	Si
Acceso limitado al personal autorizado	Si	Si
El lugar de trabajo podrá precintarse para su desinfección	Si	Si
Lavabo para manos independiente	Si	Si
Ventanilla de observación que permita ver a sus ocupantes	Aconsejable	Aconsejable
Superficies impermeables al agua y resistentes a ácidos, álcalis, detergentes y desinfectantes	Si	Si
Laboratorio con equipo propio	No	Aconsejable
Aire acondicionado	No	Opcional
Aire recirculado en el edificio	Opcional	No
El lugar de trabajo se mantendrá con presión negativa respecto a la presión atmosférica	No	Aconsejable

MEDIDAS DE CONTENCION	NIVELES DE CONTENCIÓN	
	TB NIVEL 2	TB NIVEL 3
El aire introducido y extraído del lugar de trabajo se filtrará mediante filtros de alta eficacia para partículas en el aire (HEPA)	No	Si para la salida de aire
El material infectado, animales incluidos, deberá manejarse en cabina de flujo laminar de seguridad biológica o en un aislador apropiado	Cuando proceda	Si, cuando la infección se propague por el aire
Incinerador para destrucción de muestras, material y/o animales muertos	Aconsejable	Si(disponible)
Almacenamiento de seguridad para agentes biológicos	Si	Si
Control eficiente de vectores, roedores e insectos	Aconsejable	Si
Procedimientos de desinfección especificados	Si	Si

Hoy en día se ha generalizado y hecho imprescindible en los laboratorios microbiológicos el manejo de cabinas de flujo laminar de seguridad biológica. Existen tres clases de estas cabinas, pero únicamente las de clase I y II son útiles para los laboratorios de TB.

En las de Clase I (ver gráfico, según **Casal**, 1991), el aire penetra en la cabina procedente de la habitación a una velocidad de 0,7-1m/s, atraviesa la zona de trabajo y es expulsado por la parte superior a la atmósfera fuera del laboratorio, previo paso por un filtro HEPA (D), que retiene las partículas mayores de 0,3mm vehiculadas por el flujo de aire. Existe protección para el operario, pero no para la muestra que se puede contaminar con agentes provenientes del exterior. En el Reino Unido mantienen cierta preferencia por la utilización de éstas cámaras al trabajar con patógenos del grupo 3, pero esto no ocurre en EEUU o el resto de Europa, donde está generalizado el empleo de cabinas de clase II. En ellas, el aire filtrado desciende por la cabina en forma de flujo laminar, recoge los aereosoles y los transporte a través del filtro HEPA (B), siendo sometido a un proceso de recirculación interno. Entre un 20-30% (Clase IIA) o un 60-70% (Clase IIB) se expulsa al exterior, previo paso por un segundo filtro HEPA (C). Este aire vertido se compensa, obteniéndolo del ambiente a través de la rejilla (A), situada debajo del área de trabajo. Las cámaras de clase II ofrecen seguridad biológica tanto para la muestra como para el operario, ya que la acción conjunta de los dos filtros HEPA aseguran la producción de un aire de calidad "Clase 100" (eficacia mínima del 99,999% para partículas de 0.3mm). El factor de protección de estas cabinas debe cumplir las especificaciones exigidas a nivel internacional (British Standard BS-5726, DIN 12950, NSF Estándar 49 y AFNOR NFX-44-201).

CABINAS DE SEGURIDAD BIOLÓGICA, CLASE I Y CLASE II



TOMA DE MUESTRAS.

Los bacilos tuberculosos y otras micobacterias pueden estar presentes en casi cualquier material patológico, pero el éxito para detectarlos en preparaciones microscópicas y cultivos dependerá inicialmente del cuidado en la selección y recolección de muestras. Es imprescindible llevarla a cabo en las mejores condiciones, pues de ella dependerá en gran medida el posible éxito o fracaso del estudio bacteriológico.

Deben ser rechazadas todas las muestras que no estén en buenas condiciones, ya que los fenómenos de autólisis y putrefacción deterioran rápidamente la viabilidad de las micobacterias, favoreciendo la replicación de flora microbiana contaminante. Es preferible reclamar nuevas muestras tantas veces como sea necesario que procesar inútilmente una muestra estropeada.

En segundo lugar habrá de tenerse en cuenta la asepsia y en su caso, esterilidad en la obtención de la muestra. Esto último es especialmente importante para muestras que pueden considerarse estériles y sembrarse directamente, sin descontaminación previa; algunas habituales en medicina humana, como líquido cefalorraquídeo limpio, secreciones de cavidades cerradas, pus, biopsias y materiales procedentes de órganos no abiertos al exterior. Cuando se obtienen en mataderos sanitarios, se extremarán los cuidados para evitar la contaminación entérica cruzada. Todas las muestras deben tomarse en cantidad suficiente. Los envases de recogida serán estériles y de un tamaño apropiado.

En la selección de muestras obtenidas en matadero, se tendrán en cuenta algunos criterios expuestos a continuación. Será en principio sospechosa de TB toda nodulación o su acúmulo, más o menos organizada por una cápsula conjuntiva, conteniendo material caseificado, licuado y/o calcificado. El tamaño variará desde un grano de mijo, en la *TB miliar* (generalización precoz), hasta cavernas del tamaño de un puño que a veces ocupan un lóbulo pulmonar completo. La lesión más frecuente es un estadio intermedio en el que coexisten focos recientes y antiguos de distinto tamaño. Visto esto, resulta necesario palpar las vísceras con el fin de detectar los tubérculos profundos, e incluso si esta exploración resulta negativa, diseccionar transversalmente las mismas con varios cortes (en pulmón cada 1-2 cm.). En el tracto intestinal serán sospechosos de TB los engrosamientos focales o la aparición de úlceras en la superficie del epitelio. Finalmente, las vacas preñadas pueden tener afectado el útero.

En el bovino adulto, la infección primaria suele ser pulmonar, de presentación única o múltiple y puede manifestarse en cualquier lóbulo, pero predomina la localización subplerural a nivel de las porciones dorsales y ventrales de los lóbulos caudales. Podrán afectarse con menor frecuencia otros órganos, como hígado, bazo, riñón y glándula mamaria. También es común la alteración de serosas, especialmente pleura, donde se organiza formando acúmulos o nódulos calcificados (tisis perlada). La forma intestinal es secundaria, a excepción del ternero infectado por vía digestiva (lactación) u onfalógena.

La exploración ganglionar es básica, dado que en numerosos casos será la única lesión detectada (complejo primario incompleto), sobre todo en regiones de baja incidencia de TB, donde ocurre un incremento relativo de las infecciones por el complejo *M avium* frente a *M. bovis*. En todos los casos se examinarán los ganglios mandibulares, bronquiales, retrofaríngeos, mediastínicos, hepáticos/mesentéricos (sobre todo en jóvenes) y mamarios (si la palpación de la ubre lo aconseja), procediendo a su fileteado para detectar la presencia de granulomas. El aumento de tamaño (adenomegalia), cambio de aspecto externo y/o la presencia de encapsulaciones, calcificación, caseificación o edema serán buenos indicios de lesión tuberculosa.

Se adoptarán medidas de seguridad para evitar el contagio del personal que toma las muestras, por el carácter zoonótico de la TB. Esto obliga a respetar unas precauciones por parte del personal encargado de recogerlas, como son la manipulación provista de guantes, mascarilla y ropa adecuada. Al final de la tarea se destruirá todo el material desechable usado, y se desinfectará el instrumental quirúrgico por inmersión durante media hora en una solución acuosa de fenol al 5%.

Inmediatamente después de tomadas las muestras, se anotarán los datos del ganadero/paciente, el tipo de producto y la fecha de toma, debiendo enviarse al laboratorio en un plazo máximo de 24-48 horas, durante las cuales se conservarán en ambiente refrigerado (4°C). A esta temperatura y en ausencia de contaminación, se estima un plazo de supervivencia para las micobacterias de una semana.

TÉCNICAS MICROSCÓPICAS.

Hay dos métodos estandarizados para teñir las preparaciones de organismos ácido resistentes. La técnica de Ziehl-Neelsen (ZN) y la microscopía de fluorescencia (MF). La primera requiere un microscopio de luz ordinaria mientras que para la segunda se necesita una fuente de luz ultravioleta. Si se cuenta con ambos aparatos, la elección dependerá del número de preparaciones para examinar a la vez. Así, si su número no es muy grande, por ejemplo 10-12, el método de ZN será el elegido. Una cantidad mayor de preparaciones produciría fatiga para un solo operario, siendo preferible la MI.

En un estudio comparativo realizado por **Kubica** (1980), se señala que si tenemos como criterio de positividad en la MI, el visualizar al menos tres bacilos ácido resistentes fluorescentes, dicha técnica resultaba tan segura como el ZN. En cambio, en varios laboratorios británicos se ha informado que la MI arroja más "falsos positivos" que el ZN, por lo que recomiendan sobreteñir por ZN aquellas preparaciones positivas en MI.

METODO DE ZIEHL-NEESEN.

La propiedad de ácido resistencia fue descubierta por Paul Ehrlich en 1883, un año después del descubrimiento del bacilo tuberculoso por Robert Koch, Ziehl y Neelsen realizaron posteriormente las modificaciones a la técnica de Ehrlich, quedando como la conocemos hasta la fecha. Esta técnica se basa en la ácido alcohol resistencia de las micobacterias, las cuales, a diferencia del resto de las bacterias, consiguen resistir una decoloración posterior. El principio de todas las técnicas de tinción es el mismo; la impronta, frotis o cultivo fijado por calor al portaobjetos es teñido por un colorante arilmetano, como la fucsina; luego se lava con un ácido mineral diluido en agua o alcohol y finalmente se añade un segundo colorante de contraste.

Existen varias formulaciones diferentes de la fucsina básica, la mezcla decolorante y el colorante de contraste. Algunos técnicos prefieren contrateñir con verde malaquita para conseguir un fondo más suave. Otros, por el contrario, prefieren al azul de metileno cuando se espera una gran riqueza en micobacterias (color rojo), y así poder contrastar mejor la flora contaminante (color azul). El ácido pícrico produce un fondo amarillento.

Distinguimos dos métodos de ZN, según se aplique la fucsina en caliente o en frío:

Método tradicional (Fucsina en caliente.)

Por su importancia, será descrito el protocolo en su totalidad.

Reactivos:

- Solución de fucsina básica (fucsina básica: 5g. Fenol cristalizado; 25 g. Etanol 95° 50 ml., agua destilada: 500 ml.).
- Alcohol clorhídrico (ácido clorhídrico concentrado:30 ml, etanol 95°: 970 ml.)
- Colorante de contraste (azul de metileno hidrosoluble: 1,5 g./verde malaquita:2,5 g/ácido pícrico: 3,5 g, en 500 ml. De agua destilada.

Preparación de la muestra:

Cuando partimos de abscesos caseificados, deberán abrirse cuidadosamente con bisturí estéril en la cámara de flujo laminar. Rasparemos de la pared interior, extendiendo el producto en la superficie del portaobjetos a modo de fina capa. A partir de cultivos, emulsionaremos unas pocas colonias sobre una gota de agua destilada estéril depositada en el centro del portaobjetos. Los frotis se secan al aire sin emplear ninguna fuente de calor. Se fijan las extensiones en los portas pasando éstos varias veces sobre la llama del mechero sin quemar por la parte opuesta a la extensión.

Técnica:

Cubrir los portas con fucsina de Ziehl, previamente filtrada. Se quema alcohol en un hisopo metálico y con la llama se calientan los portas hasta que emitan vapores. Se repite la operación tres veces en un periodo de 3-5 minutos, dejando enfriar los portas antes de pasarlos de nuevo por la llama. Lavar

con agua corriente el exceso de colorante. A continuación se cubren con la mezcla de alcohol-clorhídrico, dejándola actuar durante 3-5 minutos. Se repite de nuevo la decoloración esta vez durante 2-3 minutos; se lavan y escurren de nuevo. Cubrir con el colorante de contraste (azul de metileno, verde malaquita o ácido picrico), permitiéndolo actuar 1-2 minutos. Lavar y secar.

Visualización:

Se observan en microscopio a 1000 aumentos con objetivo de inmersión, revisando aproximadamente 100 campos en cada portaobjetos. Se empieza por el borde superior izquierdo y se va avanzando lateralmente hasta acabar en el borde superior derecho. Las micobacterias aparecen como bacilos o cocobacilos de color rojo, a veces filamentosas, de pequeño tamaño (2-4mm de largo por 0,5mm de ancho), rectas o curvadas, a veces aisladas y en otras ocasiones formando acúmulos de localización preferentemente intracelular (en improntas de tejidos). Cuando la tinción se realiza a partir de un cultivo, a veces se observan bacilos débilmente acidoresistentes (parte de los organismos teñidos de azul o verde). Hay que tener cuidado, ya que pueden tratarse de cultivos puros o bien de contaminación.

Método de Tan Thiam Hok (Fucsina en frío).

Es una técnica útil en el campo, cuando resulta imposible realizar el calentamiento de la fucsina. Tiene únicamente dos pasos: colorear con una solución etanofenolada de fucsina básica, lavar y contrateñir con una solución ácida de azul de metileno.

TINCIÓN DE FLUORESCENCIA

Se basa, al igual que la tinción de Ziehl, en la ácido-alcohol resistencia de las micobacterias, que se tiñen con fluorocromo como la auramina fenolada (o una mezcla de auramina-rodamina) durante 15 minutos y se decoloran 2 minutos con alcohol clorhídrico (0,5% de clorhídrico en etanol 70°). Como colorante de contraste se emplea la naranja de acridina, dejándola actuar 2 minutos.

La visualización al microscopio debe hacerse inmediatamente después de teñir las preparaciones. Debemos de enfocar con luz UV utilizando un objetivo de pocos aumentos (objetivo 25X). Las micobacterias se visualizan de color amarillo.verdosas fluorescentes, sobre un fondo naranja o rojo fluorescente.

MÉTODOS DE CULTIVO E IDENTIFICACIÓN:

DESCONTAMINACIÓN:

Hay un grupo de productos patológicos humanos obtenidos de cavidades cerradas, que se consideran como no contaminados, tales como cavidad articular, líquido cefalorraquídeo, médula ósea, sangre y exudados. La riqueza en micobacterias de estas muestras es reducida, por lo que someterlas a un proceso de descontaminación sería innecesario, a la vez que contraproducente para el análisis. En cambio, otros proceden de cavidades abiertas al exterior o están muy contaminados "per se" (heces, orina, líquido bronquial). La mayoría de productos de patología animal remitidos al laboratorio para cultivo son cadáveres y tejidos obtenidos en matadero o a través de necropsias realizadas en campo y laboratorio. Suelen contener numerosos microorganismos que se multiplican rápido y contaminan los medios de cultivo para micobacterias, consumiendo sus nutrientes con anterioridad al crecimiento de éstas.

Estos productos deben ser tratados con el fin de eliminar o reducir la contaminación pero preservando la integridad de las micobacterias. El crecimiento de estos microorganismos se puede suprimir en parte con el uso de un "cocktail antimicrobiano". Sin embargo, no hay antibióticos ni colorantes, solos o combinados que puedan suprimir completamente el desarrollo de ciertos gérmenes (por ejemplo Pseudomonas, algunas enterobacterias, estreptococos, levaduras y hongos). Algunos laboratorios cifran como aceptable una contaminación del 2-3% de los cultivos de muestras en estado fresco. Si el estado de conservación es mediocre al haber transcurrido varios días desde la toma sin mantener la cadena de

frío, esta cifra puede dispararse. Se podría asegurar que un laboratorio que afirme no sufrir contaminación de los cultivos, está usando probablemente un método que destruye muchas micobacterias.

El segundo objetivo del procedimiento de descontaminación es el de reducir la viscosidad de la muestra, que posibilite un mejor arrastre por centrifugación de la mayoría de las micobacterias liberadas. Esta "liberación" se acrecienta homogeneizando previamente la muestra en PBS estéril mediante digestor Stomacher, al provocar una lisis suficiente en el tejido, pero evitando que sea muy enérgica para generar daño bacteriano.

La descontaminación se realiza sometiendo a la muestra, previamente homogeneizada, a la acción de soluciones ácidas o alcalinas, o bien de agentes tensioactivos. Estos últimos presentan la ventaja de no exigir un lavado posterior de la muestra cuando ésta va a ser sembrada sobre un medio de cultivo sólido a base de huevo, puesto que los fosfolípidos de la yema neutralizan de manera adecuada los agentes tóxicos. Se han descrito numerosos métodos de descontaminación, aunque sólo unos pocos han demostrado ser efectivos. A grandes rasgos, la diferencia primordial entre unos y otros consiste en la intensidad del tratamiento y en la práctica o no de centrifugación. De este modo, un tratamiento "débil" produce un efecto mínimo sobre las micobacterias y otros gérmenes contaminantes. Será recomendado cuando presumamos que la muestra esté poco contaminada y ofrezca un óptimo estado de conservación, factores que no suelen concurrir en las procedentes de necropsia o matadero. Un tratamiento "enérgico", destruirá a la vez los bacilos ácido-resistentes y la flora contaminante, debiéndose controlar cuidadosamente el tiempo de exposición.

Después del tratamiento habremos de centrifugar, siempre por encima de 2000 rpm, a fin de concentrar en lo posible las micobacterias existentes. Para evitar la exposición a los aerosoles, frecuentes en los procesos de agitación y centrifugación, trabajaremos en cabina de seguridad biológica y centrifugaremos los tubos en el interior de buckets sellados de seguridad.

Entre los principales métodos descritos señalamos a continuación los de uso habitual:

CON CENTRIFUGACIÓN:

- Método de Petroff:

Es el utilizado en las muestras procedentes de matadero y necropsias animales. Como descontaminante y homogeneizante se utiliza una solución de hidróxido sódico al 4%. Una concentración mayor resultaría más homogeneizante, aunque también más letal para las micobacterias, mientras que una concentración menor no provocaría una buena homogeneización. Después del tratamiento con hidróxido sódico (15-30 minutos), se añade agua destilada estéril, se centrifuga (3000 rpm, 15 minutos) y neutralizamos el sedimento con ácido sulfúrico al 10-15% o ácido clorhídrico 2n. El sedimento es sembrado una vez que el pH alcance el rango de 6,5-7,2.

- Método de Kubica modificado por Krasnoww:

En este procedimiento se utiliza una sustancia homogeneizante, la cisteína y otra descontaminante, el cloruro de benzalconio, que sustituye al hidróxido sódico y es menos agresivo para las micobacterias.

- Método de Tacquet y Tison:

En esta técnica se utiliza, al igual que en la de Petroff, hidróxido sódico aunque más diluido (1%), y además, laurilsulfato sódico, con lo que se consigue la descontaminación y fluidificación. Para neutralizar se utiliza ácido ortofosfórico, con púrpura de bromocresol, como indicador de pH.

- Método del ácido oxálico:

Está recomendado para muestras de humana (esputos), presuntivas de contener *Pseudomonas sp.*

- Método de Teepol:

Es una técnica que por su gran poder descontaminante (hidróxido sódico+teepol 410), suele reservarse para productos pluricontaminados, tales como heces.

- Método Löwenstein (ácido sulfúrico).

Este método se utilizará en muestras patológicas que no necesiten homogeneización sino solo descontaminación, ya que el ácido sulfúrico al 4-15% sirve únicamente para descontaminar y es poco agresivo para las micobacterias.

SIN CENTRIFUGACIÓN.

Descontaminamos alternativamente con hidróxido sódico o fosfato trisódico. Las micobacterias son concentradas mediante una técnica de floculación, añadiendo una solución 1,5% de cloruro cálcico y 1,5 % de cloruro de bario. El sedimento floculado se extrae con una pipeta estéril.

Para la descontaminación de muestras sospechosas de albergar flora contaminante usaremos uno de los métodos descritos anteriormente. Sin embargo, es conveniente conservar la mitad de la muestra a 4°C, por si hemos de repetir el proceso con otro método en caso de que los cultivos se contaminen por el primero empleado.

CULTIVO Y AISLAMIENTO DE LAS MICOBACTERIAS.

Las técnicas clásicas de cultivo de material clínico sobre medios selectivos o de enriquecimiento y el subcultivo posterior para obtener cultivos puros, no pueden aplicarse a la bacteriología de tuberculosis. La mayor parte de las micobacterias patógenas crecen lentamente, tardando dos a seis semanas e incluso más en manifestar un crecimiento visible.

Muy diferentes medios han sido formulados para el crecimiento de los bacilos tuberculosis y otras micobacterias, pero hoy día sólo se emplean unos pocos, tanto sólidos como líquidos. Entre los primeros predominan aquellos a base de huevo, como el de Löwenstein-Jensen, Coletsos y Stonebrink. La adición de piruvato sódico como estimulante del crecimiento de *M. bovis* fue introducida por Stonebrink, haciendo a este medio y al Coletson idóneos para el aislamiento de esta bacteria. El Löwenstein-Jensen puede ir adicionado de glicerol (LIG) o de piruvato (LIP) convirtiéndole en óptimo para *M. tuberculosis* y *M. bovis*, respectivamente. Otras micobacterias de interés patógeno como el *M. avium complex* crecen mejor con la adición de piruvato sódico, aunque también son capaces de utilizar el glicerol como fuente de carbono.

Una segunda clase de medios sólidos muy enriquecidos están compuestos por una base de agar a la que se añade un suplemento OADC (ácido oléico-albúmina-dextrosa-catalasa) disponible comercialmente, en una mezcla antibiótica inhibidora constituida por polimixina B, carbenicilina, trimetoprin y anfotericina (**Mitchinson**, 1983). Entre ellos, destacamos el Middlebrook's 7H10 y su modificación 7H11. Se emplean en la recuperación de bacilos poco viables.

Los medios líquidos permiten emplear mayores inóculos procedentes de fluidos poco contaminados (peritoneal, pleural, pericárdico, cerebrospinal). Los principales son el Middlebrook 7H9, el del Kirchner, -adicionado de la mezcla antibiótica de Mitchinson-, el de Dubos, que contiene el detergente Tween 80 para evitar el crecimiento en forma de película y facilitar los estudios cuantitativos.

Se deben emplear tubos de cierre hermético, en lugar de placas de Petri, para evitar la desecación del medio y la eliminación de aerosoles. Además, necesitan de grandes inóculos que han de distribuirse por toda la superficie del medio. Un error, muy común es usar inóculos pequeños. Es recomendable inocular con pipeta Pasteur en vez de asa de siembra, volúmenes de 0,2-0,4 ml de centrifugado. En el caso de los medios líquidos, la cantidad indicada sería 1 ml. Deben sembrarse al menos dos tipos diferentes de medio de cultivo. Si el inóculo no puede sembrarse inmediatamente, lo congelaremos a -20°C.

Los tubos inoculados se mantienen en posición horizontal con su tapón entreabierto, por un periodo de 1-2 horas, facilitando la absorción del inóculo. Tras este periodo, se incuban en estufa a 35-37°C colocados en posición vertical, hasta la aparición de colonias individuales. La instalación de una fuente de luz en el interior de la estufa de incubación, facilita la pronta detección de especies fotocromógenas. También se consigue fuera de la estufa, exponiendo el cultivo en pleno crecimiento a una lámpara de 40W durante 60 minutos, separado a una distancia de 50cm, y volviéndolo a incubar normalmente. Si la cepa adquiere pigmentación, se dice que presenta fotoinducción positiva (fotocromógena). Su coloración

variará del amarillo anaranjado, por la acción de los carotenos, al rosado, debido al licopeno. El segundo grupo (escotocromógenas) comprende a las especies que se pigmentan en la oscuridad. Esta característica se comprueba cubriendo el tubo con papel de aluminio o papel negro, evitando de esta forma que sea fotoinducido.

Debemos asegurar que los cierres estén bien ajustados, ya que el consumo de oxígeno, –e incremento de dióxido de carbono–, general una atmósfera microaerófila estimuladora del crecimiento micobacteriano, en especial con cepas de *M. bovis*. De este modo, si la estufa lo permite, los tubos serán incubados durante la primera semana con los tapones de rosca aflojados, en una atmósfera que contenga un 10% CO₂, para posteriormente apretarlos a fin de prevenir la desecación.

Los cultivos se examinarán a los 3 días, desechándose aquellos que demuestren una contaminación obvia, como por ejemplo hongos, medios licuados o cambiados de color (verde oscuro) debido a la acidificación. Se examinarán más detenidamente aquellas colonias confluyentes de un tono amarillo, naranja o rosáceo, ya que podrían tratarse de micobacterias ambientales. El resto de cultivos se inspeccionarán semanalmente, hasta un periodo de 6, 8 e incluso 12 semanas. Las colonias sospechosas serán confirmadas mediante Ziehl-Neelsen.

IDENTIFICACIÓN.

Una vez realizado el aislamiento, se debe llevar a cabo la identificación del mismo. La pauta a seguir en la identificación de una micobacteria sigue una metódica consistente en la apreciación inicial de unas características fenotípicas tales como su morfología, tipo de crecimiento o la coloración de las colonias, realizables en un laboratorio de microbiología sencillo. A continuación ha de evaluarse el patrón bioquímico de la cepa, esencial en la diferenciación de los miembros del Complejo *M. tuberculosis*. Esta fase requiere una mayor capacidad técnica, pero permite la diferenciación a nivel de especie. Laboratorios más sofisticados, –normalmente de referencia–, utilizan sistemas radiométricos, sondas de ADN y tecnología de amplificación, encaminados a la detección rápida del crecimiento y/o genoma micobacteriano. Esta tecnología se aplica actualmente al diagnóstico de la TB humana, al conjugar a la vez rapidez y fiabilidad. Por último, algunos centros de investigación llevan a cabo la tipificación de cepas del Complejo *M. tuberculosis* mediante ingeniería genética, diferenciando así subpoblaciones microbianas intraespecíficas con el fin de elaborar mapas epidemiológicos.

MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS SIMPLES.

Son el primer paso en la identificación de una micobacteria y reúnen una serie de observaciones fáciles de realizar pero de gran interés diferencial. **Casal** (1991), señala las siguientes:

- Emulsionabilidad de las colonias en agua destilada.
- Morfología y tinción de la cepa de micobacteria según las tinciones de ZN y fluorocromos.
- Morfología de las macrocolonias y microcolonias. Sobre medio Löwenstein-Jensen, *M. bovis* produce colonias pequeñas (1mm), lisas, aplanadas, pálidas y húmedas, adheridas al medio y a veces con una papila central en cultivos envejecidos. *M. tuberculosis* ofrece colonias rugosas, con aspecto de miga de pan, y no se adhieren al medio. *M. avium* presente colonias lisas, cremosas o lobuladas.
- Termoresistentes a 60°C durante 4 horas.
- Formación de cuerdas o cordones (cord factor). Ausente en la mayoría de las micobacterias atípicas.
- Crecimiento en diferentes medios de cultivo.
- Pigmentación de las colonias: fotocromógenas, escotocromógenas, no cromógenas.
- Velocidad de crecimiento: rápida (<7 días) y lenta (>7 días). *M. avium* crece en 7-15 días, mientras que *M. tuberculosis* *M. bovis* lo hacen con posterioridad a los 15 días, pudiendo

alcanzar hasta 2 meses.

- Temperatura óptima de crecimiento. El grupo de las mesófilas (37°C) es el más numeroso. Entre ellas *M. bovis* y *M. tuberculosis* son estrictas (crecen a 37°C pero no a 22°C y 45°C), mientras que *M. avium*, lo puede hacer hasta 45°C.
- Apetencia de oxígeno: *M. tuberculosis* es aerobio, a diferencia de *M. bovis* o *M. avium*, que son microaerófilos. En un medio de cultivo semisólido, el primero crece como una película en superficie y los segundos en el fondo. En los medios a base de huevo y glicerol, los aerobios producen un crecimiento abundante y los microaerófilos discreto, Estos dos maneras de crecer se denominan "eugónica" y "disgónica".

MÉTODOS BIOQUÍMICOS Y ENZIMÁTICOS.

Los métodos convencionales se basan en el resultado de diferentes ensayos bioquímicos y enzimáticos, ofreciendo un perfil metabólico del aislado para su diferenciación a nivel específico. Son imprescindibles para distinguir entre miembros del Complejo *M. tuberculosis*. Los principales son:

■ PRUEBA DE LA NIACINA.(Konno, 1956)

Se basa en la propiedad de algunas micobacterias para descomponer a 68°C el peróxido de hidrógeno, liberando oxígeno molecular en forma de espuma gaseosa. *M. tuberculosis* y *M. bovis*, son negativas, a la vez que el *M. avium* es positivo.

■ ACTIVIDAD NITRATASA (Bönicke, 1962).

Consiste en la reducción de los nitratos a nitritos mediante las enzimas nitrato reductoras. Algunas cepas también poseen nitrito reductasas, pudiendo reducir el nitrito a nitrógeno libre. En el primer caso, la reacción positiva se manifiesta al reaccionar el nitrito sódico formado por acción de las primeras enzimas, con una amina aromática en medio ácido, generando cloruro de diazonio. Este compuesto al unirse al reactivo N-naftil-propilendiamina, forma un derivado azoico de color rojizo. En el segundo caso, cuando añadimos polvo de Zn el líquido permanecerá incoloro, al no quedar nitritos (por acción de la nitrito reductasa), lo que será índice de positividad. *M. tuberculosis* es positivo a la nitrata, mientras que *M. bovis* y *M. avium* son negativos.

■ RESISTENCIA A LA TCH (Hidracida del ácido 2-tiofenocarboxílico)(Harrington y Karlson, 1966).

Consiste en la observación del crecimiento o inhibición de las micobacterias frente a una concentración 10mm de TCH. *M. tuberculosis* y *M. avium* son resistentes. Por el contrario, *M. bovis* es sensible. Sin embargo, hay que hacer la salvedad de que la resistencia a la isoniazida implica resistencia también al TCH, por lo que esta prueba no es valorable en cepas de *M. bovis* resistentes a la isoniazida. Asimismo, *M. bovis*, es sensible a la hidracida del ácido isonicotínico (1 mg/ml), al ácido paraaminosalicílico (2 mg/ml) y a la streptomicina (2 mg/ml),

■ PRUEBA DE LAS AMIDASAS (UREASA, NICOTINAMIDASA, PIRAZINAMIDASA) (Bönicke, 1962).

Se basa en la habilidad de las micobacterias para hidrolizar varias amidas en ácidos orgánicos libres y amoniaco. El estudio de las actividades enzimáticas frente a 10 amidas, -entre ellas urea, nicotinamida y pirazinamida-, se comprueba mediante una serie de reactivos adecuados (Nessler o Russell), que reflejan la presencia de amoniaco producido al desaminar una u otra amida problema. El perfil enzimático de las tres especies es el siguiente:

- Ureasa: *M. tuberculosis* y *M. bovis* positivos. *M. avium*, negativo.
- Nicotinamidasas y Pirazinamidasas: *M. tuberculosis* positivo y *M. avium*, negativo.

■ UTILIZACIÓN DEL PIRUVATO.

M. bovis generalmente crece mejor sobre medios que incluyen piruvato, al preferirlo como fuente de carbono respecto al glicerol. La prueba consiste en la inoculación de dos medios (con y sin piruvato) durante 28 días, a 37°C, tras lo cual se compara el grado de crecimiento alcanzado en ambos.

■ RESISTENCIA A LA PIRAZINAMIDA.

Está basada en la facultad de determinadas micobacterias para desarrollarse en un medio que contiene pirazinamida ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ de medio). *M. bovis* es resistente a este antibiótico, mientras que *M. tuberculosis* resulta sensible.

■ SENSIBILIDAD A LA CICLOSERINA

Rist y cols (1967) demostraron que la cepa BCG de *M. bovis* era resistente a la cicloserina, a diferencia del resto de miembros del Complejo *M. tuberculosis*. Es por tanto una prueba básica en la distinción de *M. bovis* (sensible) y BCG (resistente).

TÉCNICAS ESPECIALES.

Sólo se utilizan en centros muy especializados o de investigación, pero no de forma rutinaria.

CROMATOGRAFÍA DE LÍPIDOS.

Marks y Szulga (1965) y **Jenkins (1981)** mostraron que las micobacterias se podrían identificar usando la técnica de cromatografía en capa fina para averiguar su patrón lipídico y compararlo con el de las cepas de referencia. No debemos olvidar que los lípidos son parte esencial en la constitución de estas bacterias y llegan a suponer incluso un 20-40% de su peso seco. Este método es particularmente útil en la identificación de especies inusuales en humana *M. malmonaense* y *M. szulgai*, y para distinguir entre varias especies de rápido crecimiento. Los solventes empleados dependen del grupo de micobacterias que se vaya a estudiar.

SISTEMA RADIOMÉTRICO.

El ácido palmítico marcado con C-14 existente en el medio de cultivo (Middlebrook 7H12) es metabolizado por la micobacteria en su crecimiento y el C-14 se libera en forma de CO_2 marcado. Dicha actividad se mide en un sistema de cámara iónica (sistema comercial automatizado BACTEC), que expresa dichos registros como índice de crecimiento IC. El método radiométrico BACTEC está especialmente calibrado para medir el IC de *M. tuberculosis*. En el caso de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana (en humana), cuando un determinado antibiótico al que es sensible la micobacteria está presente en el medio de cultivo, ocurre una disminución en la generación de CO_2 marcado, manifestando lo contrario en caso de resistencia.

Las principales ventajas del sistema radiométrico. Son primeramente el importante ahorro en tiempo para obtener los resultados del cultivo (5-7 días) y las pruebas de sensibilidad (4-5 días). Asimismo el método es aplicable en la detección de micobacterias procedentes de muestras clínicas. Por el contrario, es bastante sensible a la presencia de contaminación, lo que añade una seria desventaja para fines veterinarios. Además, su costo es elevado y necesita de una instalación y técnicos especializados en manejo de isótopos radiactivos.

HIBRIDACIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ACIDOS NUCLÉICOS, SONDAS DE ADN.

La utilización de sondas se basa en la habilidad de una cadena simple de ADN (o ARN) de unirse (hibridación) a otra cuya secuencia de bases sea complementaria. Este fenómeno se empleó en la identificación de micobacterias a principio de los años setenta. En estos estudios, el ADN estaba representado por la totalidad del genoma fijado a una membrana, y se medía el grado de unión (homología) de cadenas marcadas con isótopos, pertenecientes a especies conocidas. Esta homología daba una idea de la proximidad genética, que era elevada entre especies, moderada dentro de los grupos de micobacterias de rápido y lento crecimiento, pero baja entre estos dos grupos.

Con la introducción de las técnicas de ingeniería genética, fue posible clonar pequeños fragmentos de ADN y obtener la suficiente cantidad para el desarrollo de reactivos. Examinando "librerías" de tales clones, se pudieron seleccionar aquellos que están relacionados a una sola especie. Al principio, las sondas estaban marcadas con isótopos, pero hoy en día incorporan marcadores no radiactivos, como los enzimáticos o el éster de acridina (quimioluminiscencia). Entre estos últimos, el sistema comercial GEN PROBE (bioMérieux) es el de uso más difundido, y cuenta con sondas para la identificación del cultivos

pertenecientes a Complejos micobacterianos (*Complejo M. tuberculosis* y *Complejo M. avium*) o especies aisladas (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. Kansaii* y *M. gordonae*). Desafortunadamente para el diagnóstico en veterinaria, las sondas no permiten la diferenciación entre miembros del Complejo *M. tuberculosis*.

Las técnicas de amplificación, tales como la PCR (reacción en cadena de polimerasa), LCR (reacción en cadena de la ligasa), Q Beta replicasa, SDA (Strand displacement amplification) o la TMA (transcription-mediated amplification), se basan en explotar "in vitro", la capacidad de replicación del ADN (PCR) o del ADN ribosomal (TMA), con el fin de producir grandes cantidades de una secuencia determinada de ácido nucleico, dentro de una mezcla compleja de secuencias heterogéneas. La identificación del producto obtenido se confirma mediante hibridación con sondas de ADN. Su mayor ventaja es la gran sensibilidad (superior al cultivo) y la especificidad, siempre que se minimicen las sustancias interferentes e inactiven las nucleasas que pueden digerir los ácidos nucleicos.

En el campo de la micobacteriología existen kits comerciales (MTD-GEN PROBE) que emplean la tecnología TMA (amplificación del ARN ribosómico), para detectar secuencias diana del *Complejo M. tuberculosis* en muestras humanas. Algunos estudios (**Pfyffer y cols**, 1996), demuestran que es una técnica sensible y específica para la detección rápida del Complejo *M. tuberculosis* en una gran variedad de especímenes clínicos. Podría tener cierta aplicación en el laboratorio veterinario, pero al no diferenciar los miembros de dicho complejo, sería necesariamente un test complementario al cultivo.

Una técnica PCR, aplicada sobre tejidos animales se ha empleado en la investigación de *M. bovis* (**Wards y cols**, 1995). El método fue capaz de detectar todas las muestras microscópicamente positivas por ZN y la mayoría de los tejidos, con microscopio negativa y cultivo positivo. Se calcula una sensibilidad de 200-500 organismos/100µl de tejido homogeneizado, cifra muy próxima a los 50-150 ofrecidos por diversos autores con tests PCR de *M. tuberculosis* (**Buck y cols**, 1992).

MARCADORES EPIDEMIOLOGICOS.

M. bovis es capaz de infectar una gran variedad de especies animales, tanto domésticas como silvestres. Por este hecho, resulta de indudable interés en la epidemiología de la TB, proceder a una diferenciación de cepas que nos permita aproximarnos a las rutas de transmisión de la enfermedad.

Las cepas de *M. bovis* son muy uniformes y no se diferencian fenotípicamente, por serotipificación ni por fagotipificación. La ingeniería genética ha puesto a punto técnicas de tipificación, basadas en las diferencias genéticas entre aislamientos (polimorfismos del ADN). La más utilizada es el RFLP (restriction fragment length polymorphism), también denominada DNA Fingerprinting. Consiste en poner de manifiesto ciertos fragmentos polimórficos de restricción mediante el uso de sondas específicas dirigidas a determinados elementos genómicos. Será necesario en un primer paso digerir el ADN, y a continuación hibridar con sondas que reconocen diversos marcadores genéticos.

En el complejo *M. tuberculosis* han sido identificados entre otros, tres marcadores distintos que permiten la diferenciación entre cepas:

Secuencia de inserción IS6110 (**Thierry y cols**, 1990). La gran mayoría de cepas de *M. bovis* presentan una sola copia, especialmente las de origen bovino. En cambio las procedentes de caprino y de algunas especies silvestres pueden portar varias copias.

Secuencias cortas repetitivas DR. Son secuencias de 36pb directamente repetidas, que se localizan en una posición única del cromosoma, adyacente a la secuencia IS6110, en número variable. Se ha utilizado con éxito en la tipificación de cepas del *Complejo M. tuberculosis*.

Repeticiones polimórficas ricas en G+C.

La técnica RFLP se emplea habitualmente en estudios epidemiológicos en TB humana. En cambio, son muy limitados los trabajos desarrollados sobre *M. bovis* (**Cousins y cols**, 1993; **Liébana y cols**, 1996), aunque con enormes posibilidades futuras. Entre las técnicas de PCR utilizadas en la tipificación de micobacterias del *Complejo M. tuberculosis*, destaquemos una primera sobre el marcador genético IS6110 (**Ross y Dwyer**, 1993) y una segunda conocida como DVR-Spoligotyping (Groenen y cols, 1993) basada en los polimorfismos existentes en la región genómica DR.

BIBLIOGRAFIA.

Bergey, D.H., Harrison, F.C., Breed, R.S., Hammer y Huntoon (1923) Manual of determinative bacteriology, 1st edn Baltimore: Williams y Wilkins.

Bönicke, R (1962), Report on identification of mycobacteria by biochemical methods. Bulletin of the international union against tuberculosis, 32, 13-68.

Bourne, J., Donnelly, C.A., Cox, D.R., Gettinby, G., McInerney, J.P., Morrison, L y Woodroffe, R (2000). Bovine tuberculosis towards a future control strategy. Veterinary Record, 146, 207-210.

Buck, G.E., O'Hara, L.C. y Summersgill, J.T. (1992). Rapid, simple method for treating clinical samples containing Mycobacterium tuberculosis remove DNA for polymerase chain reaction. J. Clin Microbiol, 30:1331-1334.

Canetti, G. Y Grosset, J.(1968). Techniques et indications des examen bactériologiques en tuberculose. Ed. La tourelle. St. Mande.

Casal, M (1991). Microbiología clínica de las enfermedades por micobacterias. Universidad de Córdoba.

Cassidy, J.P., Bryson, D.G. y Neill, S.D. (1999). Tonsillar lesion in cattle naturally infected with Mycobacterium bovis. Veterinary Record, 144, 139-142.

Castets, M., Rist, N. Y Boisvert, H. (1969). La variété africaine du bacille tuberculeux humain. Medicine d'Afrique Noir, 16, 321-322.

Chester, F.D. (1901). A manual of determinative bacteriology. New York. MacMillan, p356.

Chretien, J. (1990). Tuberculosis and HIV. The cursed duet. Bulletin of the international union against tuberculosis and lung diseases. 65 (I), 25-28.

Collins, C.H., Yates, M.D. y Grange J.M. (1982). Subdivision of Mycobacterium tuberculosis into five variants for epidemiological purposes :methods and nomenclature. Journal of Hygiene, 89, 235-242.

Commission of the European Communities (1990). Council directive on the protection of workers from the risks related to exposure to biological agents at work. Official Journal of the European Communities L374 of 31 december 1990.

Cousin, D.V., Williams, S.N., Ross, B.C. y Ellis, T.M. (1993). Use as a repetitive element isolated from M tuberculosis in hybridisation studies with M. bovis a new tool for epidemiological studies of bovine tuberculosis. Vet. Microbiol, 37 (1-2). Pp. 1-17.

Granje, J.M. y Collins, C.H. (1983). Mycobacterial pathogenicity and nomenclature the "nyrocine mycobacteria". Tubercle, 64, 141-142.

Groenen, P.M.A., Bunschoten, A.E., Van Sooligen, D. Y Van Embesen, J.D. (1993). Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of M. tuberculosis, application of strain differentiation by a novel typing method Molecular Microbiology, 10(5): 1057-1196.

Harrington, R, y Karlson, A.G. (1966). Differentiation between : tuberculosis and M. bovis in vitro procedures. American Journal of veterinary research, 27, 1193-1196.

Jenkins, P.A. (1981). Lipid analysis for the identification of mycobacteria: an appraisal. Reviews of infectious diseases. 3, 862-866.

Karlson, A.G. y Lessel, E.F. (1970). Mycobacterium bovis nom. Nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 20, 273-282.

- Koch, R.** (1882). Die aetiologie der tuberculose. Berliner Klinische wochenschrift, 19, 221-230.
- Kochi, A** (1991). The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organisation Tubercle, 72, 1-6.
- Konno, K** (1956). New chemical method to differentiate human type tubercle bacili from other mycobacteria. Science 124, 985.
- Krebs, J.R., Anderson, R., Clutton-Brock, T., Morrison, L., Young, D., Donnelly, C.A., Frost, S. Y Woodroffe, R.** (1997). Bovine tuberculosis in cattle and badgers. London HMSC.
- Kubica, G.P.** (1980). Correlation of acid-fast staining methods with culture results for mycobacteria Bulletin of the International Union Against Tuberculosis, 55:117-124.
- Lehman, K.B. y Neuman, R.** (1984). Atlas und grundriss der bakterilogie und lehrbuch der speziellen bakterioligischen diagnostik. 1st edn. Munich: J.F. Lehmann.
- Liébana, E., Arranz, A., Francis, B y Coussins, D.** (1996). Assesment of genetic markers for species differentiation within the M. tuberculosis complex. J. Clin Microbiol; 34:933-938.
- Marchoux, E y Sorel, F** (1912). Recherches sur la lepré. Annales de l'Institut Pasteur; 26:675-700.
- Marks, J y Szulga, T** (1965). Thin layer chromatography of mycobacterial lipids as an aid to clasification Technical procedures: M. fortuitum. Tubercle; 46:400-411.
- Mitchison, D.A.,** (1982). Organisation of tuberculosis laboratory services in developing countries Bulletin on the International Union Against Tuberculosis; 57:140-147.
- Mitchison, D.A., Allen, B.W. y Manickavasagar, D.** (1983). Selective Kirchner medium in the culture of specimens other than sputum for mycobacteria. Journal of Clinical Patology; 36:1357-1361.
- Morrison, W.L., Bourne, F.J., Cox, D.R., Donnelly, C.A., Gettinby, G., McInerney, J.P. y Woodrofe, R.** (2000). Pathogenesis and diagnosis of infection with Mycobacterium bovis in cattle. Veterinary Record; 146:236-242.
- OMS** (1993). Laboratory Biosafety Manual, 2nd edn. Geneva: WHO.
- Pfyffer, G.E., Kissling, P., Jahn, E.M., Welscher, H.M., Salfinger, M y Weber, R.** (1996). Diagnostic performance of amplified M. tuberculosis direct test with cerebrospinal fluid, other nonrespiratory, and respiratory sapecimens. Journal of clinical microbiology, pp 834-841.
- Reed, G.B.** (1957). Family 1 Mycobacteriaceae Chester 1987. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 7th ed. Breed, R.S., Murray, E.G.D. and Smith, N.R. Baltimore Williams and Wilkins.
- Rieder, H.L.** (1994) Tuberculosis and human inmunodeficiency virus infection in industrialized countries. In Davies P.D.O. (Ed) Clinical Tuberculosis. London, Chapman an Hall. Pp. 227-240.
- Rist, N., Canetti, G, Boisvert, H y Le Lirzin, M.** (1967). L'antibiogramme du BCG. Valeur diagnostique de la resistance a la cycloserine. Revue de tuberculose et de pneumonologie; 31:1060-1065.
- Ross, B.C. y Dwyer, B.** (1993). Rapid, simple method for typing isolates of M. tuberculosis by using the polymerase chain reaction. J. Clin.Microbiol; 31:329-334.
- Thierry, D., Brisson-Nöel, A., Levy-Frebault, V.V., Nguyen, S., Guesdon, J.L. y Gicquel, B** (1990). Characterization of a M. tuberculosis insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. J.Clin. Microbiol, 28: 2668-2673.
- Van Soolingen., Hoogenboezem, T., de Hass PEW, Hermans, PWM, Koedam, Ma., Teppema, K.S.** (1997). A novel pathogenie taxon of the mycobacterium tuberculosis complex, Canetti: charaterization of an exceptional isolate from Africa. Int J. Syst. Bacteriol, 47:1236-1245
- Wards, B.J. Collins, D.M. y Lisle, G.W.** (1995). Detection of Mycobacterium bovis tissues by polymerase chain reaction. Veterinary Microbiology; 43: 227-240.

The Board of Directors is pleased to present this report on the activities of the Corporation during the year ended December 31, 1994. The Corporation has achieved significant milestones in its development and growth.

During the year, the Corporation has successfully completed several key projects, including the expansion of its operations and the implementation of new initiatives.

The Corporation's financial performance has been strong, with a steady increase in revenue and a decrease in expenses. This has allowed us to maintain a healthy financial position.

We are grateful to our shareholders for their continued support and confidence in the Corporation. We will continue to work hard to create value for all our stakeholders.

The Board of Directors is committed to the long-term success of the Corporation and will continue to monitor and guide its operations.

We look forward to a bright future for the Corporation and to the continued support of our shareholders.

The Board of Directors is pleased to announce that it has approved the following resolutions for the year ended December 31, 1994:

1. To approve the annual report of the Corporation for the year ended December 31, 1994.

2. To approve the dividend payment of \$0.10 per share for the year ended December 31, 1994.

3. To approve the appointment of the following directors to the Board of Directors for the year ending December 31, 1995:

John Doe, Jane Smith, and Robert Johnson.

The Board of Directors is pleased to announce that it has also approved the following resolutions for the year ended December 31, 1994:

4. To approve the appointment of the following officers to the Corporation for the year ending December 31, 1995:

John Doe, Jane Smith, and Robert Johnson.

The Board of Directors is pleased to announce that it has also approved the following resolutions for the year ended December 31, 1994:

5. To approve the appointment of the following directors to the Board of Directors for the year ending December 31, 1995:

John Doe, Jane Smith, and Robert Johnson.

The Board of Directors is pleased to announce that it has also approved the following resolutions for the year ended December 31, 1994:

6. To approve the appointment of the following officers to the Corporation for the year ending December 31, 1995:

John Doe, Jane Smith, and Robert Johnson.

The Board of Directors is pleased to announce that it has also approved the following resolutions for the year ended December 31, 1994:

7. To approve the appointment of the following directors to the Board of Directors for the year ending December 31, 1995:

John Doe, Jane Smith, and Robert Johnson.

The Board of Directors is pleased to announce that it has also approved the following resolutions for the year ended December 31, 1994:

8. To approve the appointment of the following officers to the Corporation for the year ending December 31, 1995:

Antonio Gasca Arroyo
Investigador-Jefe de Proyectos.
C.I.F.A. Alameda del Obispo. Córdoba.

RESULTADOS DE LABORATORIO Y SU INTERPRETACIÓN.

Resumen:

Se describen los procedimientos conducentes a la validación de una prueba diagnóstica, como paso previo imprescindible a la correcta interpretación de un resultado.

Dicha validación consiste, a su vez, en tres tipos de acciones: Valoración, que mide las características básicas, cuantitativamente hablando, de un procedimiento. Evaluación, que calibra las características de tipo funcional, o propiedades biológicas. En este apartado se describen algunas tan fundamentales como la sensibilidad, especificidad y valor predictivo. Por último, Ensayo, último y fundamental bloque de procedimientos encaminados a fijar las potencialidades reales del test, en su aplicación práctica y sobre el terreno. Se insiste en que estos datos de ensayo son tan importantes como cualquiera otros, ya que sin ellos no se puede realmente concluir si un procedimiento es o no realmente válido.

Se concluye, a partir de la base anterior, analizando el significado teórico y real del resultado de una prueba de laboratorio, tanto a nivel individual como colectivo o de rebaño.

Se adjuntan también Anexos con gráficos y tablas explicativas del texto.

INTRODUCCIÓN.

Ya en nuestra primera intervención intentamos dejar claro la diferencia existente entre prueba de laboratorio y diagnóstico, así como el grado de inexactitud que se aporta a lo segundo, aplicando ciegamente lo primero; insistiendo además en el hecho de que, en ocasiones, el criterio legal ha de imponerse al técnico, al tomar como primera y principal prueba de enfermedad el resultado positivo de una analítica concreta, que a lo largo de esta tem, denominaremos "oficial".

Ahora bien, todo el mundo sabe que el resultado obtenido en la medición de algo (sea lo que sea, todo lo material es mensurable) depende directamente de la calidad de la herramienta empleada. No seremos igual de exactos, o lo que es lo mismo, nos alejaremos menos de la realidad, midiendo la estatura de una persona, por ejemplo, si usamos un instrumento dividido en cms., frente a otro dividido en mms. El problema básico que se nos plantea es saber cuánto nos acercamos a la realidad, es decir, que error cometemos, cuando medimos o calibramos algo. Saber, primero, que cometemos errores, y segundo, en cuánto nos equivocamos, supone, por lo tanto, un avance en el conocimiento de la realidad que nos esforzamos por comprender.

Este planteamiento, que puede hacerse general aplicado a la observación instrumental de todo cuanto nos rodea, se hace particularmente interesante en el tema de la actividad analítica química, y desde luego, en la de tipo biológico y/o bioquímico en concreto.

Centrando el problema en las técnicas de laboratorio aplicadas al diagnóstico de enfermedades, y a la valoración de sus resultados concretos, vale decir aquí, igual que antes:

1º).- ¿Hasta que punto este resultado refleja la realidad de lo que se puede aclarar?.

2º).- Si hemos cometido algún error de apreciación, ¿en cuánto nos equivocamos?.

Estas y otras preguntas es lo que intentaremos aclarar a continuación.

PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA.

Validar algo es "dar por bueno" una cosa. Es decir, asegurar que lo que se valida sirve efectivamente para lo que se dice que sirve; no es más que comprobar la eficacia de un procedimiento. Validar una prueba diagnóstica es pues, garantizar que la citada prueba sirve en la práctica para basar en su resultado el estado de salud de un animal.

Y nótese que decimos el estado de salud de un animal, y no el diagnóstico, porque en realidad lo que determinan la mayoría de las técnicas empleadas a estos fines, y desde luego las de tipo inmunológico, es el estado de infectado o libre de infección (que no es lo mismo, evidentemente, que enfermo o sano).

Este proceso de validación de una técnica es, en definitiva, el que hace el Laboratorio de Referencia antes de recomendar su uso protocolizado. En principio, el proceso, que es largo y complejo, puede dividirse en tres grandes apartados: Valoración, evaluación y ensayo.

1º).- VALORACIÓN DE UN TEST O PRUEBA

Consiste esencialmente en estimar, de forma objetiva, mensurable y siguiendo el método científico, las características básicas de un procedimiento. Básicamente tiende a medir propiedades físico-químicas, analizando para ello los siguientes parámetros:

a).-Composición y caracterización de reactivos.

Se fijan exactamente las condiciones y tipo de reactivos, sus diluciones máximas y mínimas, su estructura química, cantidades, tiempos, etc. Los productos y protocolos que pasan estas pruebas se dicen que están "valorados".

b).-Precisión y exactitud:

La *precisión* de una prueba se define como la capacidad de repetir el mismo o muy similar resultado en varias repeticiones ejecutadas sobre la misma muestra.

Por *exactitud*, sin embargo; debemos entender la capacidad de una prueba de suministrar resultados repetidamente iguales o muy parecidos a los realmente presenten en la muestra analizada (es decir, que una prueba es exacta sólo cuando es sensible, pero no al revés).

El clásico y clarificador ejemplo para ilustrar ambos conceptos es el de los impactos provocados en una diana por un tirador. Así, el sistema formado por un tirador y rifle demostrará precisión cuando los impactos están agrupados, aunque estén lejos de la diana.

Demostrará, además, *exactitud*, cuando los impactos, además de agrupados, lo están sobre la diana. La diana, en el caso de una prueba analítica, estará representada por la valoración exacta de la muestra mediante unos "test de referencia" (ver más adelante). Y los diferentes impactos, por los resultados de varias repeticiones analíticas sobre una misma muestra "control".

Según este esquema, un procedimiento o test podrá encuadrarse, necesariamente, en una de las siguientes categorías:

- 1).-Procedimiento exacto pero no preciso.
- 2).-Procedimiento preciso pero no exacto.
- 3).-Procedimiento no preciso y no exacto.
- 4).-Procedimiento exacto y preciso.

Evidentemente solamente aquellos dentro del grupo 4 podrán ser valorados positivamente.

c).-Repetibilidad y reproducibilidad.

Repetibilidad es la capacidad o propiedad de un procedimiento para suministrar el mismo o muy similar resultado cuando se aplica sobre la misma muestra, por el mismo operador analítico y en el mismo laboratorio. Es evidentemente, una manera de medir la precisión y exactitud de un procedimiento.

Reproducibilidad, a no confundir con lo anterior, es la capacidad o propiedad de un procedimiento para suministrar el mismo o muy similar resultado cuando se aplica sobre la misma muestra, por distintos operadores analíticos y en distintos laboratorios.

La primera de estas características, la repetibilidad, es probablemente la más comprobada de cuantas pueden hacerse con una prueba serológica, puesta que se realiza a diario, decenas de veces en nuestros centros, al comprobar una y otra vez, que los controles positivos y negativos, lo son en cada placa de ELISA que se realiza.

La reproducibilidad es lo que se comprueba en las pruebas de "Ensayos colaborativos", o "Ring-test", citadas en el tema anterior, mediante las cuales se asegura la uniformidad de protocolos analíticos entre diferentes centros. Más adelante volveremos sobre ello.

A estas capacidades de "repetición" se les denomina también "Robustez" de una prueba, refiriéndose quizá a la fortaleza de un sistema analítico capaz de repetir, sus resultados en muy diferentes condiciones.

En general, puede decirse que a mayor complicación del protocolo de realización, menor robustez, y que a mayor sencillez de fundamento científico, mayor robustez.

d).-Posibilidad de automatización y viabilidad.

En este apartado deben estudiarse las posibilidades reales que, en la práctica, tiene un procedimiento determinado de poder montarse como prueba común en muchos centros de características, a veces, muy heterogéneas entre sí. Es decir, no sólo habrá que ocuparse de que el método tan complejo que de hecho también, y en lo posible, su protocolo no sea tan complejo que de hecho recorte las posibilidades de uso en muchos laboratorios de tipo medio.

Las posibilidades de automatización también son objeto de atención especial, ya que gran parte de estas tecnologías van a ser inicialmente aplicadas tanto para conjuntos pequeños de animales como censos completos de regiones o incluso de países. De tal forma que, aún contando con tecnología de confirmación es importante que la mecanización de una técnica no le reste características básicas de robustez, sensibilidad, especificidad, etc., etc.

e).-Coste:

Directamente derivado de la premisa anterior, el coste de instalación y posterior mantenimiento ha de ser igualmente valorado, al menos en sus parámetros medios, ya que evidentemente, variará sensiblemente en función de las disponibilidades y grado de desarrollo de un país o incluso una región. Este coste, que deberá abarcar tanto los de tipo directo (mano de obra especializada, aparatos especiales requeridos, reactivos, etc.) como indirecto (mantenimiento general del laboratorio, animalario necesario en su caso, gastos generales, etc., etc.) será el que deberá igualmente figurar en los estudios de Coste/beneficio que han de acompañar a la Planificación de Lucha Sanitaria General.

2º).- EVALUACIÓN DE UN TEST.

La evaluación tiende a calificar las capacidades de una prueba; es decir, sus propiedades, indicaciones y aptitudes; la diferencia con la valoración es que ésta nos da idea cuantitativa de partes y componentes; mientras que la evaluación nos da idea cualitativa, más funcional que morfológica. Desde este punto de vista funcional, en una prueba o test diagnóstico se pueden distinguir los siguientes aspectos:

a).- Características intrínsecas:

- Sensibilidad
 - Analítica.
 - Diagnóstica.
- Especificidad:
 - Analítica.
 - Diagnóstica.
- Selección del "cut-off".

b).- Características extrínsecas:

- Valor predictivo de un resultado.
- Comparación con "Gold Standard Test".

a).-Características intrínsecas de una prueba: También llamadas capacidades biológicas.

Son sin duda fundamentales, ya que se refieren nada menos que a la capacidad de discriminación de un sistema analítico, entre animales infectados y animales libres de infección.

Antes de continuar, hemos de hacer distinción entre capacidades "analíticas" y capacidades "diagnósticas", es decir, entre propiedades de tipo químico y propiedades de tipo aplicativo, a las que llamaremos biológicas. Nos explicamos:

Por **sensibilidad analítica** debe entenderse la capacidad de una técnica para detectar el analito en cuestión en cantidades tanto más pequeñas cuanto mayor sea la citada sensibilidad. Es decir, que si lo que buscamos es un determinado tipo de anticuerpo, nuestra técnica gozará de tanto más sensibilidad analítica cuanto más pequeñas sean las cantidades de anticuerpos capaz de detectar. A esta propiedad también se le llama "umbral de detección". Desde este punto de vista, tiene mucha mayor sensibilidad analítica una técnica de Radioinmunoanálisis (R.I.A.) que una Seroaglutinación Rápida (S.A.R.). Efectivamente, la primera es capaz de detectar cantidades de anticuerpos en rango de 10^{-12} grs/dl y la segunda de 10^{-6} grs/dl.

Por **especificidad analítica** se entiende la capacidad de una prueba de distinguir o discriminar entre sus sustancias similares, pero diferentes. En nuestro caso serológico, se calcularía utilizando un panel de sueros procedentes de animales que han sufrido un proceso infeccioso de similares características (por ejemplo, tuberculosis, Paratuberculosis, linfadenitis caseosa); lo que se valoraría sería la capacidad de la prueba de no reaccionar con reactividades cruzadas.

La denominación de las capacidades analíticas con los términos "sensibilidad y especificidad" no la consideramos conveniente, ya que, en la práctica, puede inducir a confundir estos conceptos con las capacidades biológicas. A las anteriores es preferible llamarlas umbral de detección o detectabilidad y capacidad discriminatoria, como ya queda dicho.

Sensibilidad y especificidad de tipo biológico.

También llamadas de tipo diagnóstico, o simplemente, capacidades diagnósticas, se definen como sigue:

Sensibilidad

Es la capacidad de una prueba de identificar como positivos a los animales infectados.

Especificidad:

Es la capacidad de una prueba de identificar como negativos a los animales libres de infección.

Intentaremos clarificar estos dos conceptos:

Imaginemos un conjunto de animales lo suficientemente amplio como para que los resultados de nuestro estudio sean estadísticamente significativo; los citados animales se dividen claramente en dos grupos con respecto a una enfermedad infecciosa determinada; unos están infectados (en número conocido) y otros no lo están (en número también conocido). Si aplicamos sobre el grupo una técnica de detección serológica de resultados cuantificables objetivamente (un ELISA, por ejemplo, cuyos resultados se miden en Densidades Ópticas, cuantificadas numéricamente), esta técnica nos permitirá agrupar a todos los animales, de forma constante, en dos grupos: animales que arrojan un resultado positivo (curva a, en el gráfico) y otros que arrojan resultado negativo (curva d).

Efectivamente resulta lógico que los animales no infectados se agrupen mayoritariamente, casi todos, en el tramo de interpretación negativo de densidades ópticas, al igual que los infectados (curva a) se agrupen en el rango de los positivos.

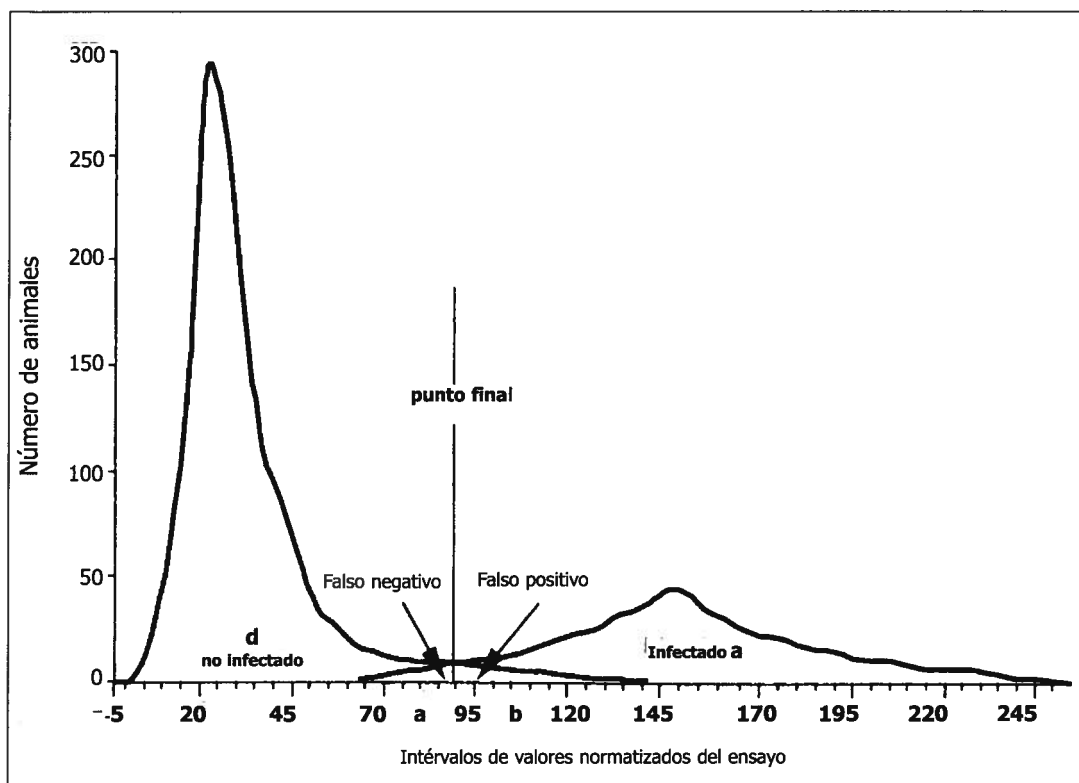


Gráfico1: Tomado de R.H. Jacobso. Rev. Sci. Tech. Off. Ont. Epiz. 1998, 17(2):507-526

Tanto en uno como en el otro caso, la distribución de ambas publicaciones adoptará una distribución tipo Gauss, con más individuos en el centro (alrededor del un valor medio) que en los extremos. Dichos extremos, en ambas curvas, contendrán individuos que, en cada clase (positivos y negativos) ostentarán valores o muy altos o muy bajos. Sin embargo, en la práctica totalidad de los casos, ambas curvas tendrán en común un espacio más o menos amplio, firmado por individuos que, en el valor de sus D.O., se superponen, es decir, no es posible discriminar si pertenecen al conjunto a o al d, ya que, ocupan un espacio común (zona sombreada del gráfico 1). En rarísimas ocasiones las dos curvas estarán separadas claramente; es decir, podremos emplear un test que agrupe, sin ninguna duda, a todos los individuos en dos grupos claramente identificados; uno de positivos infectados, y otro de negativos indemnes.

Puesto que lo más corriente es como decimos, que las dos curvas tengan una zona común, es muy importante establecer, de forma razonada y razonable, en que punto, o a partir de que D.O., un animal va a ser considerado como positivo (o perteneciente al conjunto a) o como negativo (o perteneciente al conjunto d); naturalmente nos referimos sólo a los que están en zona sombreada. Los demás no ofrecen dudas, evidentemente. Este nivel o umbral, es lo que se denomina "CUT-OFF", expresión inglesa de difícil traducción literal, pero que bien pudiera significar "punto de corte", "umbral de positividad" (o "de negatividad"), o "punto final". El trazado de este Cut-off no se hace, por supuesto, por las buenas, sino con una serie de criterios sobre los que más tarde volveremos. Baste ahora decir que en nuestro ejemplo, un cut-off equidistante dividiría la zona sombreada en dos partes, c y b, en la Gráfica 1. Los individuos en la zona c serían los que, perteneciendo al conjunto a de positivos, están a la izquierda (o por debajo) del cut-off, es decir, se consideran como negativos. Es decir, son FALSOS NEGATIVOS. Aquellos otros situados en la zona b, son los que perteneciendo al conjunto de, de indemnes o negativos, están por encima (o a la derecha) del cut-off, y por tanto son considerados como positivos. Son los FALSOS POSITIVOS.

En Resumen, en la práctica, y si aplicamos una técnica con las características ya descritas sobre un conjunto de animales que contiene individuos infectados e individuos no infectados, siempre vamos a obtener cuatro clases de resultados (Cuadro nº 1).

RESULTADOS DEL TEST.

	INFECTADOS	INDEMNES	TOTAL
POSITIVOS	a-V.P.	b-F.P.	a+b V.P. + F.P.
NEGATIVOS	c-F.N.	d-V.N.	c+d F.N. + V.N.
TOTAL	a+c V.P. + F.N.	c + d F.P. + V.N.	A+b+c+d+=N V.P.+F.P.+F.N.+V.N.

1º).- Aquellos individuos que, estando infectados, dan resultado positivo. Son los verdaderos positivos (V.P.), que integran el mayor número de individuos agrupados en la curva a.

2º).- Aquellos otros que, estando libres de infección (indemnes), dan en la prueba resultado negativo. Son los verdaderos negativos (V.N.), que se agrupan mayoritariamente en la curva d.

3º).- Los que, perteneciendo a la agrupación de infectados, ostentan valores de D.O., correspondientes a la zona de no infectados. Están en la región c, y son los falsos negativos (F.N.).

4º).- Por último, los llamados falsos positivos (F.P.), es decir, que ocupan la región b, aunque pertenecen al conjunto d.

Como puede observarse, la condición de infectado no equivale automáticamente a la categoría de positivo en el test, ni la condición de indemne equivale tampoco al 100%, con la de negativo. Según este enfoque, la sensibilidad diagnóstica sería:

$$Sd = \frac{a}{a+c} = \frac{V.P.}{V.P. + F.N.}$$

A la capacidad de una prueba para identificar como positivos los individuos realmente infectados, se le llama sensibilidad diagnóstica; expresa la relación existente entre los verdaderos positivos y el total de infectados. Cuando decimos que una prueba tiene una sensibilidad del 95%, por ejemplo, queremos decir que, cada 100 individuos realmente infectados (verdaderos positivos) la prueba detecta 95, quedando otros 5 (la diferencia hasta los 100) como negativos (falsos negativos)

Y por otra parte, la especificidad diagnóstica sería

$$Esp. D = \frac{d}{b+d} = \frac{V.N.}{F.P. + V.N.}$$

La capacidad de un test para identificar como negativos los animales realmente indemnes es lo que conocemos como especificidad diagnóstica; expresa la relación existente entre los verdaderos negativos y el total de indemnes, en el cuadro 1. Si decimos que una prueba es específica al 99%, queremos decir que, de cada 100 individuos indemnes, nos dará como negativos, el 99, habrá 1 (la diferencia hasta los 100) que será identificado como positivo (Falso positivo).

Selección del rango de Cut-Off.

En realidad, y a poco que uno analice lo dicho hasta ahora de nuestro criterio para elegir el sitio, o el rango, donde poner la línea de cut-off depende que se formen más o menos resultados falsos, o incluso que se dejen de formar totalmente algunos.

En efecto, volvamos a la gráfica 1. Con el cut-off donde está, se forman las cuatro categorías que hemos dicho (a, b, c, d). Pero si ponemos el cut-off más a la izquierda (posición 1), a medida que lo vamos llevando desde el centro hasta el 1 el colectivo c va disminuyendo, hasta desaparecer en 1. Es decir, que con el cut-off ahí, no se registran falsos negativos, que es lo que representa la zona c. A cambio, desgraciadamente, dejamos a la derecha del nuevo cut-off una zona que hasta ahora comprendía individuos sanos correctamente interpretados como negativos, para pasar a ser interpretados como positivos. Es decir, aumentamos el número de falsos positivos.

El mismo razonamiento cabe decir si situamos el cut-off en posición 2. Eliminamos los falsos positivos, a costa de aumentar los falsos negativos. Como vemos, quizás, nuestro remedio sea peor que la enfermedad.

¿Qué hacer entonces?. O dicho de otra forma ¿con que criterios debemos fijar el rango (o sitio) del cut-off?.

Existen a este fin varias alternativas que pasamos a describir rápidamente

1º).-Elección del cut-off por examen visual de la distribución de frecuencias.

Es decir, y para entendernos, un poco a "ojímetro", que es lo que hasta ahora hemos hecho en nuestras explicaciones sobre la gráfica 1. Naturalmente la distribución de frecuencias de los dos grupos será el fruto de la aplicación rigurosa de la tecnología que se está evaluando y además ambos grupos serán bien conocidos con respecto a su infección o no por el agente patógeno responsable. Conocido todo ello, no resulta difícil elegir, sobre la gráfica obtenida, el sitio del punto de corta, según se quiera primar la sensibilidad, la especificidad o la equidistancia entre ambas. Este procedimiento resulta sencillo, flexible, y no requiere realizar cálculos estadísticos a veces complicados.

2º).-Elaboración de curvas R.O.C.

Una curva R.O.C.,(Receiver-Operator-Characteristics), es decir, características operantes de un receptor, es la representación gráfica de la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad en el eje de ordenadas) frente a la tasa de falsos positivos (1-especificidad, en el abscisas), utilizando baterías de sueros de animales infectados y no infectados. Simplificando mucho, el procedimiento permite

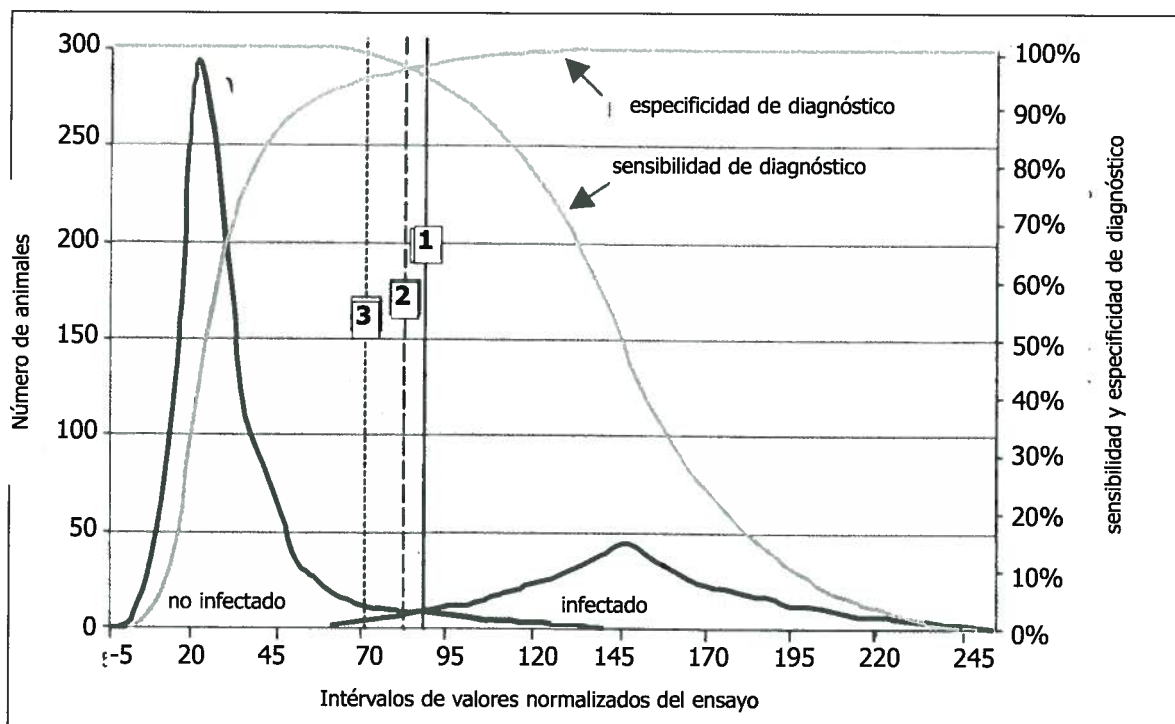


Gráfico 2: Tomado de R.H. Jacobso. Rev. Sci. Tech. Off. Ont. Epiz. 1998, 17(2):507-526

representar dos curvas, una para la sensibilidad y otra para la especificidad del método. Representando estas curvas sobre las ya vistas en la Gráfica 1 (Gráfica 2).

Se observa la posibilidad de trazar el cut-off bien en el punto de intersección de las curvas de especificidad y sensibilidad bien por delante o por detrás del mismo (Puntos 2, 1, 3). Cada posibilidad dará valores concretos de características diagnósticas, no ya de forma intuitiva como antes se describía, sino cuantitativa, sobre los % expresados en la escala de la derecha de población del 95,4% (para el doble) o del 99,7 % (para el triple).

3º).-Cut-off basados en resultados de animales no infectados.

Suponiendo que un grupo lo suficientemente amplio de animales a ciencia cierta no infectados arroja resultados negativos que, como ya hemos dicho, se distribuirán según una curva normal de Gauss, aceptamos igualmente que, situando el cut-off a la derecha de la media 2 o 3 veces de la desviación típica, estaremos abarcando un porcentaje

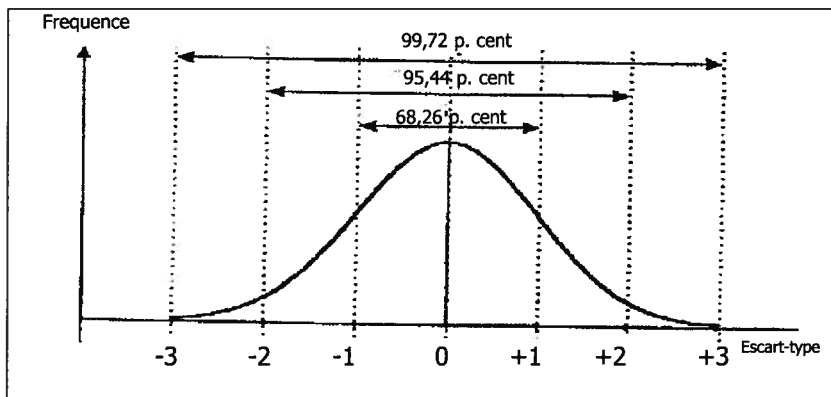


Gráfico 3: Tomado B Toma et al. "Repigrmiologie Apliqué"

Desgraciadamente, este supuesto es demasiado teórico, y raramente la distribución de las frecuencias en los valores de los animales no infectados adopta la forma normal. Más bien suele ocurrir que la curva representada por los datos prácticos sea más bien plana y con una "cola" muy prolongada hacia la derecha, lo que invalidaría bastante este procedimiento.

Puede aceptarse, sin embargo, cuando lo único

que nos interesa es fijar valores muy exigentes de especificidad, aún a costa de una sensibilidad baja. Tal podría ocurrir en una técnica de confirmación pensada para descartar resultados falsos positivos.

4º).-La categoría de "sospechoso" como resultado.

Una solución ciertamente prudente, sería la de admitir que los resultados situados en la zona de "falsos resultados" (positivos o negativos) de la gráfica 1, pueden ser calificados como sospechosos, dejando su clasificación definitiva para una segunda técnica de confirmación.

En este caso, se elegirían dos partes de corte diferente, uno para los verdaderos positivos, y otro para los verdaderos negativos. La zona intermedia quedaría para los resultados dudosos.

Esta solución teóricamente impecable, supone en la práctica algunos inconvenientes, especialmente si no se disponen de técnicas de conformación adecuadas.

b).-Características extrínsecas de una prueba.

Lo que hemos visto hasta ahora, especialmente sensibilidad y especificidad, son propiedades propias de la naturaleza de cada prueba, capacidades intrínsecas, determinadas experimentalmente y fijadas definitivamente para todo tipo de circunstancias. Existen, sin embargo, otras propiedades, que dependen más de características externas a las pruebas en sí, pero que influyen decisivamente en la validez de los resultados que arrojan las mismas. Son las llamadas propiedades extrínsecas, y se refieren sobre todo a la probabilidad estadística de que un resultado dado, positivo o negativo, coincida realmente con un animal infectado o indemne. A esta capacidad se le llama VALOR PREDICTIVO, existiendo uno para los resultados positivos y otro para los negativos; todo ello varía en función de los valores de sensibilidad, especificidad y prevalencia de la enfermedad en el colectivo estudiado. Veamos:

Valor predictivo de un resultado:

En el cuadro expresado en el cuadro 1 vemos que el total de individuos que arrojan un resultado positivo a la prueba está expresado por el conjunto $a + b$, formado a su vez por los verdaderos positivos más los falsos positivos. La proporción de este conjunto correspondiente a los verdaderos positivos, en %, sería la expresión matemática de los que se llama valor predictivo de un resultado positivo, o sea:

$$V.P. += \frac{a}{a+b} = \frac{V.P.}{V.P. + F. P.}$$

Idéntico razonamiento cabe aplicar a los resultados negativos. Entonces, el valor predictivo de un resultado negativo vendría dado por la expresión:

$$V.P. -= \frac{d}{c+d} = \frac{N.P.}{F.N. + V.N.}$$

Nótese que, en la práctica, el único dato que poseemos con respecto a un resultado analítico es el que estará encuadrado en la suma $V.P. + F.P.$, si es un resultado positivo, o en $F.N. + V.N.$, si es negativo. Los resultados de sensibilidad o especificidad serán siempre los mismos para la misma prueba, y su determinación, ya de dijo, es experimental. Para una correcta interpretación de un resultado deberán ser tenidos en cuenta, pero su significación será constante.

No ocurre así con el número total de resultados positivos y negativos que una prueba arroja al aplicarla en un colectivo. La probabilidad de que un resultado positivo sea verdadero, es decir, coincida con un animal infectado, es mayor a medida que la prevalencia, o cantidad de enfermedad presente en ese colectivo, es también mayor; y por supuesto disminuye a medida que disminuye la prevalencia. Resulta desde luego lógico pensar que en un colectivo de animales con una prevalencia de enfermedad del 100%, todo lo que una prueba dé como positivo tendrá una probabilidad muy alta de estar infectado, es decir, de ser verdadero positivo. Y todo lo que dé negativo será por definición falso negativo, sea cual sea la sensibilidad de la prueba en cuestión. Y a la inversa, en un colectivo libre de infección, con el 0% de prevalencia, cualquier resultado negativo tendrá muy alto valor predictivo (o probabilidad de coincidir con un individuo indemne), así como cualquier resultado positivo será falso positivo, sea cual sea el nivel de especificidad de la prueba.

Resumiendo: El valor predictivo de un resultado positivo aumenta a medida que lo hace la prevalencia, y disminuye también con la misma.

El valor predictivo de un resultado negativo aumenta a medida que disminuye la prevalencia, y disminuye a medida que aumenta la misma.

El ejemplo adjuntado en los Anexos ilustra que para una prueba con $Sd = 95\%$ y $Spd = 90\%$, aplicada sobre un colectivo de 1.000 animales con prevalencia del 20%, el V.P.P. (Valor predictivo del Positivo) es de 0,70 o 70%. Sin embargo, la misma prueba, para una prevalencia del 2%, tiene un V.P.P. del 16%.

Así mismo se adjunta cuadro ilustrativo de la evolución del V.P.P. para prevalencias variables, desde el 10% al 0%, en un colectivo de 100.000 animales, y usando una prueba altamente sensible y específica (99 % y 99,9 % respectivamente).

Obsérvese cómo el número de falsos positivos se estabiliza a partir del 0,1 % de prevalencia, siendo siempre de 100 a partir de ahí y hasta el 0%, sin embargo, el número de positivos verdaderos va disminuyendo, lógicamente, hasta llegar a 0 con el 0% de prevalencia. Es decir, que, en una situación de lucha real, tipo campaña, a medida que vamos rebajando la prevalencia, es decir, en la medida que vamos siendo eficaces, por cada positivo de verdad que detectamos aparecen muchos más (hasta 100 en nuestro ejemplo) falsos positivos. Hasta el punto final en que todo lo positivo será lógicamente falso.

El mismo razonamiento puede hacerse con el V.P.N., y los resultados falsos negativos. Con la salvedad de que, en este caso, la presencia de estos animales es mucho más peligrosa, ya que se dan por sanos estando en realidad infectados.

No resistimos la tentación de comentar, ahora que parece venir a cuento, el curioso hecho de que a la hora de poner en duda un resultado de laboratorio, todo el mundo (incluidos algunos colegas) protesta del resultado falso positivo, que es precisamente el más inofensivo en un plan de lucha, pero nadie, que yo conozca, y hasta este momento, protesta lo más mínimo ni pone en duda un resultado negativo (que también tiene probabilidades de ser falso, evidentemente).

Antes de terminar con este apartado, hemos también de puntualizar un aspecto, todavía, que también tiene su interés de cara a la valoración de una prueba diagnóstica. Nos referimos a valoración de parámetros diagnósticos a nivel de rebaño. En los planes de lucha sanitaria es frecuente la consideración territorial de la acción donde la unidad epidemiológica es el rebaño. Desde este punto de vista, puede hablarse de prevalencia de establo o de rebaño, como parámetro epidemiológico más exacto que el individual, a la hora de medir la implantación de una patología en un territorio.

A este nivel de rebaño conceptos como sensibilidad, especificidad y valor predictivo de una prueba pueden sufrir variaciones interpretativas, en el sentido siguiente:

- La sensibilidad de una prueba, tomando el rebaño como unidad de infección, es mejor que a nivel individual.
- La especificidad, en este mismo nivel colectivo, es sin embargo peor comparada con sus valores individuales.
- El V.P.P. a nivel de rebaño mejora a medida que aumenta el número de rebaños positivos.
- El V.P.N., a nivel de rebaño mejora a medida que disminuye el número de rebaños positivos.

Existen tablas, basadas en probabilidades estadísticas para saber exactamente, partiendo de parámetros de aplicación individual, cuáles son los esperables para su aplicación en colectivos.

Este enfoque colectivo puede tener utilidad, por ejemplo, a la hora de tomar decisiones derivadas de la interpretación de pruebas que condicionan no sólo a los animales que arrojan el resultado, sino al colectivo o rebaño al que pertenecen. Léase ganaderías tituladas sanitariamente, por ejemplo.

Resultados de comparación de la prueba con el "Gold Standard Test".

Un procedimiento de validación completo ha de incluir el resultado de una prueba realizada entre el test que se valora y otro que sirve de referencia llamado "regla de Oro" o "Test de Oro", haciendo alusión a que sus resultados pueden ser tomados como referencia, dadas sus características de fiabilidad.

Así, si lo que estamos valorando es un test inmunológico para diagnóstico indirecto de una infección, en este caso del "Test de Oro", será aquél que identifique la citada infección inequívocamente, por ejemplo, el aislamiento e identificación del agente etiológico. Cuando más se acerquen en sus resultados ambas pruebas, mejor será la calificación para la que se está evaluando.

PREVALENCIA REAL Y PREVALENCIA APARENTE.

Según lo visto hasta ahora, el número real de animales infectados en una población (prevalencia) sería equivalente a la suma de los verdaderos positivos, más los falsos negativos (VP+FN), y su % sería:

$$P.R. \text{ (Prevalencia Real)} = \frac{V.P. + F.N.}{N} \times 100$$

Sin embargo, esta es una cifra que en la práctica nunca conocemos, ya que se refiere a números absolutos de enfermos. Lo que conocemos en la práctica es otra cifra, parecida, pero no igual; es el número total de positivos (V.P.+F.P.), que es lo que obtenemos al aplicar una prueba. De tal manera que, cuando nos referimos a prevalencia, nos estamos refiriendo a esta prevalencia aparente, y no a la real.

$$P.A. = \frac{V.P. + F.P.}{N} \times 100$$

Conociendo la sensibilidad y la especificidad de la prueba usada, podemos, lógicamente, conocer la prevalencia real a partir de la aparente

$$P.R. = \frac{P.A. + (Sp-1)}{Se + Sp}$$

Donde Sp= Especificidad de la prueba

Se= Sensibilidad de la prueba.

Aunque en ocasiones la diferencia entre ambas medidas puede ser muy importante, en la práctica siempre nos solemos referir a cifras de prevalencia aparente.

3º) - ENSAYO DE UNA PRUEBA.

También llamado Verificación consiste en probar, en condiciones reales de uso, el resultado de aplicación de una prueba, así como su rendimiento y adecuación a los objetivos para los que se creó.

Así, se comprueban sobre el terreno una serie de características fundamentales especialmente las siguientes:

a).-Características biológicas:

El uso en condiciones de campo dará muchas ocasiones para comprobar tanto la sensibilidad como la especificidad que la prueba dice poseer. Al ser estos parámetros fijados la mayoría de las veces en pruebas experimentales concretas y sobre colectivos animales también concretos, lo prudente es esperar valores similares para estas propiedades biológicas, pero muy raras veces idénticos a los fijados experimentalmente. Lo habitual es guiarse por valores máximos y mínimos, tanto para la sensibilidad como para la especificidad, siendo tolerantes para las fluctuaciones que permanezcan dentro de estos límites.

Téngase en cuenta, además, que a la hora de la aplicación práctica de un test se está operando con reactivos diferentes en cada lote que, aunque valorados y homologados ostentan obligatoriamente cierto grado de variabilidad biológica.

Los datos obtenidos de la aplicación práctica, a veces sobre millones de muestras, servirán sin duda para el perfeccionamiento de la prueba, ya que aportarán un conocimiento de la misma muy valioso; conocimiento normalmente vedado al Laboratorio de Referencia o de Investigación que inicialmente la puso a punto; pero de todo punto indispensable para que un procedimiento analítico esté realmente validado.

Quizás ahora se comprenda mejor la alusión que hacíamos a este ensayo continuo de pruebas en los Laboratorios Regionales y Locales, y la conveniencia (obligación, podría decirse) de que esta experiencia llegue hasta quién ideó el procedimiento, cerrando un círculo de relaciones que de esta forma sería perfecto.

b).-Características de repetibilidad:

Anteriormente y cuando definíamos esta propiedad, prometíamos volver sobre la cuestión, ahora es el momento, y a ello vamos.

La repetibilidad de una prueba es el más común de los llamados controles internos

Ya que comprueba el grado de precisión de un procedimiento, y, si se quiere, también la exactitud del mismo. De una forma rutinaria se lleva a cabo cada vez que en una reacción se ponen controles de reactividad conocida (positivos y negativos, por ejemplo), siendo esta una forma valiosa, automática y cómoda de evaluar este aspecto.

Conviene sin embargo, realizar de forma periódica ensayos encaminados expresamente a la evaluación de este parámetro. Para ello se emplean las llamadas gráficas de Levey-Jennings, que reflejan la dispersión, expresada en variaciones sobre la media de una serie de normalmente 20 ensayos repetidos sobre la misma muestra (ver anexo).

Resulta también demostrativa al respecto la experiencia de Paul y White (1973), que realizaron una consistente en analizar dos veces el suero procedente de 100 individuos. Los resultados coincidieron en 62 muestras; de las 38 restantes, 34 presentaron una variación del doble del título inicial, y 4, una variación del cuádruple. Esto nos hace suponer que, en general, no es realista esperar un grado de repetibilidad del 100% en varios ensayos sucesivos sobre la misma muestra. Además, la variabilidad

observada en las titulaciones séricas de ambas repeticiones también debe ser observada; de tal manera que una diferencia del doble en la citada titulación (de 1/16 a 1/32) por ejemplo) no representa una variación real de valoración, y sí lo es una del cuádruple (de 1/16 a 1/64 por ejemplo).

c).-Características de reproductibilidad:

Si las pruebas de repetibilidad decíamos que representan el tipo de control interno de calidad más frecuente, las de reproductibilidad representan la mas corriente forma de controles externos. Para realizar correctamente un ensayo de Reproductibilidad se necesitan al menos un grupo de 10 muestras, preferiblemente duplicadas, y representativas de todas las diluciones esperadas de los analizables. El nivel de concordancia alcanzado por los diferentes laboratorios que participan en la prueba dará la medida de la idoneidad del procedimiento.

Considerando que el error humano es la más frecuente fuente de variación a la que suelen estar sujetos los ensayos colaborativos, puede resultar útil confeccionar las mismas gráficas de Levey-Jennings, ya citadas, para cada técnico de laboratorio que participe en la prueba. Del análisis de estas gráficas podrá deducirse si las variaciones observadas se deben a las características intrínsecas del test o de la persona que lo realiza (o incluso de las condiciones del lugar de trabajo o medioambientales).

CLASIFICACIÓN O.I.E. DE LOS TEST DIAGNÓSTICOS.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente sobre características de validación de pruebas, la Oficina Internacional de Epizootías (O.I.E.) recomienda determinadas técnicas para la detección o descarte de patologías concretas.

Todas están descritas en el Código Zoosanitario Internacional, y no es nuestra intención descender a ese detalle en este curso. Sin embargo, no está demás conocer los diferentes niveles de "recomendación" que el citado Código aplica:

Técnica "OFICIAL":

Es la citada en el Código Zoosanitario Internacional, y considerada como Óptima para determinar el estatus sanitario de los animales.

Técnica "ALTERNATIVA"

Es una técnica para el diagnóstico de enfermedades en titulaciones locales, pero que puede ser también usada para operaciones de Import/Export previo acuerdo bilateral.

Técnica "DE SCREENING":

Es un test de alta sensibilidad para aplicación en gran escala.

Técnica "DE CONFIRMACIÓN".

Test de alta especificidad usado para confirmar resultados previos obtenidos por otro método.

En consecuencia con estas definiciones y recomendaciones, en todos los países miembros de la O.I.E., (toda la U.E. pertenece a esta Organización) existen normas legales que imponen el uso de técnicas "oficiales" (en el sentido de obligatorias) para basar la sospecha y/o confirmación de una Enfermedad de Declaración Obligatoria.

EMPLEO E INTERPRETACIÓN DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS.

Hasta el momento, todo lo dicho nos ha de servir para tener en sólidos elementos donde basar, finalmente, nuestro criterio acerca de los diferentes "test" diagnósticos, y poder decidir sobre su uso en dos aspectos fundamentales: cuándo usar cada uno, y cómo interpretar los resultados obtenidos.

Con respecto a la primera cuestión, lo primero, quizás, a tener en cuenta es la diferencia existente entre los criterios a adoptar según tratemos de garantizar la salud de un animal concreto, un rebaño, o un territorio.

No es lo mismo, ni se afrontan riesgos iguales, al asegurar que un animal, o un rebaño, o una zona, están indemnes de tal o cual enfermedad; y tampoco que están infectados.

Lo primero a aclarar es que, en general, es más fácil asegurar que un animal o un rebaño (y por tanto un territorio, si son varios los rebaños) está infectado a que está indemne. Efectivamente, para lo primero, y si es necesario, siempre podremos recurrir a confirmar una primera sospecha serológica mediante el aislamiento del agente etiológico, o la visualización de lesiones concretas. Esto podrá ser muy difícil, o lo que es más importante, tener un coste prohibitivo, pero si es necesario, puede hacerse.

Asegurar, por el contrario, que los animales o los rebaños examinados están libres o indemnes de algo es más arriesgado, y puede decirse que, en la práctica, es casi imposible hacerlo con el 100% de certeza, y con un solo examen. Siempre cabe la posibilidad ante un animal negativo, de que sea tolerante inmunológico, o esté en periodo de incubación, o tenga anticuerpos bloqueantes; o que, en el intento de aislar el agente patógeno, no se haya tenido éxito (lo que no significa que no esté allí). Para un rebaño, los factores de confusión serían los mismos.

Así que, cada vez que decimos que un animal, o una zona o un rebaño, están libres de algo, estamos aceptando el riesgo de equivocarnos, por remoto que sea. Una práctica fácil para aportar seguridades a esta situación es remitir la situación al nivel superior; es decir, tendremos más seguridad para certificar que un animal está libre de algo, si además procede de un rebaño negativo; en el caso del rebaño, podríamos referirnos a la región, y el de la región, a la Comunidad Autónoma o país.

Siguiendo a B. Toma, la sistemática a seguir sería:

1º).-Analítica individual.

a).- Búsqueda de animales infectados en el seno de rebaños infectados.

Es la situación frecuente de las Campañas de Saneamiento, y en general, de la lucha contra enfermedades endémicas.

Para ello, elegiremos una técnica de "screening" de alta sensibilidad, lo que, en situaciones de alta prevalencia, suministrará un V.P.P., muy alto. El empleo de un test de confirmación, de elevada especificidad, corregirá algunos de los errores cometidos por exceso.

b).-Certificación de "animales libres o indemnes":

De cara a su ingreso en rebaños libres u otras actividades (ferias traslados, etc.). Para asegurarse de un V.P.N. lo más alto posible, la prevalencia del rebaño de procedencia debe ser mínima, es decir, como decíamos antes, debemos exigir que además de negativos, procedan de rebaño libre. La técnica aplicada debe dar los menos falsos negativos posibles, es decir, tener alta sensibilidad.

La garantía de indemne puede asegurarse mucho más exigiendo, además, dos pruebas consecutivas de resultado negativo, separadas entre sí al menos el equivalente a un periodo de incubación de la enfermedad que se sospeche (usualmente 3 semanas); durante este periodo entre-pruebas el rebaño permanecerá en condiciones que aseguren la imposibilidad de primoinfección.

2º).-Analítica de rebaño:

a) Identificación a nivel de rebaño:

Un rebaño infectado es aquel que alberga, al menos, un animal infectado. Esta característica puede asegurarse, o bien controlando a todos los animales (para lo que usaremos un test de screening de las mismas características que el mencionado en 1º-a), o bien, efectuando muestreos que han de ser representativos. En este último caso, se puede usar un test de sensibilidad más débil.

b) Certificación de rebaños libres o indemnes.

Son de aplicación las mismas condiciones descritas en el apartado 1º-b.

3º) -Analítica de territorio.

De este nivel, puede interesarnos tener una visión global, de todos los rebaños de la zona, o sólo de una parte.

En el primer caso, el test será de aplicación a todos los rebaños del territorio en cuestión y se procederá como en el punto número 2.

En el segundo caso. Se trata de un sondeo, que tendrá como objetivo la tasa de infección de rebaño, o número de rebaños infectados en una zona; o incluso conocer, en una zona, cuántos rebaños están por encima de una tasa de infección determinada. Aquí podrá actuarse mediante muestreos con la suficiente significación estadística, igual que en punto 2º-a.

Para certificar la ausencia de infección a nivel territorial habrá que tener en cuenta, de entrada, que, como decíamos al principio, se corren más riesgos de equivocarse. Por ello, para asegurar el procedimiento, se controlarán todos los rebaños, con repetición del test, utilizando pruebas que aseguren un alto valor del V.P.N. Otras veces, a este nivel, lo que se desea es asegurar que la tasa de prevalencia, en un determinado territorio, está por debajo de un cierto nivel; para ello puede bastar con un muestreo representativo de los rebaños de la zona examinada.

INTERPRETACION DEL RESULTADO DE UNA PRUEBA.

Por último, hemos de ver qué consecuencias podemos sacar ante el resultado de una prueba de laboratorio, en concreto y en la práctica.

Ello depende de cuatro circunstancias en principio:

1º Clase de resultado: negativo o positivo.

2º Objeto de la analítica: individuo o rebaño.

1º).- Interpretación de un resultado positivo:

a).-En un animal:

Para empezar, si un animal arroja un resultado positivo con una prueba debidamente validada, hay que pensar que muy probablemente está infectado.

Desde un punto de vista estadístico en función del V.P.P. que arrojen las características biológicas del test junto con la prevalencia, se evaluará la posibilidad de que se trate de un resultado falso positivo.

En función del animal examinado existen circunstancias que pueden interferir en el resultado, dándolo falsamente positivo. Estas son:

– Presencia de anticuerpos de origen materno: Durante 6-9 meses para bovinos, 6 meses para equinos, 4-6 meses para porcinos y 2-3 meses para perro/gato, este riesgo existe.

– Anticuerpos de origen vacunal: Dependiendo del tipo de vacuna empleada (viva o inactivada), así como de las características del antígeno inoculado (completo o delectado).

– Comunidades antigénicas: entre diferentes patógenos. Tal ocurre con patologías muy próximas antigénicamente, como por ejemplo, PPC y BVD; o tuberculosis y enfermedad de Johns; o diferentes tipos de micoplasmas, etc.

– Presencia de anticuerpos inespecíficos: En ocasiones existen en el suero de los animales investigados anticuerpos que, a pesar de no ser específicos del antígeno frente al que se ensayan, pueden reaccionar con el, de forma imperfecta, pero suficiente para provocar una reacción positiva. Ello se conoce como fenómeno de "bridgins" (literalmente "puenteo"), y a estos anticuerpos inespecíficos, como de tipo heterófilo (que a su vez, pueden ser poliespecíficos, antiidiotípicos o factores reumatoides).

– Otras causas: ligadas sobre todo a factores físico-químicos que intervienen en reacciones tan complejas como un ELISA, calidad y clase de la "fase sólida" (placas), condiciones microambientales de la prueba, etc.

b).- En un rebaño:

En su momento vimos que, a escala de rebaño, la probabilidad de obtener un resultado falso positivo en algún individuo es mayor que la escala individual, al ser peor la especificidad de los test empleados.

Por lo tanto, el hecho de obtener una respuesta positiva única, en un rebaño con prevalencia cero hasta ese momento debe conducirnos, en principio, a una actitud de prudencia ya que existen muchas posibilidades de que se trate de un falso resultado. Siempre que sea posible se llevarán a cabo investigaciones o reacciones complementarias antes de tomar decisiones al respecto.

Otra cosa diferente es la obtención de muchos resultados positivos en el mismo rebaño; en este caso podemos tener la certeza prácticamente absoluta de la presencia de la infección, y mucho más si esos resultados son variados, es decir, existen positividad débiles, medianas y fuertes.

2º).- Interpretación de un resultado negativo.

Anteriormente dijimos que es mucho más comprometido asegurar que un animal o grupo de animales está libre de una infección que lo contrario. Por lo tanto, en este caso será siempre más prudente decir "la prueba es negativa", que "el animal está indemne".

a).- Sobre un animal.

El V.P.N., de una prueba, como ya se ha visto, será mejor cuanto más escasa sea la enfermedad que se investiga. Los resultados falsos negativos dependerán también de la sensibilidad de la prueba empleada, y de su presencia dependerá a su vez el éxito de la lucha sanitaria en el transcurso del tiempo.

Insistimos de nuevo en el hecho de que para nosotros, como agentes de esa lucha, y profesionalmente involucrados en su éxito, lo que de verdad debe preocuparnos son este tipo de falsos resultados, los negativos, y no los positivos. Estos últimos, en todo caso, comportarán el sacrificio de unos pocos más de animales, sin que pueda decirse que, a escala de campaña de lucha, ello suponga nada de especial relevancia.

La presencia, sin embargo, de un solo falso negativo en un rebaño implicará que la fuente de infección permanece, y que la enfermedad se reproducirá de nuevo; lo que equivale a decir que nuestro esfuerzo no habrá servido de mucho.

De ahí que, en una fase avanzada de la lucha sanitaria como la que ya, afortunadamente, estamos disfrutando en Andalucía para patologías como Tuberculosis, Brucelosis, Perineumonía, Leucosis, etc. Lo verdaderamente importante para nosotros (incluidos ganaderos, naturalmente) debería ser obtener las mayores seguridades de que nuestros resultados negativos corresponden realmente a animales libres de infección. Y no lo contrario, como en ocasiones sorprendentemente ocurre, los únicos resultados que estamos dispuestos a poner en duda son precisamente los positivos.

Existen características y peculiaridades biológicas que, en animales concretos, pueden inducir a la obtención de resultados falsamente negativos. Veamos cuales:

– Muestra tomada en momento inadecuado:

Tal ocurre con los animales en periodo de incubación, o en el periodo o fase negativa de la inmunidad (lapso de tiempo entre el estímulo antigénico y la respuesta inmunitaria).

Es necesario citar aquí que este peligro es frecuente, ya que son muchas las enfermedades infecciosas de los animales con un prolongado periodo de incubación. Así, la herpesvirosis (*E. Aujeszky, I.B.R., rinoneumonitis equina*) producen periodos de varios meses desde la infección hasta que la respuesta de anticuerpos puede ser detectada. Lo mismo ocurre con leucosis enzoótica, anemia infecciosa equina, *Visna-Maedi, adenomatosis pulmonar, paratuberculosis*, y varias más que, por diferentes motivos, pueden prolongar fases de "latencia", incluso durante años.

Basar en una simple determinación de anticuerpos la garantía de sanidad frente a alguna de estas patologías es, desde cualquier punto de vista incorrecto.

– Tolerancia inmunológica:

Animales nacidos de madres infectadas pueden resultar negativos a las pruebas, aunque estén a su vez infectados; ello ocurre cuando la infección ha tenido lugar durante el desarrollo fetal, y que antes de que el sistema inmunitario del feto aprenda a distinguir "lo propio" de "lo extraño"; en este caso, el feto tomará como propio un antígeno correspondiente a virus o bacteria, y no producirá anticuerpos contra él, por la misma razón que no los produce contra sus propias células.

Estos animales serán negativos toda su vida, y se comportarán como eliminadores de gérmenes, con el consiguiente peligro de mantenimiento de la enfermedad, ya que no podrán ser desenmascarados fácilmente.

Se puede, y se debe, prevenir su presencia impidiendo, o evitando en lo posible, la práctica de esperar a que animales positivos y gestantes paran su cría antes de ser sacrificados.

Este fenómeno de tolerancia inmunológica es, en general, posible, para cualquier tipo de enfermedad infecciosa, aunque sea más probable para algunas que para otras. Así, ha sido descrito en brucelosis (bovina y de pequeños rumiantes), peste porcina clásica, diarrea vírica bovina, parvovirus porcina, etc.

– Muestra inadecuada:

En ocasiones una muestra poco apropiada puede provocar un resultado negativo, aún cuando proceda de un animal positivo. Tal ocurre, por ejemplo, con una muestra de suero para investigar anticuerpos (que arrojará resultado negativo durante el periodo negativo de inmunidad) cuando debería haberse recogido una muestra de sangre completa (o vísceras) para investigar antígeno (que daría positivo durante el mismo periodo). De ahí se deriva la importancia de la clase y momento de recogida de la muestra. Y no sólo de la muestra, sino de la petición analítica que se hace al Laboratorio. Todo ello puede tener, como vemos, capital importancia a la hora de obtener un resultado válido.

– Supresión inducida de la respuesta inmune:

Diversos estados fisiológicos pueden dar lugar a una respuesta inmunitaria más débil de lo normal, o incluso suprimirla. Así, los estados de parasitación fuerte, la hipoalimentación o la caquexia, y por supuesto determinados tratamientos farmacológicos (antiinflamatorios de origen esteroide) son los más frecuentes.

– Presencia de anticuerpos incompletos:

En ocasiones los animales (y las personas) desarrollan y poseen en su sangre este tipo de antígeno, bloqueando los sitios de unión (epitopos) e impidiendo que pueda hacerlo con los específicos, si los hay. Por ello se llaman también "anticuerpos bloqueantes"; están descritos en reacciones tan frecuentes como la brucelosis, especialmente en ganado caprino.

– Fatiga inmunológica:

Un exceso de estímulo antigénico, continuado en el tiempo, agota la reacción inmunológica y acaba por anularla. Eso es lo que ocurre en las enfermedades infecciosas de curso crónico, donde en ocasiones se pueden observar animales hiporreactivos. Esa es la base de los animales "anérgicos" a la prueba de tuberculina, siendo precisamente los más gravemente afectados por la enfermedad lo que paradójicamente, pueden dar falsos resultados negativos a la prueba. El mismo fenómeno ha sido observado en vacunos viejos en las pruebas de diagnóstico de brucelosis, que van arrojando titulaciones séricas cada vez más bajas en edades avanzadas e infecciones antiguas.

c).- Sobre un rebaño:

Sobre un colectivo las probabilidades de cometer errores cuando obtenemos resultados negativos de todos los individuos son mucho más pequeñas que cuando, en base a un solo resultado individual, queremos asegurar la ausencia de enfermedad.

De tal manera que la total negatividad de todos los individuos de un rebaño ya en sí representa una garantía.

No obstante, la posibilidad de infección latente existe, y no tendremos la total seguridad hasta no obtener dos resultados negativos consecutivos, separados por un periodo suficiente como para "desenmascarar" a todos los individuos que, en la primera prueba, pudieran encontrarse en periodo de incubación.

A MANERA DE CONCLUSIÓN FINAL.

Después de todo lo dicho sobre pruebas, diagnósticos, interpretaciones, resultados verdaderos y falsos, etc. ¿Qué conclusión podría sacarse en claro?, ¿Cuál es, en definitiva, el núcleo de la cuestión?.

En primer lugar, que el hecho de recoger una muestra, enviarla al laboratorio, esperar el resultado, y aplicarlo en consecuencia, son actos que, por repetitivos que puedan ser, no deben ser nunca rutinizados, ya que cada uno tiene su importancia.

En segundo lugar, que con esos hechos tan simples se pretende comprender una realidad compleja, donde intervienen tres grupos de factores: primero, la presencia o no de infección en un animal o grupo de animales. Esa es la realidad a medir. Segundo, la herramienta a aplicar; es decir la tecnología a emplear, con todos sus condicionantes. Tercero, la medida obtenida; o sea el resultado analítico. Y cuarto, el proceso deductivo final que, a partir de lo anterior, nos permita concluir algo cierto; está fuera del conjunto pero es necesario para darle coherencia y sentido.

Este criterio final, es sin duda alguna, lo más valioso de todo el conjunto.

Y en tercero, y último lugar, que las pruebas denominadas "oficiales de diagnóstico", aún con su cuota de posibilidad de error, representan magníficas herramientas para la consecución de nuestros objetivos. Pero debemos conocerlas, en su fundamento y aplicaciones, para sacar el máximo rendimiento de sus resultados.

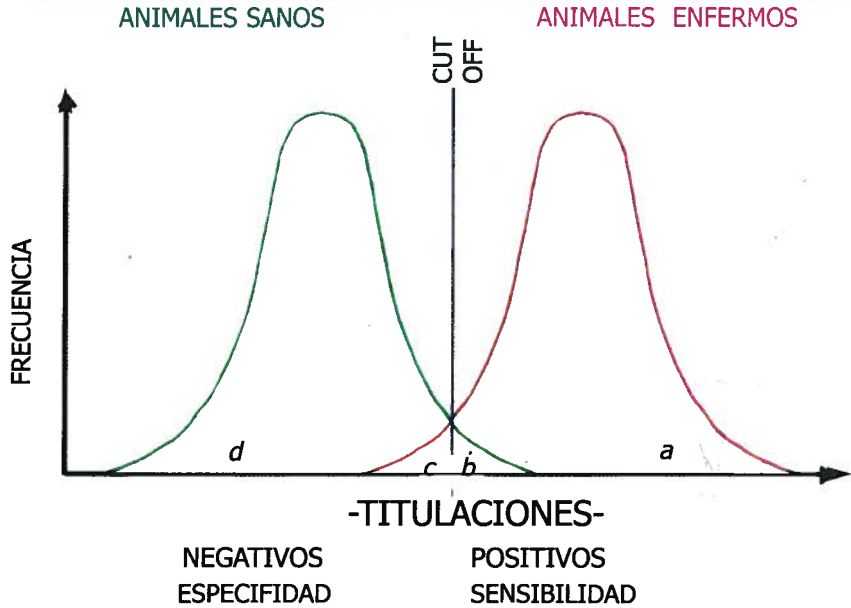


LABORATORIO DE SANIDAD Y PRODUCCION ANIMAL

-CORDOBA-

JUNTA DE ANDALUCIA

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO



		ENFERMEDAD		
		+	-	TOTAL
TEST	+	a	b	a+b
	-	c	d	c+d
TOTAL		a+c	b+d	N

$$S = \frac{a}{a+c}$$

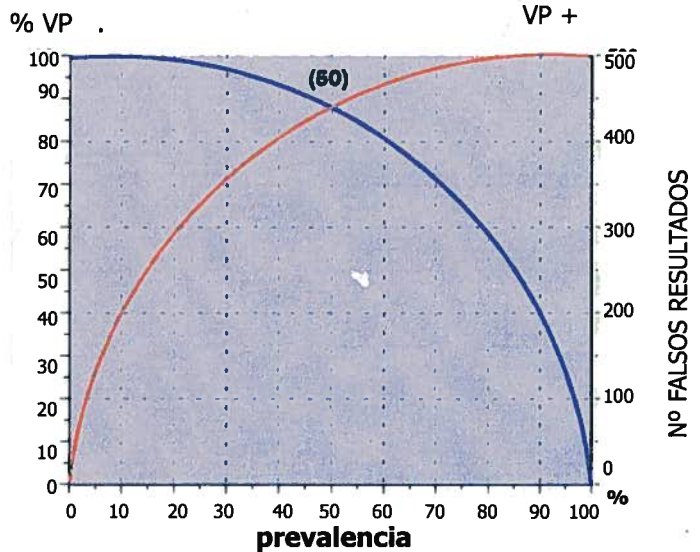
$$E = \frac{d}{b+d}$$

$$VP = \frac{a}{a+b}$$

$$VP = \frac{d}{c+d}$$

$$(a+b) + (c+d) = N$$

- a = Enfermos Verdad
- b = Falsos Positivos
- c = Falsos Negativos
- d = Sanos Verdaderos



$$S = 90\%$$

$$E = 90\%$$

$$n = 10.000$$

**VALOR PREDICTIVO DEL TEST
DIAGNÓSTICO**

SEN = 95 ESP = 90

A) PREVALENCIA 20%

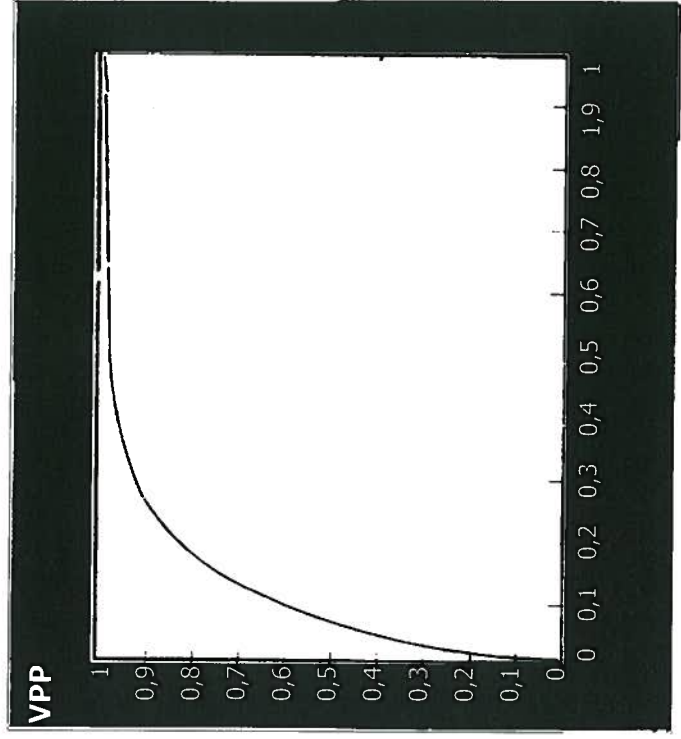
	+	-	
+	190	80	270
-	10	720	730
	200	800	

VPP = 0,70

B) PREVALENCIA 2%

	+	-	
+	190	80	117
-	10	720	883
	20	980	

VPP = 0,16





LABORATORIO DE SANIDAD Y PRODUCCION ANIMAL
-CÓRDOBA-
JUNTA DE ANDALUCÍA

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE C.S.G. VALOR BIOLÓGICO DE DIFERENTES TEST

PATOLOGÍAS	ESPECIE	TEST	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
BRUCELOSIS (ABORTUS)	BOVINA	R.B.	95,2-100	77,6-98,5
		S.A.L.	62-98,6	87,7-99,5
		R.F.C.	97,2	88,2-98,5
		I.D.R.	93	92,4-80
		E.L.I.S.A.	37	99
BRUCELOSIS (MELITENSIS)	OVINA/CAPRINA	R.B.	68-73	83-86
		R.F.C.	95	97
L.E.B.	BOBINA	E.L.I.S.A.	98,5-100	99-100
P.C.B.	BOBINA	R.F.C.	95-97	96-98
TUBERCULOSIS	BOBINA	INTRADERMORREACCIÓN	69-96	89-99

AGRICULTURA



GANADERÍA



PESCA Y ACUICULTURA



POLÍTICA, ECONOMÍA Y SOCIOLOGÍA AGRARIA



FORMACIÓN AGRARIA



CONGRESOS Y JORNADAS



R.A.E.A.



ISBN 84-8474-124-9



9

7 8 8 4 8 4 7 4 1 2 4 4

P.V.P.: 18 €



JUNTA DE ANDALUCÍA

Consejería de Agricultura y Pesca