



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Últimos avances en Microbiología médica diagnóstica.

Alumno: Wilson Alejandro Lozano Patzi

Jaén. Julio, 2022.



**UNIVERSIDAD DE
JAÉN**

Trabajo Fin de Grado

Últimos avances en Microbiología médica diagnóstica.



Alumno: Wilson Alejandro Lozano Patzi

Jaén. Julio, 2022

ÍNDICE

1. Resumen	4
1.1 Abstract	4
2. Introducción	5
2.1. Agentes etiológicos	7
2.1.1. <i>Virus</i>	7
2.1.2. <i>Bacterias</i>	9
2.1.3. <i>Hongos</i>	10
2.1.4. <i>Parásitos</i>	11
3. Objetivos	12
4. Material y métodos	13
5. Resultado y discusión	14
5.1. Encuentro entre el huésped y el microorganismo	14
5.2. Diagnóstico de laboratorio	15
5.2.1. <i>Microscopia</i>	15
5.2.2. <i>Detección de antígenos</i>	16
5.2.3. <i>Cultivo</i>	17
5.2.4. <i>Detección, amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos</i>	20
5.3. Últimos avances en diagnóstico microbiológico	27
5.3.1. <i>Últimos avances en diagnóstico microbiológico de la COVID – 19</i>	36
6. Conclusiones	42
7. Bibliografía	43

1. RESUMEN.

La Microbiología es una ciencia que ha evolucionado de manera continua, desde la observación de “animálculos” realizada por Anton van Leeuwenhoek hasta la caracterización de los mismos permitiendo su clasificación dentro de grandes familias como: virus, bacterias, hongos y parásitos. Entre ellos prestaremos especial atención a aquellos que suponen una amenaza para el ser humano, por su capacidad para producir enfermedades.

Este Trabajo Fin de Grado se centrará en, una de las aplicaciones prácticas de la Microbiología, los métodos de diagnóstico para la detección de enfermedades producidas por agentes patógenos, mediante la realización de una revisión que abarcará desde los métodos tradicionales, los más comúnmente usados hoy en día, hasta aquellos más innovadores, pero no por ellos menos útiles, que han sido desarrollados en los últimos años. Dentro de este último grupo prestaremos especial atención a los empleados para combatir la reciente pandemia causada por la COVID-19.

Palabras clave: diagnóstico, microbiología, patógenos, SARS – CoV – 2.

1.1. Abstract.

Microbiology is a science that has evolved continuously, from the observation of "animalcules" by Anton van Leeuwenhoek to their characterisation, allowing their classification within large families such as: viruses, bacteria, fungi and parasites. Among them, we will pay special attention to those that pose a threat to humans, due to their capacity to produce diseases.

This Final Degree Project will also focus on one of the practical applications of Microbiology, namely diagnostic methods for the detection of diseases caused by pathogenic agents, by carrying out a review that will range from traditional methods that are the most commonly used today to those more innovative, but no less useful, that have been developed in recent years. Within the latter group, we will pay special attention to those used to combat the recent pandemic caused by COVID-19.

Key words: diagnosis, microbiology, pathogens, SARS - CoV - 2.

2. INTRODUCCIÓN.

La microbiología se define como la parte de la Biología que estudia los microorganismos. Ahora bien, adentrándonos un poco en la historia que dio lugar a la acuñación de dicho término, tendríamos que remontarnos al año 1674 en el que Anton van Leeuwenhoek, con la ayuda de unas lentes que él mismo pulimentó, fue capaz de observar por primera vez unos seres diminutos a los que llamó “animálculos”.

Tuvieron que pasar aproximadamente unos 100 años para que Otto Müller ampliase los estudios de Leeuwenhoek y siguiendo los criterios de Linneo, estableciese una primera clasificación de las bacterias dividiéndolas en géneros y especies.

Hacia 1840 Friedrich Henle propuso una teoría (“teoría de los gérmenes” de las enfermedades) según la cual estos microorganismos serían los responsables de causar enfermedades en el ser humano.

Finalmente, en la década de 1870 a 1880 fueron Robert Koch y Louis Pasteur quienes confirmaron dicha teoría, demostrando que enfermedades como la rabia, el carbunco o el cólera entre otras, eran producidas por dichos microorganismos.

Como muchos otros ámbitos dentro del mundo de la ciencia, la Microbiología no podía quedar exenta de una revolución y actualización de los conocimientos previos de forma continua. Todo ello impulsado por el Proyecto Genoma Humano, un trabajo a nivel mundial que terminó en 2005 con la secuenciación completa del genoma humano, determinando las secuencias de aproximadamente 3000 millones de nucleótidos que componen los 23000 genes codificadores de proteínas que forman el ADN humano y cuyo principal legado fue el desarrollo de tecnologías y soluciones informáticas que permiten la generación y análisis de grandes cantidades de datos de secuenciación de ADN y ARN mensajero (Murray *et al.*, 2013).

Este proyecto supuso además la base sobre la que posteriormente se desarrollaría el Proyecto Microbioma Humano, donde se analiza la composición genética de las poblaciones bacterianas que viven tanto en el interior como en el exterior del ser humano. Dicho proyecto inició su andadura en 2007 con la recolección de muestras provenientes de boca, piel, intestino y vagina, permitiendo la identificación de microorganismos mediante la secuenciación de regiones específicas del gen 16S del ARN ribosómico y la determinación de la información sobre el contenido génico de

toda la población mediante la secuenciación de todo el genoma de un grupo de muestras (Cho & Blaser, 2012). Los resultados obtenidos mostraron que el intestino y la vagina son las partes del cuerpo con mayor y menor diversidad taxonómica respectivamente, además de que diversos microentornos, tenían su propio microbioma específico (Fig. 2).

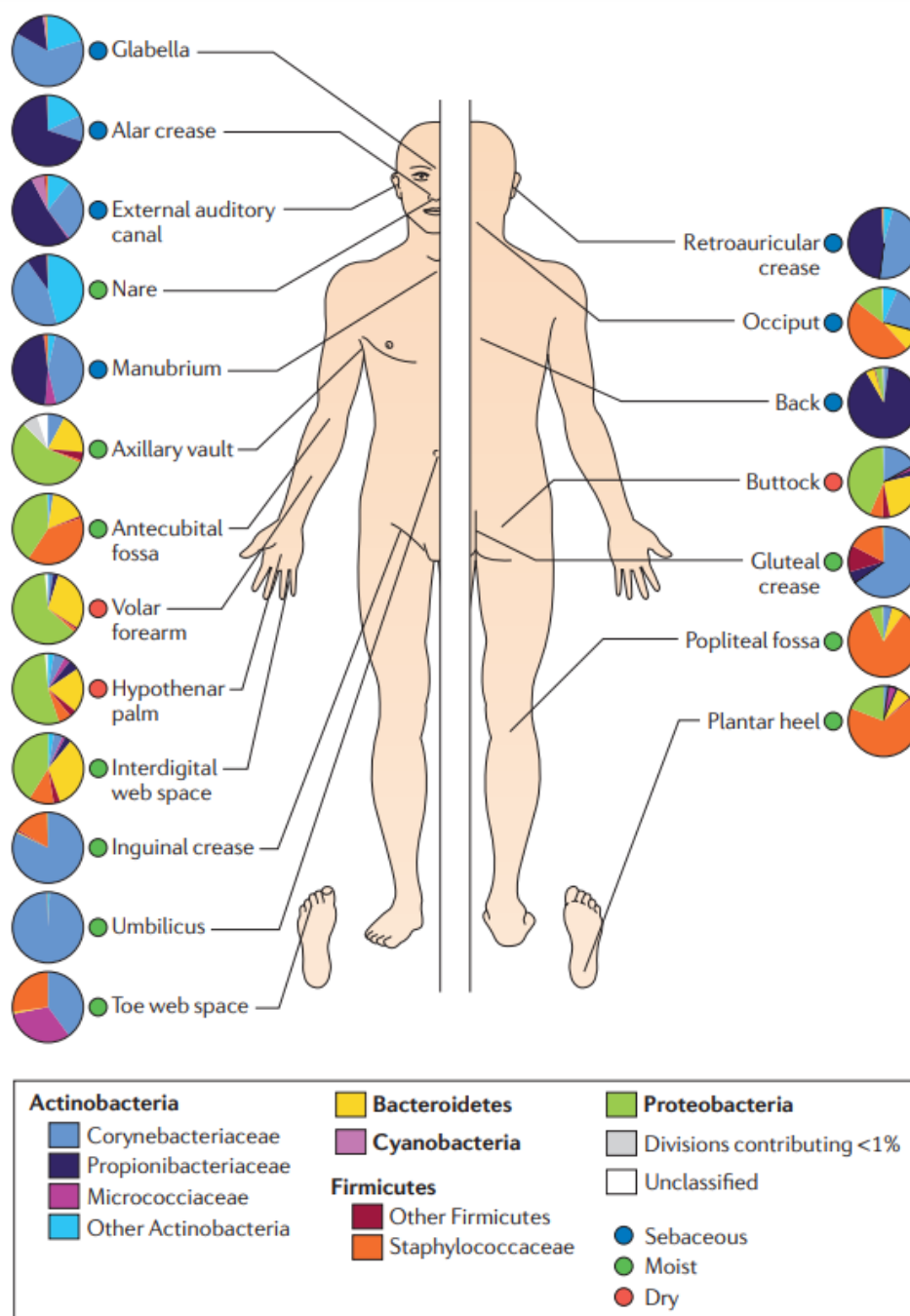


Figura 2 Distribución topográfica de las bacterias en regiones de la piel (Grice & Segre, 2011).

2.1. Agentes etiológicos.

El grado de complejidad del mundo de la microbiología médica es tal que, como hemos visto anteriormente, existen miles de tipos de microorganismos diferentes repartidos tanto por el interior como por el exterior del ser humano. Además, una gran parte de ellos tiene capacidad patogénica. Es por ello que resulta necesario realizar una clasificación de dichos organismos atendiendo a sus rasgos distintivos.

2.1.1. Virus.

Se trata de parásitos intracelulares obligados, ya que van a depender de la maquinaria bioquímica de la célula hospedadora para su replicación, además su reproducción va tener lugar mediante el ensamblaje de componentes individuales en lugar de por fisión binaria (Murray *et al*, 2013). Constan además de un genoma compuesto por ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) y para poder replicarlo van a depender de la maquinaria biosintética de la célula hospedadora, a la que tendrá que adaptarse.

La partícula vírica consiste en un genoma de ácido nucleico empaquetado en una cubierta proteica (cápside) y, en ocasiones, una membrana externa (envoltura) (Fig. 2.1), denominado virión. Contendrá también una serie de proteínas o enzimas accesorias que facilitarán la replicación inicial en la célula (Pellett *et al.*, 2014).

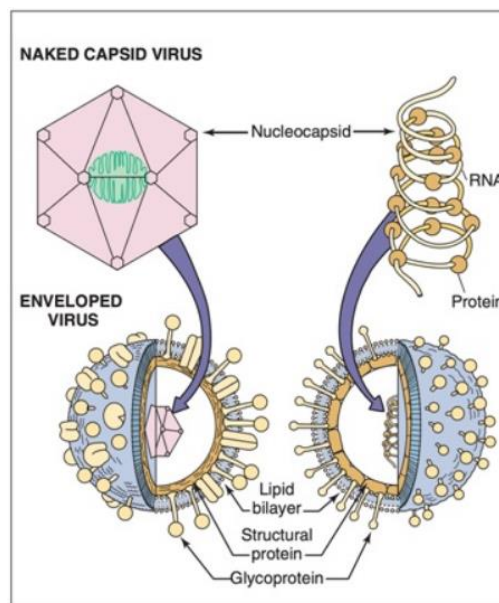


Figura 2.1 Estructura de un virus con cápside icosaédrica desnuda (arriba izquierda) y de virus con envoltura (abajo), con nucleocápside icosaédrica (izquierda) o ribonucleocápside helicoidal (derecha) (Murray *et al.*, 2013).

Podemos clasificarlos en función de su material genético de la siguiente forma (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Familias de virus ADN, ARN y algunos de sus miembros más importantes (Murray *et al.*, 2013).

Virus ADN		Virus ARN	
Género	Miembros	Género	Miembros
<i>Poxvirus</i>	Virus de la viruela	<i>Paramyxovirus</i>	Virus parainfluenza, Virus del sarampión
<i>Herpesvirus</i>	Virus del herpes simplex tipo 1 y 2, Virus de la varicela – zóster, Virus de Epstein – Barr	<i>Ortomyxovirus</i>	Virus de la gripe, tipos A, B y C
<i>Adenovirus</i>	Adenovirus	<i>Coronavirus</i>	Coronavirus, Virus del síndrome respiratorio agudo grave
<i>Papillomavirus</i>	Virus del papiloma	<i>Arenavirus</i>	Virus de la fiebre de Lassa
<i>Polyomavirus</i>	Virus JC, Virus BK	<i>Rhabdovirus</i>	Virus de la rabia
<i>Parvovirus</i>	Parvovirus B19	<i>Filovirus</i>	Virus Ébola, Virus Marburg
<i>Hepadnavirus</i>	Virus de la hepatitis B	Retrovirus	Virus de la leucemia de células T humanas tipos I y II, Virus de la inmunodeficiencia humana

2.1.2. Bacterias.

Las bacterias se caracterizan por presentar un genoma constituido por una molécula única circular con dos cadenas de ácido desoxirribonucleico (ADN) compuestas por unos 5 millones de pares de bases (Murray *et al.*, 2013). Además, emplean un ribosoma de menor tamaño, el ribosoma 70S, por lo general cuentan con una pared celular formada por peptidoglicano que rodea las membranas protegiéndolas del entorno, esto permite que puedan sobrevivir en entornos hostiles: presión osmótica baja, temperaturas extremas (tanto altas como bajas) o ambientes secos (Radkov *et al.*, 2018).

En parte, la gran diversidad de agentes patógenos que se describen entre las bacterias se sustenta en la capacidad que poseen para transferir e intercambiar material genético entre ellas. En cuanto a los mecanismos que emplean las bacterias para realizar el intercambio genético, podemos destacar:

- Elementos genéticos móviles: caracterizados por su elevado grado de transmisibilidad, contienen ácido desoxirribonucleico (ADN) de un microorganismo que lo libera en el ambiente para que posteriormente sea captado por otro individuo capaz de reconocerlo y fijarlo. Siendo estos: transposones, plásmidos y bacteriófagos (virus que infectan a bacterias concretas).
- Islas de patogenicidad (PAI): son grandes grupos de genes relacionados con la patogenicidad y ubicados en el cromosoma bacteriano. Se caracterizan por: poseen uno o más genes de virulencia, suelen estar asociados con genes de ácido ribonucleico de transferencia (ARNt), poseen inestabilidad genética y por lo general tienen estructura de mosaico con componentes adquiridos en distintos momentos (Schmidt & Hensel, 2004).

2.1.3. Hongos.

Caracterizados por ser un grupo variado y bien distribuido de microorganismos con una función principal, que es la de degradar materia orgánica. Tienen además una existencia heterótrofa como: saprobiontes, simbioses, comensales o parásitos (Murray *et al.*, 2013).

Dentro de la patogenia de la micosis podemos distinguir dos grandes grupos, siendo estos:

- Patógenos primarios: patógenos fúngicos primarios productores de infecciones respiratorias. Cuentan con una fase saprobia en la que se produce la formación de las células infecciosas transportadas por el aire y una fase parasitaria en la que el hongo se reproduce asexualmente y desarrolla los factores de virulencia que le permitirán sobrevivir a condiciones ambientales hostiles (Cole, 2020).
- Patógenos oportunistas: en este caso será el estado del hospedador el que determine el grado de patogenicidad. Por lo general, se desarrollarán como colonizadores benignos o como saprobios ambientales y causarán una infección grave únicamente ante una deficiencia en las defensas del hospedador (Cramer & Perfect, 2009).

Las principales afecciones asociadas a infecciones micóticas quedan reflejadas como sigue (Tabla 2.2):

Tabla 2.2 Características de los patógenos fúngicos y primarios oportunistas (Murray *et al.*, 2013).

Patógenos primarios		Patógenos oportunistas	
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Blastomycosis pulmonar primaria y crónica	Género <i>Candida</i>	Candidiasis mucocutánea y bucal / vaginal
<i>Coccidioides immitis</i>	Infección pulmonar inicial, Meningitis	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Neumonía criptocócica primaria, Meningitis
<i>Histoplasma capsulatum</i>	Histoplasmosis pulmonar aguda y crónica	Género <i>Aspergillus</i>	Aspergilosis broncopulmonar alérgica, Sinusitis, Aspergiloma
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Afectación crónica de un solo órgano o multifocal		

2.1.4. Parásitos.

Se trata de animales invertebrados capaces de producir enfermedades en el ser humano y en animales (Murray *et al.*, 2013).

Si bien es cierto que dichas enfermedades son consideradas como tropicales, el mundo globalizado en el que vivimos hace que sea realmente útil e importante su conocimiento, debido a la gran escalada de casos que se han registrado en los últimos años, así lo refleja el estudio llevado a cabo por (Edwards & Krishna, 2004) y que queda reflejado a continuación (Tabla 2.3).

Tabla 2.3 Morbilidad estimada de las infecciones parasitarias (Murray *et al.*, 2013).

Infección	N.- estimado de infectados	Muertes (anuales)
Paludismo	> 500 millones	2,5 millones
Filariasis linfática	128 millones	0
Leishmaniasis	2 millones	59.000
Anquilostomiasis	> 1.000 millones	-
Esquistosomiasis	200 millones	500.000 a 1 millón
Trichuriasis	900 millones	-
Tripanosomiasis	100.000 casos nuevos por año	50.000
Ascariasis	1.300 millones	60.000
Oncocerquiasis	17,7 millones	0
Enfermedad de Chagas	16 – 18 millones	50.000

De manera tradicional los parásitos se han clasificado atendiendo a la morfología de sus estructuras intracitoplasmáticas y su modo de reproducción. Aunque debido a los avances tecnológicos su clasificación actualmente se basa en la bioquímica y biología molecular, comparando subunidades pequeñas del ácido ribonucleico ribosómico (SUP ARNr) (Mathison & Pritt, 2019).

Quedando clasificados en función de su importancia médica de la siguiente manera (Tabla 2.4):

Tabla 2.4 Parásitos de importancia médica (Murray *et al.*, 2013).

Reino	Filo	Microorganismos
Protozoa	<i>Metamonada</i> (flagelados)	<i>Giardia, Chilomastix</i>
	<i>Parabasala</i> (flagelados)	<i>Dientamoeba, Trichomonas</i>
	<i>Percolozoa</i> (flagelados)	<i>Naegleria</i>
	<i>Euglenzoa</i> (flagelados)	<i>Leishmania, Trypanosoma</i>
	<i>Amebozoa</i> (amebas)	<i>Acanthamoeba, Entamoeba</i>
	<i>Apicomplexa</i> (esporozoos)	<i>Cyclospora, Toxoplasma, Plasmodium</i>
	<i>Ciliophora</i> (ciliados)	<i>Balantidium coli</i>
Stramenopila	<i>Bigyra</i>	Género <i>Blastocystis</i>
Animalia	Nematelmintos (nematodos, gusanos redondos)	<i>Trichinella, Ascaris, Enterobius</i>
	Platelmintos	Trematodos, Cestodos
	Artrópodos	Crustáceos, arañas, insectos

3. OBJETIVOS.

El principal objetivo de este Trabajo Fin de Grado es la realización de una revisión bibliográfica que pretende hacer un repaso a la historia de la microbiología en lo que a métodos de diagnóstico médico se refiere. Se hará especial mención a los últimos avances que se han realizado en este campo.

Partiendo desde sus inicios y cómo surgió esta ciencia, hasta el día de hoy, haciendo especial hincapié en lo que a métodos de diagnóstico médico se refiere, resaltando la importancia de que éstos se mantengan actualizados y evolucionen de manera acorde a las nuevas circunstancias microbiológicas a las que nos tengamos que enfrentar.

Así pues, esta revisión se centrará en dar a conocer los últimos avances realizados en el diagnóstico microbiológico y las técnicas que de ello deriven y que presenten un futuro prometedor en la resolución de problemas recientes en este ámbito.

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

Para la realización de esta revisión bibliográfica ha sido necesario recopilar información de carácter científico y que esté debidamente contrastada.

La principal fuente de información han sido los siguientes libros (Tabla 4), a los que se tuvo acceso a través del catálogo de la Biblioteca Digital de la Universidad de Jaén (BUJA):

Tabla 4 Bibliografía consultada a través del catálogo de la Universidad de Jaén.

Autor y Año	Título
Murray, Rosenthal & Pfaller, (2017)	<i>Microbiología médica</i>
Carroll, Morse, Mietzner & Miller (2016)	<i>Jawetz, Melnick & Adelberg Microbiología médica</i>
Forbes, Sahm & Weissfeld, (2009)	<i>Bailey & Scott Diagnóstico microbiológico</i>
Mims, Playfair, Roitt, Wakelin & Williams (1999)	<i>Microbiología médica</i>

Además de los libros y de manera complementaria se recurrió a artículos científicos, que tratasen la información requerida de un modo más profundo y actualizado, ya que los avances en los últimos años han sido determinantes y los manuales carecen de esta necesaria actualización continua. Para ello se emplearon distintos motores de búsqueda como pueden ser:

- PubMed: base de datos que recibe soporte del NCBI (Centro Nacional de Investigación Biotecnológica) de USA. En ella se albergan más de 30.000.000 citas.
- ResearchGate: página web de colaboración que orienta a investigadores que hacen ciencia de cualquier disciplina. Cuenta con una base de datos con más de 35 millones de registros, foros, grupos de discusión, etc.
- Google Scholar: se trata del propio motor de búsqueda de Google en el que se puede encontrar bibliografía científico – académica con acceso a editoriales, bibliotecas, repositorios y bases de datos bibliográficas entre otras.

Algunas de las palabras clave que se han empleado han sido: microbiological diagnosis, COVID AND diagnosis, molecular diagnosis, PCR, clinical metagenomic y DNA sequencing, entre otras.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Una vez conocidos los agentes etiológicos capaces de generar patologías en el ser humano, vamos a centrarnos ahora en los métodos que existen para llevar a cabo su diagnóstico e identificación. Como paso previo analizaremos la relación que se establece entre el huésped y el microorganismo.

5.1. Encuentro entre el huésped y el microorganismo.

En sentido contrario a lo que una primera impresión nos puede dar a entender, las relaciones que se establecen entre el huésped y un microorganismo son siempre bidireccionales.

Un error muy frecuente es pensar que porque el ser humano utiliza microorganismos para su beneficio propio (industria alimenticia, insecticidas biológicos o el uso de ingeniería genética para la eliminación de residuos industriales) es el dominante en esta relación; pero una vez que se entiende que los microorganismos comparten el objetivo común de sobrevivir, y que además lo han logrado, resulta mucho más difícil determinar cuál de los dos participantes es el usuario y cuál el usado (Forbes *et al.*, 2009).

En la Fig. 5.1 se exponen las distintas fases de la relación que establece un microorganismo con el huésped.

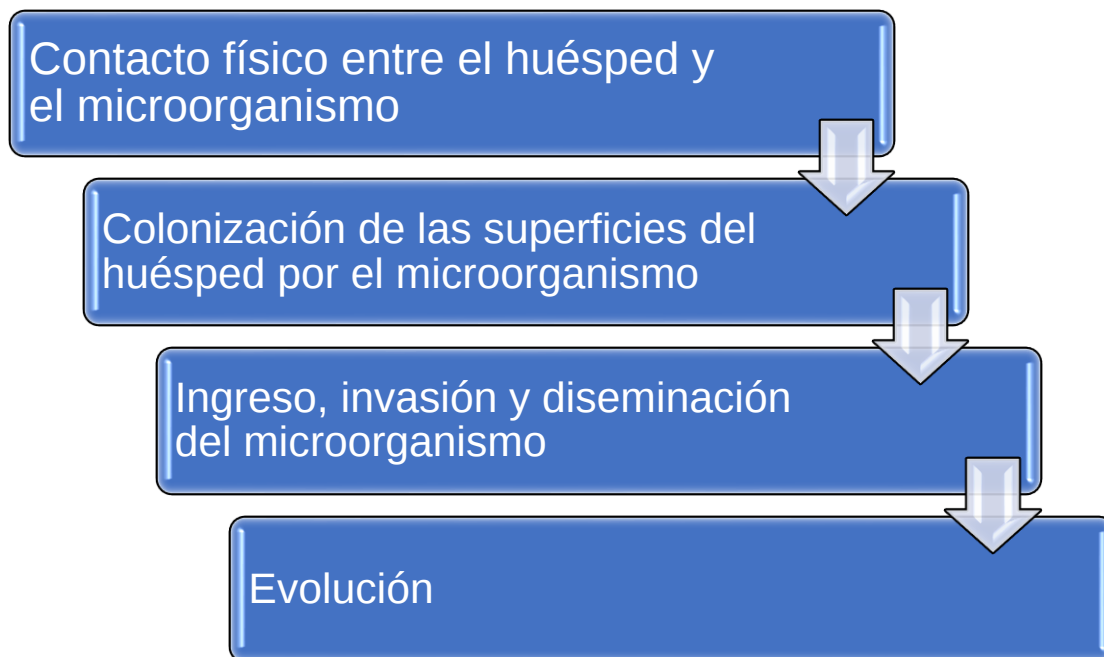


Figura 5.1 Fases generales de la interacción huésped – microorganismo (Forbes *et al.*, 2009).

5.2. Diagnóstico de laboratorio.

En muchas ocasiones, los agentes etiológicos anteriormente descritos, suelen compartir los mismos métodos de diagnóstico en el laboratorio de microbiología, es por ello que a continuación serán citados y descritos brevemente con la intención de más adelante centrarnos especialmente en aquellos métodos más recientes.

Por lo general la detección de patógenos en un laboratorio de diagnóstico clínico puede realizarse mediante distintos métodos:

5.2.1. Microscopia.

Es la primera herramienta y la más básica con la que cuenta el clínico, aunque no por ello deja de ser efectiva, mediante una primera observación puede realizar una primera criba para clasificar al patógeno atendiendo a su tamaño y forma. Un ejemplo sería la diferenciación de un coco como una bacteria esférica, mientras que un aspecto de bastón será indicativo de un bacilo y una forma serpenteante de un espirilo (Fig. 5.2.).

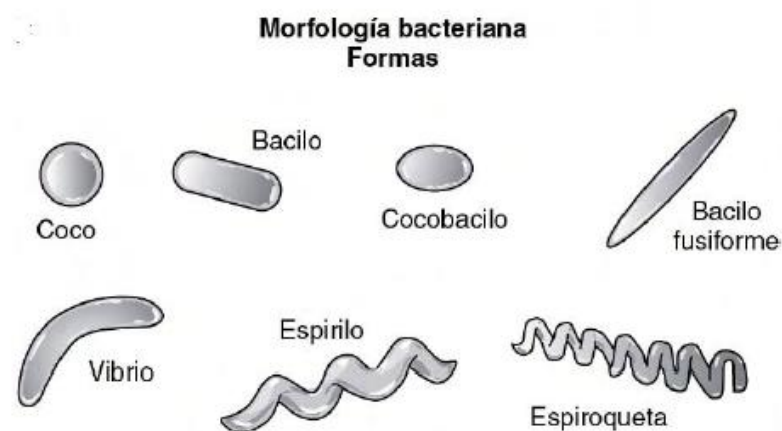


Fig. 5.2. Morfología de las bacterias (Murray *et al.*, 2013).

Si a esto se añade el uso de la tinción de Gram, que emplea el violeta cristal como colorante inicial y la safranina como colorante de contraste, es posible realizar una distinción entre bacterias grampositivas y bacterias gramnegativas (Fig. 5.3), siendo las primeras las que adquirirán un color morado debido a su gruesa capa de peptidoglicano en la pared celular, que permite la retención del colorante, mientras que las gramnegativas tendrán una coloración roja por acción del colorante de contraste (Meroueh *et al.*, 2006).

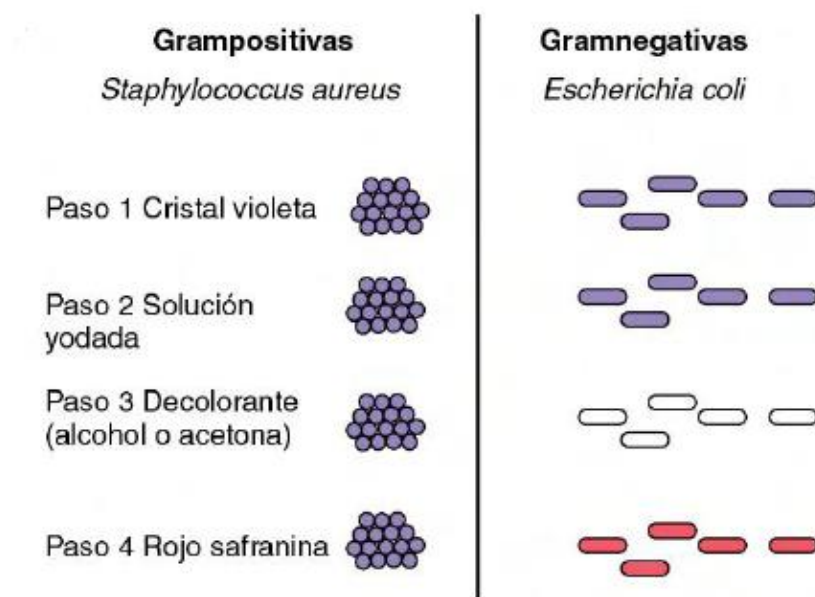


Fig. 5.3 Bacterias grampositivas con el cristal violeta retenido por la gruesa capa de peptidoglicano; bacterias gramnegativas que se visualizan por acción del colorante de contraste rojo (Murray *et al.*, 2013).

5.2.2. Detección de antígenos.

Mediante el serotipado se pueden enfrentar anticuerpos específicos capaces de detectar los antígenos característicos de una cepa bacteriana en concreto, esto resulta especialmente útil cuando se trabaja con organismos difíciles de cultivar *in vitro* (*Treponema pallidum* causante de la sífilis) o demasiado peligrosos para ser cultivados en el laboratorio (*Francisella* responsable de la tularemia) (Murray *et al.*, 2013).

5.2.3. Cultivo.

De manera similar a la microscopia, el uso adecuado de medios de cultivo para el crecimiento de bacterias permitirá la posibilidad de determinar el tipo de bacteria con la que se trabaja. Estos a su vez pueden clasificarse según su finalidad en:

1. Medios de enriquecimiento: caracterizados por presentar los nutrientes específicos que requieren los agentes patógenos en su crecimiento. Suele emplearse para el desarrollo de una bacteria en concreto dentro de una mezcla de microorganismos, mediante el uso de especificidad de nutriente. Se utiliza por ejemplo para el crecimiento de *Legionella pneumoniae*.
2. Medios nutritivos: a diferencia de los anteriores estos medios se caracterizan por presentar los nutrientes necesarios para el desarrollo de microorganismos sin tener en cuenta los requerimientos especiales de cultivo, es decir, no van a promover el crecimiento de un patógeno en particular por encima de los demás.
3. Medios selectivos: es el caso opuesto a los medios nutritivos, ya que en este caso contienen agentes que inhiben el crecimiento de todos los microorganismos excepto aquellos que resultan de interés. Como agentes inhibidores suelen emplearse: sales biliares, colorantes o alcoholes entre otros.
4. Medios diferenciales: presentan un factor que hace que las colonias bacterianas muestren características metabólicas propias de su grupo, permitiendo así diferenciarlas de otras bacterias que crecen en la misma placa (Forbes *et al.*, 2009).

A pesar de la diferenciación que se hace dentro de los medios de cultivo, cabe destacar que muchos de ellos no se ciñen a una única función, sino que cumplen varias de ellas en el diagnóstico de bacterias. Es el caso del Agar MacConkey y el Agar sangre, como veremos a continuación.

Algunos medios artificiales para el diagnóstico bacteriológico son:

- Agar sangre: es un medio enriquecido que permite la diferenciación de bacterias con actividad hemolítica, pudiendo ser α – hemolíticas (producen una hemólisis parcial) en el caso de presentar un halo verdoso y turbio o bien, β – hemolíticas (producen una hemólisis total) si el halo observado es transparente.
- Cultivo en MacConkey: medio tanto diferencial como selectivo ya que es específico para el aislamiento de enterobacterias capaces de crecer en presencia de sales biliares. Además, permite diferenciar a las cepas fermentadoras de lactosa de las que no lo son, mediante un viraje del indicador de pH rojo neutro a un color rosa o amarillo respectivamente.
- Agar Hektoen entérico: se trata de un medio moderadamente selectivo, utilizado en el diagnóstico de microorganismos gramnegativos entéricos, especialmente para las especies de *Shigella* y *Salmonella*, retrasando selectivamente el crecimiento de bacilos no patógenos. A la vez es también un medio diferencial ya que contiene citrato férrico que permite la detección de organismos productores de H₂S mediante la formación de un precipitado negro (Forbes *et al.*, 2009).
- TSA: es un medio multiuso que se obtiene tras la digestión, por parte de enzimas, tanto de la soja como de la caseína y que sirve como base para la preparación de otros medios de cultivo, por ejemplo, el Agar sangre no es más que TSA enriquecido con sangre. Además, facilita el crecimiento de bacterias difíciles de cultivar como pueden ser: *Brucella*, *Corynebacterium*, *Listeria* y *Neisseria* entre otras.

Cierto es que existen una gran variedad de medios de cultivo empleados habitualmente en el diagnóstico microbiológico de enfermedades infecciosas, es por ello que a modo de resumen serán agrupados en la Tabla 5.

Tabla 5 Medios de cultivo para el diagnóstico bacteriano (Forbes *et al.*, 2009).

Medio de cultivo	Objetivo principal
Agar bilis esculina (BEA)	Aislamiento diferencial e identificación presuntiva de estreptococos del grupo D y enterococos
Agar de Bordet – Gengou	Aislamiento de <i>Bordetella pertussis</i>
Agar amortiguado con carbón y extracto de levadura (BCYE)	Enriquecimiento para especies de <i>Legionella</i>
Caldo tioglicolato para <i>Campylobacter</i>	Medio de mantenimiento selectivo para el aislamiento de especies de <i>Campylobacter</i>
Agar cefsulodina – irgasán – novobiocina (CIN)	Selectivo para especies de <i>Yersinia</i> ; útil además para el aislamiento de especies de <i>Aeromonas</i>
Agar sangre con cistina y telurito	Aislamiento de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
Agar manitol salado	Aislamiento selectivo de estafilococos
Agar alcohol feniletílico (PEA)	Aislamiento selectivo de cocos grampositivos y bacilos anaerobios gramnegativos
Caldo selenito	Enriquecimiento para el aislamiento de especies de <i>Salmonella</i>
Caldo tetratonato	Selectivo para especies <i>Shigella</i>
Agar de Thayer – Martin	Selectivo para <i>Neisseria gonorrhoeae</i> y <i>N. meningitidis</i>
Caldo tioglicolato	Favorece el crecimiento de anaerobios, aerobios, microaerófilos y microorganismos con requerimientos especiales de cultivo
Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)	Aislamiento y diferenciación de especies <i>Salmonella Shigella</i> y de otros bacilos entéricos gramnegativos

5.2.4. Detección, amplificación y secuenciado de ácidos nucleicos.

De manera similar a como se utilizan anticuerpos específicos para la detección de antígenos característicos, es también posible el uso de sondas de ADN para detectar, localizar y cuantificar secuencias de ácidos nucleicos específicos en muestras clínicas (Murray *et al.*, 2013).

Para la obtención de sondas de ADN se emplean métodos químicos que clonan fragmentos genómicos específicos de un genoma vírico; mientras que en el caso de los ARN se empleará la transcriptasa inversa retrovítica para a continuación clonar los vectores correspondientes.

En el ámbito de estas técnicas destacaremos las siguientes, puesto que son las más empleadas debido a su fiabilidad y precisión:

- FISH (hibridación fluorescente *in situ*): esta técnica se empezó a emplear hace casi treinta años, siendo reconocida prácticamente de inmediato como una herramienta muy útil en el análisis y la composición de los cromosomas, llegando a jugar un papel importante en la consecución del objetivo perseguido por el Proyecto Genoma Humano. Dado su elevado nivel de precisión y su capacidad de adaptación tardó muy poco tiempo en irrumpir en otros ámbitos de la ciencia, como es el caso de la investigación biológica y médica, permitiendo el desarrollo de aplicaciones y métodos de diagnóstico aplicables a diferentes campos como: genética clínica, neurociencia, toxicología, y diagnóstico microbiológico (Volpi & Bridger, 2008).

Mediante esta técnica se aplican tratamientos químicos o térmicos a la muestra que se desea identificar, provocando así la desnaturalización de las cadenas de ADN para a continuación añadir las sondas que permitirán la hibridación. Las sondas de ADN se marcan con nucleótidos radiactivos que producen fluorescencia, de modo que cuando la sonda encuentra su segmento correspondiente se fija a él y permite su detección y localización mediante inmunofluorescencia indirecta o enzimoimmunoanálisis (Murray *et al.*, 2013) (Fig. 5.4).

Actualmente la técnica FISH se ha diversificado gracias a la mejora en lo que a sensibilidad y especificidad se refiere, a raíz de la mayor comprensión que existe en la actualidad de las características químicas y físicas de los ácidos nucleicos, a lo que se suman las mejoras en el campo de la microscopia de fluorescencia y la imagen digital (Volpi & Bridger, 2008).

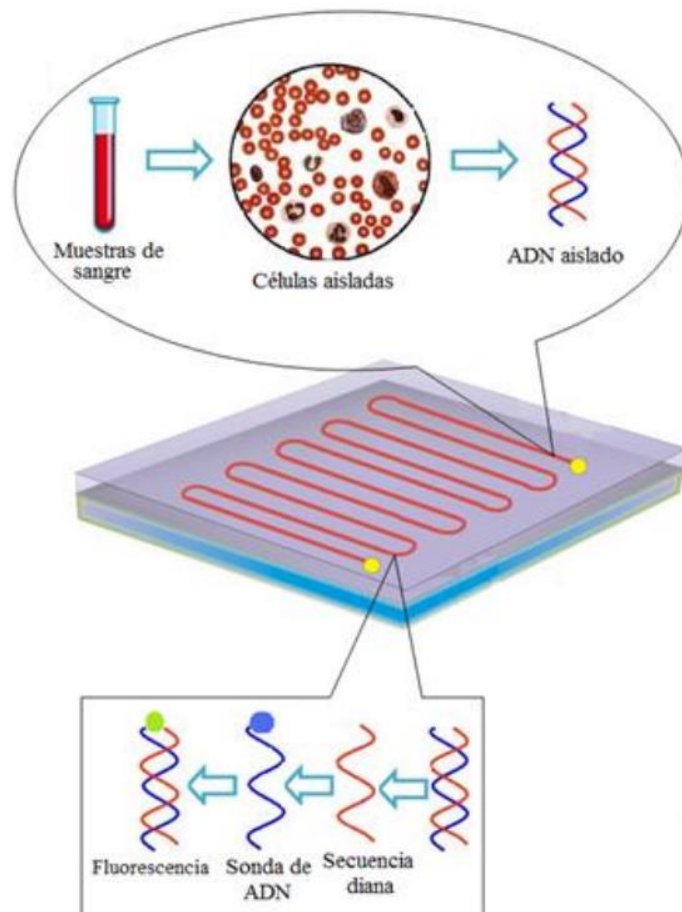


Fig. 5.4 Principio de la hibridación de ácidos nucleicos. La identificación se establece por hibridación positiva (presencia de fluorescencia) (Devadhasan et al., 2011)

- PCR (reacción en cadena de la polimerasa): surge de la observación que realizó Mullis del método de secuenciación de Sanger, el cual producía señales débiles al secuenciar el gen de una sola copia debido a la concentración insuficiente de ADN (Sanger *et al.*, 1977). Esta concentración tan baja era producida por la necesidad de desnaturalizar la molécula de ADN para pasar de una cadena doble a una sencilla, siendo en esta última donde actúa el cebador inverso para finalmente dar lugar al amplicón (fragmento de ADN amplificado).

Otro de los inconvenientes que presentó la técnica en primera instancia era la necesidad de reponer constantemente, tras cada desnaturalización, la polimerasa hasta que años más tarde se observó que la polimerasa de la bacteria *Thermophilus aquaticus* era capaz de soportar temperaturas de hasta 94°C eliminando así la necesidad de reponerla antes de cada paso (Saiki *et al.*, 1988).

El principio básico de este método de diagnóstico consiste en el empleo de la enzima Taq ADN polimerasa, que en última instancia será la que lleve a cabo la amplificación de regiones del ADN. Además, será también necesaria la presencia en exceso de trifosfatos de desoxirribonucleótidos (dNTPs), oligómeros de ADN (primers) y un termociclador (Zhu *et al.*, 2020).

El funcionamiento, como podemos observar en la Fig. 5.5 es el que sigue:

1. El ADN de doble cadena es desnaturalizado mediante calor.
2. Alineación de los primers (hibridación) con las hebras individuales de ADN.
3. Extensión de los primers por acción de la ADN polimerasa (elongación), dando lugar a dos copias de la hebra de ADN original.

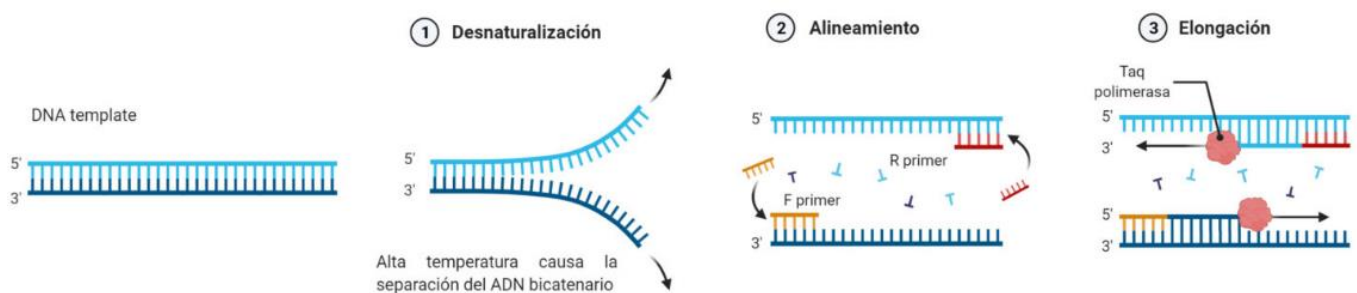


Fig. 5.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (LA TÉCNICA de LA PCR (INTRODUCCIÓN Y PRINCIPIOS BÁSICOS) - Labbox España, 2022).

El mayor inconveniente al que se puede enfrentar esta técnica es la llamada ampliación inespecífica, o lo que es lo mismo, la amplificación de regiones del ADN que no son de interés. Esto es debido a que las polimerasas de ADN que se emplean en esta técnica actúan en un rango entre 60 y 72°C (Fig. 5.6). No obstante a veces pueden activarse por debajo de esta horquilla haciendo que los primers se unan de manera no específica (Zhu *et al.*, 2020).

Para evitar este problema se emplean las llamadas Taq polimerasas Hot Start, que llevan consigo un inhibidor evitando así su activación, solamente cuando se alcanza la temperatura óptima de elongación este inhibidor se disocia.

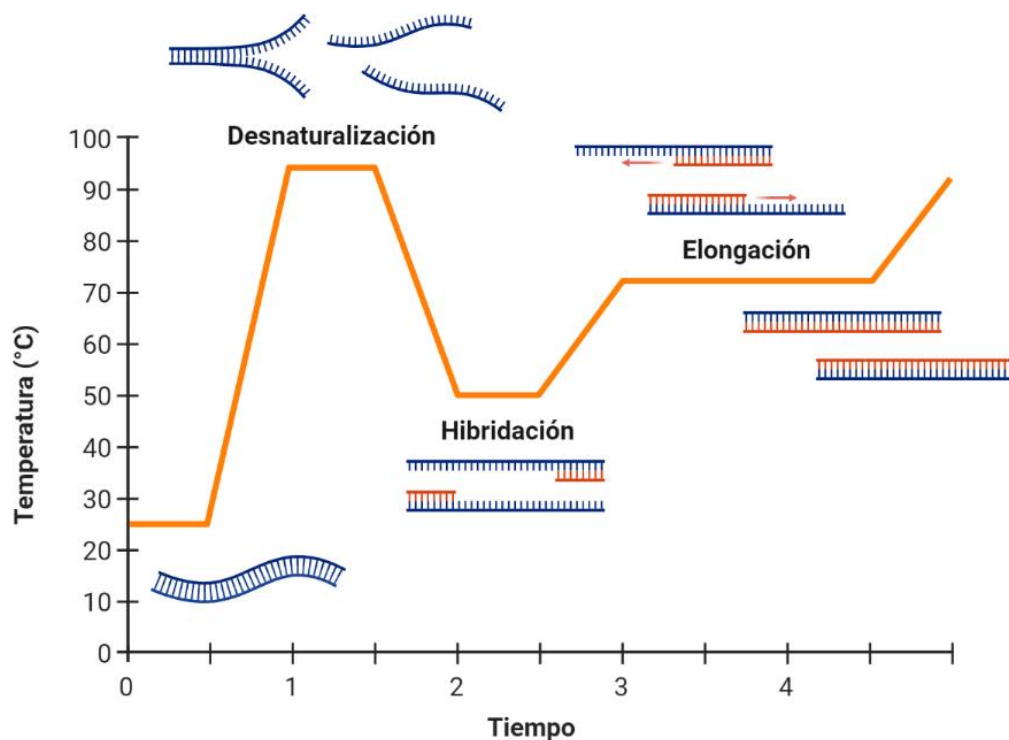


Fig. 5.6 Rango de temperaturas óptimas para las distintas fases del proceso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (LA TÉCNICA de LA PCR (INTRODUCCIÓN Y PRINCIPIOS BÁSICOS) - Labbox España, 2022).

- ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas): esta técnica ha sido empleada como un ensayo inmunológico rutinario para la detección de antígenos específicos con el fin de controlar las respuestas de los anticuerpos a la vacunación (Farr, 1958). Además, ha servido para sustituir otros métodos como el radioinmunoanálisis, que suponía un riesgo para la salud debido a los isótopos radiactivos utilizados.

El fundamento de este método de diagnóstico, se basa en la detección, por parte de un anticuerpo enlazado a una enzima, de un antígeno inmovilizado, surgiendo de este enlace un producto que puede ser detectado (Plested *et al.*, 2022).

1. Para ello será necesario realizar la unión de un antígeno a una superficie de plástico tratado que tenga afinidad por proteínas. Prestando especial atención a la cantidad de antígeno que se añade, ya que puede provocar falsos positivos (exceso de antígeno) o falsos negativos (falta de antígenos).
2. Conjugación del antígeno con una enzima (ensayos de competición de antígenos), por lo general peroxidasa o fosfatasa alcalina, durante un tiempo determinado para producir una solución coloreada que pueda ser cuantificada en el espectrofotómetro. En el caso de querer realizar alguna de sus variantes (Fig. 5.7) como: ensayos directos, indirectos o de tipo sándwich lo que se conjugará será el anticuerpo.

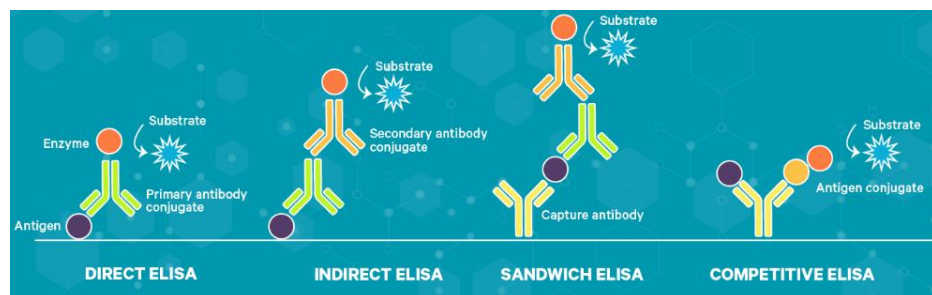


Fig. 5.7 Fundamento de la técnica ELISA y sus distintas variantes. (*Introducción al Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas - Prueba ELISA* | Redes de Tecnología, 2021).

3. La reacción enzimática se revelará mediante un lavado que permita la eliminación de inmunocomplejos (moléculas marcadas pero no fijadas), a continuación se añade el sustrato enzimático que es donde tendrá lugar la reacción, pasado un tiempo se añade una solución stop que la detenga y finalmente se lee la densidad óptica en el espectrofotómetro.

- SDS – PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de detergente aniónico dodecilsulfato sódico): Es una técnica basada en la separación de proteínas en función de su grado de movilidad electroforética sobre una tira de gel (Fig. 5.8). Esta a su vez dependerá de factores como la longitud de la cadena polipeptídica y la masa molecular principalmente (Kurien & Scofield, 2012).

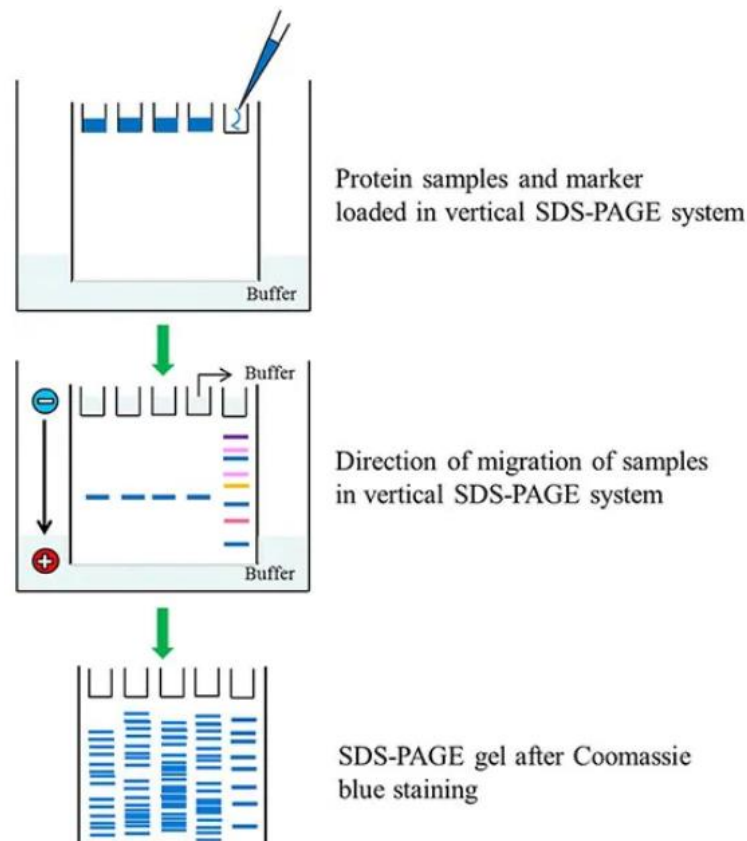


Fig. 5.8 Técnica SDS – page para la separación de proteínas en función de su peso molecular. (Kurien & Scofield, 2012).

Para poder llevar a cabo la separación de proteínas es necesaria, en primer lugar, su desnaturalización, lo que permitirá la eliminación de la estructura tanto secundaria como terciaria, pero sin alterar los enlaces disulfuro, añadiendo además una carga negativa proporcional a su masa (Shapiro *et al.*, 1967), como sustancia desnaturalizadora se emplea el SDS (dodecilsulfato sódico).

Se une con una proporción aproximada de 1,4 gr. de SDS por 1,0 gr. de proteína, dando una relación carga/masa uniforme por lo que se deduce que la distancia de migración en el gel está directamente relacionada con el tamaño de la proteína (Weber & Osborn, 2020).

En el caso de que no se añadiese este detergente aniónico se hablaría de una PAGE nativa, en la que proteínas con una masa molecular similar migrarían de manera muy distinta debido a la diferencia en la proporción carga/masa.

Una vez que las proteínas han sido desnaturalizadas, se les aplica una corriente eléctrica sobre una capa de gel de poliacrilamida en un tampón químico, al haber adquirido una carga negativa por acción del SDS se desplazarán a través del gel en dirección hacia el ánodo. Cabe destacar que el gel está compuesto por una serie de poros que serán los encargados de dificultar en mayor o menor medida, atendiendo al tamaño, el desplazamiento de la proteína (Raymond & Weintraub, 1959). Las de menor tamaño atravesarán esos poros sin mayor dificultad recorriendo una mayor distancia, mientras que las mayores encontrarán mayor resistencia y quedarán muy próximas al punto de origen. Terminada la electroforesis se procede a la tinción del gel (mayoritariamente se emplea el azul de Coomassie) lo que permite la observación de distintas bandas a lo largo del gel (Fig. 5.9).

Para su determinación suele realizarse una comparativa con marcadores moleculares de tamaño molecular conocido que se depositan en el gel en una calle aparte (Smith, 2022).

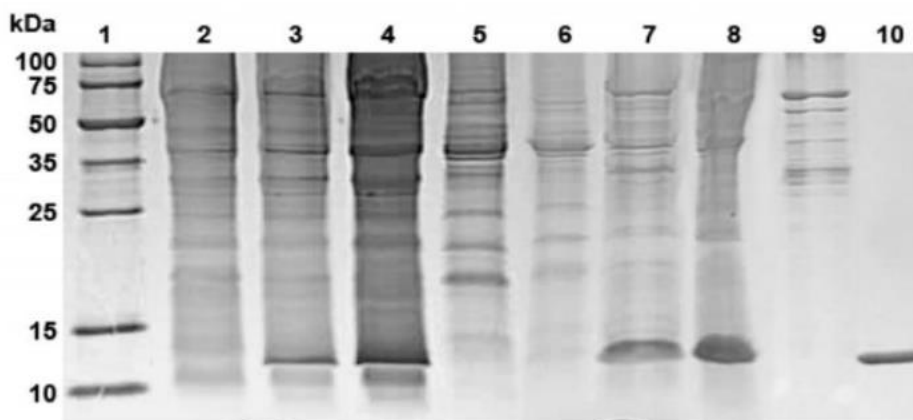


Fig. 5.9 Tira de gel tras el proceso de tinción. Carril 1 marcadores de peso molecular conocido con los que poder realizar la comparativa de las muestras (resto de carriles) (Falero *et al.*, 2009).

La electroforesis en gel es normalmente la primera opción en un ensayo de pureza de proteínas debido a su fiabilidad y a su sencillez. Aun así, se pueden dar falsos positivos y negativos.

5.3. Últimos avances en diagnóstico microbiológico.

- MALDI - TOF: MALDI hace referencia a la desorción/ionización láser asistida por matriz; mientras que TOF es por el detector de iones que se acopla al MALDI para que determine el tiempo que tarda una partícula subatómica en atravesar una determinada distancia (L'Ollivier & Ranque, 2016).

Para la realización de esta técnica serán necesarios los elementos reflejados en la Fig. 5.10:

1. Una fuente de energía (MALDI) que permita la ionización de la muestra y su transformación a fase gaseosa.
2. Un analizador de masas (TOF) capaz de determinar el tiempo de vuelo de los iones, o lo que es lo mismo, el tiempo que tardan en impactar en el detector desde que son excitados.
3. Un detector de iones capaz de transformar la energía de excitación de los iones en un impulso eléctrico, que permitirá la obtención de un perfil característico.

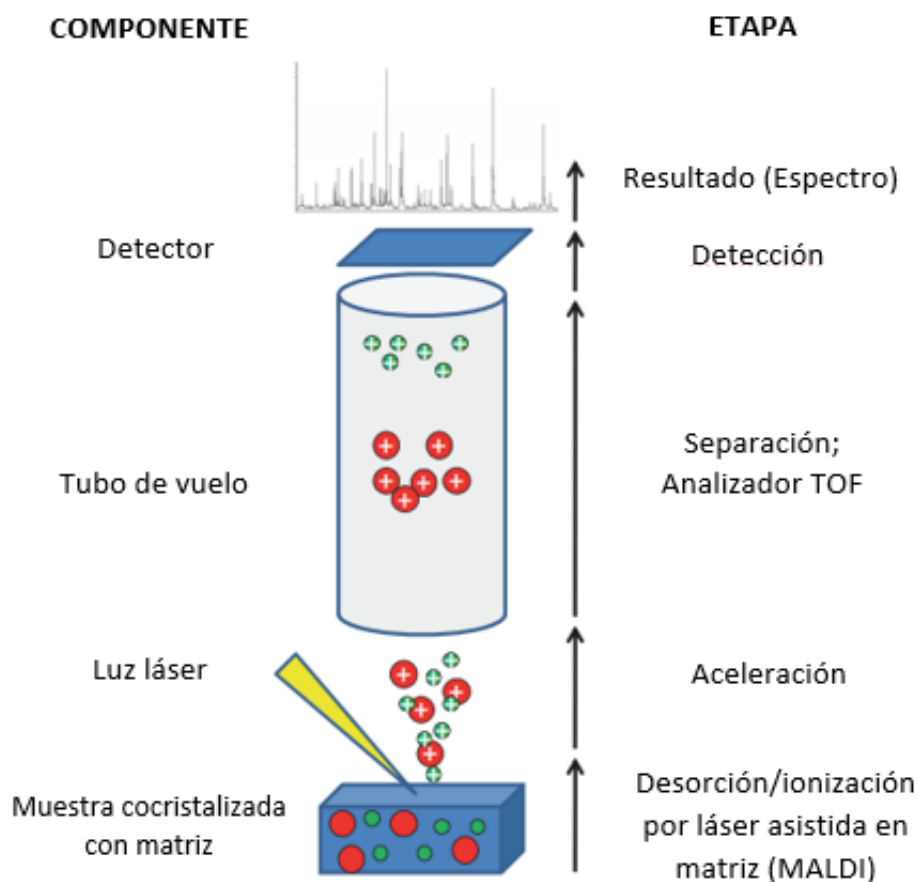


Fig. 5.10 Unidades funcionales dentro de un espectrómetro de masas (Croxatto *et al.*, 2012).

Estas partículas subatómicas se detectarán mediante la técnica de espectrometría de masas, que consiste en determinar de qué manera se distribuyen las moléculas de una muestra atendiendo a su masa, esto a su vez se consigue a través de la evaporación del analito a nivel de moléculas termolábiles y no volátiles como proteínas y lípidos (Jannetto & Fitzgerald, 2016). Para ello se emplea un espectrómetro de masas (Fig 5.11)

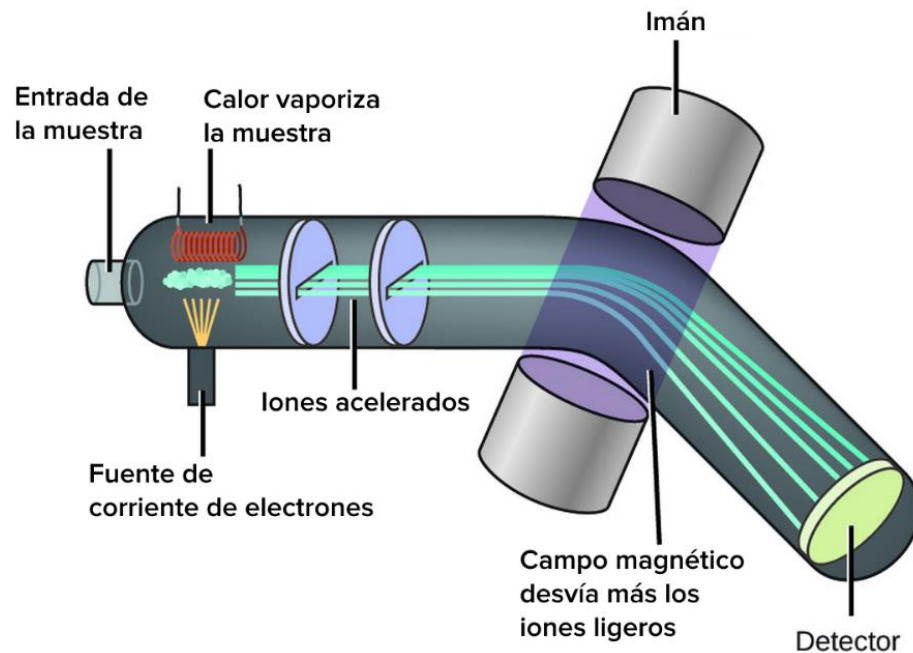


Fig. 5.11 Esquema de un espectrómetro de masas (Skooog *et al.*, 2001)

La realización de la técnica se ve reflejada en la Fig. 5.12 y consiste en:

1. Transferir una colonia bacteriana a la placa de muestra, que además contendrá la matriz, una vez seca se introduce en el espectrómetro de masas.
2. A continuación y por acción del láser, las proteínas de la bacteria, sobre todo las ribosómicas, se ionizan.
3. Mediante campos electrostáticos las proteínas ionizadas son aceleradas para hacer que impacten en el detector, este determinará la relación masa – carga emitiendo una señal con intensidad característica.
4. Dicha intensidad será empleada para elaborar un espectro de masas, siendo éste el que podrá compararse con las bases de datos.

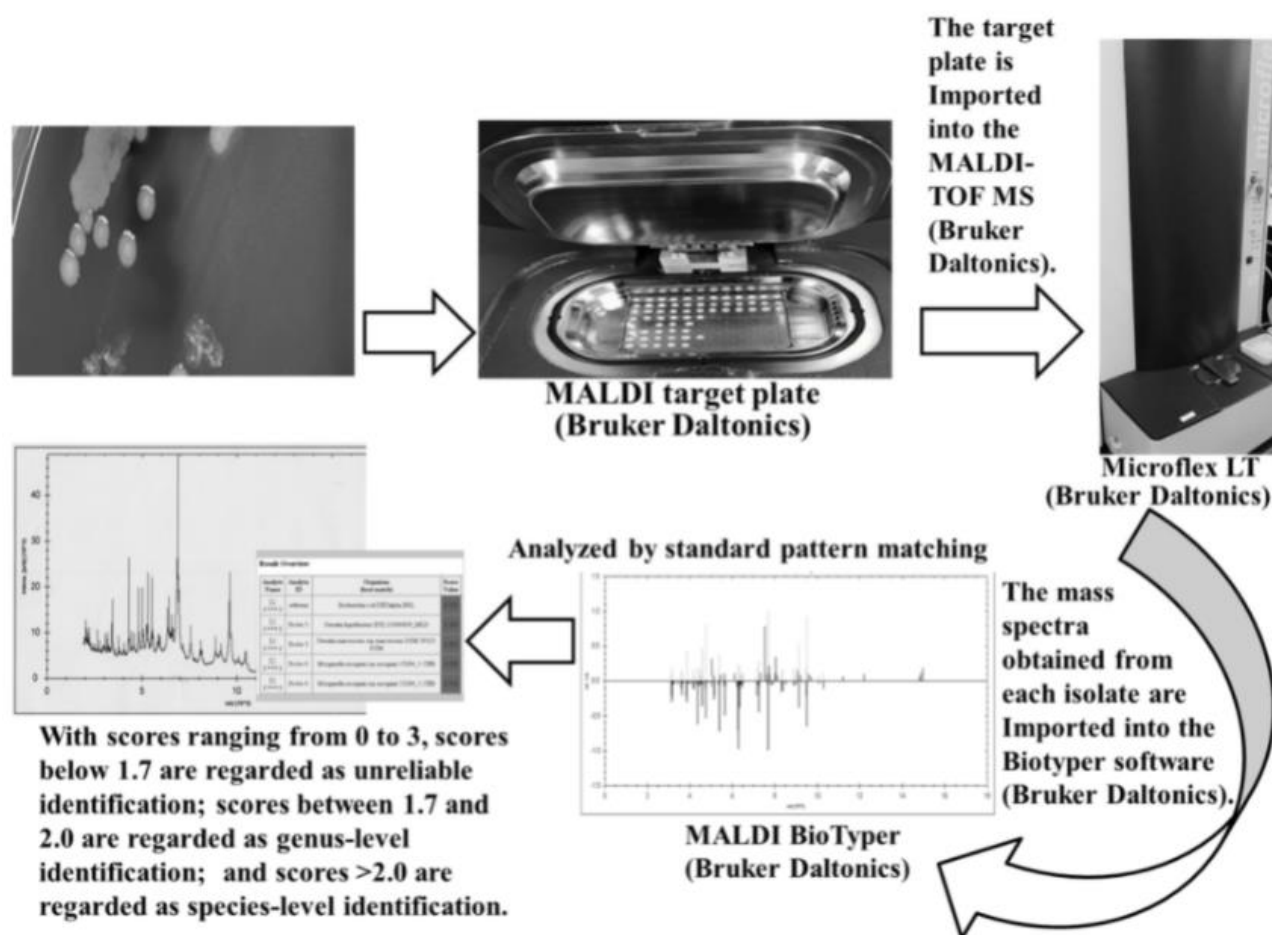


Fig. 5.12 Descripción de la identificación de bacterias mediante la técnica MALDI - TOF MS (Tsuchida *et al.*, 2020).

En definitiva, se trata de una técnica proteómica, cuyo objetivo final es la consecución de un espectro propio del analito estudiado, para una posterior comparación con bases de datos que permita la determinación de género, especie e incluso cepa bacteriana; aunque también es posible la identificación de virus (Croxatto *et al.*, 2012).

- NGS (secuenciación de nueva generación de ADN): esta técnica es conocida por aglutinar un grupo de tecnologías capaces de realizar la secuenciación de fragmentos de ADN de forma masiva y paralela en un breve período de tiempo (Green & Guyer, 2011).

Este procedimiento se recomienda particularmente para el diagnóstico de septicemias, campo que resulta especialmente crítico para el resto de técnicas más convencionales, porque a pesar de que la mayoría de patógenos pueden ser detectados mediante cultivo en un plazo máximo de 48 horas, existe un elevado número de complicaciones que pueden surgir y que dificultan el proceso (Miller *et al.*, 2018). Según la fase pueden ser:

- Fase preanalítica: tratamiento antibiótico previo a la toma de muestra, dificultad en la obtención del volumen necesario para la realización de la prueba y sobre todo posible contaminación.
- Fase analítica: crecimiento promedio del patógeno en medio de cultivo entre 2 y cinco días.

La técnica NGS surge de la necesidad de analizar y secuenciar fragmentos de ADN cada vez más grandes y se basa en un proceso de secuenciación en escopeta (shotgun sequencing) mediante la cual los fragmentos superpuestos de ADN se secuenciaban por separado y luego se ensamblaban en una única secuencia continua (Heather & Chain, 2016).

La principal aplicación de este método es en el campo de la metagenómica, mediante el aporte de un enfoque objetivo para la detección de patógenos a partir de muestras clínicas. No obstante, no es esta la única aplicación posible. Hay que añadir el hecho de que también permite la secuenciación total del genoma de aislados clínicos de bacterias, hongos y virus; todo ello sumado a la metagenómica anteriormente citada permite la caracterización de las cadenas de transmisión (Greninger & Naccache, 2019).

El procedimiento seguido por la técnica es el que sigue:

1. El ADN ha de ser fragmentado en varios segmentos.
2. Mediante el uso de primers o adaptadores se marca en el ADN el punto de inicio para la replicación.
3. Los fragmentos de ADN marcados son amplificados mediante adaptadores basándose en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
4. Secuenciación o lectura de los fragmentos de ADN.
5. Finalmente la secuencia es reconstruida por completo mediante secuencias de referencia y por último los datos son exportados a ficheros de almacenamiento.

La secuenciación propiamente dicha suele realizarse mediante el *Secuenciador Illumina* que goza de una amplia utilización y aceptación por parte de la mayoría de los laboratorios (Gu *et al.*, 2019). Para ello los pasos que sigue son:

- Obtención de un cluster (colonias de un mismo fragmento) a partir de fragmentos amplificados de ADN mediante técnica PCR en puente (5.12)

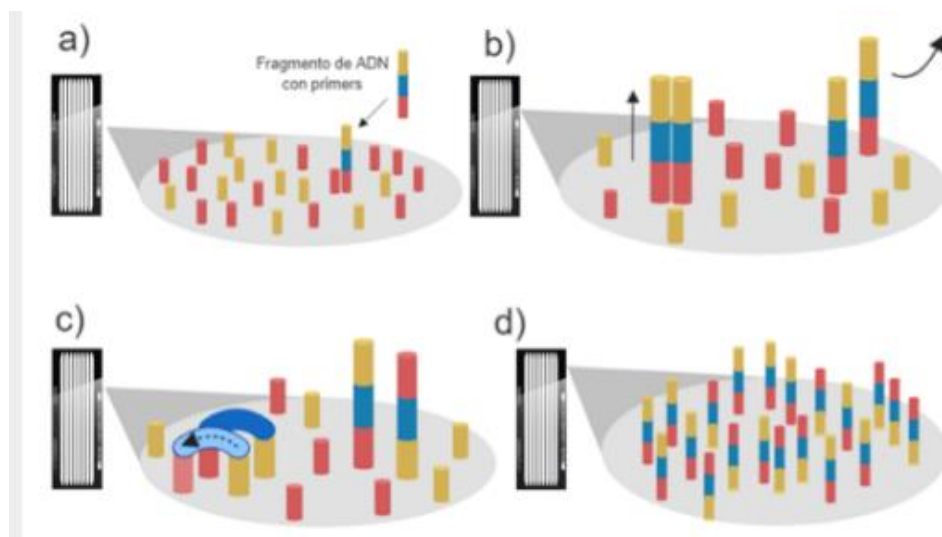


Fig. 5.12 Generación de hebras mediante PCR en puente. a) ADN anclado a la celda de flujo mediante unión de adaptadores a oligonucleótidos complementarios. b) Generación de una hebra reversa y complementaria gracias a la polimerasa; la hebra original se retira. c) La hebra reversa forma un puente y la polimerasa genera una hebra idéntica a la original. d) repetición del proceso tantas veces como sea necesario (Rubio *et al.*, 2020)

- Secuenciación de bases a través de etiquetas fluorescentes, que son añadidas solo cuando la amplificación clonal ha terminado y se pueden retirar las hebras reversas dejando únicamente aquellas que son idénticas a la original (Morozova & Marra, 2008). A continuación, se añaden nucleótidos modificados con terminadores reversibles que evitan la unión de más de un nucleótido en cada sitio de reacción, reduciendo así las probabilidades de error en la secuenciación (Goodwin *et al.*, 2016).

Una por una, las bases irán emitiendo fluorescencia para ser identificadas. Finalmente se retirará cada etiqueta antes de la secuenciación del próximo nucleótido evitando así que dos bases emitan señal de manera simultánea (Zhang *et al.*, 2012).

- NAATs (prueba de amplificación de ácidos nucleicos): Durante los últimos años este método de diagnóstico ha ido ganando popularidad, debido a su capacidad para detectar la presencia de un patógeno en los primeros días de infección, a diferencia de los métodos serológicos (Fig. 5.13) que requieren de más tiempo, ya que no son capaces de detectar el patógeno hasta que no se produce una respuesta por parte del sistema inmune. Esta diferencia de tiempos puede resultar de vital importancia para el tratamiento y supervivencia del paciente en infecciones graves. El éxito de esta prueba se debe precisamente, a la rapidez que aporta para diagnosticar enfermedades como las provocadas por el virus del Ébola, la tuberculosis o la enfermedad provocada por el virus del Zika entre otras, permitiendo la aplicación de un tratamiento adecuado de forma casi inmediata que reduzca la morbilidad y mortalidad (Magro *et al.*, 2017).

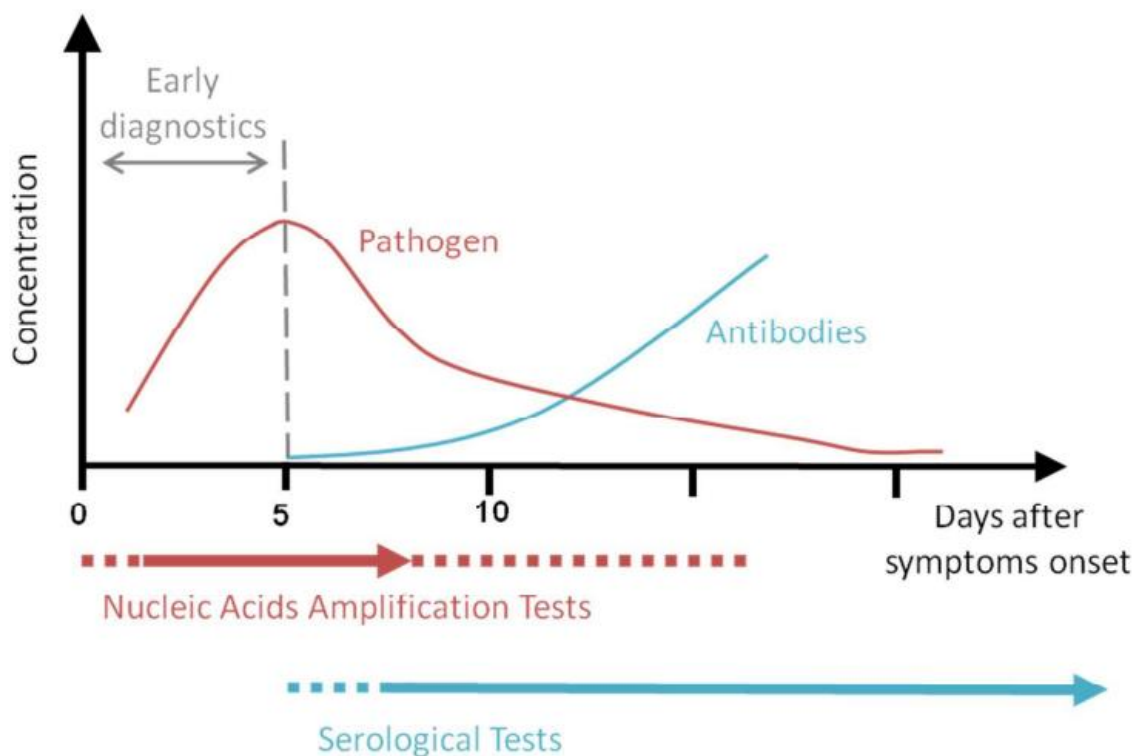


Fig. 5.13 Variación en el tiempo para la detección de patógenos mediante la técnica NAATs y los ensayos serológicos (Magro *et al.*, 2017).

Las NAATs trabajan de manera conjunta con microfluídicos basados en papel (Fig. 5.14) (para sustituir otros sustratos como gel, silicona o plástico), que son dispositivos microfluídicos compuestos por fibras hidrofílicas (de celulosa o nitrocelulosa) que transportan la muestra desde un punto de entrada a otro de salida a través de un medio poroso por capilaridad (Martinez *et al.*, 2009).



Fig. 5.14 Papel microfluídico utilizado en la técnica NAATs (Martinez *et al.*, 2009).

Al igual que en la PCR, el fundamento de esta técnica es la amplificación del ácido nucleico, pero la diferencia reside en que la primera requiere de un equipo sofisticado y costoso debido a la necesidad del termociclador; mientras que la técnica NAATs emplean cebadores y/o enzimas especialmente diseñadas para llevar a cabo la desnaturalización de las hebras de ADN (Bodulev & Sakharov, 2020).

Esta desnaturalización puede llevarse a cabo mediante:

- PCR: es de sobra conocida su utilidad en la amplificación de ácidos nucleicos, no obstante, su uso en papel u otros sustratos como: papel de cromatografía de celulosa (CHR), poliéter sulfona (PES), membrana de policarbonato (PC), fibra de vidrio sin aglutinante (GF) o nitrocelulosa (NC) no ha resultado tener éxito (Rohrman & Richards-Kortum, 2012).
- RPA (amplificación de la polimerasa recombinante): técnica isotérmica que trabaja óptimamente en una horquilla de entre 37 y 42°C amplificando la secuencia objetivo mediante el empleo de recombinasa y polimerasa de desplazamiento de hebras dentro de un sándwich de celulosa y fibra de vidrio (Lo *et al.*, 2013).
- LAMP (amplificación isotérmica mediada por bucle): al igual que la anterior se trata de una técnica isotérmica (60 – 65°C) que amplifica la secuencia diana mediante tres conjuntos de cebadores y una polimerasa capaz de desplazar la hebra. La configuración de estos cebadores hace que la cantidad de ADN generada sea muy superior a la obtenida mediante PCR (Uehara *et al.*, 2016)
- HDA (amplificación dependiente de la helicasa): técnica que utiliza una polimerasa para el desplazamiento de la hebra y una helicasa que desenrolla y separa las hebras de ADN. Recientemente ha sido empleada en la detección de *Mycobacterium tuberculosis* sobre papel cromatográfico de celulosa recubierto con BSA reduciendo así la adsorción de ADN y enzimas (Kumar *et al.*, 2015).

No obstante, no se puede obviar el hecho de que un resultado positivo en estas pruebas, no siempre es indicativo de infección activa, ya que en ocasiones puede ser provocado por una baja concentración bacteriológica (no patógena) o bien, por el ADN de organismos muertos una vez que el paciente ha recibido un tratamiento satisfactorio (Di Bonaventura *et al.*, 2021).

5.3.1. Últimos avances en diagnóstico microbiológico de la COVID – 19.

La reciente pandemia vivida provocada por el virus SARS – Cov – 2 (síndrome respiratorio agudo severo 2) ha supuesto una grave amenaza para el sistema sanitario a nivel mundial, debido al elevado número de contagios, ingresos hospitalarios y fallecimientos producidos.

Este virus se caracteriza por presentar un ARN monocatenario envuelto en una membrana que a su vez estará rodeada por espículas de glicoproteínas, encargadas de dar la forma de corona característica de estos virus (Fig. 5.15); además este ARN codifica cuatro proteínas estructurales fundamentales (Kadam et al., 2021). A saber:

- Espina del glicoproteína (S).
- Membrana de glicoproteína (M).
- Proteína de la envoltura (E).
- Proteína de la nucleocápsida (N).

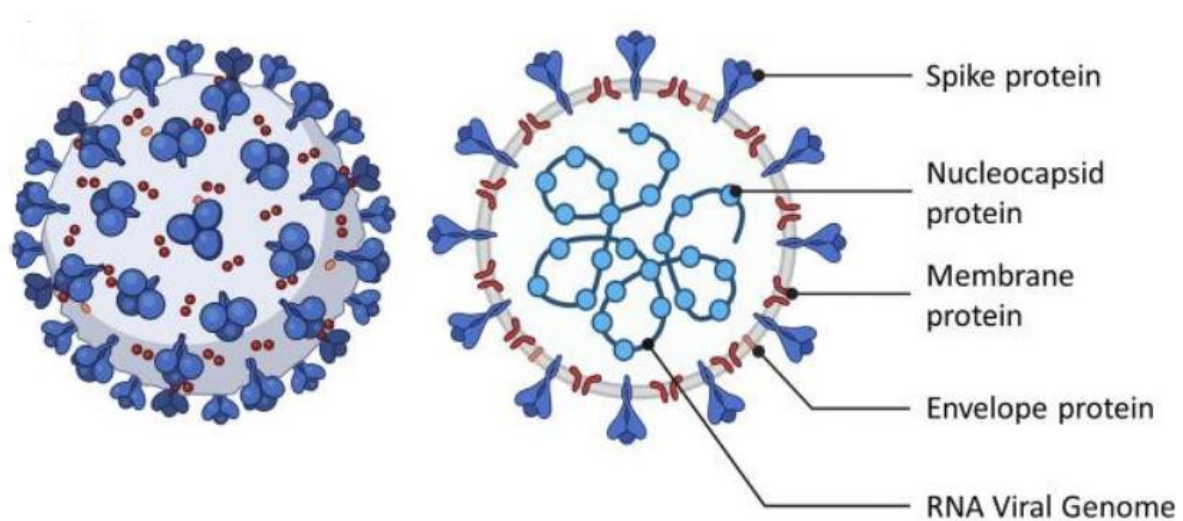


Fig. 5.15 Proteínas estructurales del virus SARS – CoV – 2 (Kadam et al., 2021).

Sin embargo, esta no ha sido la primera amenaza en las dos últimas décadas, durante las cuales se ha observado el surgir de enfermedades víricas graves como: síndrome respiratorio agudo severo (2002), virus de la gripe (influenza) H1N1 (2009), virus del Ébola (2013) o virus del Zika (2015) (Majumder & Minko, 2021).

Los síntomas de la COVID – 19 son diversos y varían mucho de un paciente a otro, desde los más comunes (fiebre, fatiga, tos) a los menos comunes (dolor de garganta, dolor de cabeza, opresión en el pecho) pasando por síntomas menores (náuseas, vómitos, diarreas). Si a eso se le suman los pacientes asintomáticos (aquellos que no presentan ningún síntoma de la enfermedad pero que pueden transmitirla igualmente) estamos hablando de una enfermedad realmente peligrosa y que pone de manifiesto la necesidad de evolución en el campo del tratamiento y el diagnóstico.

Centrándonos en este último, en la Tabla 6 resumimos algunos de los métodos tradicionales e innovadores de detección de esta infección.

Tabla 6. Métodos de diagnóstico para la COVID – 19 (Majumder & Minko, 2021).

Método de diagnóstico	Objetivo	Variantes
Detección del virus	Detectar si una persona está infectada o no por el virus SARS – CoV – 2	RT – PCR RT – LAMP CRISPR ELISA para la detección de antígenos del virus
Test de anticuerpos	Detectar si una persona ha estado infectada o no por el virus SARS – CoV – 2	Serología anti - SARS – CoV – 2 inmunoglobulina M (IgM) e inmunoglobulina G (IgG) Ensayo de flujo lateral basado en nanopartículas ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti - SARS – CoV – 2
Métodos de imagen médica	Detectar manchas opacas en los pulmones con distribución periférica o posterior como signo de COVID – 19	Radiografía pectoral con rayos X Tomografía axial computerizada (TAC) pectoral Ultrasonido en pulmones

A continuación se desarrollan algunas de ellas:

- RT – PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa): se trata de la técnica ideal para el diagnóstico de COVID – 19 a día de hoy. A diferencia de la PCR tradicional, en esta técnica es posible el uso de una molécula de ARN a partir de la cual se retrotranscribe una cadena de ADN complementario (ADNc) a través de la enzima transcriptasa inversa (Green & Sambrook, 2018). A continuación, se realiza una PCR convencional amplificando el ADNc y convirtiéndolo en una doble hebra de ADN, el proceso se repite tantas veces como sea necesario hasta que se produzca la detección del ADNc vírico mediante señal fluorescente o eléctrica (Fig. 5.16).

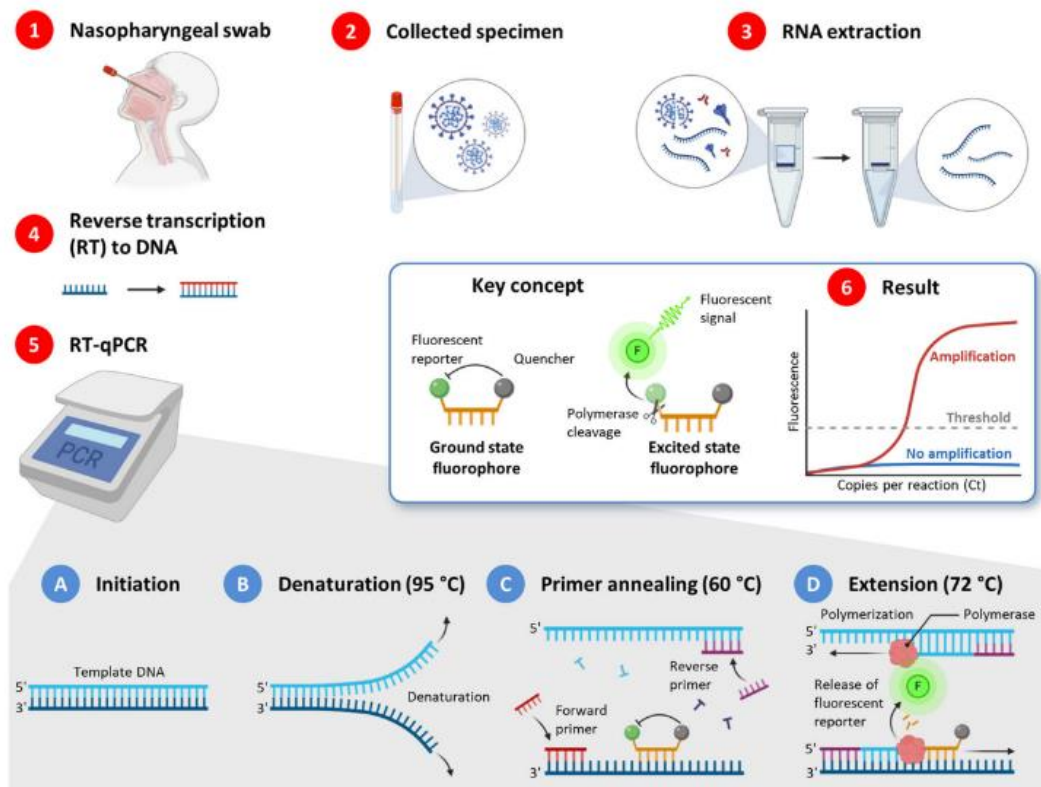


Fig. 5.16 Procedimiento para el diagnóstico de COVID – 19 mediante la técnica RT – PCR (Majumder & Minko, 2021).

Para la obtención de esa señal fluorescente resulta imprescindible la adición de un fluoróforo a la mezcla de la PCR que contendrá trifosfatos de desoxirribonucleótidos (dNTPs) y oligómeros de ADN (primers). La acción del fluoróforo es inhibida mediante el uso de un quencher, que evita la excitación de este por acción de la fuente de luz del termociclador (Majumder & Minko, 2021).

A pesar de la gran utilidad de esta técnica, el hecho de ser nueva hace que tenga muchos aspectos que mejorar aún, como los muchos cambios de temperatura que tiene que efectuar en cada ciclo o el tiempo que se tarda en conseguir resultados.

Para ello empiezan ya a surgir algunas soluciones que proponen el uso de amplificaciones isotérmicas mediadas por bucle de transcripción inversa (RT – LAMP) (Park *et al.*, 2020).

O un nuevo ensayo, aún en fase de prueba, de PCR cuantitativa en tiempo real de paso único altamente sensible para la detección del SARS – CoV – 2 (OSN – qRT – PCR) capaz de detectar la presencia del virus en una muestra incluso si la carga viral es muy baja en un breve periodo de tiempo (Wang *et al.*, 2020).

- Ensayo de flujo lateral basado en nanopartículas: se trata de una herramienta con un futuro prometedor en el diagnóstico de una gran variedad de enfermedades. Su éxito se basa en la sencillez de los instrumentos que usa, así como lo visualmente intuitivos que son sus resultados, pero sobre todo por la fotoestabilidad derivada de la resonancia plasmónica superficial localizada de las nanopartículas de oro que permite la realización de ensayos colorimétricos (AuNP) (Pan *et al.*, 2010).

En los últimos años se ha ensayado su utilidad para el diagnóstico de COVID – 19 mediante la detección de anticuerpos (IgM) en una muestra de suero.

La técnica consiste en recubrir la tira, del sistema de flujo lateral basado en nanopartículas de oro (AuNP – LF), con la proteína de la nucleocápsida como antígeno seguida del anticuerpo IgM antihumano conjugado (Huang *et al.*, 2020). Como se observa en la Fig. 5.18.

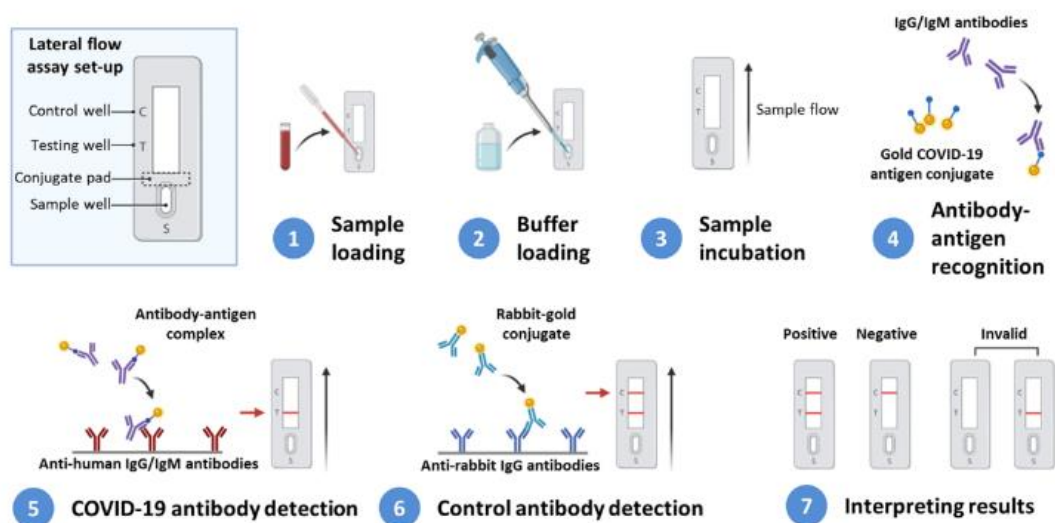


Fig. 5.18 Montaje de un ensayo de flujo lateral basado en nanopartículas de oro (AuNP – LF) (Majumder & Minko, 2021).

Sobre ella se añade una gota de sangre como muestra, junto con el tampón y se deja incubar la muestra para que el conjugado dorado (antígenos de COVID – 19) reaccione con los anticuerpos marcados con IgG e IgM.

- Tomografía axial computerizada (TAC): se trata una técnica de imagen para el diagnóstico y su finalidad es la detección temprana de la enfermedad, especialmente en aquellas regiones en las que los kits de diagnóstico convencionales no son abundantes.

Esta técnica se basa en la observación de los pulmones a través de un TAC (Fig. 5.19) permitiendo diferenciar el estadio de la enfermedad en la que se encuentra el paciente, en función de si se observan opacidades en vidrio esmerilado bilaterales y periféricas o si por el contrario se veían patrones de formas irregulares y sombreadas (Majumder & Minko, 2021).

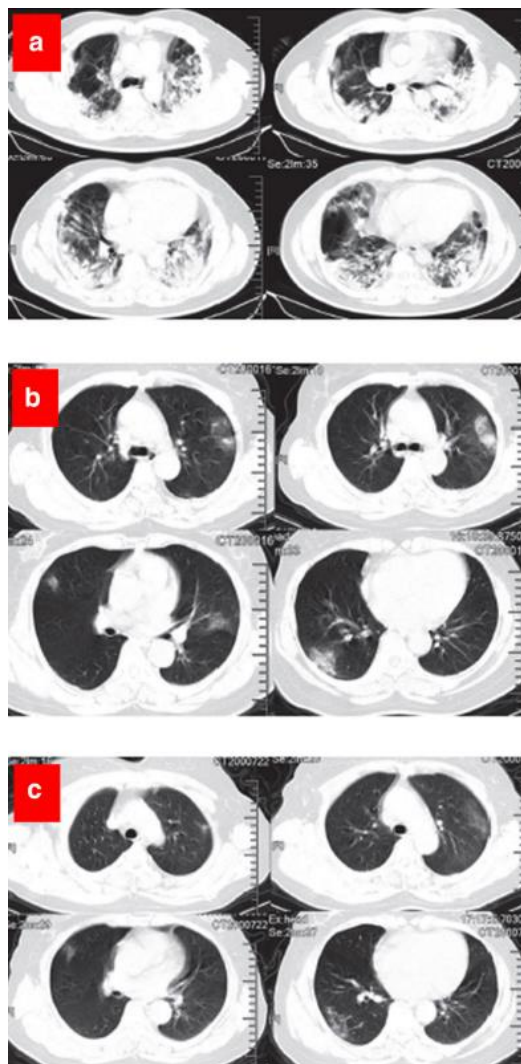


Fig. 5.19 a) múltiples áreas bilaterales lobulares y subsegmentarias (fase avanzada). b) opacidad bilateral en vidrio deslustrado, así como áreas subsegmentadas consolidadas (fase inicial). c) opacidad bilateral (fase intermedia) (Majumder & Minko, 2021).

6. CONCLUSIONES.

La importancia del papel que ha desempeñado la Microbiología a lo largo de la historia de la humanidad está fuera de cualquier discusión, sobre todo si atendemos a cómo ha mejorado la calidad de vida de las personas además de aumentar su esperanza de vida. No obstante, la reciente situación provocada por el virus SARS – Cov – 2 ha servido para evidenciar, más aún si cabe, que aún queda mucho camino que recorrer.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es sin lugar a duda la técnica más extendida entre los laboratorios de diagnóstico microbiológico dada su gran capacidad para amplificar un fragmento de material genético permitiendo así determinar la presencia o ausencia de un patógeno. El fundamento de esta técnica ha servido para que a partir de ella evolucionen nuevos métodos de diagnóstico con una mayor especificidad y que además logren proporcionar resultados fiables en un menor periodo de tiempo.

De esta manera han surgido técnicas nuevas como la amplificación isotérmica mediada por bucle de transcripción inversa (RT – LAMP) capaz de generar amplificaciones mucho más grandes que con la técnica convencional, agilizando el trabajo y haciéndolo debido a su capacidad de realizar el proceso a una única temperatura, por lo que se requiere aparatos menos especializados. O la prueba de paso único altamente sensible (OSN – qRT – PCR) que ayuda a evitar falsos negativos dada su capacidad de detectar el material genético del virus incluso si este es escaso en la muestra.

Estas y muchas otras técnicas más habrían acabado surgiendo a lo largo del tiempo, si bien la pandemia vivida ha acelerado su investigación y desarrollo. Por ello es de vital importancia la investigación y el desarrollo tecnológico para en un futuro contar con herramientas que nos ayuden a combatir las situaciones adversas que estén por venir.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- BODULEV, O. L. & SAKHAROV, I. YU. (2020). *Isothermal Nucleic Acid Amplification Techniques and Their Use in Bioanalysis*. Biochemistry (Moscow), 85(2), 147–166.
- CHO, I & BLASER, M. J. (2012). *The human microbiome: at the interface of health and disease*. Nature Reviews Genetics. 13 (4), 260 – 270.
- CRAMER, R. A. & PERFECT, J. R. (2009). *Recent advances in understanding human opportunistic fungal pathogenesis mechanisms*. Clinical Mycology, 15–31.
- CROXATTO, A., PROD'HOM, G. & GREUB, G. (2012). *Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology*. FEMS Microbiology Reviews, 36(2), 380–407.
- COLE, G.T. (2020). *Basic Biology of Fungi*. Medical Microbiology, 4.
- DEVADHASAN, J. P., KIM, S. & AN, J. (2011). *Fish-on-a-chip: a sensitive detection microfluidic system for alzheimer's disease*. Journal of Biomedical Science, 18(1).
- DI BONAVENTURA, G., ANGELETTI, S., IANNI, A., PETITTI, T., & GHERARDI, G. (2021). *Microbiological Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis: An Overview*. Pathogens, 10(12).
- EDWARDS, G. & KRISHNA, S. (2004). *Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Issues in the Treatment of Parasitic Infections*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 23(4), 233–242.
- FALERO, A., CABALLERO, A., FERRÁN, B., IZQUIERDO, Y., FANDO, R. & CAMPOS, J. (2009). *DNA Binding Proteins of the Filamentous Phages CTX ϕ and VGJ ϕ of Vibrio cholerae*. Journal of Bacteriology.
- FARR, R. S. (1958). *A Quantitative Immunochemical Measure of the Primary Interaction Between I*BSA and Antibody*. Journal of Infectious Diseases, 103(3), 239–262.
- FORBES, B. A., SAHMN, D. F. & WEISSFELD, A. S. (2009). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. (12^a ed.) Editorial Médica Panamericana.

GREEN, E. D. & GUYER, M. S. (2011). *Charting a course for genomic medicine from base pairs to bedside*. Nature, 470(7333), 204–213.

GREEN, M. R. & SAMBROOK, J. (2018). *Quantification of RNA by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*. Cold Spring Harbor Protocols, 2018(10), pdb.prot095042.

GRENINGER, A. L. & NACCACHE, S. N. (2019). *Metagenomics to Assist in the Diagnosis of Bloodstream Infection*. The Journal of Applied Laboratory Medicine, 3(4), 643–653.

GRICE, E. A. & SEGRE, J. A. (2011). *The skin microbiome*. Nature Reviews Microbiology, 9(4), 244–253.

GU, W., MILLER, S., & CHIU, C. Y. (2019). *Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection*. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 14(1), 319–338.

HEATHER, J. M., & CHAIN, B. (2016). *The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA*. Genomics, 107(1), 1–8.

Introducción al ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas - Prueba ELISA Redes de tecnología. (2021).

HUANG, C., WEN, T., SHI, F.-J., ZENG, X.-Y. & JIAO, Y.J. (2020). *Rapid Detection of IgM Antibodies against the SARS-CoV-2 Virus via Colloidal Gold Nanoparticle-Based Lateral-Flow Assay*. ACS Omega, 5(21), 12550–12556.

JANNETTO, P. J. & FITZGERALD, R. L. (2016). *Effective Use of Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory*. Clinical Chemistry, 62(1), 92–98.

KADAM, S. B., SUKHRAMANI, G. S., BISHNOI, P., PABLE, A. A., & BARVKAR, V. T. (2021). *SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights*. Journal of Basic Microbiology, 61(3), 180–202.

KUMAR, A. A., HENNEK, J. W., SMITH, B. S., KUMAR, S., BEATTIE, P., JAIN, S., ROLLAND, J. P., STOSSEL, T. P., CHUNDA-LIYOKA, C., & WHITESIDES, G. M. (2015). *From the Bench to the Field in Low-Cost Diagnostics: Two Case Studies*. Angewandte Chemie International Edition, 54(20), 5836–5853.

- KURIEN, B. T., & SCOFIELD, R. H. (2012). *Extraction of Proteins from Gels: A Brief Review*. *Methods in Molecular Biology*, 403–405.
- LA TÉCNICA DE LA PCR (INTRODUCCIÓN Y PRINCIPIOS BÁSICOS) - Labbox España. (2022, March). Labbox España.
- LO, S.-J., YANG, S.-C., YAO, D.-J., CHEN, J.-H., TU, W.-C., & CHENG, C.-M. (2013). *Molecular-level dengue fever diagnostic devices made out of paper*. *Lab on a Chip*, 13(14), 2686.
- L'OLLIVIER, C. & RANQUE, S. (2016). *MALDI – TOF – Based Dermatophyte Identification*. *Mycopathologia*, 182(1-2), 183–192.
- MAJUMDER, J., & MINKO, T. (2021). *Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19*. *The AAPS Journal*, 23(1).
- MARTINEZ, A. W., PHILLIPS, S. T., WHITESIDES, G. M., & CARRILHO, E. (2009). *Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices*. *Analytical Chemistry*, 82(1), 3–10.
- MATHISON, B. A. & PRITT, B. S. (2019). *Medical Parasitology Taxonomy Update, 2016–2017*. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(2).
- MEROUEH, S. O., BENCZE, K. Z., HESEK, D., LEE, M., FISHER, J. F., STEMMLER, T. L., & MOBASHERY, S. (2006). *Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (12), 4404–4409.
- MOROZOVA, O. & MARRA, M. A. (2008). *Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics*. *Genomics*, 92(5), 255–264.
- MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S. & PFALLER, M. A. (2013). *Microbiología médica* (8^a ed.) Elsevier Saunders.
- PAN, D., PRAMANIK, M., SENPAN, A., ALLEN, J. S., ZHANG, H., WICKLINE, S. A., WANG, L. V., & LANZA, G. M. (2010). *Molecular photoacoustic imaging of angiogenesis with integrin-targeted gold nanobeacons*. *The FASEB Journal*, 25(3), 875–882.

PARK, G.-S., KU, K., BAEK, S.-H., KIM, S.-J., KIM, S. I., KIM, B.-T., & MAENG, J.-S. (2020). *Development of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays Targeting Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)*. The Journal of Molecular Diagnostics: JMD, 22(6), 729–735.

PELLETT, P.E., MITRA, S. & HOLLAND, T.C. (2014). *Basics of virology*. Neurovirology, 45 – 66.

PLESTED, J. S., COULL, P. A., & GIDNEY, M. A. J. (2022). *ELISA*. Hemophilus Influenzae Protocols, 243–262.

RADKOV, A. D., HSU, Y.P., BOOHER, G. & VANNIEUWENHZE, M. S. (2018). *Imaging Bacterial Cell Wall Biosynthesis*. Annual Review of Biochemistry, 87(1), 991–1014.

RAYMOND, S., & WEINTRAUB, L. (1959). *Acrylamide Gel as a Supporting Medium for Zone Electrophoresis*. Science, 130(3377), 711–711.

ROHRMAN, B. A., & RICHARDS-KORTUM, R. R. (2012). *A paper and plastic device for performing recombinase polymerase amplification of HIV DNA*. Lab on a Chip, 12(17), 3082.

RUBIO, S., PACHECO - OROZCO, R. A., GÓMEZ, A. M., PERDOMO, S. & GARCÍA - ROBLES, R. (2020). *Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica*. Universitas Médica, 61(2).

SAIKI, R., GELFAND, D., STOFFEL, S., SCHARF, S., HIGUCHI, R., HORN, G., MULLIS, K., & ERLICH, H. (1988). *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 239(4839), 487–491.

SANGER, F., NICKLEN, S., & COULSON, A. R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 74(12), 5463–5467.

SCHMIDT, H. & HENSEL, M. (2004). *Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis*. Clinical Microbiology Reviews, 17(1), 14–56.

- SHAPIRO, A. L., VIÑUELA, E., & V. MAIZEL, J. (1967). *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 28(5), 815–820.
- SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., & NIEMAN, T.A. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. (5^a ed.). McGraw Hill Interamericana de España SL.
- SMITH, B. J. (2022). *SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins*. Basic Protein and Peptide Protocols, 23–34.
- TSUCHIDA, S., UMEMURA, H. & NAKAYAMA, T. (2020). *Current Status of Matrix - Assisted Laser Desorption/Ionization – Time – of - Flight Mass Spectrometry (MALDI - TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology*. Molecules, 25(20), 4775.
- UEHARA, M., HANAMURA, M., YAMADA, K., YAMAGUCHI, A., MURAYAMA, T., SAITO, Y., IDEGAMI, K. & HONDA, T. (2016). *A Rapid and Automated Device for Purifying Nucleic Acids*. Analytical Sciences, 32(3), 371–374.
- VOLPI, E. V. & BRIDGER, J. M. (2008). *FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique*. BioTechniques, 45(4), 385–409.
- WANG, J., CAI, K., ZHANG, R., HE, X., SHEN, X., LIU, J., XU, J., QIU, F., LEI, W., WANG, J., LI, X., GAO, Y., JIANG, Y., XU, W., & MA, X. (2020). *Novel One-Step Single-Tube Nested Quantitative Real-Time PCR Assay for Highly Sensitive Detection of SARS-CoV-2*. Analytical Chemistry, 92(13), 9399–9404.
- WEBER, K. & OSBORN, M. (2020). *The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*. The Journal of Biological Chemistry, 244(16).
- ZHANG, W., CUI, H. & WONG, L. J. C. (2012). *Application of Next Generation Sequencing to Molecular Diagnosis of Inherited Diseases*. Chemical Diagnostics, 19–45.
- ZHU, H., ZHANG, H., XU, Y., LAŠŠÁKOVÁ, S., KORABEČNÁ, M., & NEUŽIL, P. (2020). *PCR past, present and future*. BioTechniques, 69(4), 317–325.