

Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio



Índice

Sección I: Estructura y organización del laboratorio clínico

Tema 1. Características y diseño de un laboratorio.....	4
Tema 2. Seguridad en el laboratorio clínico.....	33
Tema 3: Gestión de calidad en el laboratorio clínico.....	53

Sección II: Laboratorio de microbiología

Tema 4. Toma y procesamiento de muestras.....	68
Tema 5. Identificación bacteriana.....	95
Tema 6. Antibiograma	134
Tema 7. Hemocultivos	152
Tema 8. Microbiota	178
Tema 9. Control serológico de la gestante.....	214
Tema 10. Diagnóstico del VIH.....	237
Tema 11. Diagnóstico de la gripe.....	267
Tema 12. Diagnóstico de legionelosis	298



Índice

Sección III: Laboratorio de hematología

Tema 13. Hemograma.....	327
-------------------------	-----

Sección VI: Laboratorio de bioquímica

Tema 14. Alteraciones del metabolismo del hierro.....	370
Tema 15. Marcadores bioquímicos de sepsis.....	398
Tema 16. Seminograma	419
Tema 17. Hipersensibilidad alimenticia	448
Tema 19. Metabolómica clínica	485

Sección I: Estructura y organización del laboratorio clínico

TEMA 1

Características de un laboratorio clínico

Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio

Nacho Escrig, PhD

EL LABORATORIO CLÍNICO



Definición:

Un laboratorio clínico es un **establecimiento público o privado** donde se realizan **análisis de muestras biológicas** de cualquier origen para el **apoyo** a actividades de **diagnóstico, prevención, tratamiento, seguimiento, control y vigilancia de enfermedades** de acuerdo con un **sistema de calidad**.

¿Es lo mismo que un laboratorio de investigación?



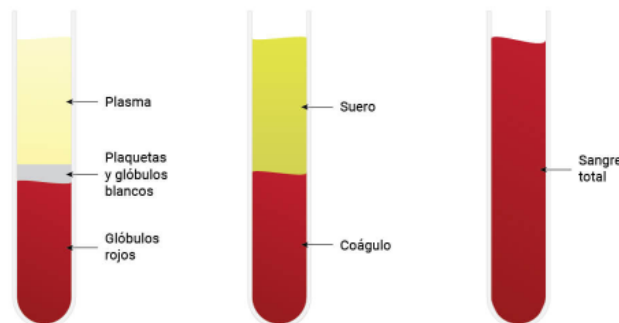
Tipos de exámenes en el laboratorio clínico:



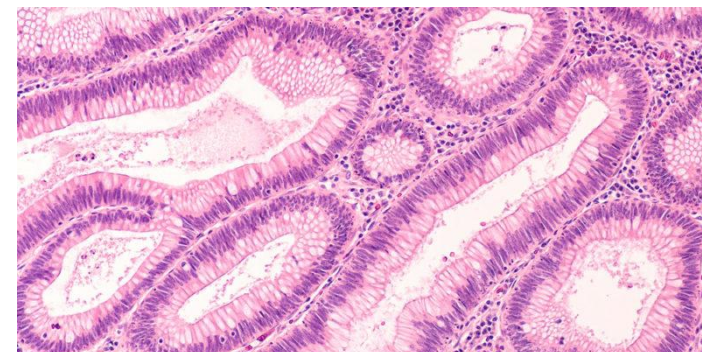
Bioquímicos



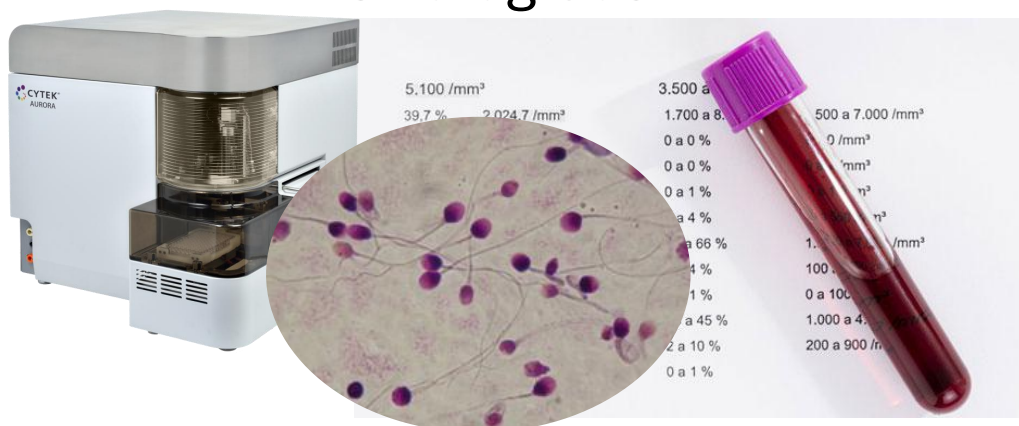
Serológicos



Histológicos



Citológicos



Genéticos



Microbiológicos



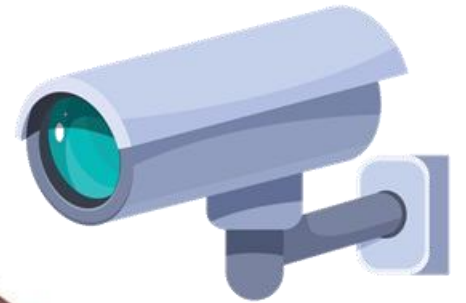
Características de un laboratorio clínico



- Seguro
- Eficiente
- Cómodo



- Sistemas de control de acceso
- Sistemas de almacenamiento
- Sistemas de seguridad
- Sistemas de privacidad



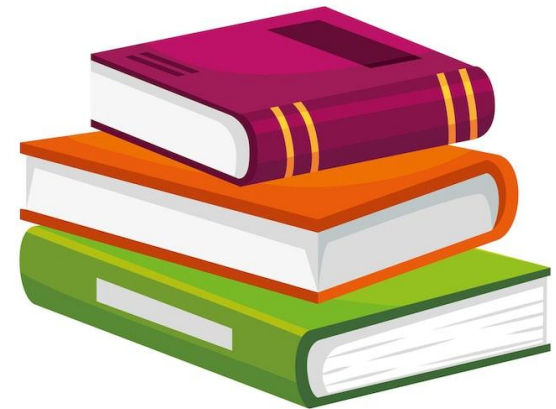
Normativa de diseño de laboratorio clínico



NO EXISTE

Leyes y normativas con pautas generales:

- Ley General de Sanidad: pautas básicas sobre todo referentes a la autorización administrativa.
- ISO 15189: requisitos de calidad y competencias
- ISO 15190: requisitos de seguridad



Normativa de diseño de laboratorio clínico



NO EXISTE

Ley General de Sanidad 14/1986:

- Autorización administrativa previa
- Contar con medios técnicos, instalaciones y profesionales
- Comunidades Autónomas regulan los requisitos técnicos mínimos

ISO 15190: seguridad

TEMA 2

- Infraestructura
- Manipulación de reactivos
- Bioseguridad

ISO 15189: calidad

TEMA 3

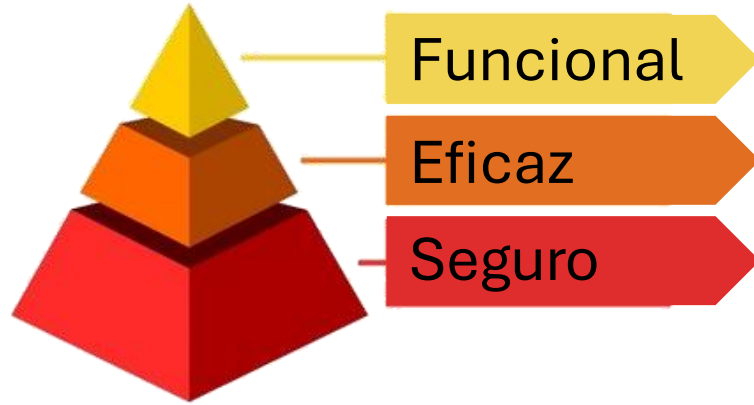
- Normativa de calidad, no vinculante
- Estructura organizativa
- Instalaciones
- Condiciones ambientales
- Equipamiento
- Competencias del personal
- Procedimientos (PNT)
- Controles de calidad
- Trazabilidad
- Gestión de riesgos



Espacio del laboratorio clínico



OBJETIVO PRINCIPAL:



- Seguro:
 - Ventanas cerradas
 - Bien iluminado
 - Puertas abiertas en sentido de evacuación
 - No puertas correderas
- Adaptado:
 - Personal (2 m² por trabajador)
 - Volumen de análisis
 - Cartera de servicios
- Flexible:
 - Mayor espacio si investigación o docencia
 - Diáfanos
 - Equipos no se fijan a las paredes
- Resistente
 - Peso (1000 kg/ m²)
 - Agentes químicos
 - Temperaturas

CUANTO
MÁS
SIMPLE
MEJOR



Equipamiento del laboratorio clínico



El laboratorio tiene que tener el equipo necesario para llevar a cabo su función.



Tener en cuenta:

- Peso de los equipos
- Superficies con vibración
- Apertura de puertas de los equipos
- Enchufes de seguridad
- Disposición que permita la limpieza



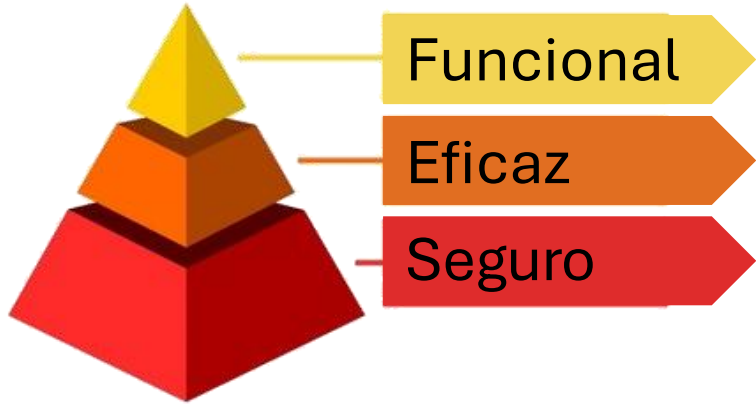
La disposición del equipo debe ordenarse a reducir las distancias que recorren las muestras

EFICIENCIA

Seguridad del laboratorio clínico

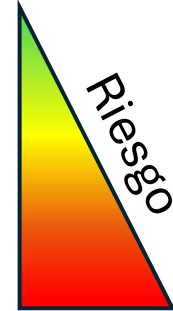


El laboratorio tiene que estar adaptado a los agentes biológicos que se manejen



Niveles de contención (NC):

- NC I
- NC II
- NC III
- NC IV



Señalización de seguridad



Seguridad del laboratorio clínico



TEMA 2

Niveles de contención biológica

NC I

- Riesgo bajo
- Microorganismos no patógenos
- E.g. *E. coli*

NC II

- Riesgo moderado
- Patógenos no transmisibles por vía aérea y con tratamiento disponible
- E.g. *Salmonella*, *S. aureus*, VIH

NC III

- Riesgo alto
- Patógenos que causan enfermedades graves y se transmiten por vía aérea, pero con tratamiento disponible
- E.g. Tuberculosis, COVID, Virus del Nilo

NC IV

- Riesgo extremo
- Patógenos que causan enfermedades con alta mortalidad cuya transmisión puede ser aérea y sin tratamiento disponible
- E.g. Ébola, Virus Crimea-Congo, Viruela

Seguridad del laboratorio clínico



Datos

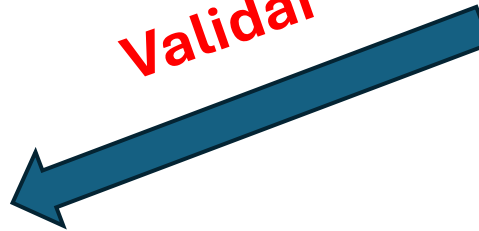
- Protección de datos
- Trazabilidad de los datos
- Gestión de los datos



SISTEMAS INFORMÁTICOS

- Almacenar grandes volúmenes de datos
- Generar un histórico
- Facilitar los informes
- Reducir errores humanos

Validar

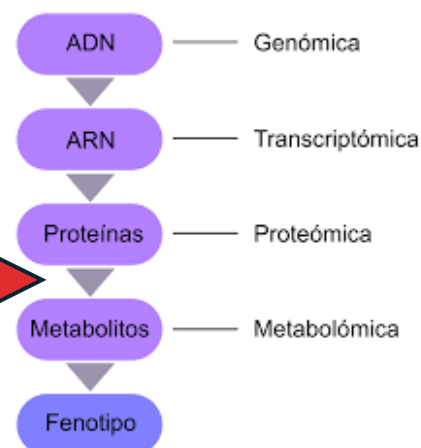
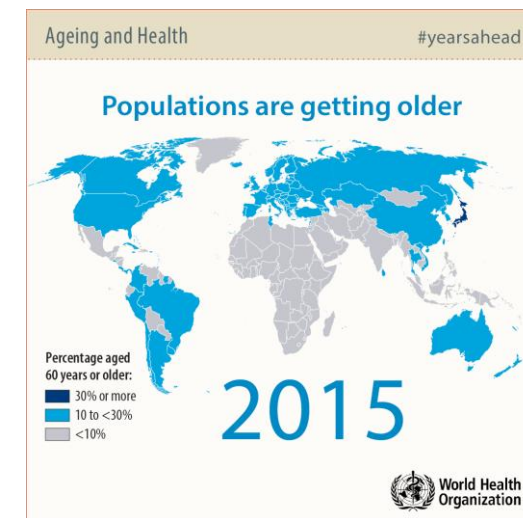


Distribución del laboratorio clínico



La demanda de laboratorios clínicos ha crecido mucho debido a:

- Envejecimiento poblacional
- Reducción de costes
- Nuevas técnicas analíticas
- Avances diagnósticos



Distribución del laboratorio clínico



Recepción:

- Con acceso directo desde el exterior y visible para el paciente.
- Se entregan los resultados, gestionan las peticiones y se atiende al paciente.
- Tienen protocolos para recogida de muestras.

Sala de espera

- Con los elementos necesarios para la correcta atención a los usuarios

Sala de toma de muestras:

- Tiene camillas para la toma de muestras
- Puede tener un box cerrado para toma de muestras especiales

Zona de distribución de las muestras:

- Área de recepción y preparación de las muestras
- Tiene que estar bien organizado para evitar pérdida de tiempo
- Extremar las medidas de seguridad para asegurar la trazabilidad



Distribución del laboratorio clínico



Zona de procesamiento de muestras

- Es la zona donde se analizan las muestras
- Pueden existir zonas distintas por tipo de muestra según el tamaño del laboratorio

Almacén

- Suele ser contigua al área de procesamiento para optimizar el trabajo
- Temperatura controlada

Despachos de facultativos

- Lo ideal es que estén cerca del área analítica pero fuera de esta.



Flujo de trabajo del laboratorio clínico



Son las fases en las que se distribuye el trabajo

En el proceso de una analítica hay tres fases:

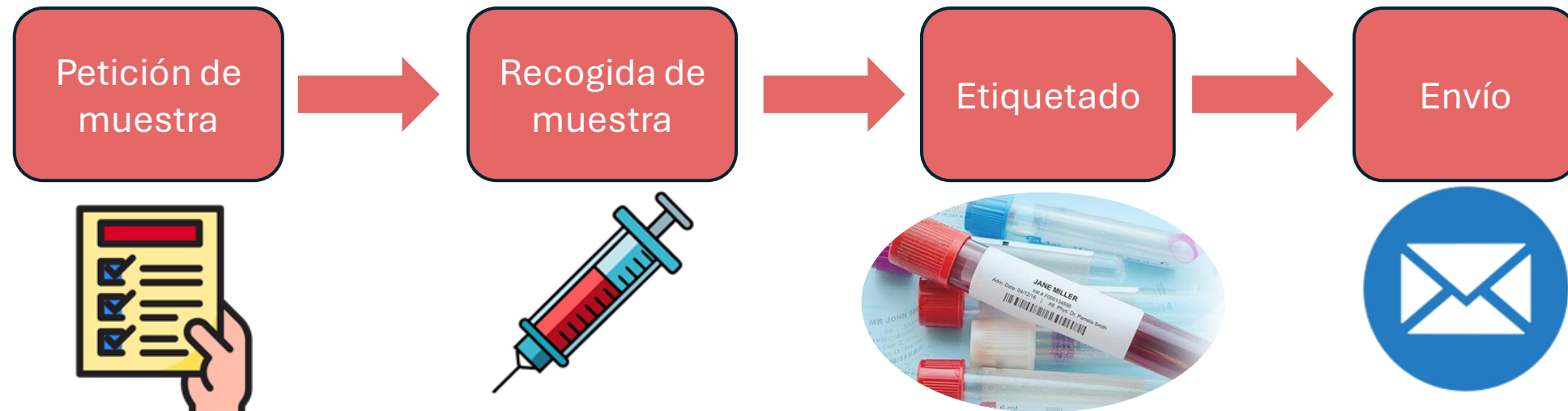
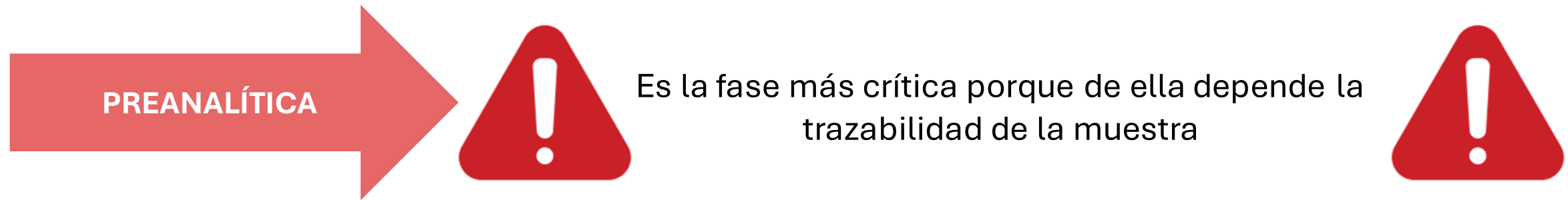


Flujo de trabajo del laboratorio clínico



Son las fases en las que se distribuye el trabajo

En el proceso de una analítica hay tres fases:



Flujo de trabajo del laboratorio clínico



Son las fases en las que se distribuye el trabajo

En el proceso de una analítica hay tres fases:

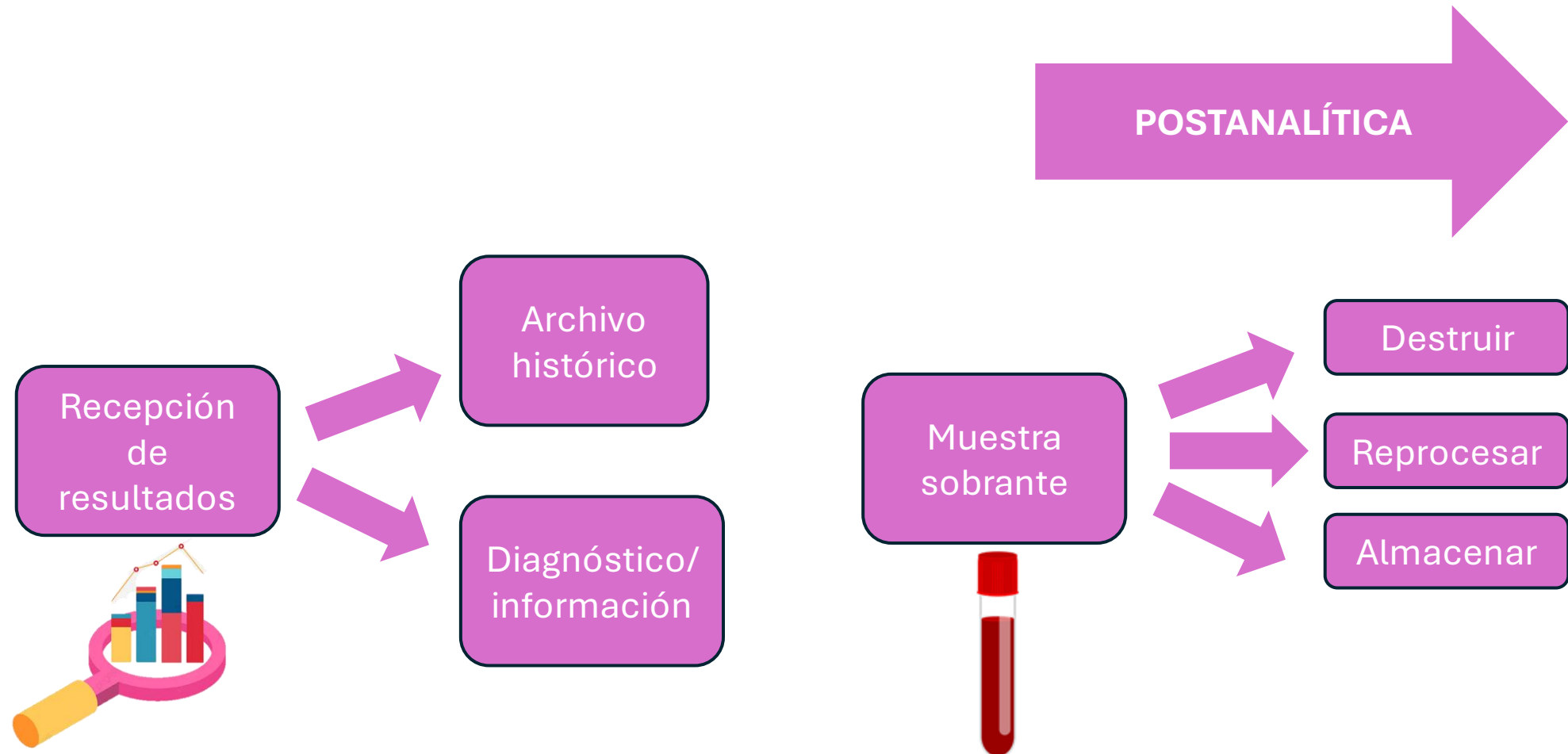


Flujo de trabajo del laboratorio clínico



Son las fases en las que se distribuye el trabajo

En el proceso de una analítica hay tres fases:



Flujo de trabajo del laboratorio clínico



Flujo de trabajo $\leftarrow \rightarrow$ Distribución del laboratorio

En el proceso de una analítica hay tres fases:



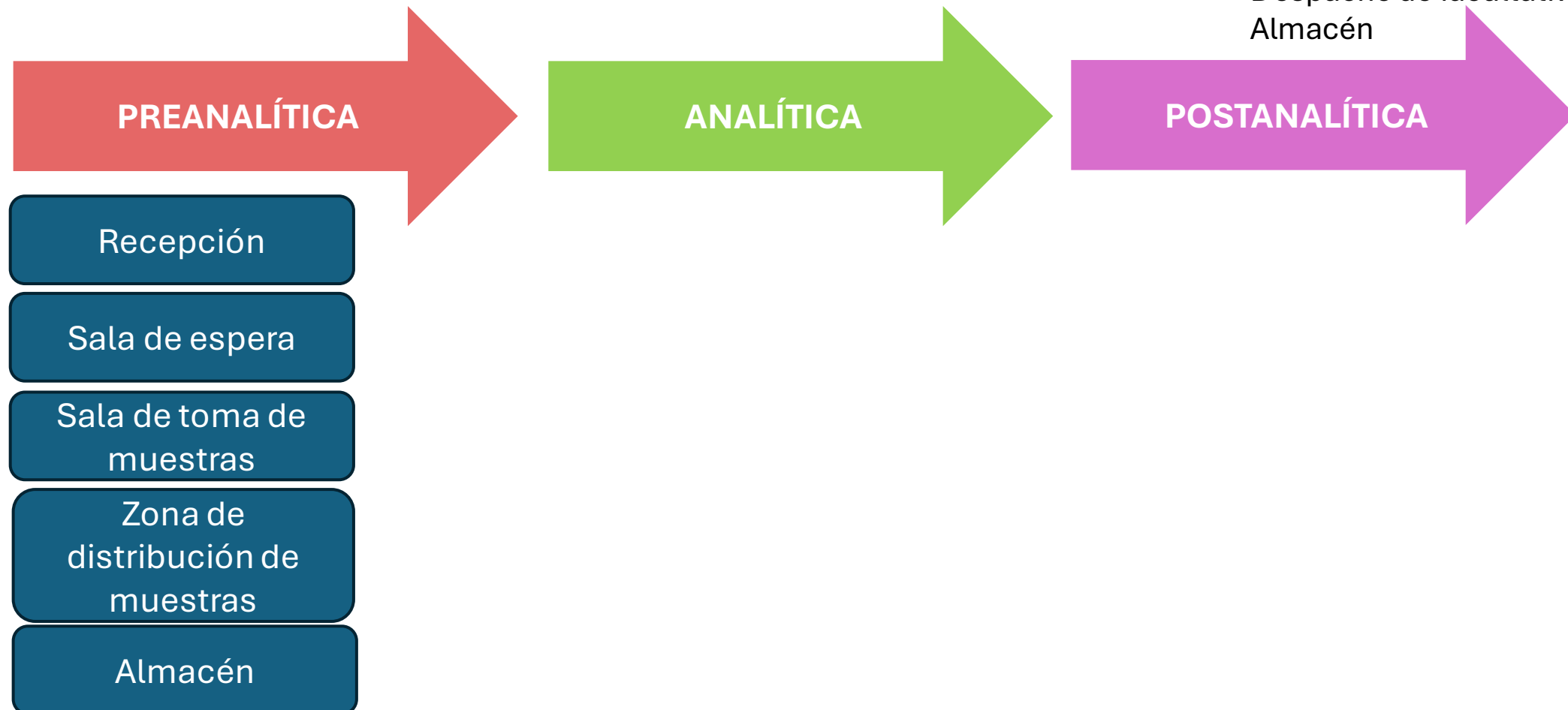
Recepción
Sala de espera
Sala de toma de muestras
Zona de distribución de la muestra
Zona de procesado de muestras
Despacho de facultativos
Almacén

Flujo de trabajo del laboratorio clínico



Flujo de trabajo $\leftrightarrow$ Distribución del laboratorio

En el proceso de una analítica hay tres fases:

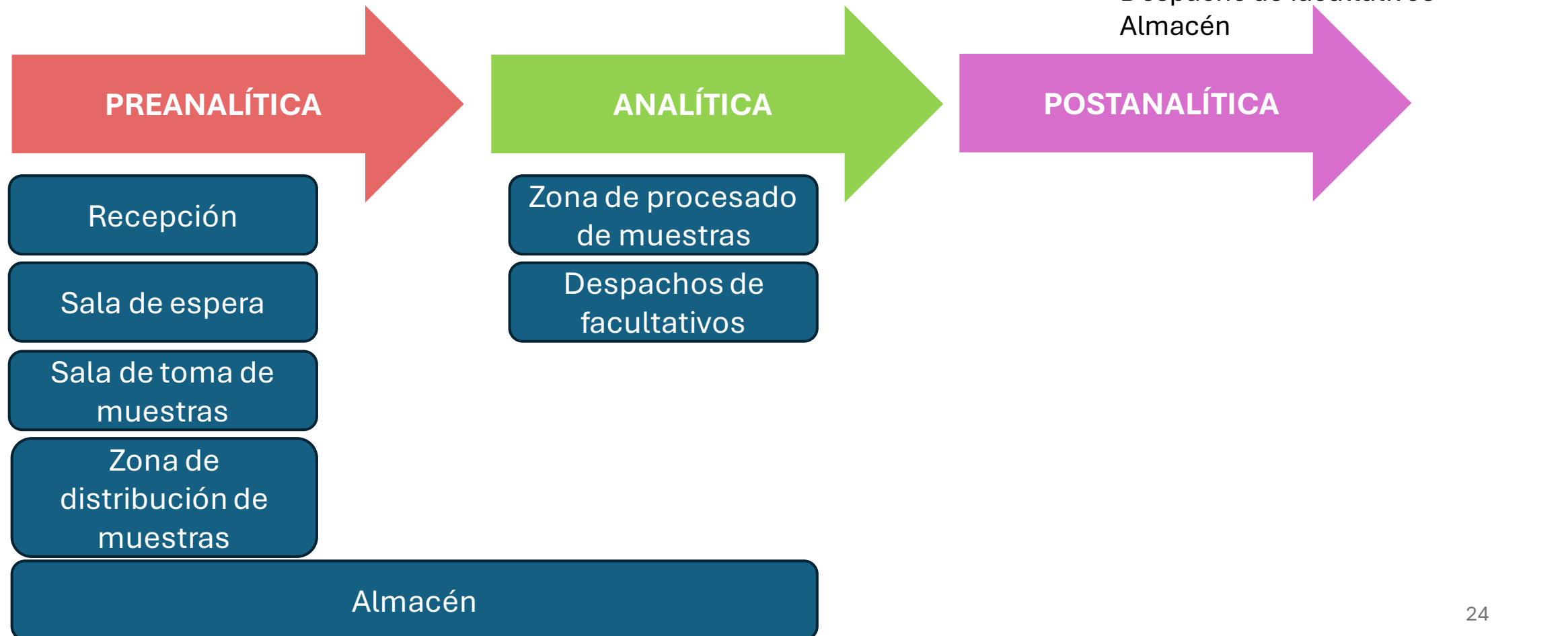


Flujo de trabajo del laboratorio clínico



Flujo de trabajo $\leftrightarrow$ Distribución del laboratorio

En el proceso de una analítica hay tres fases:

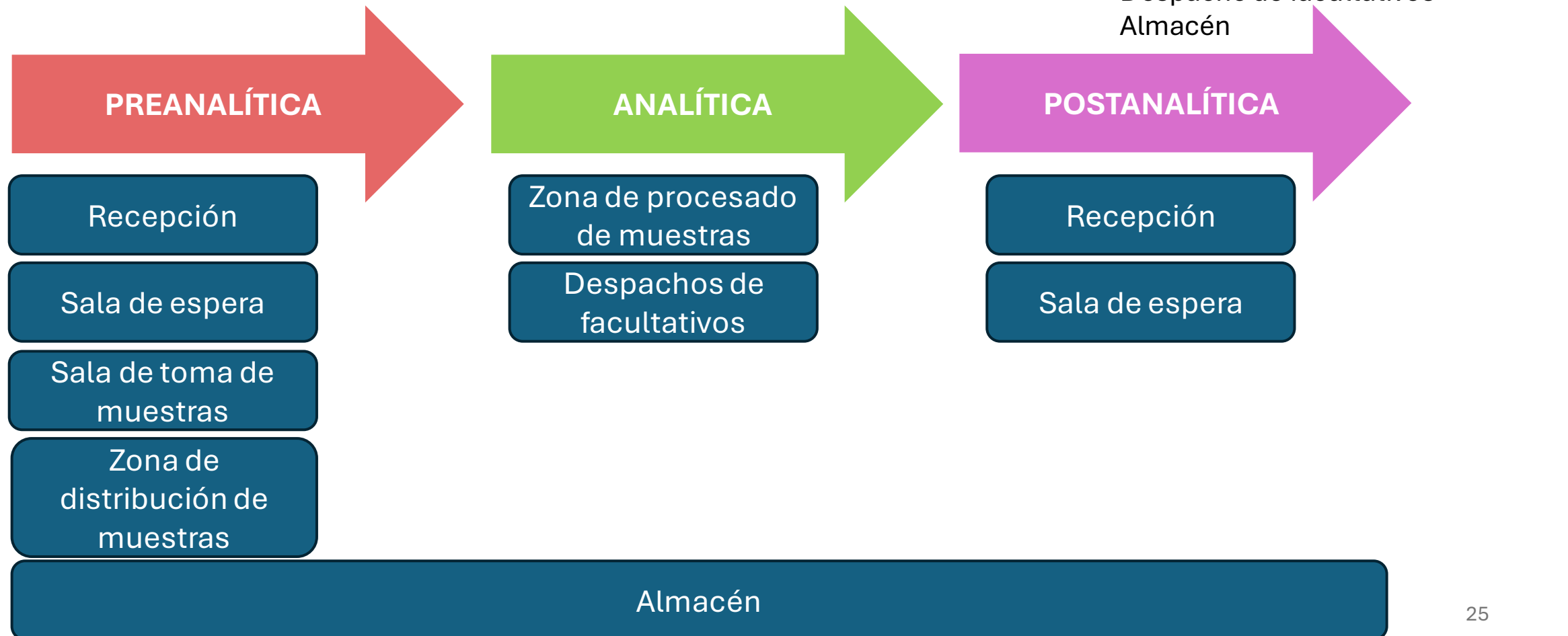


Flujo de trabajo del laboratorio clínico



Flujo de trabajo $\leftrightarrow$ Distribución del laboratorio

En el proceso de una analítica hay tres fases:



Organización del trabajo en el laboratorio clínico



Es clave para minimizar errores en la preanalítica y agilizar la postanalítica

➤ Facultativo:

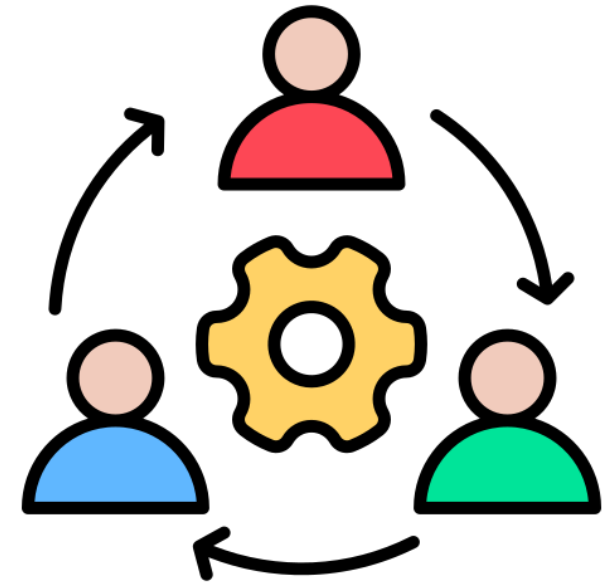
- Integra, gestiona y coordina los recursos y la información
- Valida los resultados

➤ Técnico:

- Hace el trabajo rutinario con las muestras y el equipo



IMPORTANTISIMO EL TRABAJO EN EQUIPO
RESPETANDO LA JERARQUÍA



Organización del trabajo en el laboratorio clínico



Es clave para minimizar errores en la preanalítica y agilizar la postanalítica

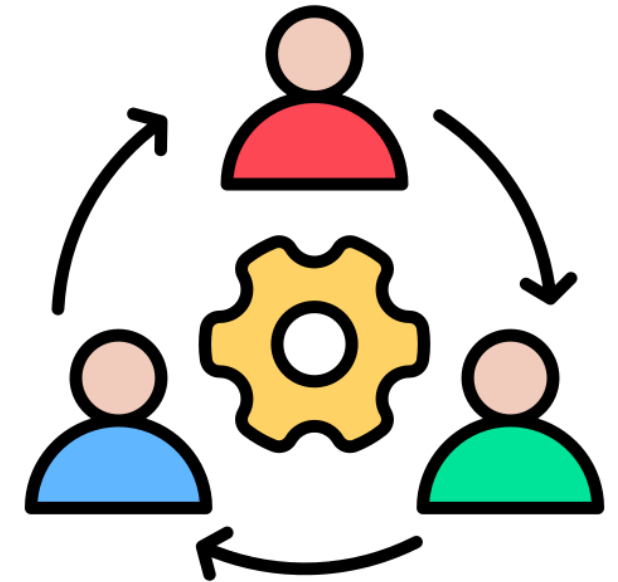


IMPORTANTISIMO EL TRABAJO EN EQUIPO
RESPETANDO LA JERARQUÍA



- Conocer las responsabilidades y encargados
- Optimizar los recursos
- Dividir el trabajo
- Coordinar las actividades
- Optimizar los recursos
- Facilitar la supervisión

La organización del trabajo ayuda a determinar los horarios donde el trabajo es máximo para tener personal suficiente



Organización funcional en el laboratorio clínico



Es importante para responder a la alta demanda de determinaciones analíticas

- Flujo de las muestras
 - Velar por el mínimo movimiento de muestras y de personal
 - Adaptar el flujo de trabajo al tipo de muestra
- Flujo de la información, formado por:
 - Volante de solicitud:
 - ☐ Petición de análisis por parte del médico
 - Informe de los resultados:
 - ☐ Refleja la calidad del laboratorio.
 - ☐ Global, único y fácil de interpretar
 - ☐ Medio de comunicación con el paciente
 - ☐ Recoge magnitudes, unidades, límites de referencia, fecha y facultativo

Tiempo de respuesta: tiempo máximo que llevará emitir un resultado. Se indica en la cartera de servicios y es un factor de calidad.

Política de personal en el laboratorio clínico



Una plantilla profesional y altamente cualificada asegura un trabajo de calidad

- Compenetrada
- Trabajo en equipo
- Equilibrio entre especialización y flexibilidad
- Plan de formación continuada para recibir cambios, incorporar técnicas y equipos nuevos.



Control de Calidad en el laboratorio clínico



Se debe garantizar la calidad de todos los procesos del laboratorio, no solo de los resultados.

Plan de calidad anual con objetivos de mejora o de alcanzar indicadores de calidad.

Siguiendo los parámetros de la UNE-EN-ISO 15189 que incluye:

- Gestión de calidad
- Organización y personal
- Instalaciones y condiciones ambientales
- Equipamiento
- Preamanalítica
- Analítica
- Postanalítica
- Trazabilidad
- Gestión de no conformidades
- Evaluación y mejora continua
- Seguridad y confidencialidad

Estos puntos se supervisan a diario y se evalúan con auditorías internas y externas



TEMA 3

Eliminación de residuos en el laboratorio clínico



Se generan muchos residuos que deben ser debidamente gestionados

- Residuos sin riesgo o urbanos: se reciclan como cualquier residuo
 - Grupo I: material no sanitario
 - Botellas, papel, cartón...
 - Grupo II: material sanitario no contaminado con muestras biológicas
 - Vendas, guantes, apósitos, algodones, gasas...
- Residuos con riesgo: tienen contenedores especiales
 - Grupo III: material sanitario con riesgo biológico
 - Residuos infecciosos, punzantes, fluidos, cultivos, vacunas...
 - Grupo IV: material sanitario con riesgo de toxicidad
 - Químicos, absorbentes, medicamentos, productos de limpieza...
 - Grupo V: equipos fuera de uso
 - Fluorescentes, toners, mobiliario...

Eliminación de residuos en el laboratorio clínico



Sección I: Estructura y organización del laboratorio clínico

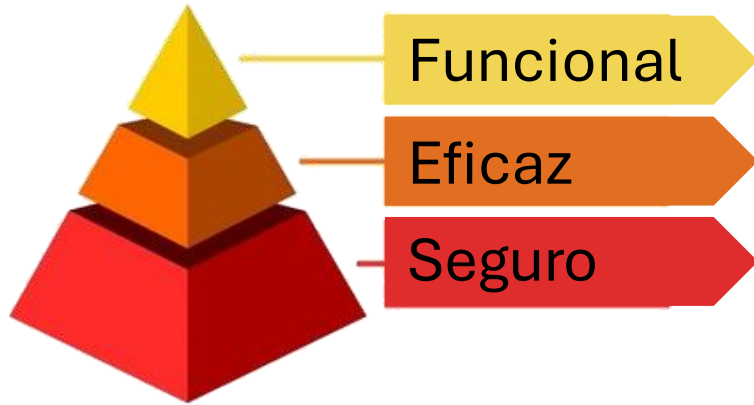
TEMA 2

Seguridad en el laboratorio clínico

Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio

Nacho Escrig, PhD

TIPOS DE RIESGO EN EL LABORATORIO



Existen cuatro tipos de Riesgo en un laboratorio:

Psicofísicos



Físicos



Biológicos



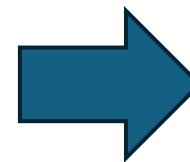
Químicos



Buenas prácticas de laboratorio (BLP)



Normas a seguir para el correcto funcionamiento de un laboratorio



**UNE-EN-ISO
15190**

- Procedimientos normalizados de trabajo
- Gestión de residuos
- Gestión de equipos
- Diseño de instalaciones
- Formación del personal

Se recopilan en el **MANUAL DE SEGURIDAD** específico

Incluye:

- Uso de elementos de bioseguridad y protección
- Manejo de residuos, limpieza y desinfección
- Accidentes de trabajo



El manual de seguridad ha de estar disponible pues es un **DERECHO** para todos los trabajadores conocer los riesgos que entraña su trabajo

Se ha de elaborar un **INVENTARIO** de reactivos que incluya la [FICHA TÉCNICA](#)

Riesgos en el laboratorio



¿Qué riesgo es más acusado en un laboratorio clínico de microbiología?

Psicofísico



Físico



Biológico



Químico



AGENTE BIOLÓGICO:
Microorganismo capaz de
originar alergia o toxicidad

Riesgos en el laboratorio



¿Qué accidentes son más comunes en un laboratorio clínico de microbiología?

Psicofísico



Biológico



Físico



Químico



PERCEPCIÓN DE RIESGO
evaluación subjetiva que hace
un individuo sobre la
peligrosidad de una situación
o actividad, basada en
factores personales,
emocionales y contextuales

Bioseguridad y Bioprotección



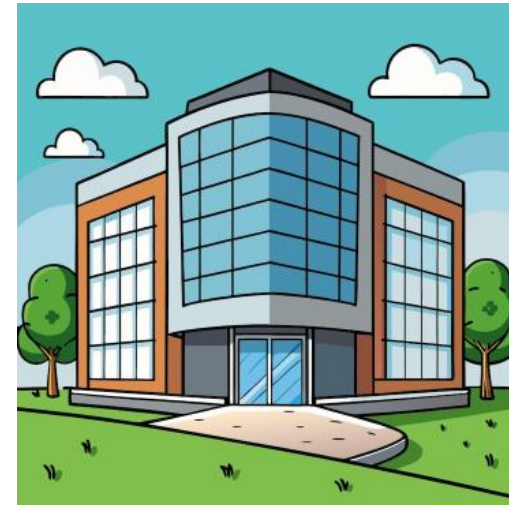
BIOSEGURIDAD

- Principios, técnicas y prácticas que se aplican para evitar la exposición no intencional a agentes biológicos y toxinas y/o su liberación accidental.
- Se aplican para proteger al personal, a los pacientes y a la comunidad.
- Es un derecho de la población.



BIOPROTECCIÓN

- Medidas de aplicadas por la institución y el personal destinadas a reducir el riesgo de pérdida, robo, uso incorrecto o liberación de agentes biológicos o toxinas



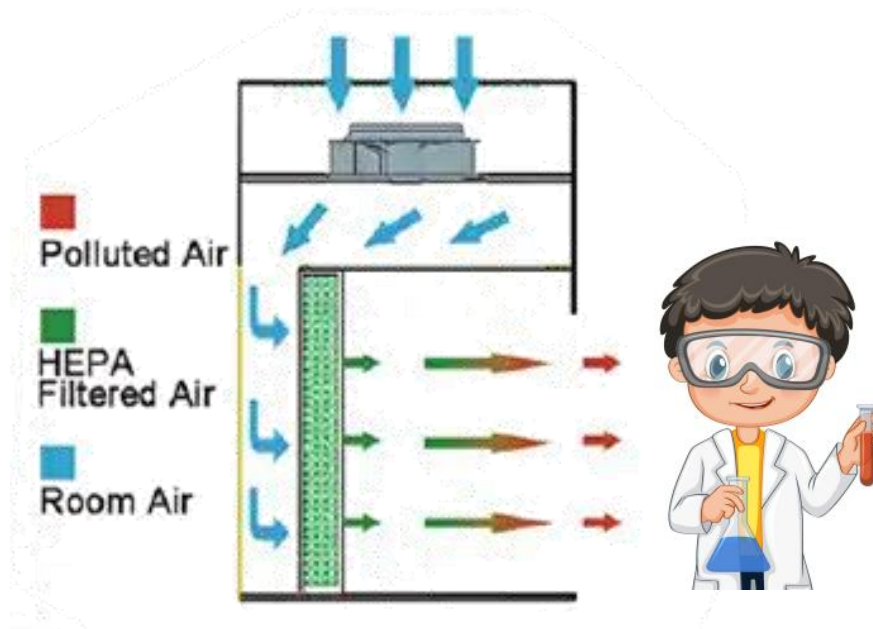
Cabinas de flujo



Flujo del aire

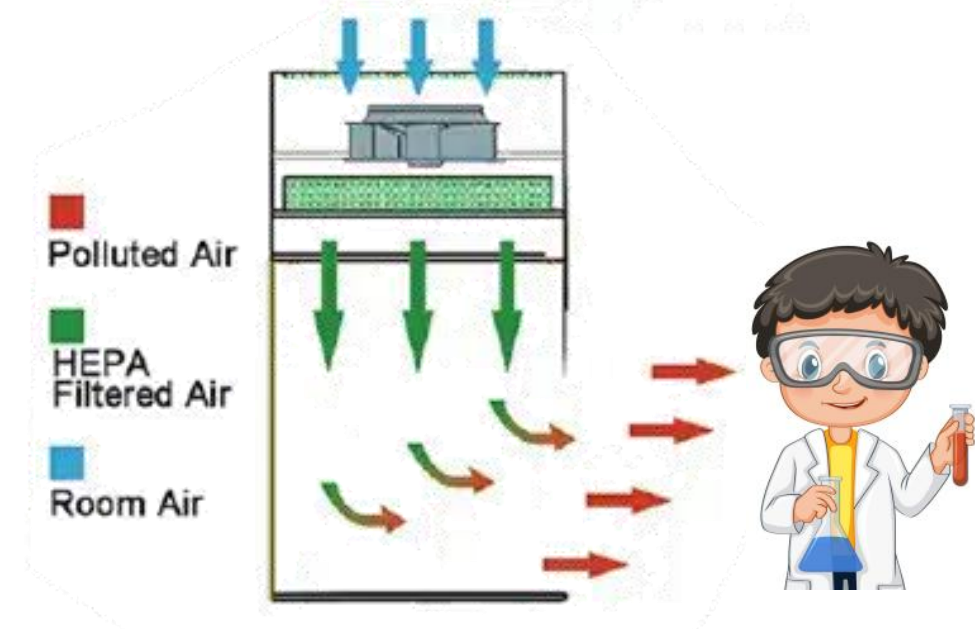
Recirculación del
aire

Flujo Horizontal



- Filtra desde la parte trasera
- Protege la muestra
- No protege al usuario
- No protege el ambiente

Flujo Vertical



- Filtra desde arriba
- Protege la muestra
- Protege algo al usuario
- No protege el ambiente

Cabinas de flujo



Flujo del aire

Recirculación del
aire

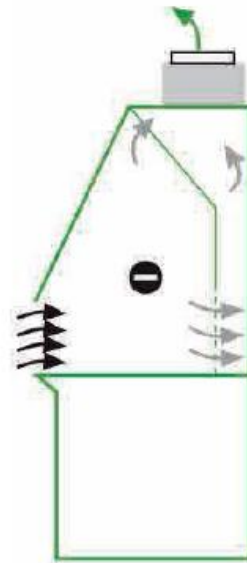
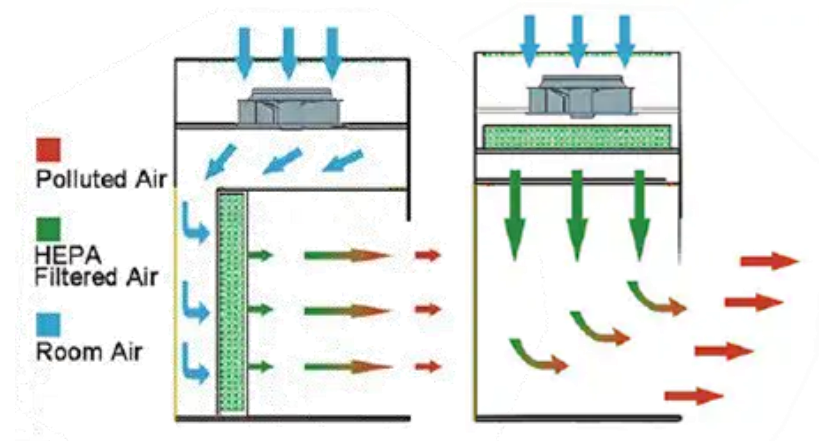
- Aire del local
- Aire limpio (filtro absoluto)
- Aire potencialmente contaminado
- ⊖ Presión negativa
- ⊕ Presión positiva

Flujo Laminar

Clase I

Bioseguridad Clase II

Clase III



- Tanto vertical como horizontal
- Protege la muestra
- No protege al usuario
- No protege el ambiente

- Flujo turbulento
- No protege muestra
- Protege al usuario
- Protege el ambiente

- Flujo laminar vertical
- Protege muestra
- Protege al usuario
- Protege al ambiente

- Totalmente sellada
- Presión negativa
- Acceso con guantes
- Filtra entrada y salida

Cabinas de flujo



Flujo del aire

Recirculación del
aire

Flujo Laminar



Clase I



Bioseguridad Clase II



Clase III



- Tanto vertical como horizontal
- Protege la muestra
- No protege al usuario
- No protege el ambiente

- Flujo turbulento
- No protege muestra
- Protege al usuario
- Protege el ambiente

- Flujo laminar vertical
- Protege muestra
- Protege al usuario
- Protege al ambiente

- Totalmente sellada
- Presión negativa
- Acceso con guantes
- Filtra entrada y salida

Cabinas de flujo



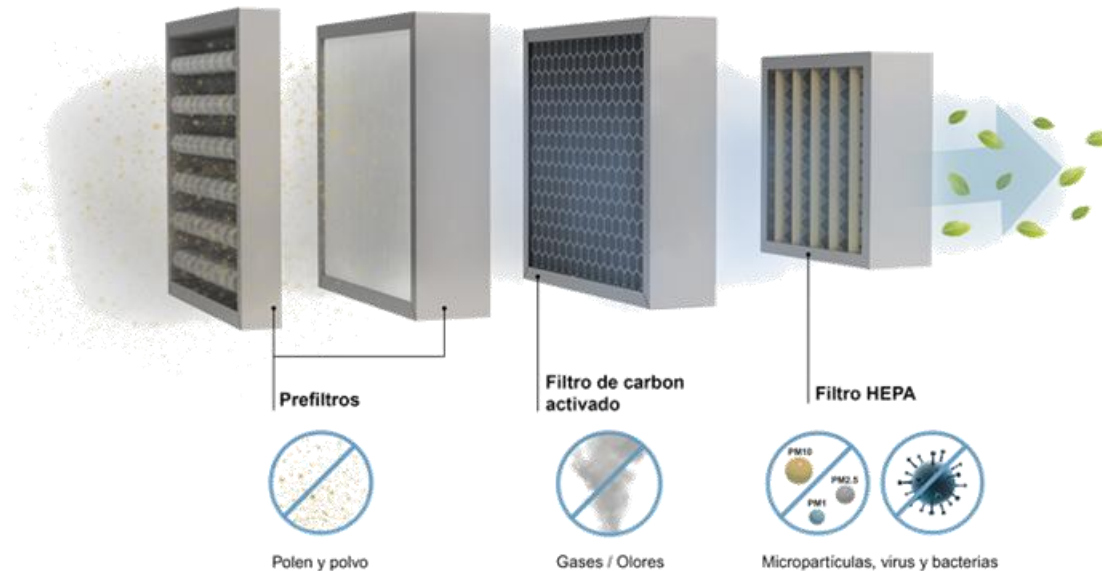
Tipos de filtros

HEPA

- High efficiency particulate air
- Eficiencia de 99,97%
- Partículas menores de 0,3 μm

ULPA

- Ultra low penetration air
- Eficiencia de 99,9995%
- Partículas menores de 0,12 μm



Niveles de contención



Contención: descripción de métodos que hacen seguro el manejo de determinados agentes biológicos para reducir la exposición del personal y del entorno a los mismos.

Barreras primarias

- Protegen al trabajador y al ambiente inmediato
- Técnicas microbiológicas
- EPIs (equipos de protección individual)



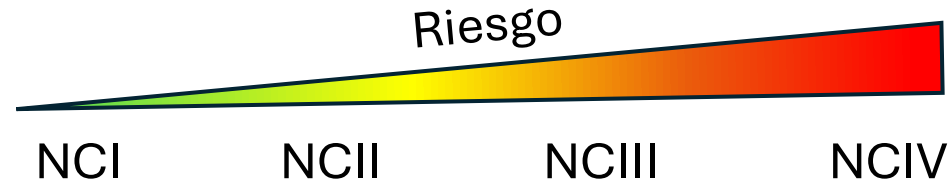
Barreras secundarias

- Protegen al personal y al ambiente lejano
- Cabinas
- Infraestructuras de limpieza



EN TODO LABORATORIO TIENE QUE HABER UN RESPONSABLE DE SEGURIDAD ⁴³

Niveles de contención



NCI

Características

- Microorganismos que no presentan problemas ni para el investigador ni para el entorno
- Pueden ser patógenos oportunistas para los que hay tratamiento y cuya letalidad es nula en condiciones normales
- E.g. *Escherichia coli*, *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Saccharomyces...*

Equipamiento

- EPIs básicos (guantes, bata)
- Contenedores de punzantes
- Autoclave

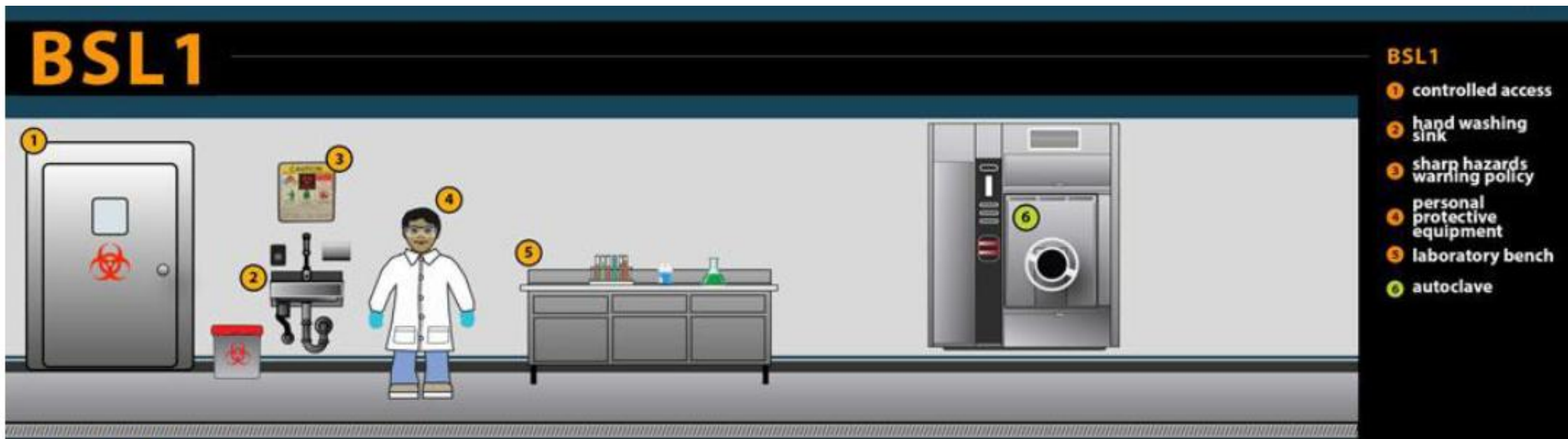
Instalaciones

- No requiere equipo de contención ni instalaciones especiales
- Puertas de control de acceso
- Lavabos
- Suelos antideslizantes sin alfombras
- Ventanas cerradas (o mosquiteras)
- Superficies impermeables
- Sillas de fácil limpieza

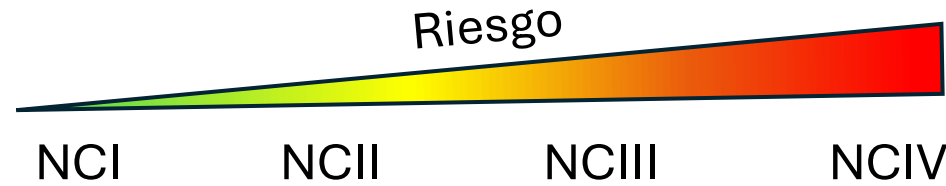
Niveles de contención



NCI



Niveles de contención



NCII

Características

- Agentes biológicos con capacidad de transmisión limitada, con tratamiento y medidas preventivas
- E.g. *Salmonella*, *S. aureus*, Hepatitis A y B, VIH...

Equipamiento

- EPIs básicos (guantes, bata, gafas)
- Campana de bioseguridad clase II
- Contenedores de punzantes
- Autoclave o incinerador

Instalaciones

- Si es posible lejos de áreas públicas
- Puertas de control de acceso con cierre automático
- Lavabos de pie
- Suelos antideslizantes sin alfombras
- Ventanas cerradas
- Superficies impermeables
- Sillas de fácil limpieza
- Ducha y lavador de ojos

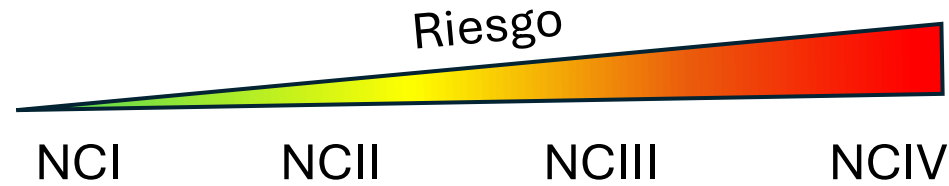
Niveles de contención



NCII



Niveles de contención



NCIII

Características

- Agentes biológicos que producen enfermedades graves, aunque con tratamiento y medidas de prevención
- E.g. *M. tuberculosis*, *Clamydia*, virus del Nilo, ectromelia virus, Hepatitis C, COVID, Leishmania...

Equipamiento

- EPIs especial (doble guante, mono, respirador)
- Campana de bioseguridad clase II
- Contenedores de punzantes
- Autoclave o incinerador

Instalaciones

- Separado del resto de laboratorios
- Acceso restringido
- Lavabos de pie
- Sistema de doble puerta con vestuario
- Suelos antideslizantes sin alfombras
- Ventanas cerradas y selladas
- Superficies impermeables
- Sillas de fácil limpieza
- Ducha y lavador de ojos
- Presión negativa
- Flujo de aire no recirculado

Niveles de contención



NCIII

BSL3 (WITH RISK-BASED ENHANCEMENTS)

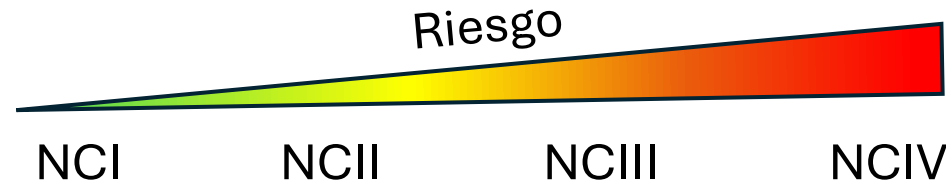
AIR TIGHT (WHEN DISINFECTING)

AIR TIGHT (WHEN DISINFECTING)

BSL3

- 1 self-closing, double-door access
- 2 controlled access
- 3 personal shower out
- 4 sharp hazards warning policy
- 5 hand washing sink
- 6 sealed penetrations
- 7 physical containment device
- 8 powered air purifying respirator
- 9 laboratory bench
- 10 autoclave
- 11 exhaust HEPA filter
- 12 effluent decontamination system

Niveles de contención



NCVI

Características

- Agentes biológicos que producen enfermedades graves, se transmiten fácilmente y no tienen tratamiento ni medidas de prevención
- E.g. virus ébola, virus Crimea-Congo, virus Marburgo virus Lassa, Viruela

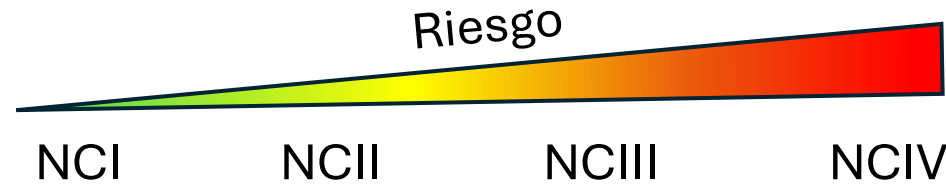
Equipamiento

- EPIs completo (doble guante, mono, respirador)
- Campana de bioseguridad clase II o III
- Contenedores de punzantes
- Autoclave o incinerador

Instalaciones

- Aislado del resto de laboratorios
- Acceso restringido
- Lavabos de pie
- Sistema de doble puerta con vestuario
- Suelos antideslizantes sin alfombras
- Ventanas cerradas y selladas
- Superficies impermeables
- Sillas de fácil limpieza
- Ducha previa y cambio de ropa
- Presión negativa
- Flujo de aire no recirculado

Niveles de contención



NCIV



Agentes biológicos



Grupo	Pueden provocar enfermedad en el hombre	Puede ser un peligro para los trabajadores	Puede expandirse a la comunidad	Profilaxis eficaz o tratamiento disponible
1	No	-	-	-
2	Sí	Sí	Improbable	Sí
3	Sí	Sí	Posible	Sí
4	Sí	Sí	Alto riesgo	No

Sección I: Estructura y organización del laboratorio clínico

TEMA 3

Gestión de calidad en el laboratorio clínico

Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio

Nacho Escrig, PhD

Normativa de diseño de laboratorio clínico



NO EXISTE

Ley General de Sanidad 14/1986:

- Autorización administrativa previa
- Contar con medios técnicos, instalaciones y profesionales
- Comunidades Autónomas regulan los requisitos técnicos mínimos

ISO 15190: seguridad

- Infraestructura
- Manipulación de reactivos
- Bioseguridad

ISO 15189: calidad

- Normativa de calidad, no vinculante
- Estructura organizativa
- Instalaciones
- Condiciones ambientales
- Equipamiento
- Competencias del personal
- Procedimientos (PNT)
- Controles de calidad
- Trazabilidad
- Gestión de riesgos



Calidad



¿Qué es?

Grado en el que un objeto cumple con los requisitos determinados inherentes al producto.

La **definen los usuarios** que son los que ponen en valor el producto.

Sirve para asegurar que un laboratorio es técnicamente competente

¿Cómo lo demostramos?

Hay entidades que evalúan cómo se hacen las cosas en el laboratorio a través de certificados de calidad



Normativa ISO



ISO

International organization for standardization: formada por organismos nacionales de normalización de más de 160 países.

Elabora normas técnicas **no vinculantes** para estandarizar la calidad, seguridad, eficiencia y compatibilidad

UNE-EN-ISO-9001

Normativa en la que se basa el sistema de gestión de calidad

UNE-EN-ISO-15189

Requisitos a cumplir por los laboratorios clínicos para demostrar que son técnicamente competentes

UNE-EN-ISO-15190

Normativa de seguridad

Certificación vs Acreditación



Ambos son informes de un organismo evaluador independiente y externo sobre el cumplimiento de las normas ISO

Certificación:

- Indica la existencia de un sistema de gestión de calidad
- Requisito indispensable para abrir un laboratorio
- No implica una buena competencia técnica

UNE-EN-ISO-9001



Certificación vs Acreditación



Ambos son informes de un organismo evaluador independiente y externo sobre el cumplimiento de las normas ISO

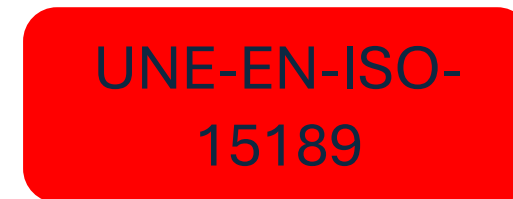
Certificación:

- Indica la existencia de un sistema de gestión de calidad
- Requisito indispensable para abrir un laboratorio
- No implica una buena competencia técnica



Acreditación:

- Implica la certificación
- NO es requisito indispensable para abrir un laboratorio
- Indica una buena competencia técnica



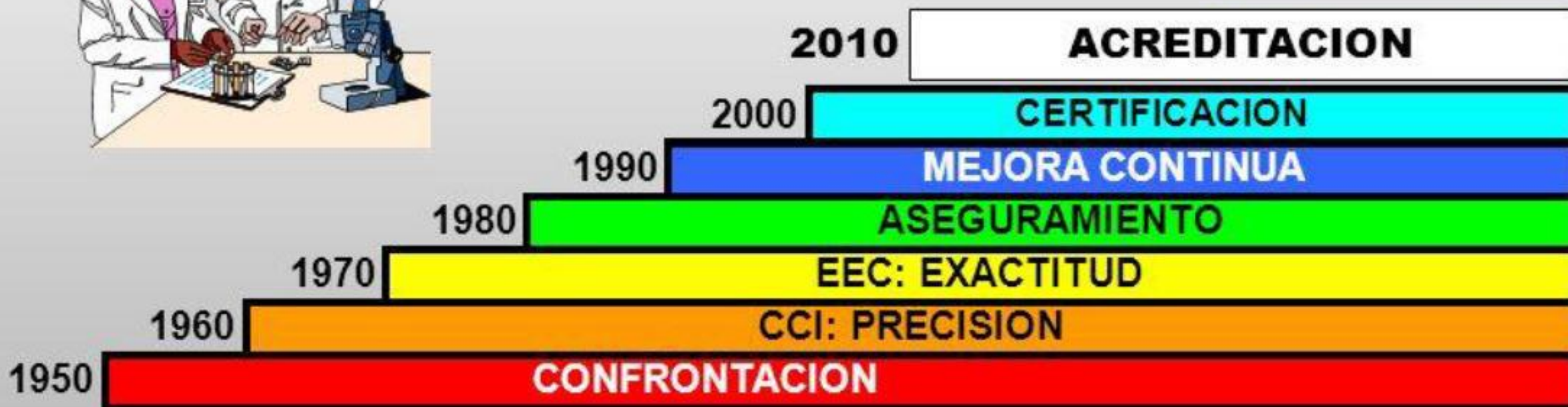
Certificación vs Acreditación



ISO-15189



International
Organization for
Standardization



Certificación



Procedimiento por el que un tercero, empresa independiente y aceptada, garantiza que se produce con los requisitos especificados o implícitos. ➡ **AUDITORÍA**

Documentación necesaria para certificarse:

- ☐ **Identificación y trazabilidad:** dónde está la muestra en cada momento
- ☐ **Control de procesos:** indicadores de que los procesos han ido bien
- ☐ **Inspección:** documentación de los procesos que se van a realizar
- ☐ **Auditorías internas:** para controlar de forma interna el proceso
- ☐ **Control de equipos:** documentación de estado
- ☐ **Plan de formación para el personal:** formación continuada



**Documentar lo
que se hace**

**Hacer lo que
se documenta**

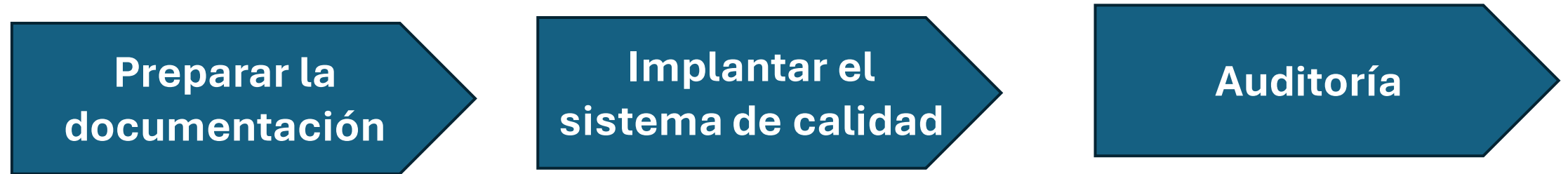
**Cumplir la Calidad
del producto
prometido**

Certificación



Procedimiento por el que un tercero, empresa independiente y aceptada, garantiza que se produce con los requisitos especificados o implícitos. → **AUDITORÍA**

Proceso



- Puede seccionarse (microbiología, hematología...)
- No determina el modo de hacer las cosas sino que las cosas se hagan
- La certificación NO ESTÁ RELACIONADA CON LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS
- La certificación indica que existe un sistema de gestion de calidad

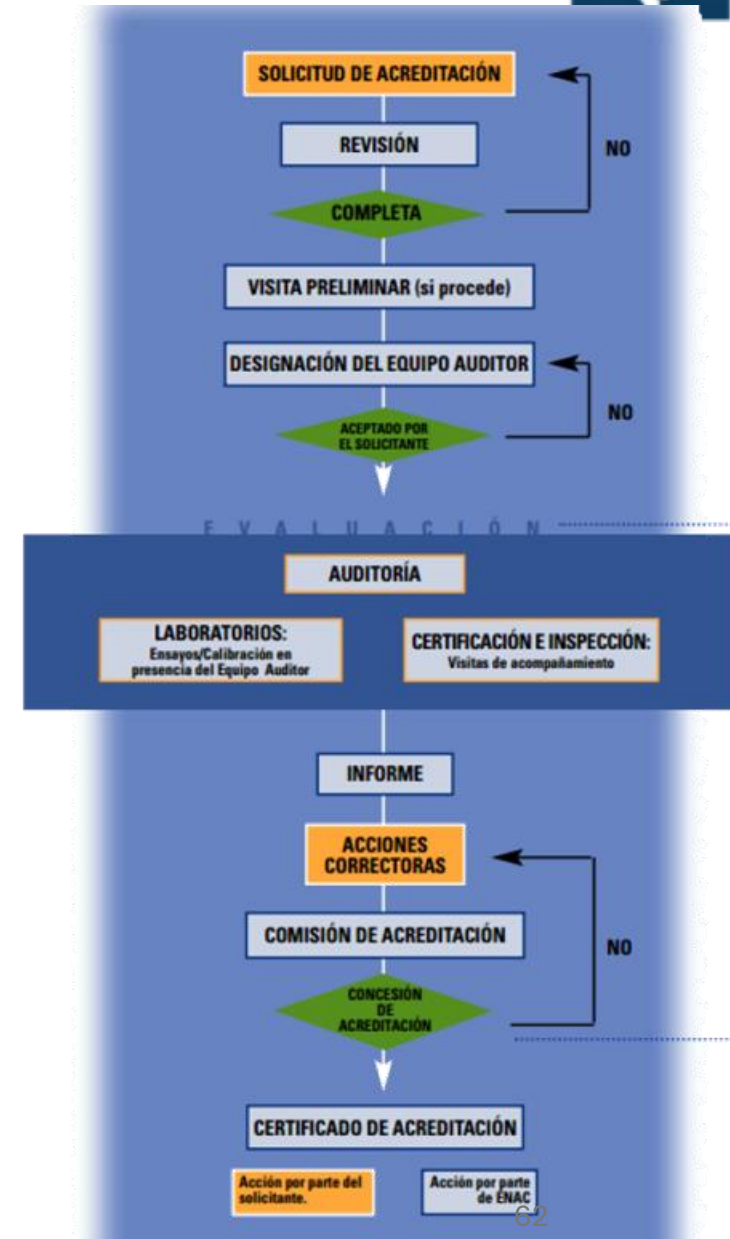
Acreditación



Procedimiento por el que se indica que las técnicas se realizan de forma correcta, acorde al ISO 15189, estando por encima de un mínimo cambiante en función de la tecnología

Es un procedimiento altamente costoso por lo que hay que:

1. Decidir qué procedimientos se someten a acreditación
2. Elaborar la documentación
3. Hacer autidetría interna para corregir desviaciones
4. Hacer auditoria externa para acreditar
5. Aplicar las acciones correctoras sugeridas por el auditor



Acreditación



Documentación

- ☐ Clara, simple, concisa y útil
- ☐ Aprobada por el director del laboratorio
- ☐ Hacer lo que está escrito y escribir lo que se hace
- ☐ Firma y fecha
- ☐ Identificada con código de trazabilidad

Documentación necesaria

1. Manual de calidad
2. Manual de extracción y transporte de muestras
3. Cartera de servicios
4. Procedimiento de gestión
5. Procedimiento normalizado de trabajo (PNT)
6. Formularios y registros
7. Listado de documentos en vigor





Documentación

1. Manual de calidad

- Definido por el laboratorio
- Recoge el procedimiento a seguir para cumplir ISO 15189
- Describe estructura, responsabilidades, recursos y procedimientos de calidad

2. Manual de extracción y transporte de muestras

- Instrucciones para la correcta recogida y transporte de muestras por parte de los profesionales

3. Cartera de servicios

- Conjunto de técnicas, tecnologías o procedimientos mediante los que se hacen efectivas las prestaciones sanitarias



Documentación

4. Procedimientos de gestión

- Describen las instrucciones para realizar procedimientos no técnicos (e.g. control de documentación, gestión de compras o equipos...)

5. Procedimientos normalizados de trabajo (PNT)

- Describen las instrucciones para la correcta realización de los procedimientos técnicos.

6. Formularios y registros

- Fichas que usa el paciente o los técnicos para aportar datos
- Se convierten en registros una vez rellenos (e.g. registro de temperaturas)

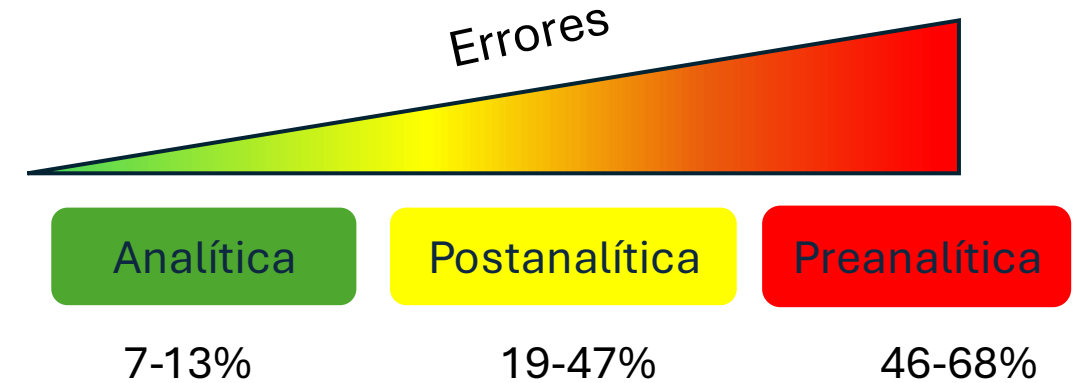
7. Listado de documentos en vigor

- Enumeración de los documentos en uso, indicando código, nombre de documento, edición, fecha de aprobación...

Sistemas de evaluación de la calidad



La calidad incluye todas las fases analíticas



Una vez acreditado hay que seguir mejorando:

- Comunicación de profesionales
- Reclamaciones
- Auditorías
- Encuestas de satisfacción de los usuarios



Sistemas de evaluación de la calidad



Es necesario implementar sistemas para corregir desviaciones

Incidencias

- No afectan significativamente a la calidad
- No alteran el resultado
- Afectan al servicio

No conformidades

- Afectan significativamente a la calidad
- Resultado de incumplimiento de especificaciones de calidad
- Pueden alterar los resultados del ensayo

OPORTUNIDAD DE
MEJORA

Área de mejora

Procedimiento

Causas

**Acciones
correctivas**

Sección II: Laboratorio de microbiología

TEMA 4

Toma y procesamiento de muestras

Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio

Nacho Escrig, PhD

Flujo de trabajo



En el proceso de una analítica hay tres fases:



La toma de muestras en el ámbito microbiológico es MUY sensible, de su correcta ejecución depende la correcta determinación

Flujo de trabajo



Los resultados han de ser **precisos, significativos y clínicamente relevantes**.

1. Recogida de la muestra

2. Conservación y transporte de la muestra

3. Recepción de la muestra en el laboratorio

4. Procesamiento de la muestra

5. Almacenamiento de la muestra tras su procesamiento

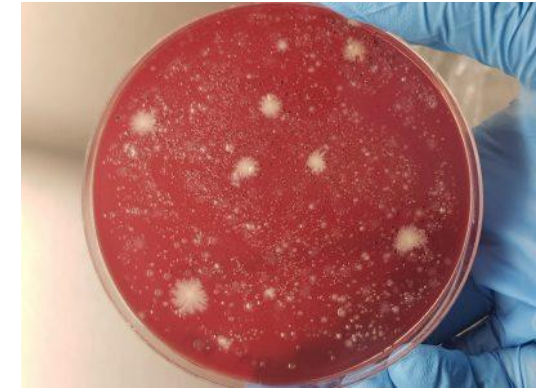
1. Recogida de muestra



El tipo de muestra a recoger está determinado por una sociedad científica basándose en estudios



La recogida de la muestra es un punto **CLAVE** ya que errores en la recogida pueden suponer el fracaso de la identificación del agente etiológico



El laboratorio tiene que elaborar un **MANUAL** claro y conciso con el tipo de muestras para cada análisis y distribuirlo en los lugares donde se tome la muestra.



1. Recogida de muestra



Tabla 1. Muestras clínicas recomendadas para los estudios microbiológicos más habituales.

Proceso Infeccioso (sospecha o diagnóstico clínico)	Tipo de muestra para estudios microbiológicos	Comentarios
Abscesos	Aspirado del absceso	Cerebral, intraperitoneal o visceral, pulmonar
Artritis	Líquido sinovial	
Bacteriemia	Hemocultivos Sangre con EDTA	Posibilidad de detección directa mediante técnicas de Microbiología Molecular
Bronquiolitis	Aspirado/lavado nasofaríngeo	
Cervicitis	Exudado endocervical	
Colecistitis	Líquido biliar	
Conjuntivitis	Exudado conjuntival	Ambos ojos
Diarrea	Heces, aspirado duodenal	Torunda rectal, solo en casos seleccionados
Encefalitis	LCR	
Empiema pulmonar	Líquido pleural	
Endocarditis	Hemocultivos, válvula, verruga	
Endoftalmitis	Líquido intraocular	
Faringoamigdalitis	Exudado faríngeo o periamigdalar	
Gripe	Exudado nasofaríngeo Aspirado y lavado nasofaríngeo, broncoaspirado, lavado broncoalveolar y biopsias transbronquial, pulmonar o pleural	
Infección del catéter	Catéter, frotis pericatóter o conexión del catéter	Sospecha de bacteriemia asociada a catéter obtener hemocultivos
Infecciones asociadas al parto o puerperio (corioamnionitis)	Líquido amniótico, placenta	
Infecciones de piel y partes blandas (impetigo, foliculitis, erisipela, celulitis, úlceras, infecciones gangrenosas, abscesos cutáneos, heridas y quemaduras)	Aspirados, biopsias y exudados de las lesiones realizados preferiblemente con jeringa	Si es posible NO utilizar torunda

Cada tipo de muestra requiere un contenedor diferente para su adecuada conservación hasta el momento del procesamiento



1. Recogida de muestra

Materiales de recogida

El material de recogida de la muestra afecta a la conservación del agente etiológico de interés.

Torundas o hisopos:

Extremo:

- Algodón: contiene ácidos grasos que inhiben bacterias
- Alginato cálcico: tóxico para virus y puede interferir con técnicas (PCR)
- Nylon: es la más usada

Mango:

- Madera: puede interferir con técnicas de microbiología molecular o inactivar virus
- Aluminio o plástico: más usado.





1. Recogida de muestra

Materiales de recogida

El material de recogida de la muestra afecta a la conservación del agente etiológico de interés.

Tubo contenedor

- Con medio
- Sin medio
- Anaeróbico





1. Recogida de muestra

Materiales de recogida

Tabla 3. Consideraciones sobre la toma de las muestras

TIPO DE MUESTRA	ENVASE	VOLUMEN	PROCEDIMIENTO	COMENTARIOS
Abscesos	Contenedor estéril Jeringa de extracción con cambio de aguja	El que se pueda obtener	Punción-aspiración Cirugía	Cerebral, intraperitoneal o visceral, pulmonar
Catéteres, frotis pericatóter y de la conexión	Contenedor estéril (catéter) Torunda con MT (frotis)	2 a 4 cm distales (porción intravascular)	Extracción aseptica del catéter Frotando la piel o introduciendo la torunda en el orificio de la conexión	
Líquidos estériles (articular, biliar, amniótico, diálisis peritoneal)	Contenedor estéril MT para anaerobios Jeringa estéril Frasco hemocultivos	1-5 ml aerobios y anaerobios 10 ml hongos 10 ml micobacterias	Punción percutánea	Enviar un pequeño volumen en frasco estéril para Gram
Prótesis, válvulas cardiacas y otros dispositivos	Contenedor estéril		Cirugía abierta	
Tejidos y biopsias	Contenedor estéril MT para anaerobios MT para virus	Máximo tejido posible, evitando zonas necróticas	Punción-aspiración Punch o cirugía abierta	Para micobacterias y <i>Helicobacter pylori</i> añadir unas gotas de agua destilada No enviar las muestras envueltas en gasas

2. Conservación y transporte



Como norma general las muestras han de enviarse rápidamente al laboratorio a temperatura ambiente. Después se reubican.

Para conservarlas periodos de tiempo más largos se ponen a 2-8 °C

EXCEPTO:

- Hemocultivos
- Líquido cefaloraquídeo (LCR)
- Exudados
- Líquidos biológicos

Microorganismos de análisis inmediato:

- *Nisseria gonorrhoeae*
- *Nisseria meningitidis*
- *Haemophilus influenzae*
- *Streptococcus pneumoniae*
- Bacterias anaerobias

La concentración de microorganismos en estas muestras es baja, por lo que es necesario que crezcan y no se mantengan estáticos durante el transporte.

2. Conservación y transporte



Una misma muestra puede tener condiciones de conservación diferentes dependiendo de lo que se vaya a buscar en ella

Tabla 5. Conservación de las principales muestras empleadas en el diagnóstico microbiológico

Muestra	Determinación	Envase	Transporte Tiempo, Temperatura	Conservación Tiempo, Temperatura
Sangre	Hemocultivo	Frascos de hemocultivos	≤ 2 h, TA	≤ 24 h, TA
	Serología	Tubo de suero Tubo de plasma (no válido si hay que inactivar)	≤ 2-4 h, TA	< 24 h, 2-8°C > 24 h, -20°C o -70°C
	Cargas virales	Tubo plasma (nunca heparina)	≤ 2 h, TA	≤ 72 h, -20°C > 72 h, -70°C
	Virus	Tubo plasma	≤ 2 h, TA	
	Detección ácidos nucleicos	Tubo sangre con EDTA	≤ 2 h, TA	
	Parásitos	Sangre con EDTA	≤ 1 h, TA	2-8°C
Médula ósea	Bacterias/Hongos/Micobacterias	Tubo estéril con anticoagulante, frascos hemocultivos	≤ 2 h, TA	≤ 24 h, TA
	Parásitos (<i>Leishmania</i> spp.)	Tubo estéril con anticoagulante (heparina)	≤ 2 h, TA	
	Detección ácidos nucleicos	Tubo sangre con EDTA	≤ 2 h, TA	
	Virus	Tubo estéril con anticoagulante	≤ 24 h, 2-8°C	> 24 h, -70°C
Catéter intravenoso	Bacterias/Hongos	Frasco estéril	≤ 15 min, TA	≤ 24 h, 2-8°C
Líquido cefalorraquídeo	Bacterias	Frasco estéril	≤ 15 min, TA	≤ 24 h, 35°C
	Micobacterias	Frasco estéril	≤ 2 h, TA	≤ 24 h, 2-8°C
	Hongos	Frasco estéril	≤ 2 h, TA	≤ 24 h, 35°C
	Virus	Frasco estéril	≤ 15 min, TA o 2-8°C	≤ 24 h, 2-8°C
	Serología	Frasco estéril	≤ 2 h, TA	≤ 24 h, 2-8°C
	Parásitos	Frasco estéril	≤ 15 min, TA	
	Detección ácidos nucleicos	Frasco estéril	≤ 2 h, TA	≤ 24 h, 2-8°C
Otros líquidos estériles: abdominal, amniótico, pleural, ascítico, biliar, articular, sinovial, pericárdico	Bacterias	Frasco estéril, tubo con medio anaerobios, frascos de hemocultivo, jeringa sin aire	≤ 15 min, TA	≤ 24 h, 2-8°C muestra en frasco de hemocultivos TA
	Hongos	Frasco estéril	≤ 2 h, TA	≤ 24 h, TA
	Micobacterias	Frasco estéril	≤ 2 h, TA	≤ 24 h, 2-8°C
	Virus	Frasco estéril, tubo con MT para virus	≤ 15 min, TA o 2-8°C	≤ 24 h, 2-8°C
	Parásitos	Frasco estéril	≤ 15 min, TA	≤ 24 h, TA
	Detección ácidos nucleicos	Frasco estéril	≤ 2 h, TA	≤ 24 h, 2-8°C

3. Recepción de la muestra

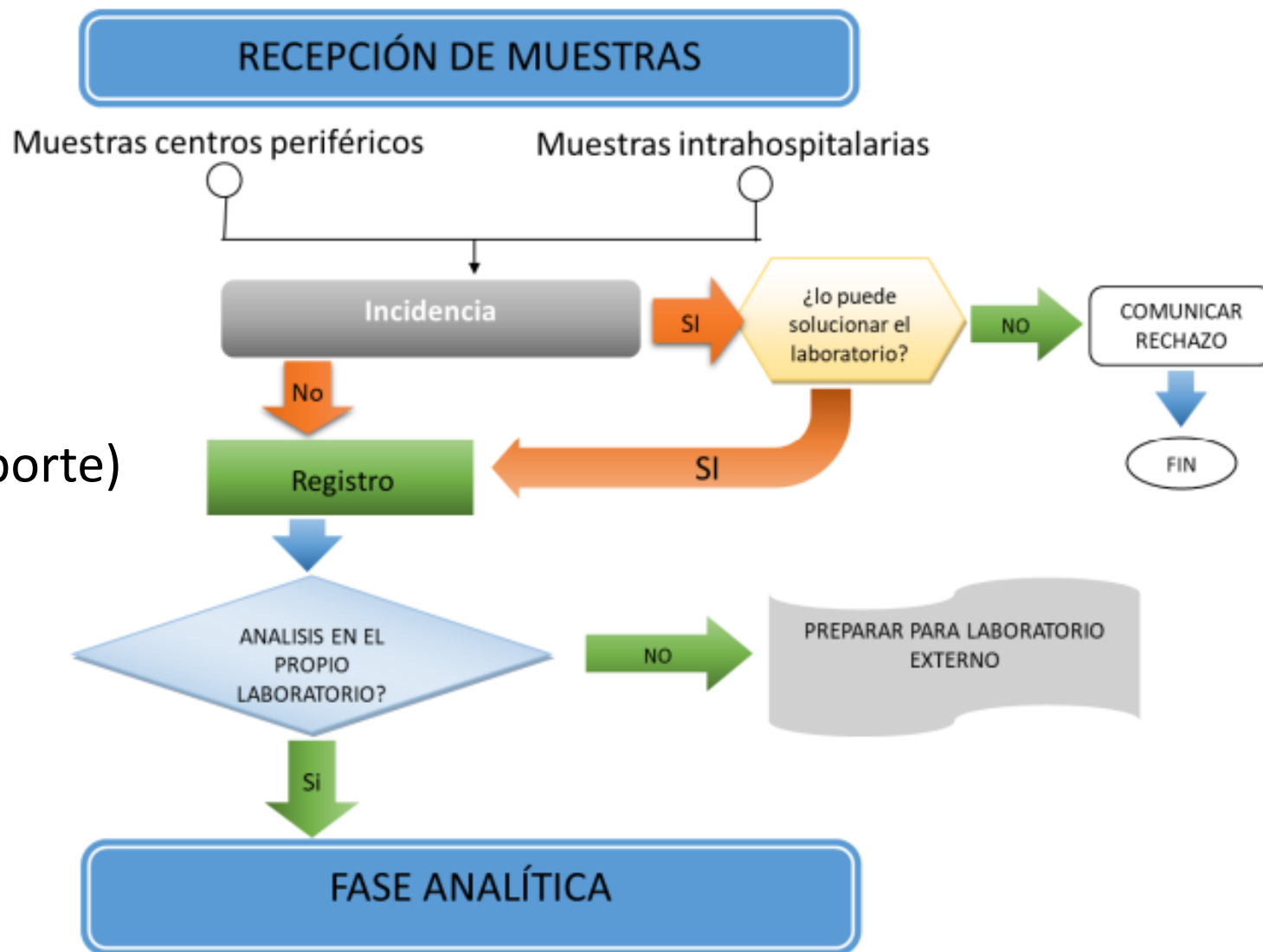


Comprobar si la muestra es adecuada

Problemas más comunes:

- Identificación incorrecta
- Muestra derramada (fallo de transporte)
- Conservación inadecuada

Comunicar y registrar



4. Procesamiento



El procesamiento estándar de muestras microbiológicas es la siembra

Procedimiento:

4.1 Priorizar muestras

4.2 Selección de medios de cultivo

4.3 Siembra



PRIORIDADES

- 1.
- 2.
- 3.



4. Procesamiento



4.1 Prioridad de las muestras microbiológicas

Tipo de muestra:

- Muestras sensibles
Líquidos estériles → poca cantidad de microorganismos
- Muestras urgentes
LCR → necesario aplicar tratamiento cuanto antes
- Muestras importantes
Biopsia quirúrgica

Demanda asistencial:

- Asistencia continuada
- Test rápidos de antígenos

4. Procesamiento



4.2 Selección de medios de cultivo

Los medios de cultivo son determinantes para la identificación de agentes etiológicos

Se seleccionan en función de:

- Tipo de muestra
- Agente etiológico

SÓLIDOS

Agar Sangre
Agar Chocolate
Agar MacConkey
Agar EMB (Eosin-methylene blue)
Agar CAN (Colistina y ácido naldíxico)

LÍQUIDOS

Caldo de tiogliconato
BHI (Brain heart infusion)
LB (caldo de lisogenia)
Caldo selenito
Caldo Todd-Hewitt

4. Procesamiento

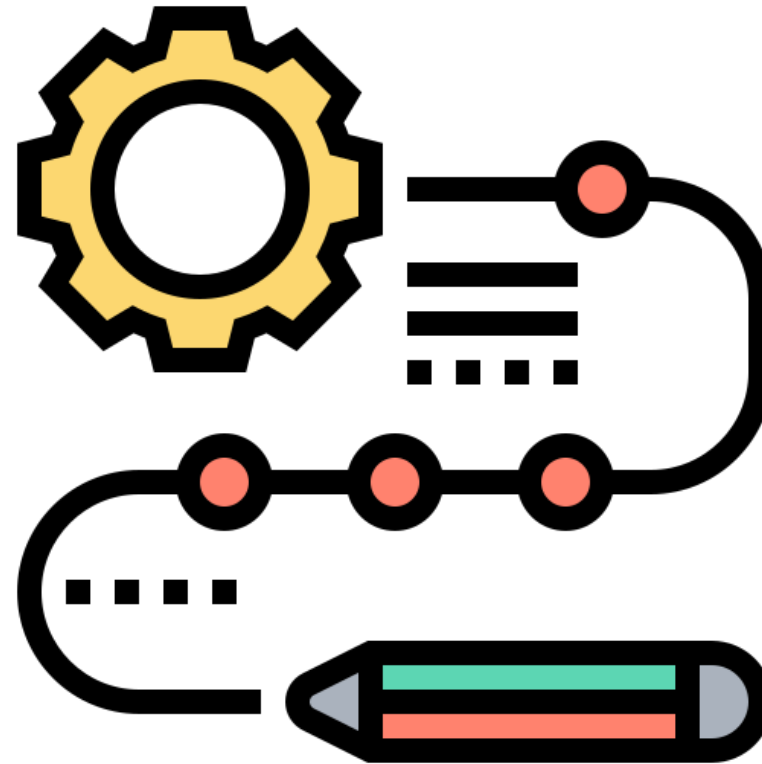


4.3 Siembra

Seguridad necesaria para la adecuada bioseguridad (nivel 2 o 3)

Incluye:

- A. Pretratamiento
- B. Siembra
- C. Frotis o extendidos
- D. Incubación

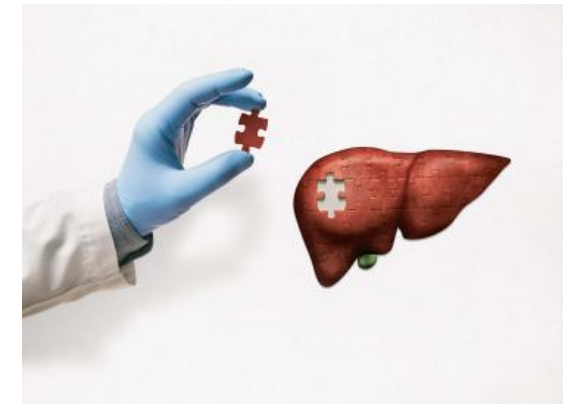
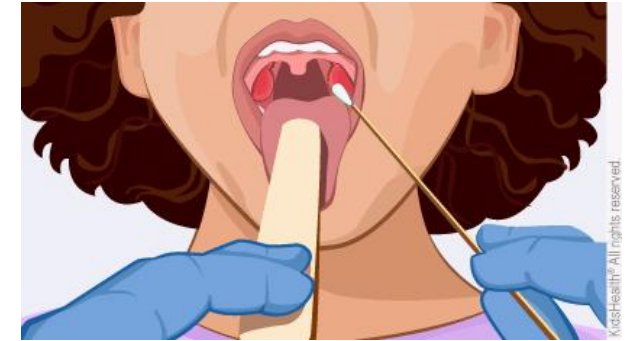


4. Procesamiento

4.3 Siembra

A. Pretratamiento

- Innecesario
- Necesario
 - Centrifugación
 - Dilución
 - Homogenización
 - Filtración
 - Descontaminación
 - Tratamientos térmicos



4. Procesamiento



4.3 Siembra

B. Siembra

Hay que elegir el medio más adecuado para identificar el agente etiológico deseado

Para seleccionar el medio se usa la bibliografía y manuales

Los medios más empleados son:

Agar sangre y agar chocolate → No selectivos

Agar MacConkey o Agar EMB → selectivos de gramnegativos

Agar CNA → Selectivo de cocos grampositivos

Caldo de tiogliconato o BHI → Enriquecidos



4. Procesamiento



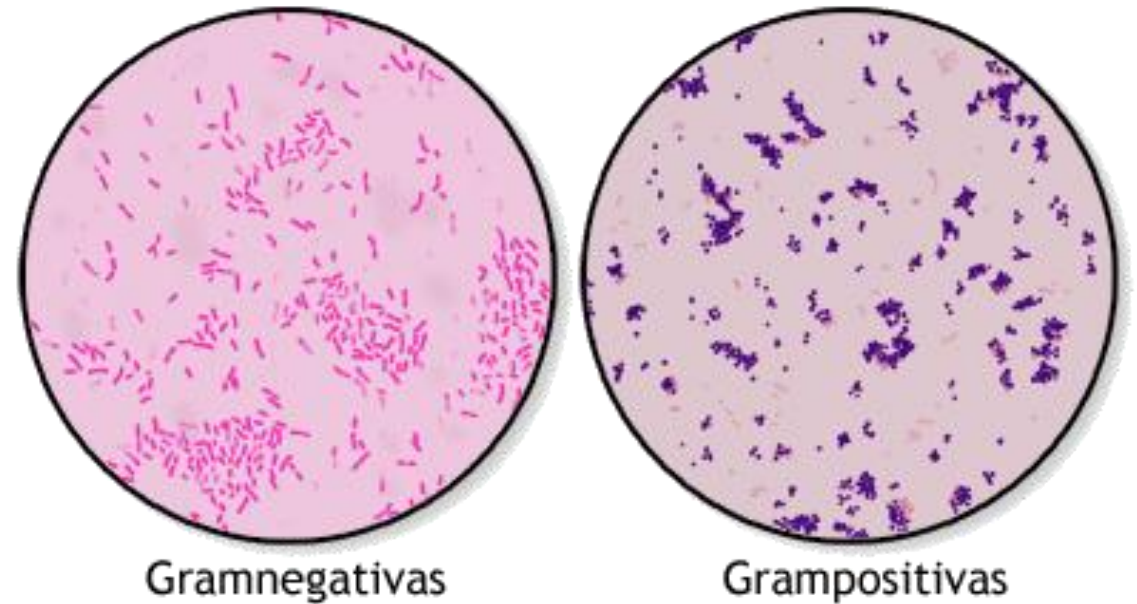
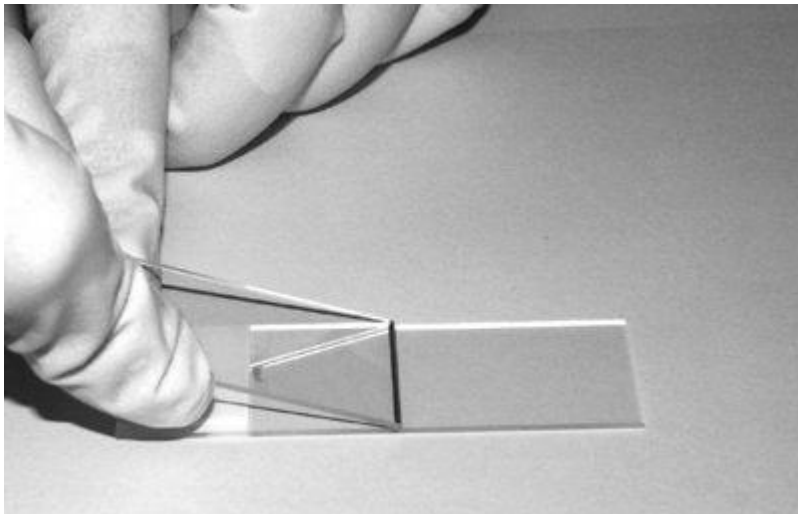
4.3 Siembra

C. Frotis o extendidos

Permiten una visión directa o mediante tinción del agente etiológico

Rápidas y coste-efectivas

Mejoran el diagnóstico



Tinción de gram

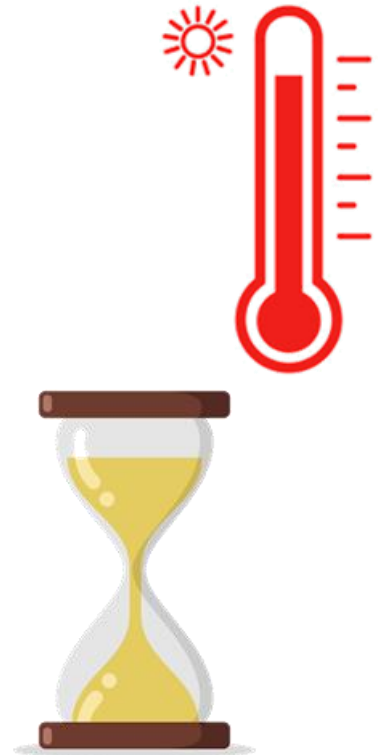
4. Procesamiento

4.3 Siembra

D. Incubación

Se ha de hacer en las condiciones óptimas para el agente etiológico

- Temperatura: la mayoría entre 35-37°C
- Atmósfera
 - Aerobiosis: rica en O₂
 - Enriquecida con 5-7% CO₂
 - Microaerofílica: O₂ reducido (5%) CO₂ enrique
 - Anaerobiosis: sin O₂
- Duración:
 - Suele ser al menos 48h
 - Orina 24h



5. Almacenamiento



Las muestras han de almacenarse el tiempo suficiente para resolver la petición

- Al menos 1 semana a 4 °C por si se necesita repetir el análisis



- La congelación NO es válida si se quiere repetir la siembra posteriormente
- La congelación solo se emplea para conservar molecularmente (PCR, antígenos...)

Muestras con relevancia biológica



El movimiento de patógenos se ve favorecido por:

- Globalización (COVID19)
- Bioterrorismo

Patógenos grupo IV

Elevada mortalidad

Ausencia de tratamiento

Ambos fenómenos crean alarma social y alteran el funcionamiento normal de la sociedad



Muestras con relevancia biológica



En España NO hay, por el momento, laboratorios de nivel de bioseguridad 4

ISCIII → proyecto planteado

GSK → proyecto en construcción



El Centro Nacional de Microbiología tiene un laboratorio de nivel 3

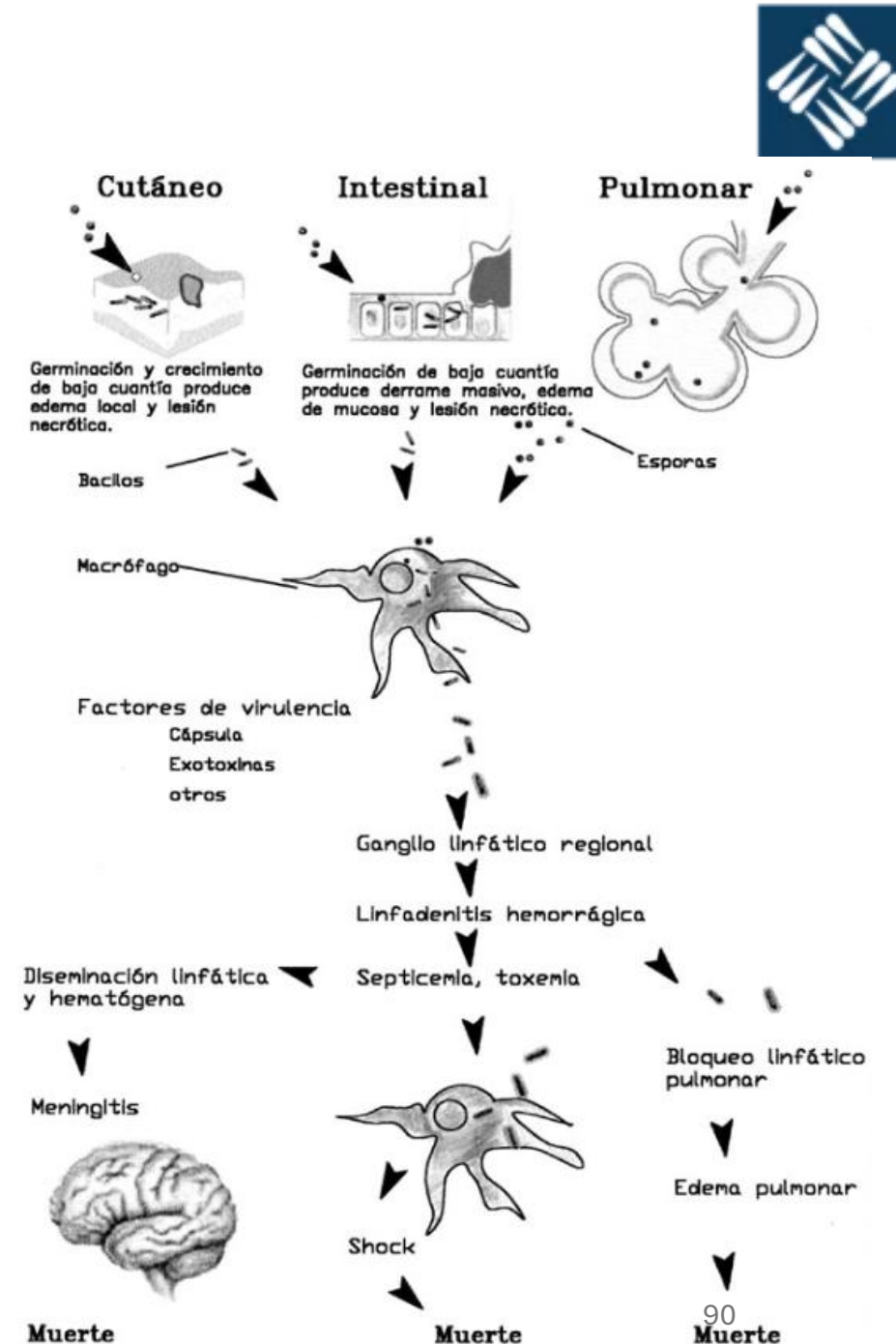
- Instalaciones con presión negativa
- Cabinas de clase II
- Equipos de protección individual (EPIS) avanzados

Los laboratorios de nivel 2 se pueden adaptar a un nivel 3 con las modificaciones adecuadas

Muestras con relevancia biológica

Bacillus anthracis (Antrax)

- Toxicidad cutánea por endotoxinas
- Llegan a ganglios linfáticos → septicemia y toxemia
- Usado en bioterrorismo
- Se puede trabajar en laboratorios nivel 2
- Evitar generación de aerosoles
- Cuidar limpieza de manos
- Se transmite por aerosolización de sus esporas
- No se transmite de persona a persona

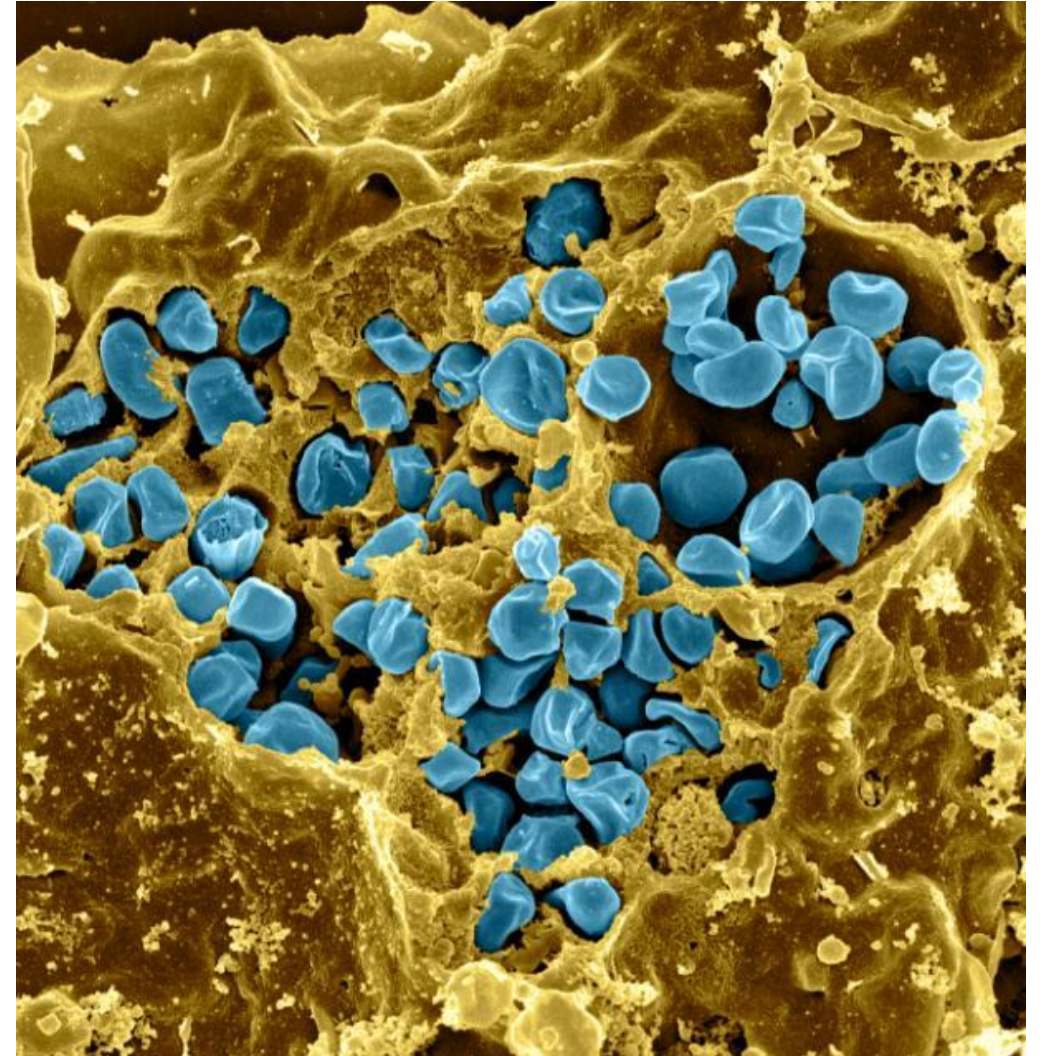


Muestras con relevancia biológica



Francisella tularensis

- Reservorio en fauna silvestre
- Cocobacilo gramnegativo
- Alta infectividad → arma biológica
- Dispersión por aerosoles
- Se obtiene de diversas muestras
- Se puede aislar y cultivar
- Laboratorio de nivel 3
- Síntomas dependen de la vía de entrada
 - Glandular
 - Ocular
 - Orofaringea
 - Pulmonar

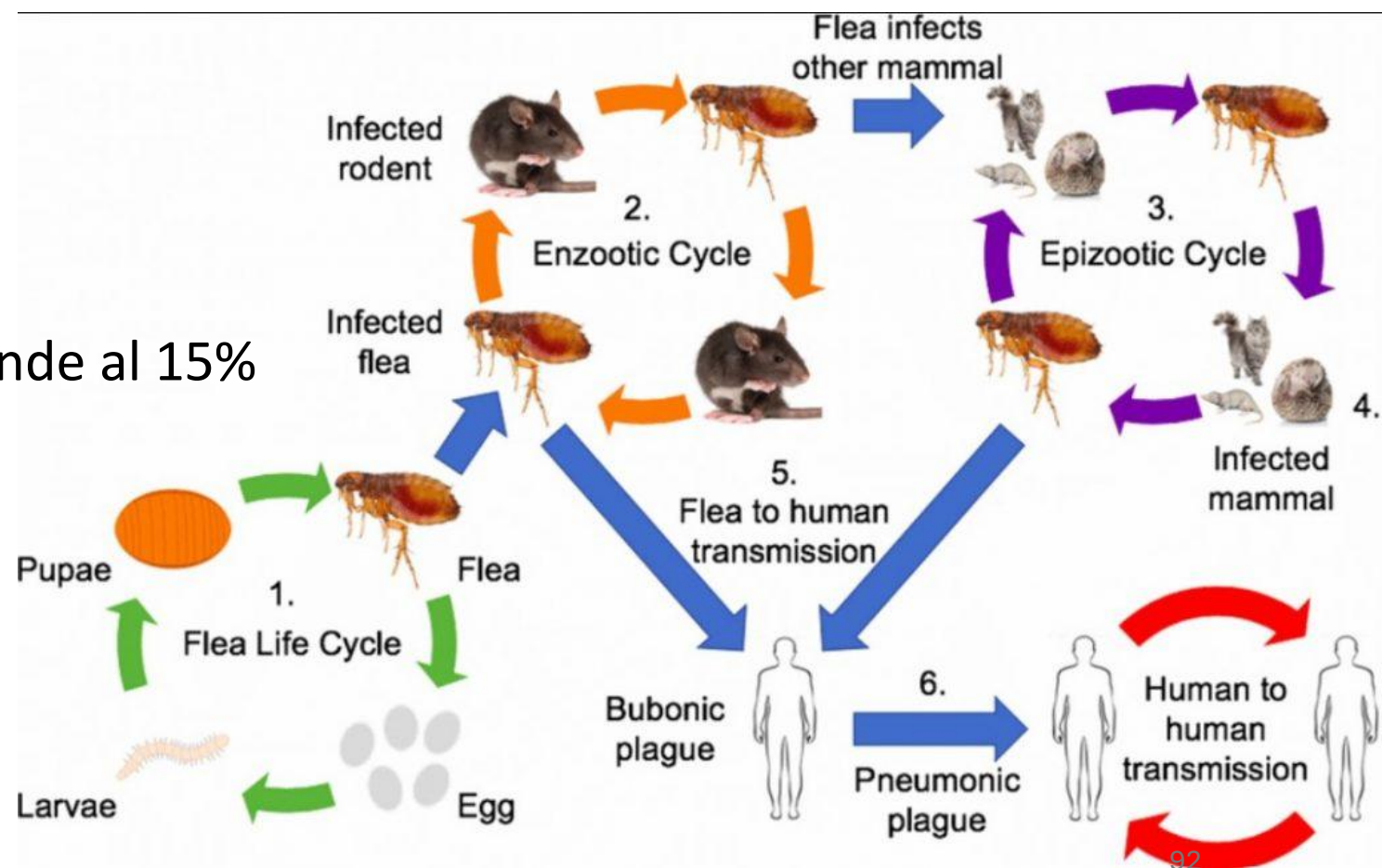


Muestras con relevancia biológica



Yersinia pestis (peste neumónica)

- Alta mortalidad
- Se transmite de persona a persona
- Transmisión aérea
- Laboratorio de nivel 3
- Con antibióticos la letalidad desciende al 15%
- Manipulación con EPIS avanzados

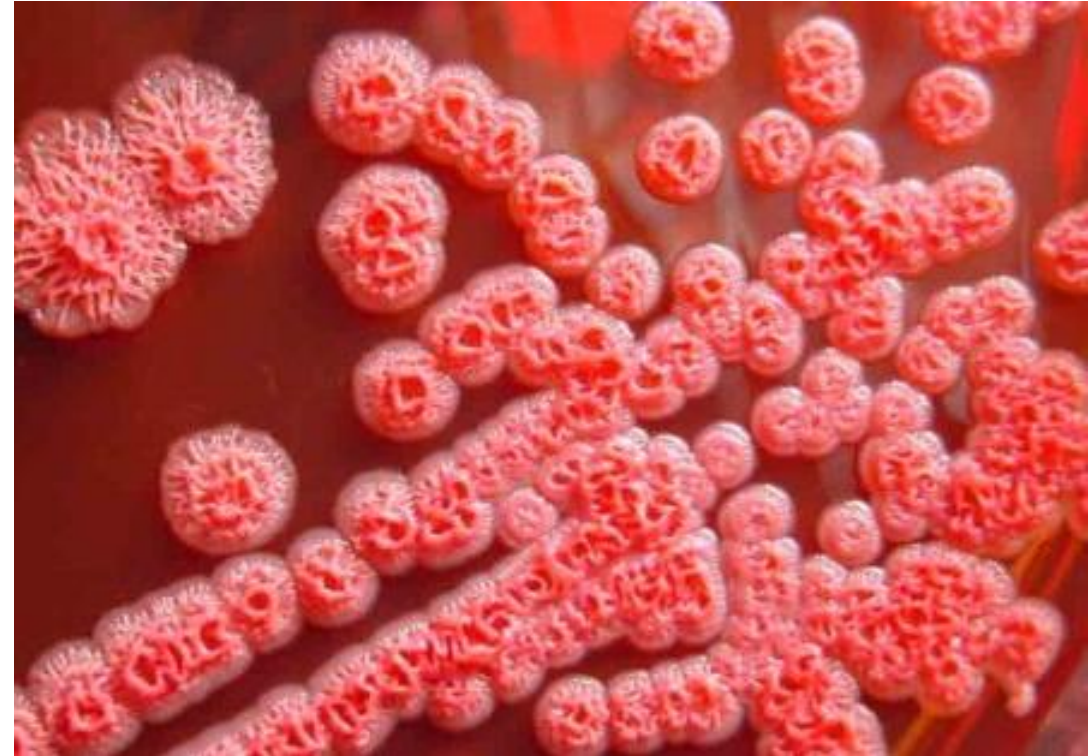


Muestras con relevancia biológica



Burkholderia pseudomallei (melioidosis)

- Alta mortalidad
- Difícil tratamiento
- Se transmite por contacto directo y aerosoles
- No se transmite de persona a persona
- Laboratorio de nivel 3
- Manipulación en cabina con EPIS avanzados



Muestras con relevancia biológica



Otras enfermedades víricas de alto riesgo biológico

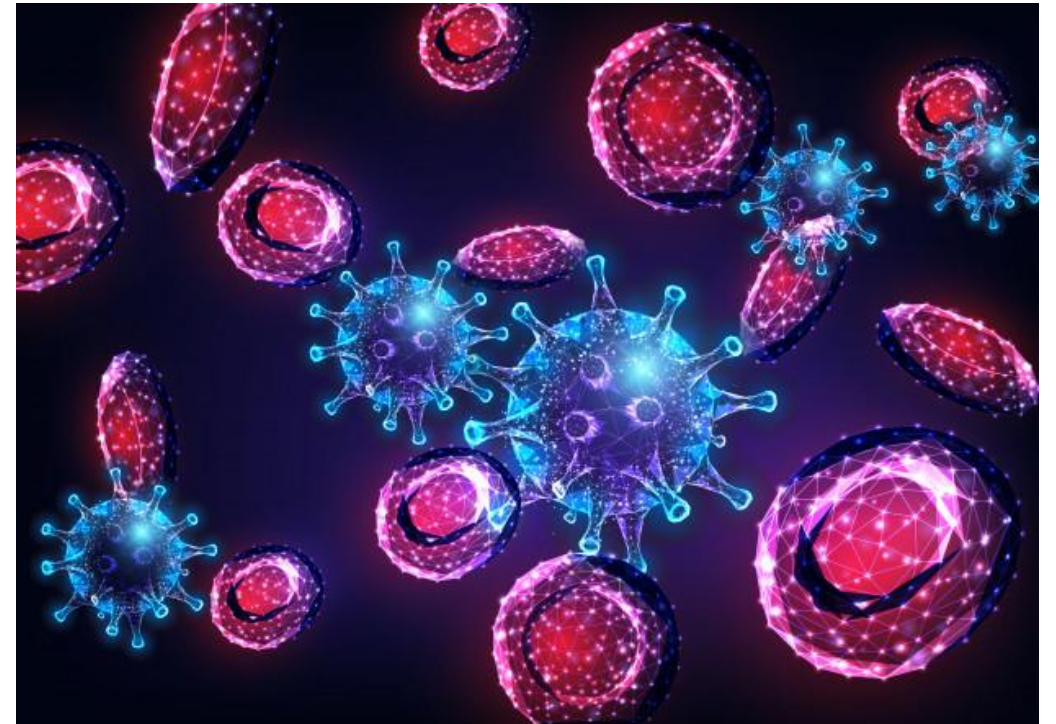
Coronavirus (SARS)

Gripe A

Ébola

Zika

- Minimizar manipulación
- Diagnostico de sangre y otros fluidos
- Medidas de seguridad extremas



Sección II: Laboratorio de microbiología

TEMA 5

Identificación bacteriana

Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio

Nacho Escrig, PhD

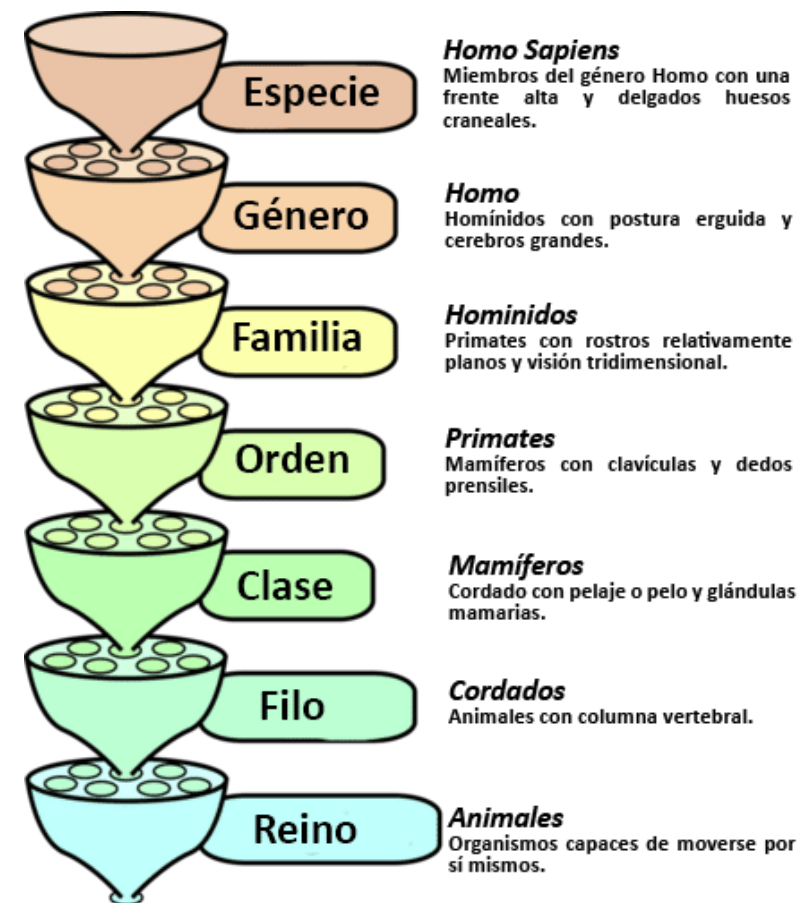
Misión del laboratorio de microbiología



Aplicar metodología precisa para identificar, género y especie, los microorganismos implicados en procesos clínicos asociados a infecciones



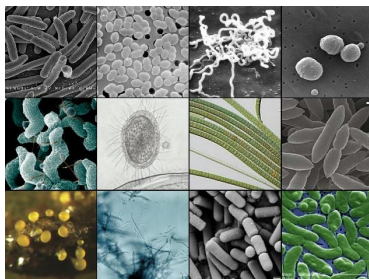
Los laboratorios tienen que elaborar un procedimiento normalizado de identificación



Métodos de identificación



1. Fenotípicos



- Limitaciones para algunos microorganismos
- Coste asequible
- Se basan en características observables
- Más usados

2. Moleculares



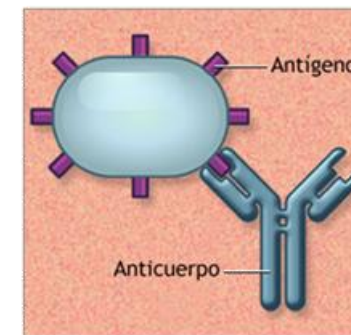
- Permiten identificar mejor los microorganismos
- Coste más elevado
- Se basan en caracterización genómica
- Se combinan con los métodos fenotípicos

3. Proteómicos



- Limitaciones para algunos microorganismos
- Coste elevado
- Se basan en el estudio del proteoma

4. Inmunológicos



- Muy sensibles
- Coste elevado
- Se basan en la afinidad antígeno anticuerpo

1. Métodos fenotípicos



Basados en la comparación de caracteres externos del agente etiológico problema con otros microorganismos conocidos.

ES EL MÉTODO DE ELECCIÓN
DEPENDEN DE CULTIVO

Permite:

- Aislamiento de microorganismo
- Identificación
- Realización de antibiograma

NO proporciona certeza absoluta:

La fiabilidad depende de la proporción de características que coincidan con el control

NO sirven para identificar:

- Micobacterias → no se tiñen con tinción gram
- Bacterias anaerobias
- Bacterias no cultivables (Rickettsias, Clamidias, Espiroquetas)
- Bacterias no visibles al microscopio (Mycoplasmas)



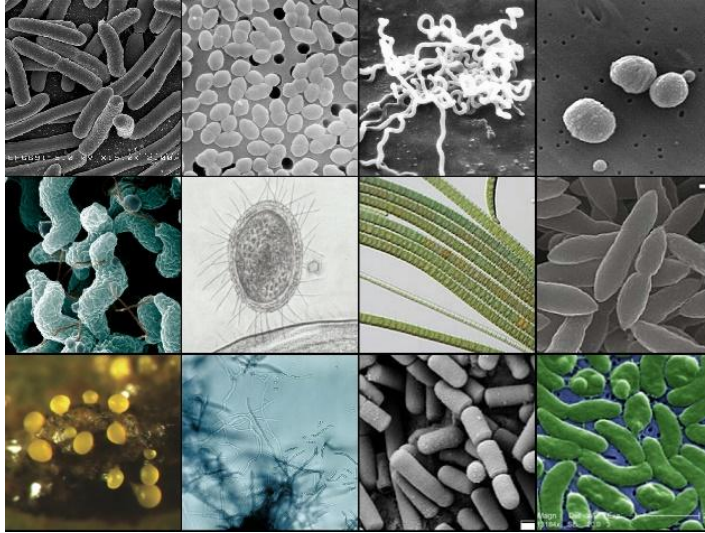
>90%

1. Métodos fenotípicos



Se estudian características

1. Microscópicas
2. Nutricionales
3. Macroscópicas
4. Bioquímicas
5. Resistencias



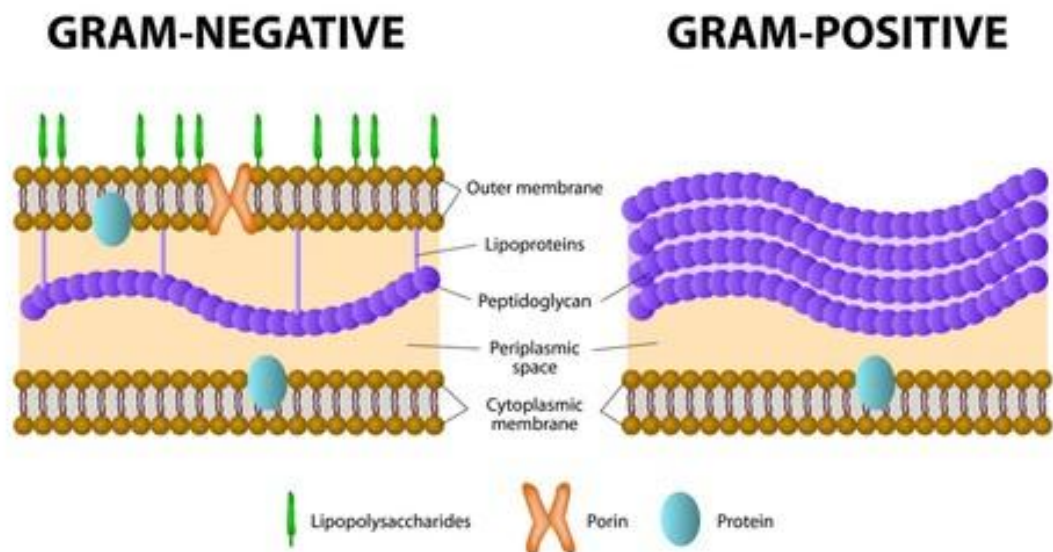
1. Métodos fenotípicos



1. Microscópicas

Se basa en el estudio a través del **microscopio** de la muestra fresca o tras una tinción

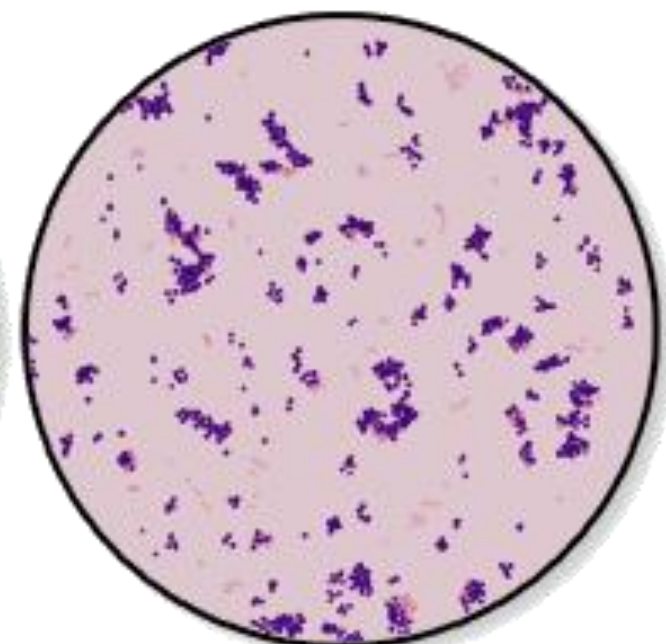
La tinción más utilizada es la tinción de Gram que se usa para un diagnóstico provisional



shutterstock.com · 224095714



Gramnegativas



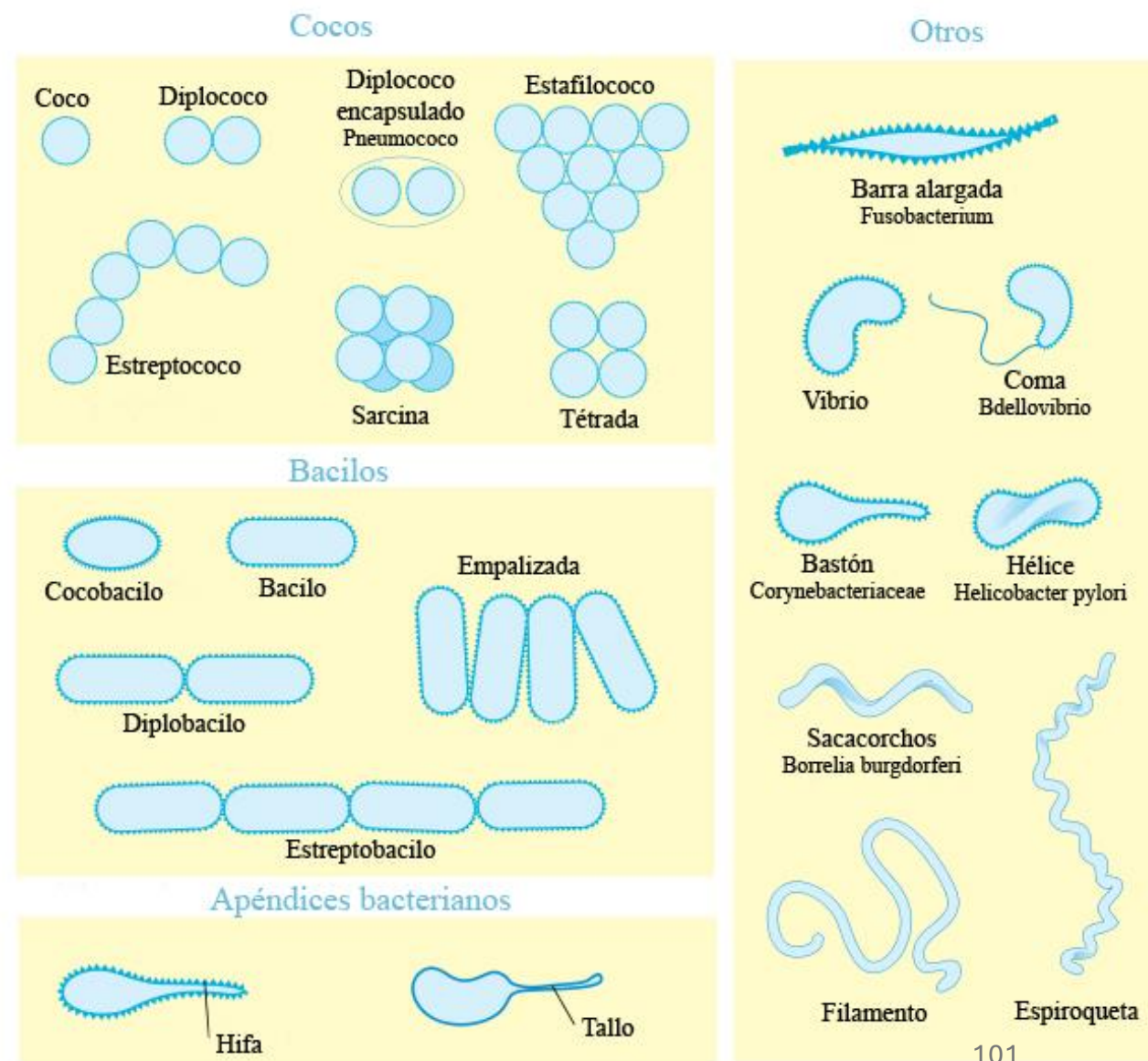
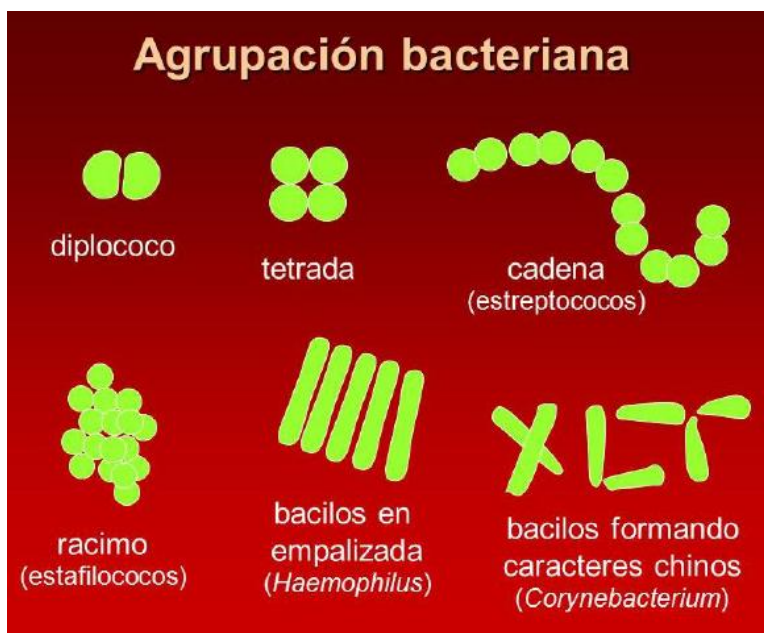
Grampositivas

1. Métodos fenotípicos

1. Microscópicas

Características observables:

- Forma: cocos, bacilos, cocobacilo, filamentados, irregulares
- Disposición: pareja, cadenas, racimos

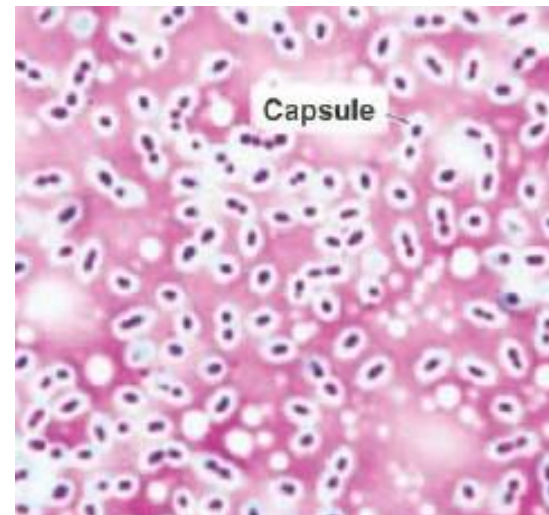


1. Métodos fenotípicos

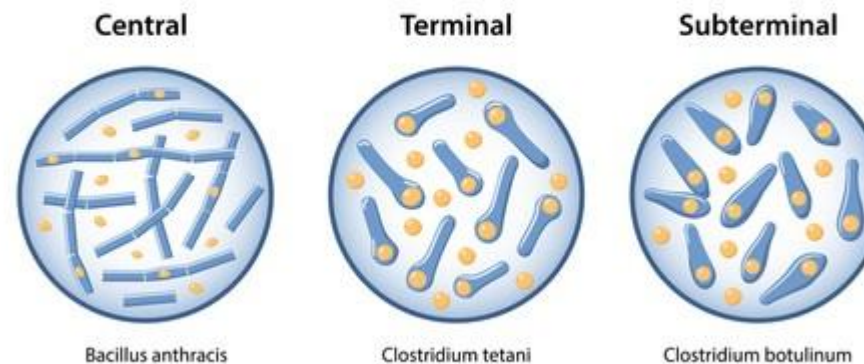
1. Microscópicas

Características observables:

- Cápsula: presente o ausente
- Esporas: terminales o subterminales
- Extremos: redondeados o puntiagudos



Bacterial spore position



1. Métodos fenotípicos



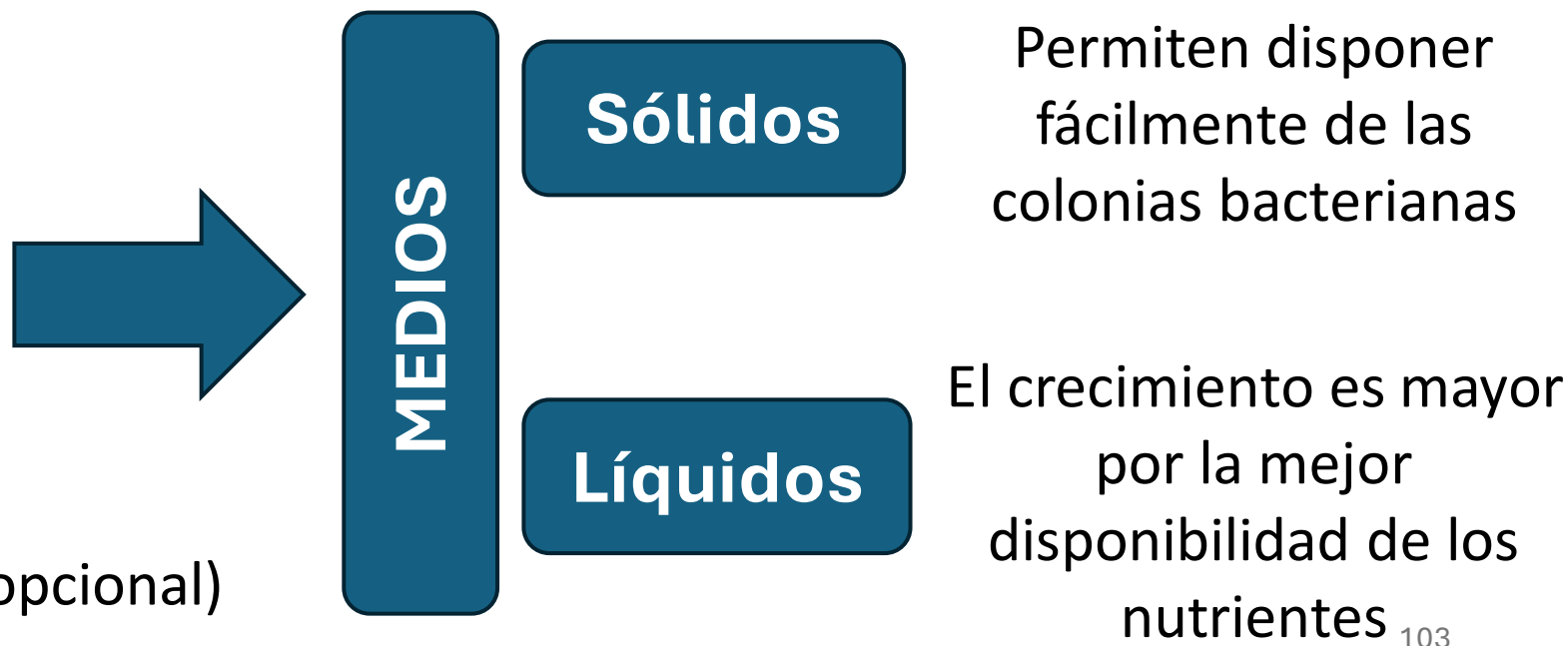
2. Nutricionales

Se estudian características tras el **cultivo** de la muestra durante 24-48h

El crecimiento (o no) del microorganismo en cada medio nos permite determinar el **género** de las bacterias.

Todo microorganismo necesita unos requerimientos para su crecimiento.

- Fuente de energía
- Fuente de carbono
- Fuente de nitrógeno
- Oligoelementos
- Sales
- Agua
- Vitaminas (opcional)
- Aminoácidos esenciales (opcional)



1. Métodos fenotípicos



2. Nutricionales

Según su capacidad para permitir el crecimiento de microorganismos los medios se clasifican en:

- A. Básicos
- B. Enriquecidos
- C. Selectivos
- D. Diferenciales
- E. Cromogénicos



1. Métodos fenotípicos

2. Nutricionales

A. Medios Básicos

Son ricos en nutrientes y permiten el crecimiento de la mayoría de las bacterias

- Agar nutritivo → morfología de colonias
- Caldo nutritivo → rápida proliferación
- Agar sangre → suplementado con sangre



Agar nutritivo



Agar sangre

1. Métodos fenotípicos

2. Nutricionales

B. Medios enriquecidos

Tienen una cantidad superior de ciertos nutrientes

Se usan para fomentar el crecimiento de bacterias que no crecen en medios básicos

- BHI (Infusión cerebro corazón)
- Agar Columbia con sangre
- Agar chocolate → suplementado con sangre calentada (factores V y X)
- Caldo tioglicato



BHI (Líquido)



Agar BHI



Agar Columbia con sangre



Agar chocolate



1. Métodos fenotípicos

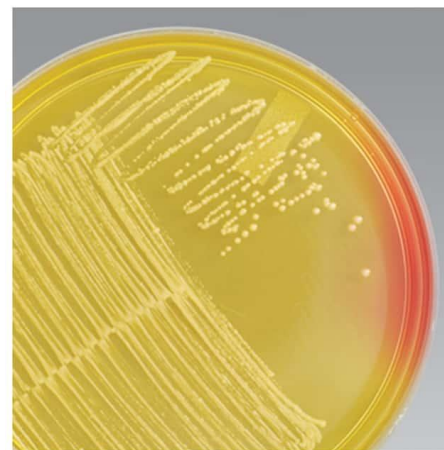
2. Nutricionales

C. Medios selectivos

Solo permiten el crecimiento de determinados microorganismos

Se usan para la separación de microorganismos de poblaciones mixtas

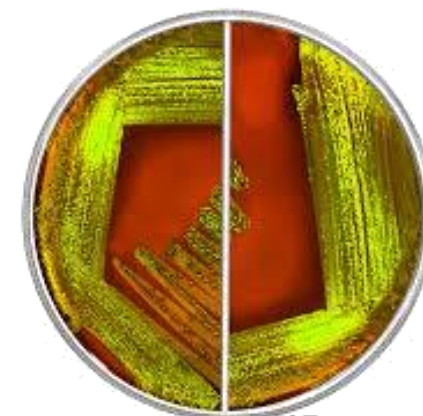
- Agar MacConkey → Gramnegativos
- Agar EMB → Enterobacterias
- Agar Sal-Manitol → Staphylococcus
- Agar Thayer-Martin → inhiben flora normal
- Agar Sabouraud dextrosa → Candida



Agar sal manitol



Agar MacConkey



107
Agar EMB

1. Métodos fenotípicos

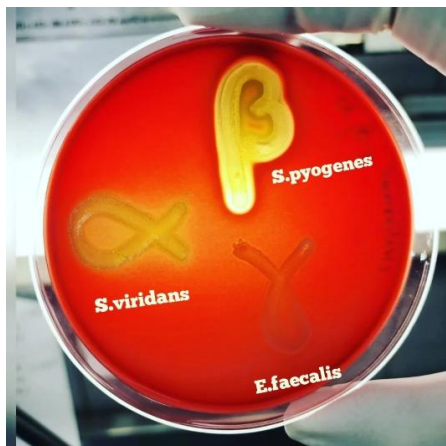
2. Nutricionales

D. Medios diferenciales

Permiten el crecimiento de varios microorganismos

Le dan unas cualidades visuales a cierto microorganismo

- Agar MacConkey → Fermentadores de lactosa
- Agar EMB → Fermentadores de lactosa
- Agar Sal-Manitol → Fermentadores de manitol
- Agar sangre → Hemólisis



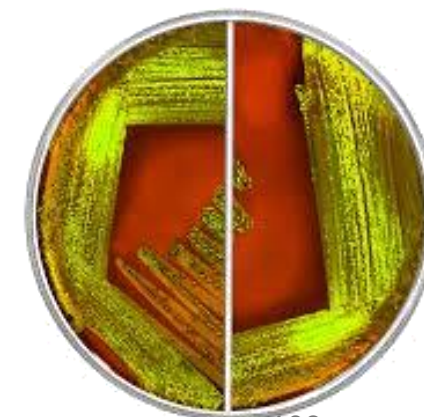
Agar sangre



Agar sal manitol



Agar MacConkey



Agar EMB



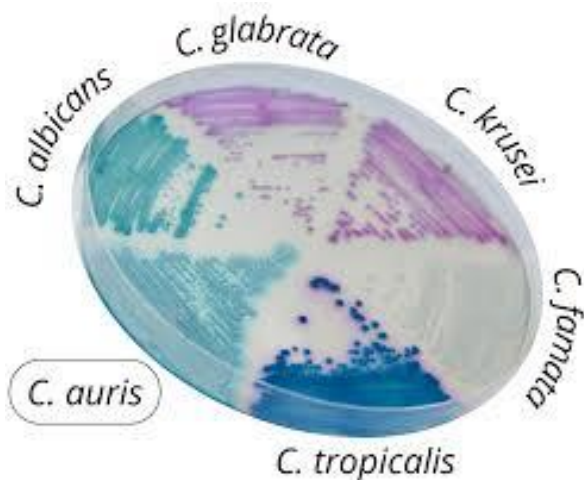
1. Métodos fenotípicos

2. Nutricionales

E. Medios cromogénicos

Tienen una sustancia cromógena que es catalizada por determinadas enzimas liberando un compuesto con color.

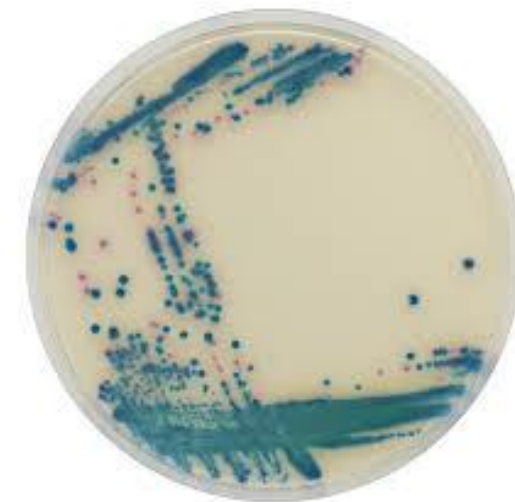
- CHROMagar MRSA → *S. aureus*
- CHROMagar ESBL → *b lactamasa*
- CHROMagar Candida → *Candida* spp.



CHROMagar Candida



CHROMagar MRSA



CHROMagar ESBL

1. Métodos fenotípicos

2. Nutricionales

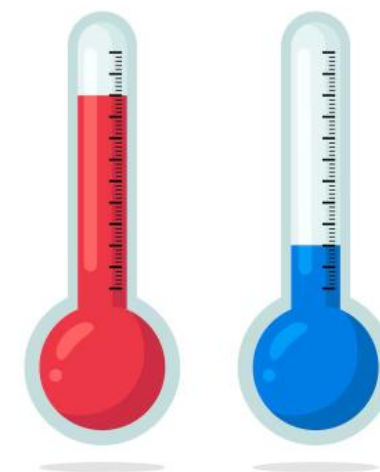
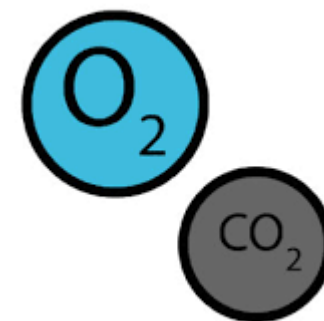
Otras características nutricionales

Atmósfera

- Aerobias estrictas: solo crecen en presencia de O_2
- Anaerobias estrictas: solo crecen en ausencia de O_2
- Microaerófilas: crecen mejor en bajas concentraciones de O_2
- Capnófilas: requieren más CO_2 para crecer

Temperatura

- Psicrófilas: crecen a bajas temperaturas 2-5°C (optimo 10-15)
- Mesófilas, crecen a temperaturas entre 10-45°C (Optimo 30-40)
- Termófilas, crecen a altas temperaturas 50-60°C



1. Métodos fenotípicos



3. Macroscópicas

Hace referencia a características visibles a simple vista

A. Morfología de las colonias

B. Hemólisis

1. Métodos fenotípicos

3. Macroscópicas

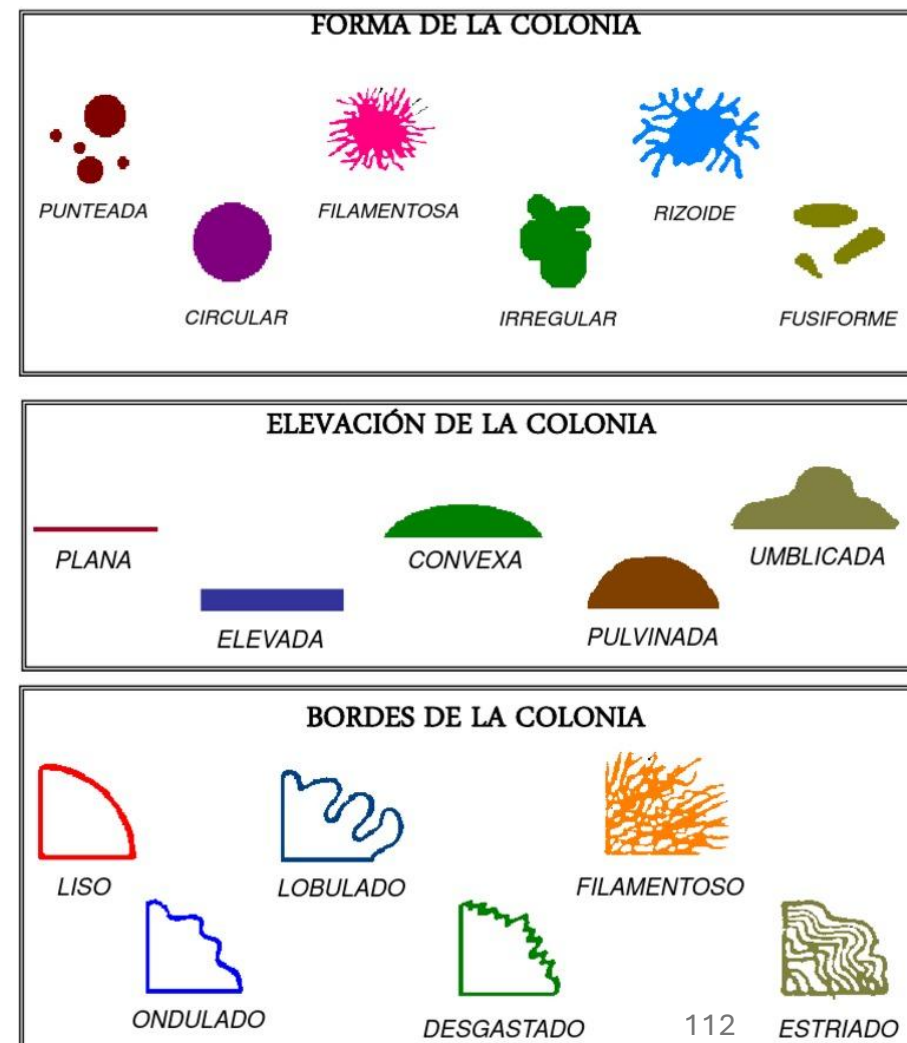
Hace referencia a características visibles a simple vista

A. Morfología de las colonias

- Tamaño: suele ser regular dentro de una especie
- Forma:
 - Borde: liso, rugoso o irregular
 - Grosor: abultada o plana
- Textura: seca o viscosa
- Pigmentación: dentro de una especie puede haber cepas pigmentadas



COLONIAS DE BACTERIAS



1. Métodos fenotípicos

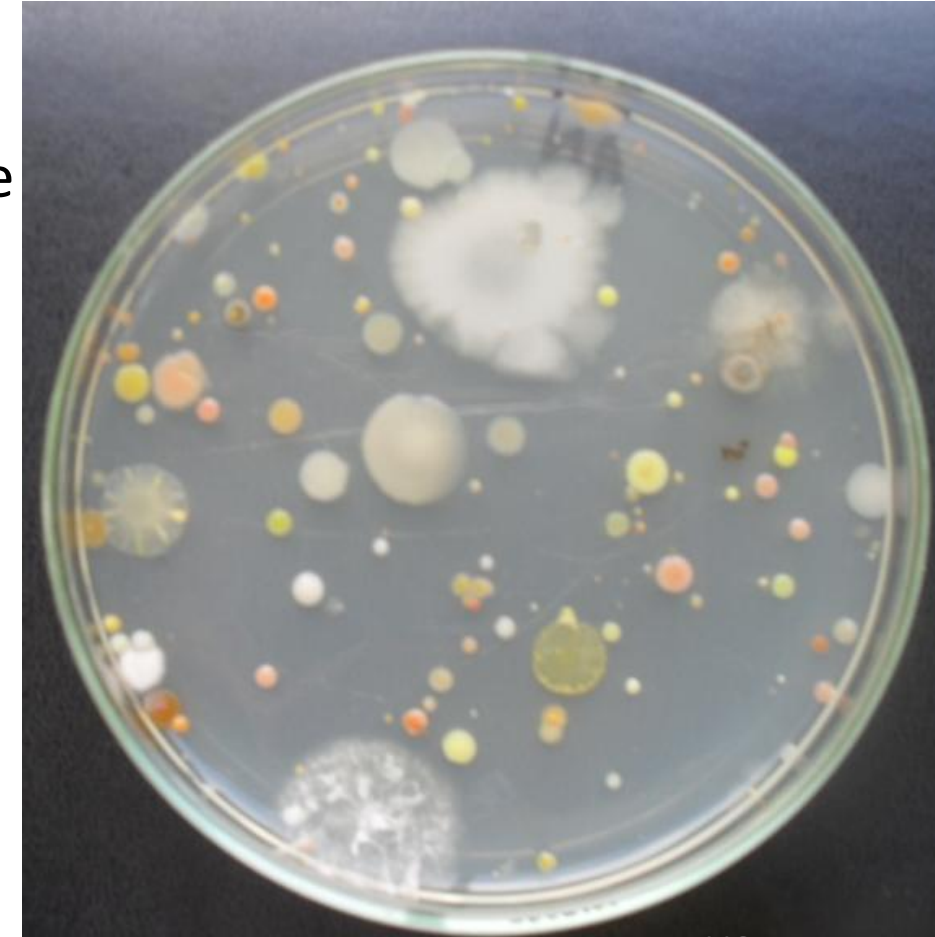


3. Macroscópicas

Hace referencia a características visibles a simple vista

A. Morfología de las colonias

- Tamaño: suele ser regular dentro de una especie
- Forma:
 - Borde: liso, rugoso o irregular
 - Grosor: abultada o plana
- Textura: seca o viscosa
- Pigmentación: dentro de una especie puede haber cepas pigmentadas



1. Métodos fenotípicos

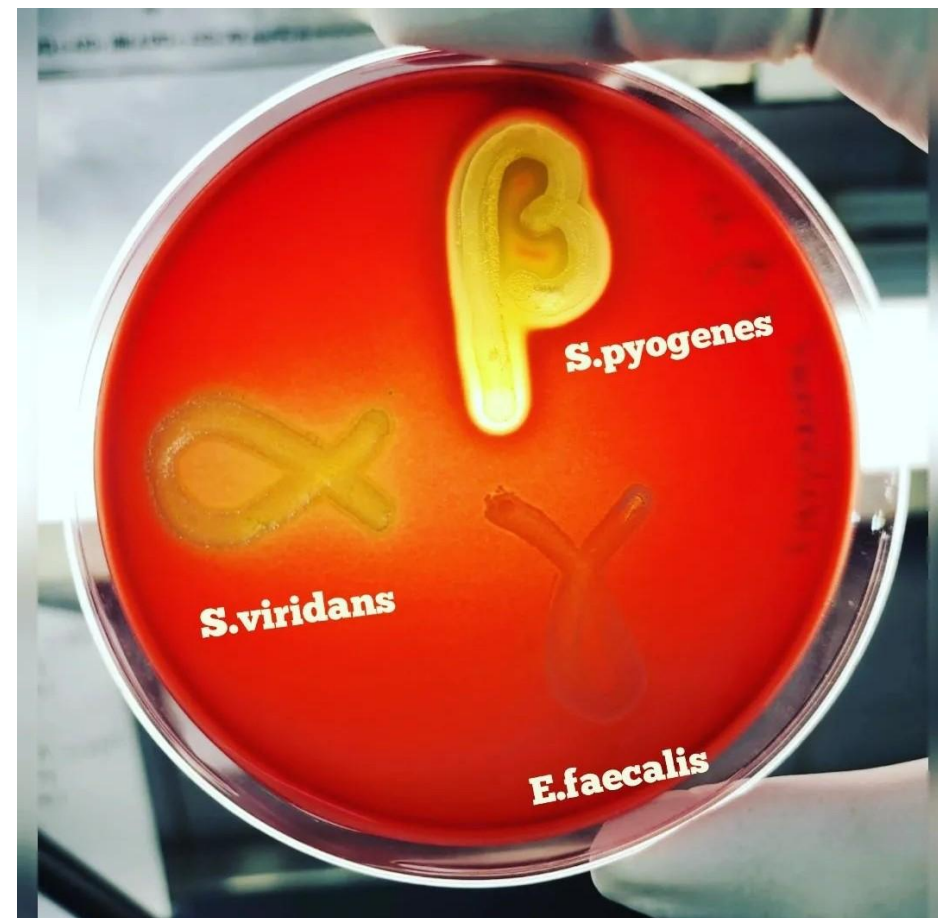
3. Macroscópicas

Hace referencia a características visibles a simple vista

B. Hemólisis

Algunos microorganismos producen hemolisinas que lisan los eritrocitos de los medios con sangre

- Hemólisis Alfa: lisis incompleta con halo verde alrededor de la colonia (*S. viridans*)
- Hemólisis Beta: lisis completa con halo blanco alrededor de la colonia (*S. aureus*)
- Gamma: ausencia de lisis





1. Métodos fenotípicos

4. Bioquímicas

Permiten la identificación de los microorganismos por sus características metabólicas

La mayoría son reacciones enzimáticas:

- Catalasa: catálisis de H_2O_2 en agua y O_2
- Oxidasa: reducción de O_2 en H_2O y H_2O_2 (respiración aeróbica)
- Ureasa: genera amoníaco
- Coagulasa: produce la coagulación de la sangre

En desuso de forma aislada
Sustituidas por sistemas multiprueba

1. Métodos fenotípicos



5. Resistencia a sustancias

Permiten la identificación de los microorganismos por las sustancias que los inhiben

- **Optoquina:** inhibe el crecimiento de *S. pneumoniae* pero no otros Streptococcus alfa-hemolíticos.
- **Bacitracina:** inhibe *S. pyogenes*, de tipo beta hemolítico.
- **Solubilidad de bilis:** algunas bacterias son lisadas por la bilis
- **Crecimiento en caldo hipersalino:** algunos microorganismos son capaces de crecer en medios con una concentración de cloruro sódico (> 6.5%)



1. Métodos fenotípicos



Sistemas comerciales multiprueba

Combinan pruebas bioquímicas y de resistencia a sustancias para identificar microorganismos

Exigen unas condiciones muy precisas para su correcta aplicación

Pueden dar errores

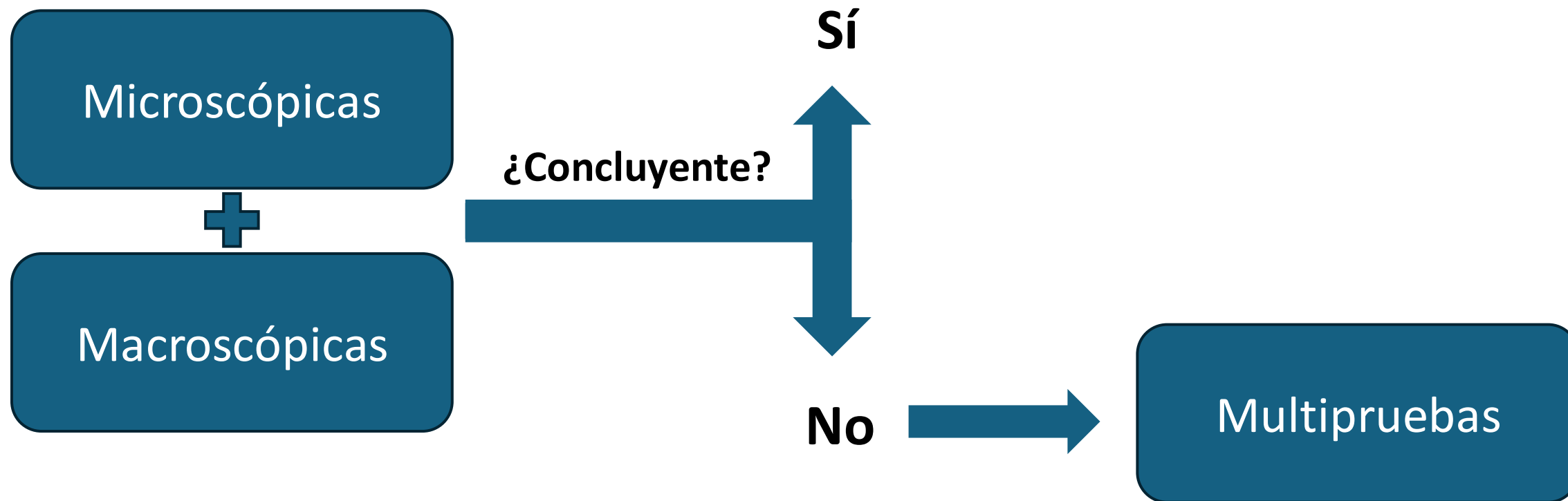
- Manuales:
 - 10-50 pruebas simultáneas
 - Agrupados de 3 en 3
 - Resultado es un dígito
- Automatizados
 - 96 pocillos
 - Inoculación automática
 - Lectura automática



1. Métodos fenotípicos



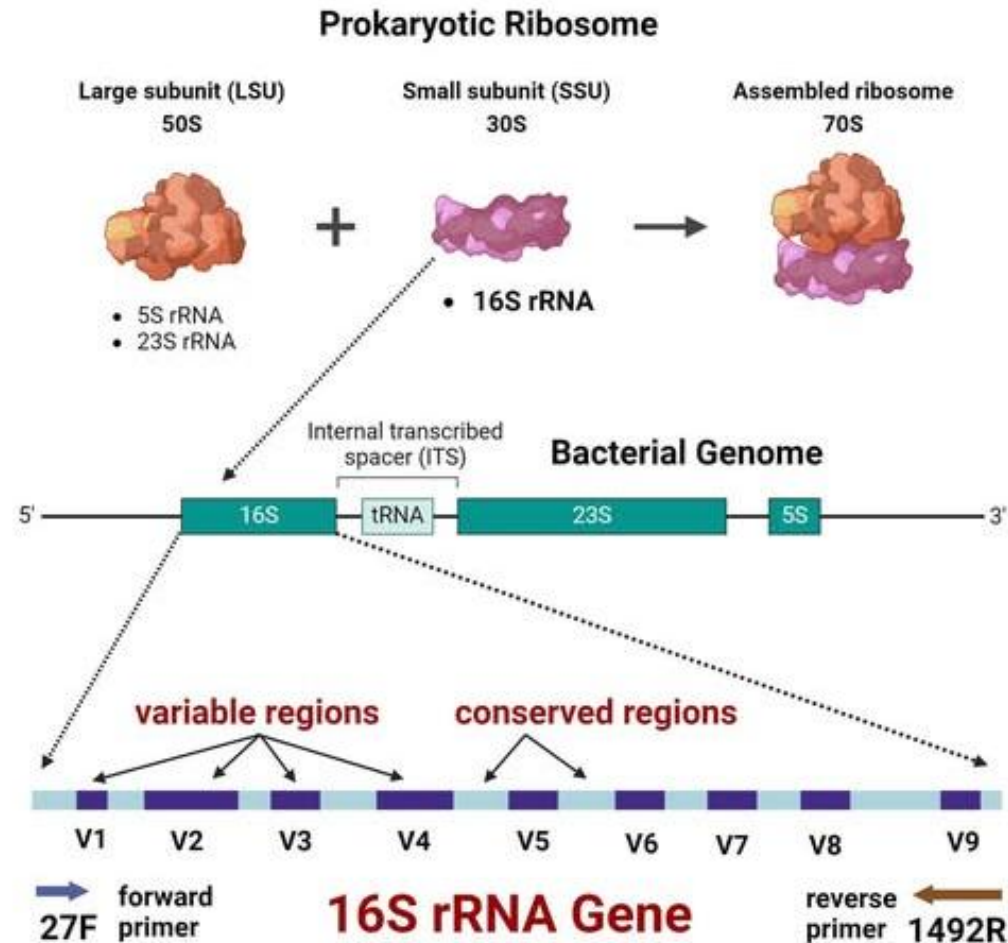
Flujo de trabajo



2. Métodos moleculares

Secuenciación rRNA 16S

Basados en la secuenciación del ARN ribosómico (rRNA) 16S



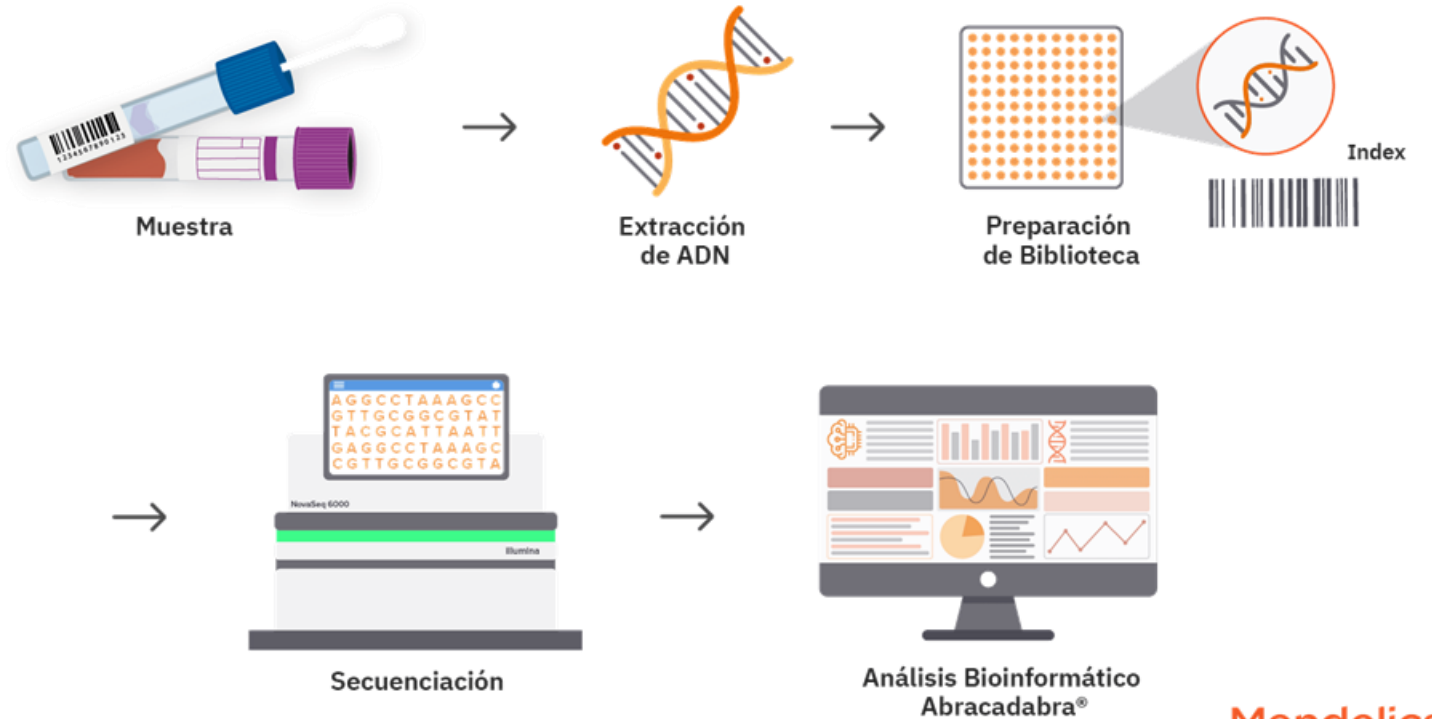
2. Métodos moleculares



Secuenciación rRNA 16S

Su análisis se lleva a cabo por secuenciación que consta de:

1. Extracción de ADN cromosómico: ya sea de la muestra o de la colonia aislada
2. Amplificación del ADN extraído
3. Secuenciación
4. Alineamiento



2. Métodos moleculares



Secuenciación rRNA 16S

Se usa para:

- Cepas poco conocidas fenotípicamente
- Cepas de difícil crecimiento (e.g. *Nocardia* spp. y *Mycobacterium* spp.)
- Cepas que tardan mucho en crecer: se suele hacer la secuenciación sobre la muestra
- Descripción de nuevos patógenos

Consideraciones:

- A veces las bases de datos son incompletas o tienen baja calidad
- Si hay discrepancia entre técnicas moleculares y fenotípicas se han de repetir. Si se mantiene la discrepancia, el genotipo se impone.
- Más efectivas en infecciones monomicrobianas



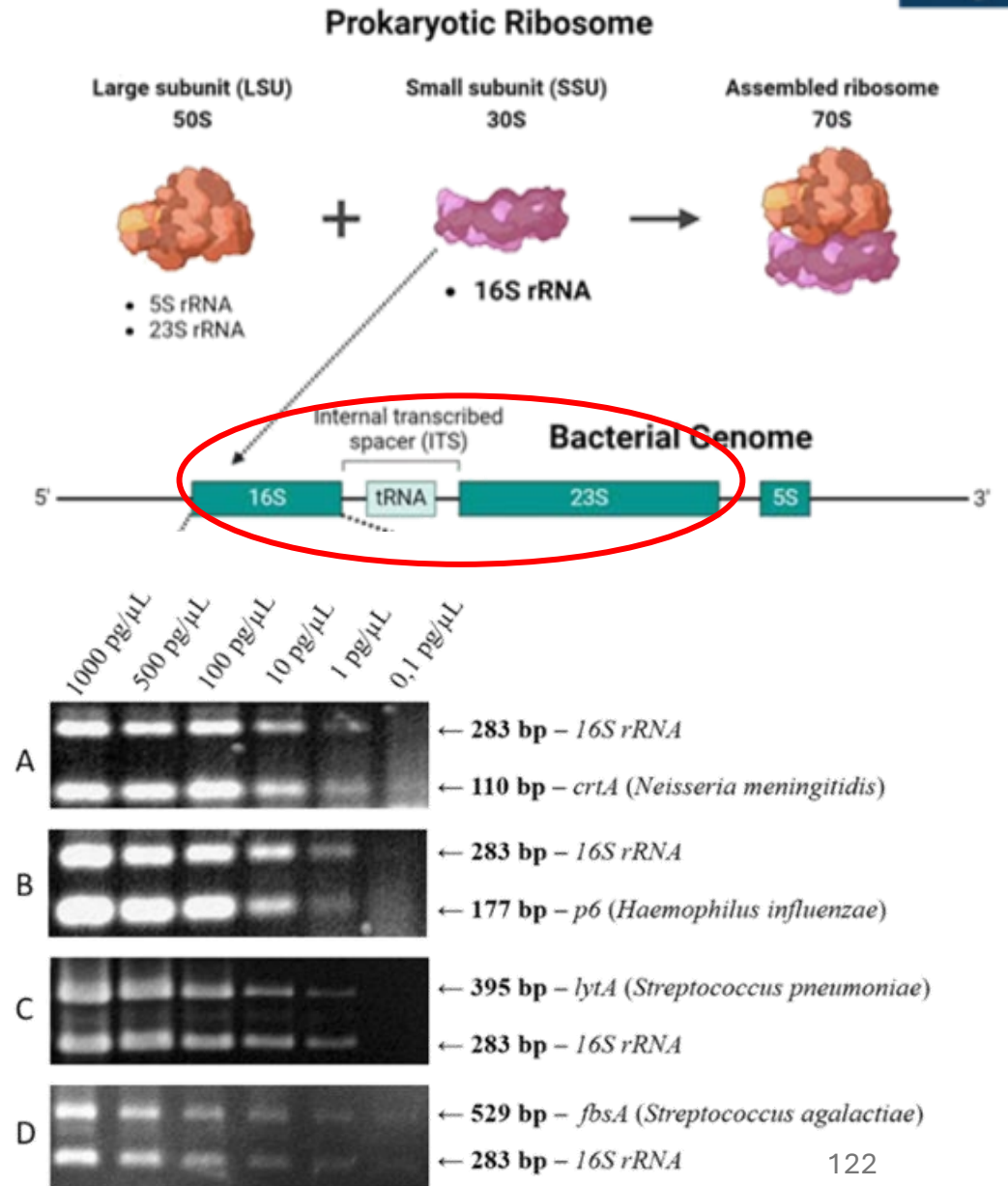
2. Métodos moleculares

PCR multiplex 16S-23S

Diferencias con 16S:

- Amplifica 16S + región espaciadora (ITS) + 23S
- ITS es muy variable y da más resolución
- Utiliza varios primers (multiplex)
- Amplifica distintas regiones al mismo tiempo
- Diferencia especie y cepa
- Se puede secuenciar o mirar la huella
- En algunos casos no requiere cultivo

Son bastante caras y su uso se restringe a situaciones urgentes marcadas por protocolos (e.g. meningitis)



3. Métodos proteómicos



Se basan en el estudio de la abundancia relativa de un conjunto de proteínas expresadas por el genoma microbiano

Proceso:

- Extracción proteica
- Digestión con proteasas
- Generación de espectro
- Alineamiento

Espectrómetro de
masas

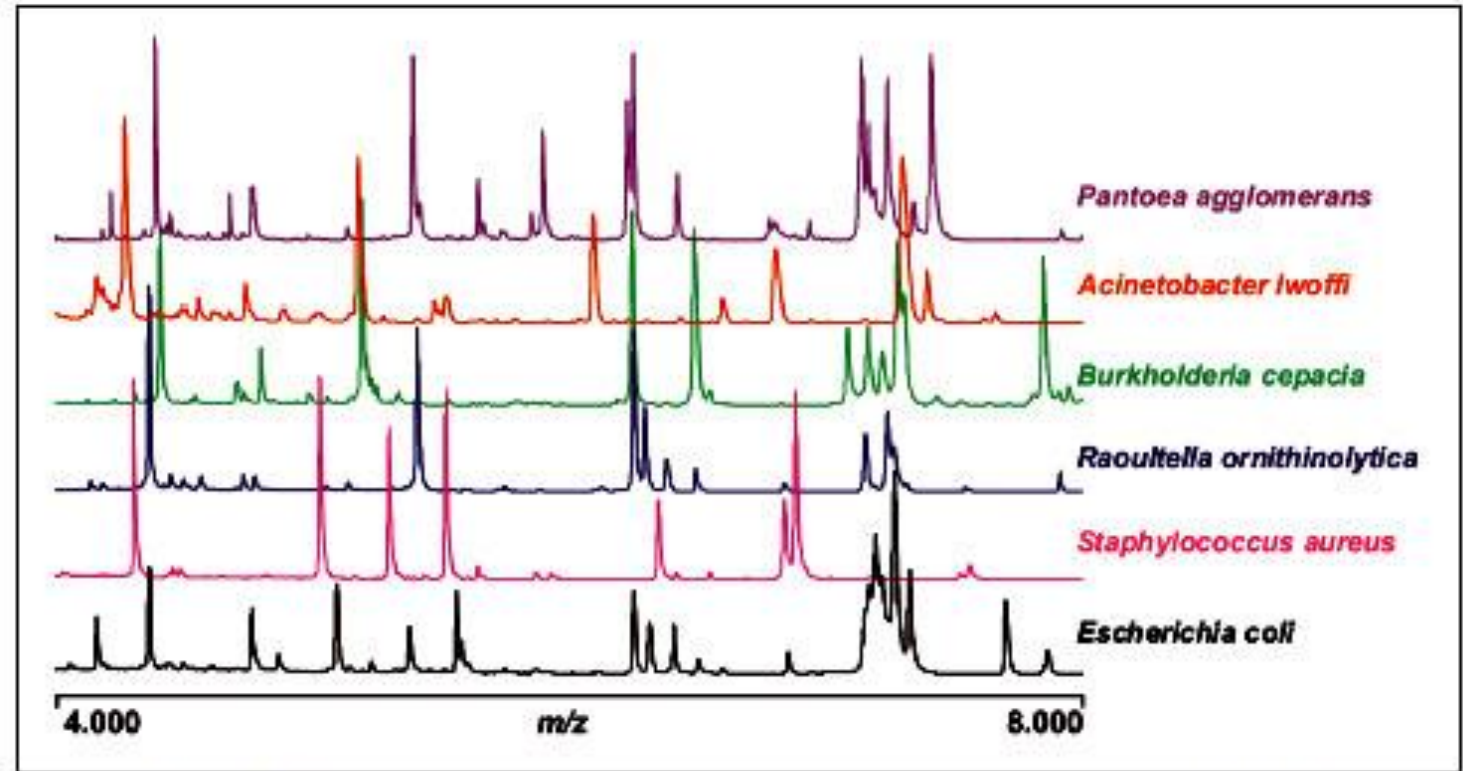


Figura 1. Diferentes perfiles de proteínas obtenidas para diferentes bacterias por MALDI-TOF MS (cortesía bioMérieux).

3. Métodos proteómicos



Espectrómetro de masas

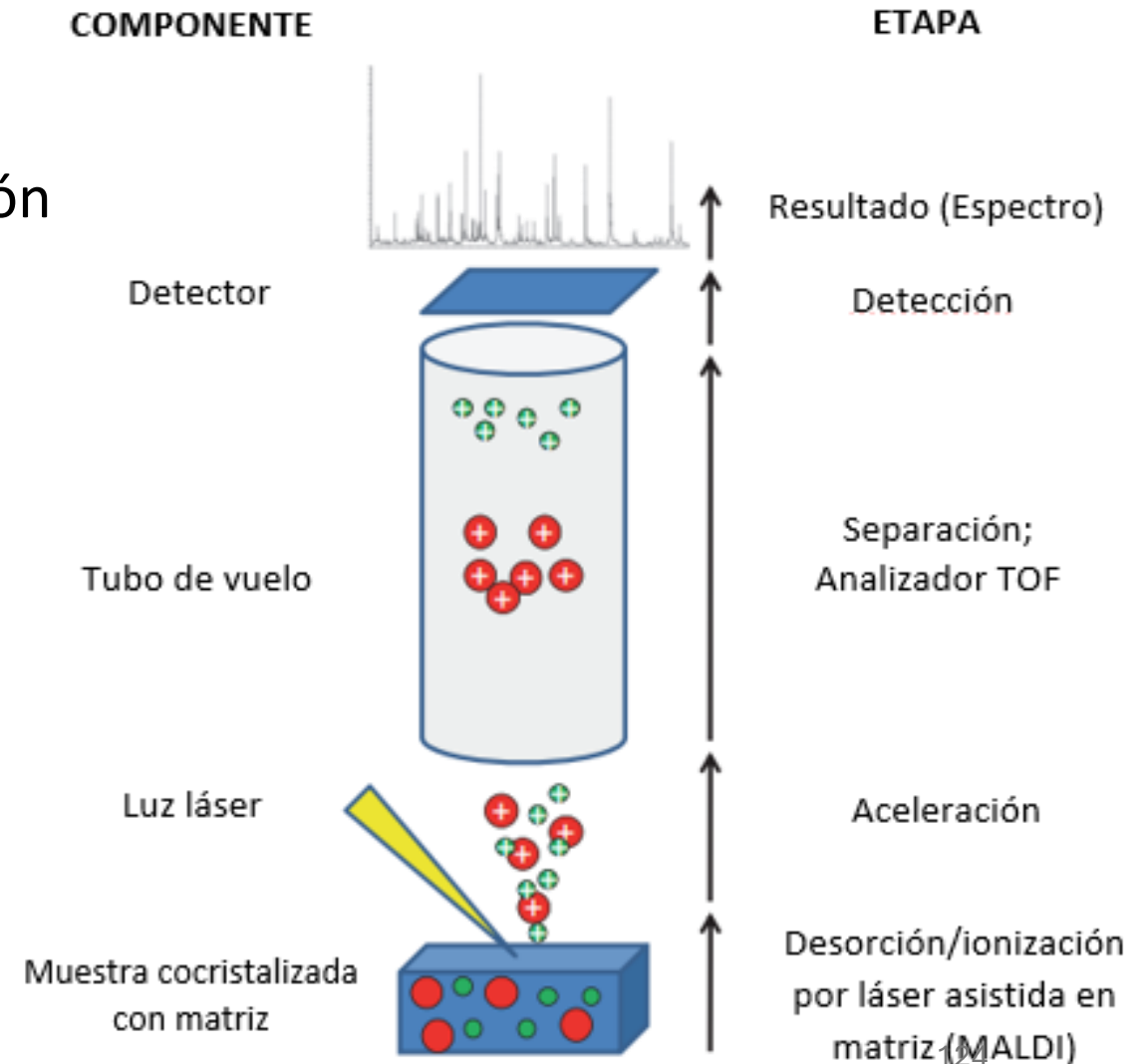
Fuente de ionización: da carga iónica a los fragmentos peptídicos resultantes de la digestión

- Electrospray: líquido
- Desorción por laser (MALDI): sólido

Analizador: separa los iones por masa

- Tiempo de vuelo (TOF)
- Cuadrupolo

Detector: produce la huella peptídica



3. Métodos proteómicos



Ventajas

- Método muy rápido
- Permite identificar muchas especies
- No se altera por medios de cultivo
- Muy reproducible e interpretable

Desventajas

- Requiere bases de datos actualizadas
- Necesita calibración y formación
- Necesita colonias puras → cultivar



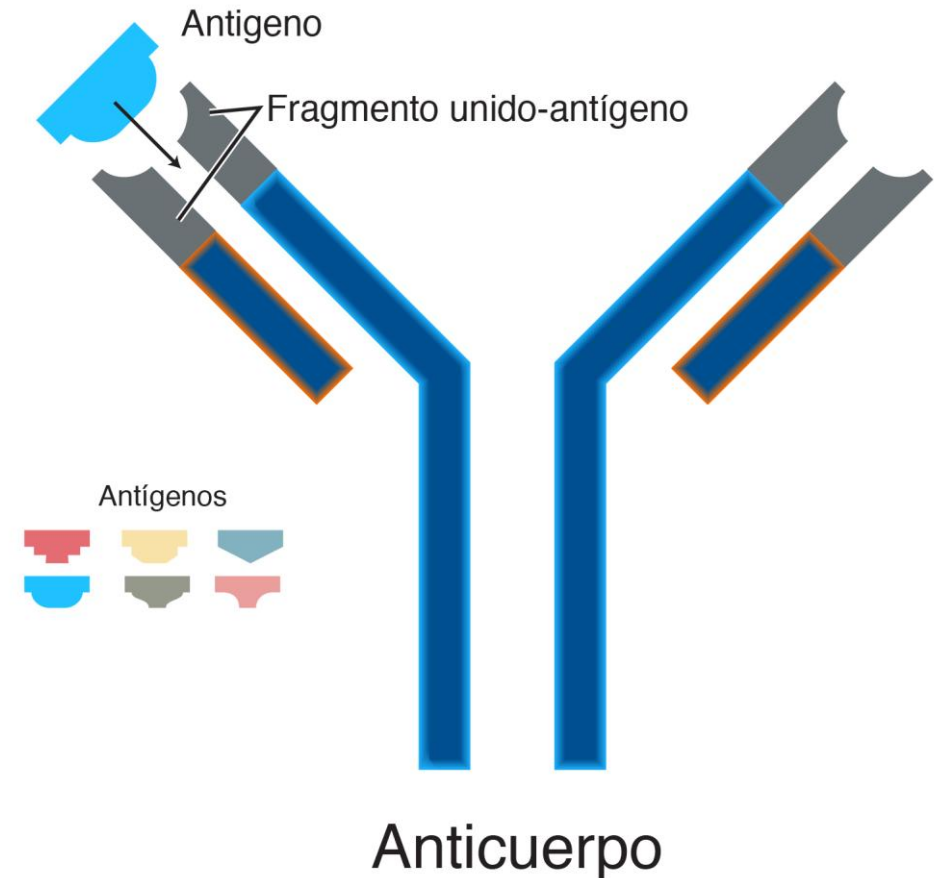
4. Métodos inmunológicos

Detección antigénica

Se basan en la afinidad antígeno-anticuerpo

Antígeno: molécula de origen microbiano reconocida como extraña por el sistema inmune

Anticuerpo: gammaglobulina producida por las células plasmáticas en respuesta a la estimulación por un antígeno. Tiene la capacidad de reconocer específicamente tal antígeno por su correspondencia estructural.



4. Métodos inmunológicos



Detección antigénica

Existen distintas técnicas basadas en este principio:

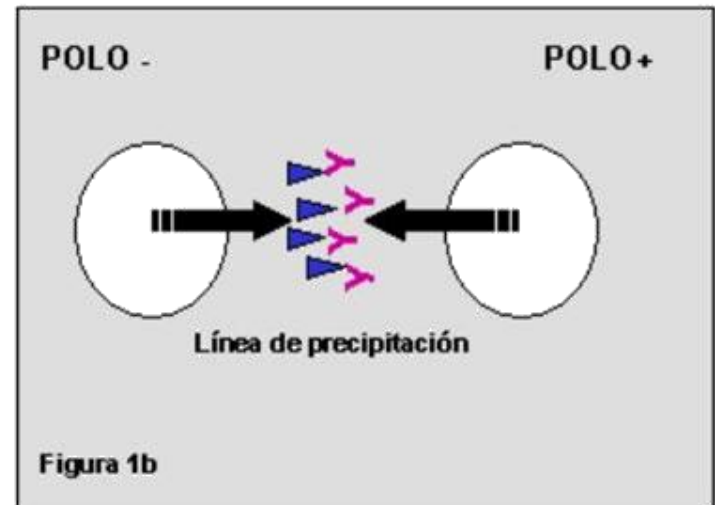
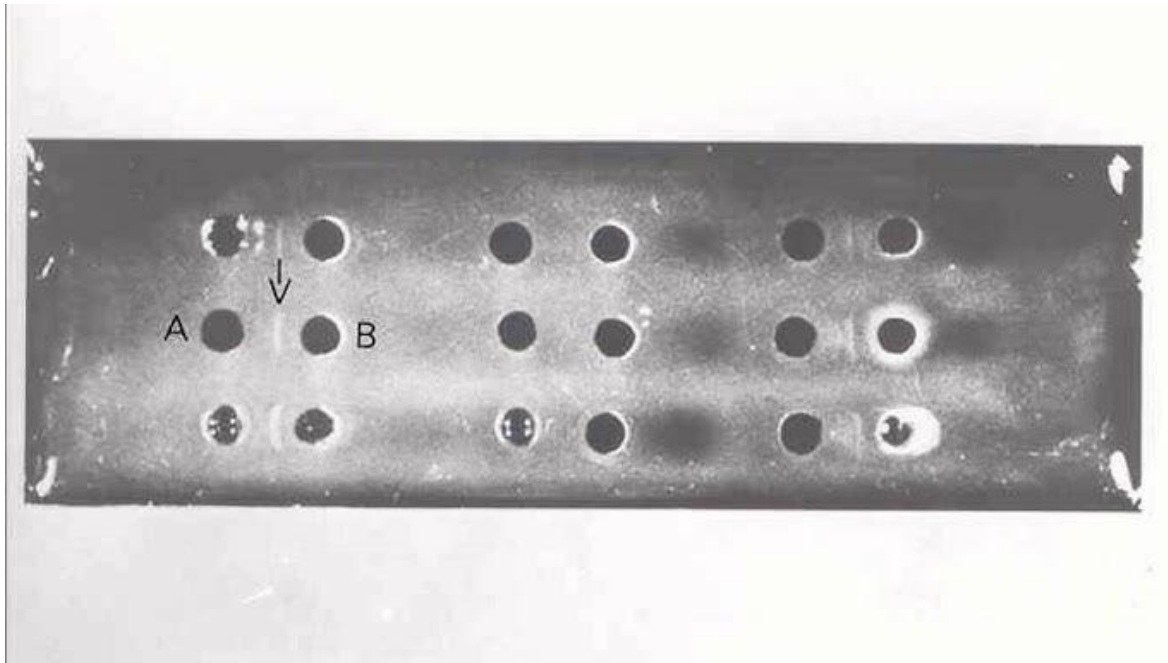
1. **Contrainmunoelectroforesis**
2. **Aglutinación**
3. **Inmunocromatografía**
4. **Ezimoimmunoanálisis (ELISA)**
5. **Immunofluorescencia**

4. Métodos inmunológicos

1. Contrainmunoelectroforesis

Electroforesis + interacción antígeno anticuerpo

Se usa con antígenos solubles

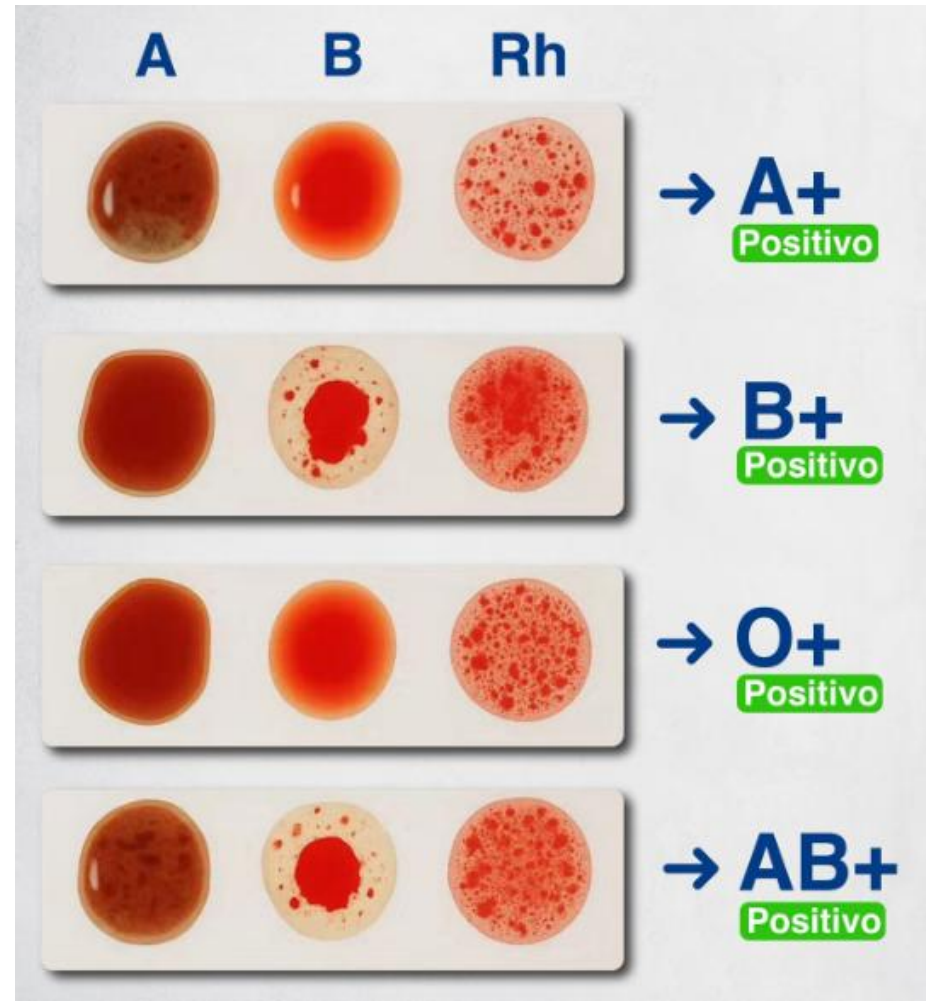


4. Métodos inmunológicos



2. Aglutinación

La interacción antígeno-anticuerpo produce grumos



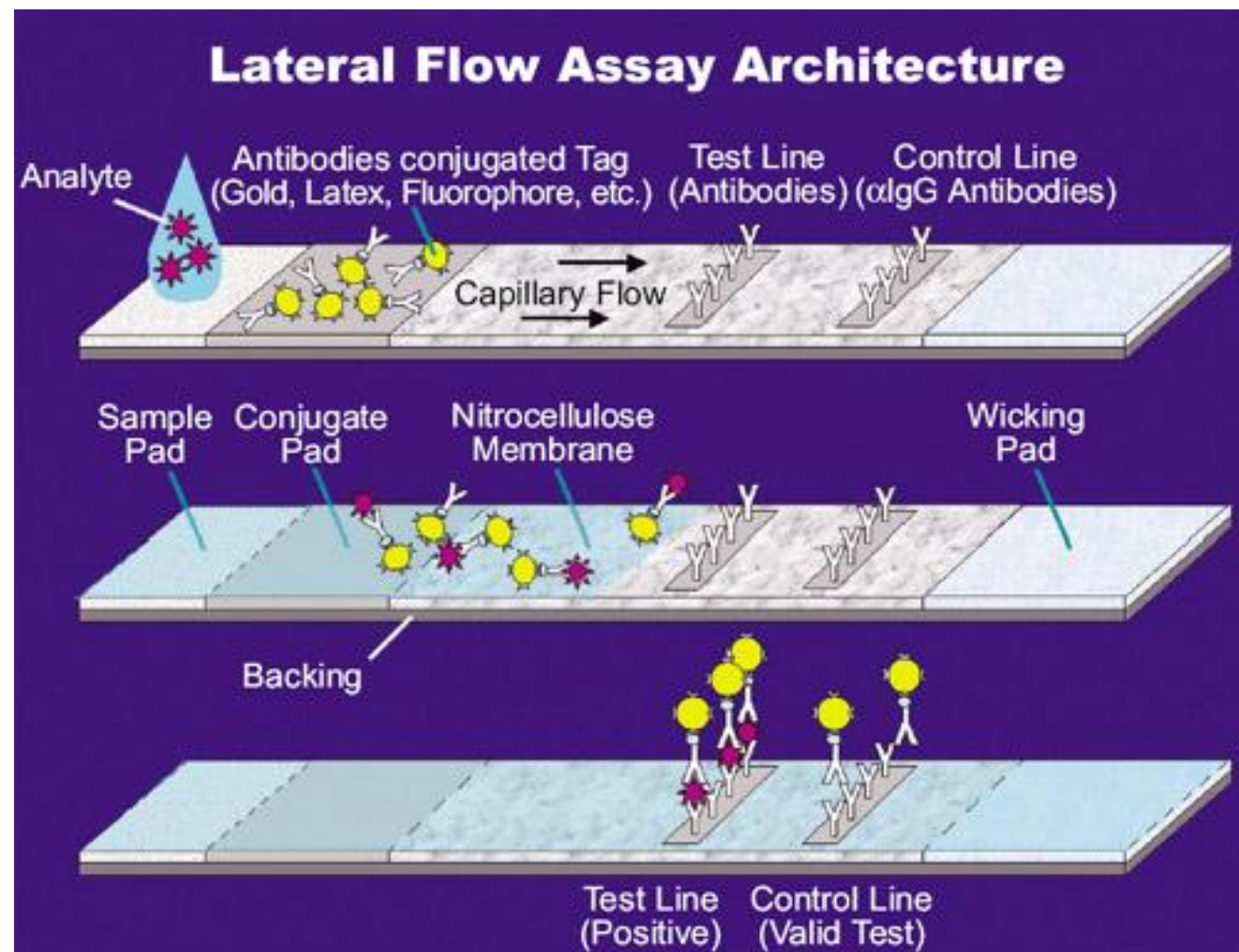
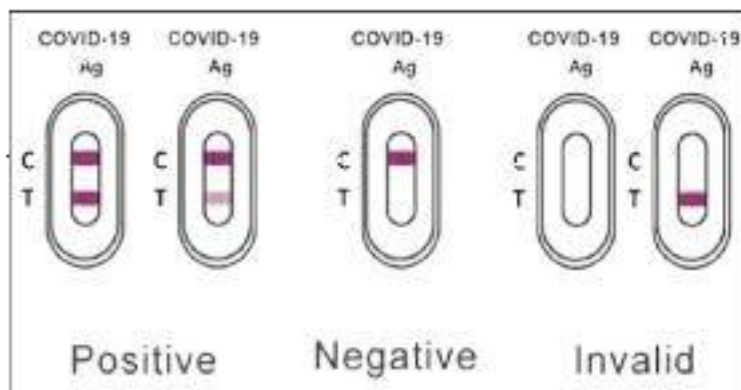
4. Métodos inmunológicos

3. Inmunocromatografía

Los antígenos recorren un papel cromatográfico por capilaridad y se topan con los anticógenos

Se usan como método de **diagnóstico indirecto** de infecciones

- IgG: sube en segundas exposiciones
- IgM: sube en primeras exposiciones



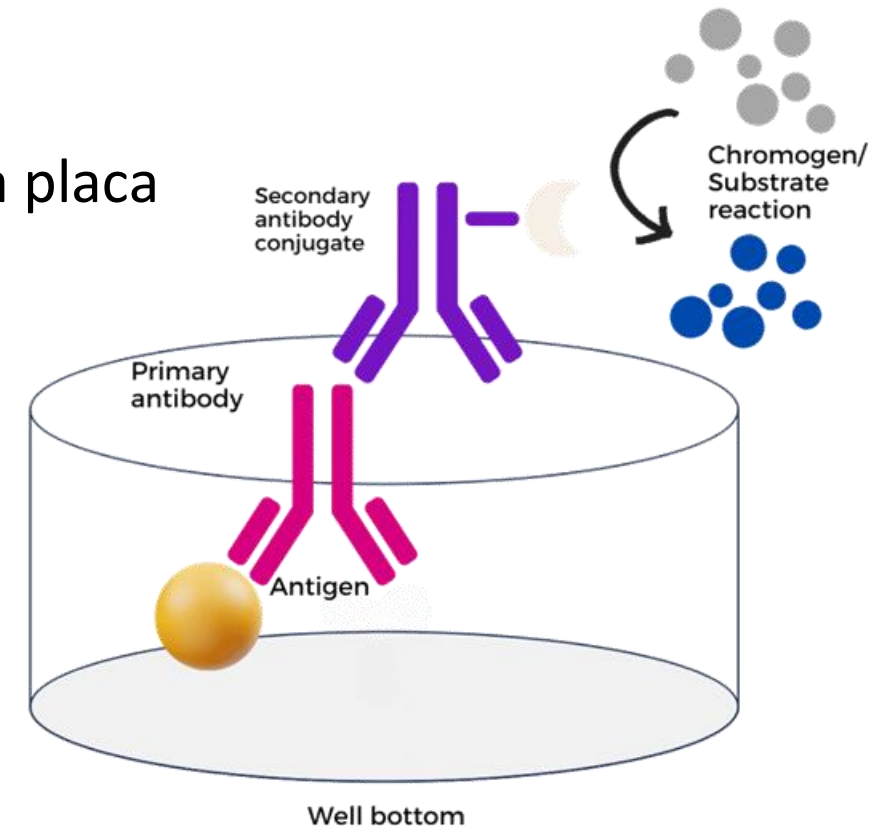
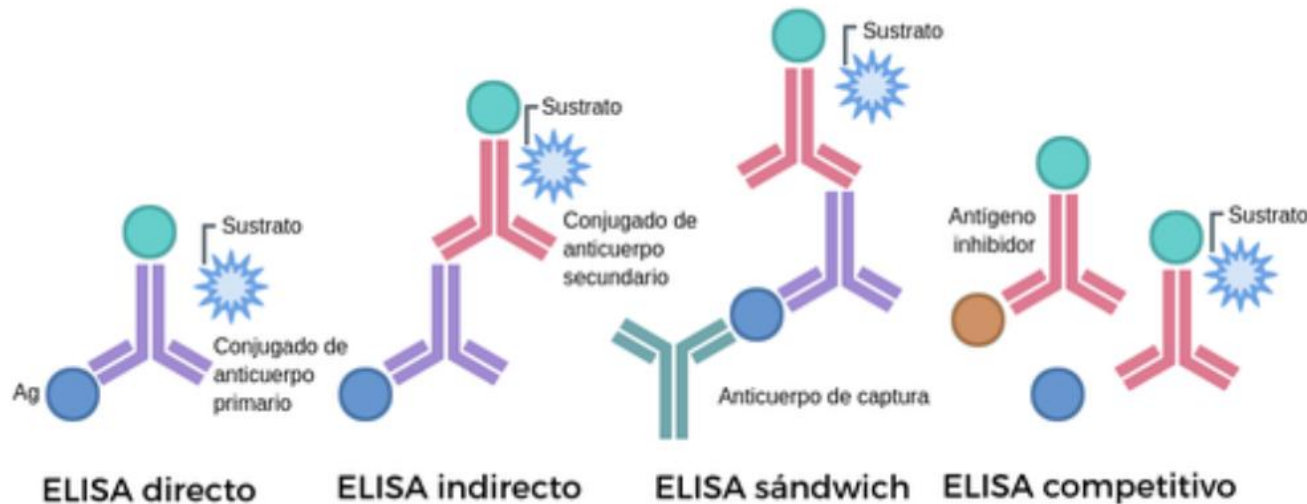
4. Métodos inmunológicos



4. Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

La reacción antígeno-anticuerpo se detecta por una **enzima** que produce un cambio de color

- Directo: solo anticuerpo 1ario
- Indirecto: anticuerpo 1ario y 2ario
- Sandwich: el antígeno se une a un anticuerpo en la placa
- Competitivo: el antígeno compite con el marcado



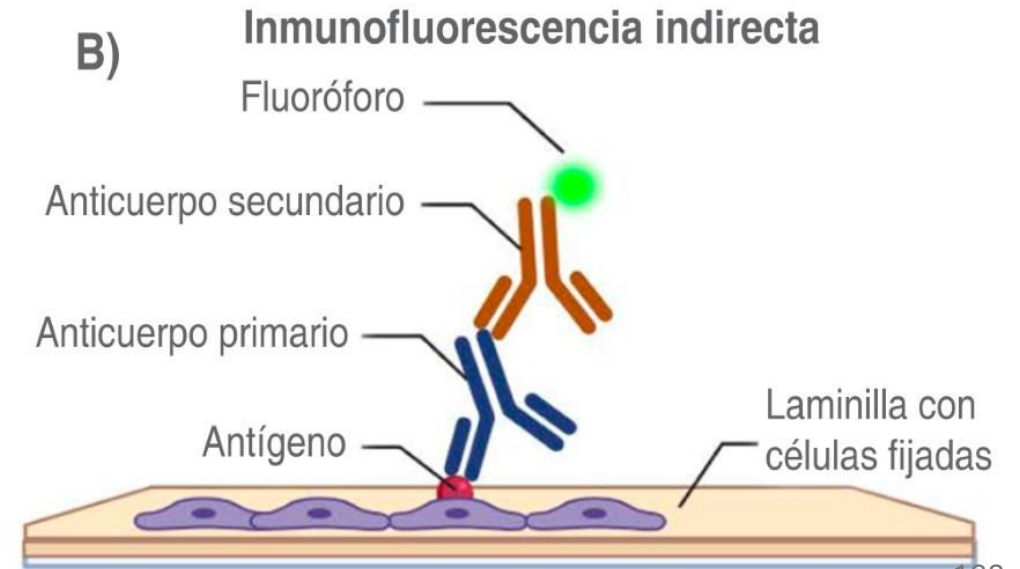
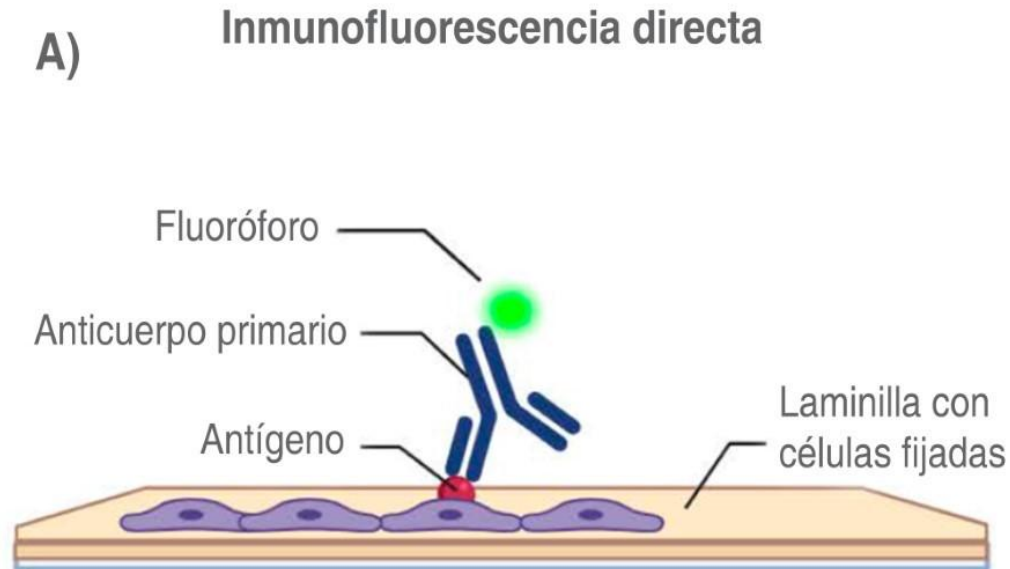
4. Métodos inmunológicos



5. Inmunofluorescencia

La reacción antígeno-anticuerpo se detecta por una **fluorocromo** acoplado al anticuerpo
Requiere de microscopio de fluorescencia

- Directa: solo anticuerpo 1ario
- Indirecta: anticuerpo 1ario y 2ario



IDENTIFICACIÓN BACTERIANA



CONCLUSIÓN

Existe una gran variedad de técnicas para identificar muestras microbiológicas

Para elegir el procedimiento adecuado hay que usar el sentido común basándose en:

- Eficacia: que sea útil para el diagnóstico
- Eficiencia: que siendo útil requiera los mínimos recursos

Sección II: Laboratorio de microbiología

TEMA 6

Antibiograma

Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio

Nacho Escrig, PhD

Resistencia a los antibióticos



Es una de las mayores amenazas para la salud mundial (OMS)

Causan la muerte de **1.27 M** personas por año

33.000 de estas muertes en Europa

4.000 de estas muertes en España

Es un fenómeno natural acelerado por:

- Uso innecesario de antibióticos
- Pautas inadecuadas de antibióticos
- Uso incorrecto de antibióticos
- Uso de antibióticos en alimentos



Antibiograma



Métodos estandarizados para orientar la selección del antibiótico a utilizar en un paciente con una infección bacteriana

Aportan información:

Cualitativa: indica si el agente etiológico es sensible al antibiótico o no

Cuantitativa: indica la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Esta información es específica de cada par microorganismo-antibiótico

Clasificación de las bacterias en:

Sensible: indica alta probabilidad de éxito terapéutico

Intermedia: indica un efecto terapéutico incierto

Resistente: indica una alta probabilidad de fracaso terapéutico



Métodos de realización de antibiograma



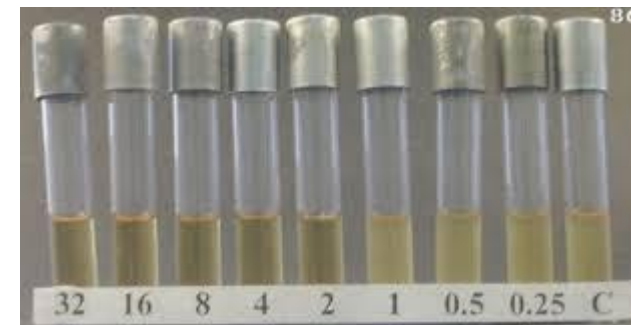
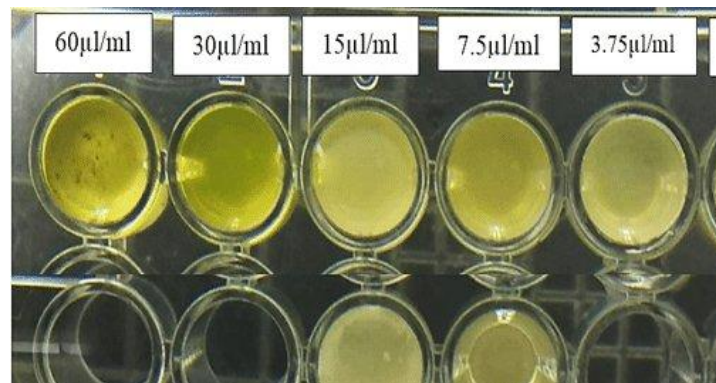
Existen dos métodos

1. Método de dilución:

A. En agar

B. En caldo

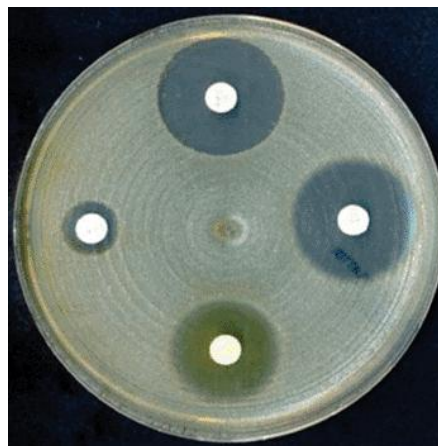
C. Microdilución (GOLD standard*)



2. Método de difusión:

A. Discos

B. E-test



Se suelen usar dos métodos que se complementan en información

*El GOLD standard es el método de referencia, con el cual se evalúan los demás

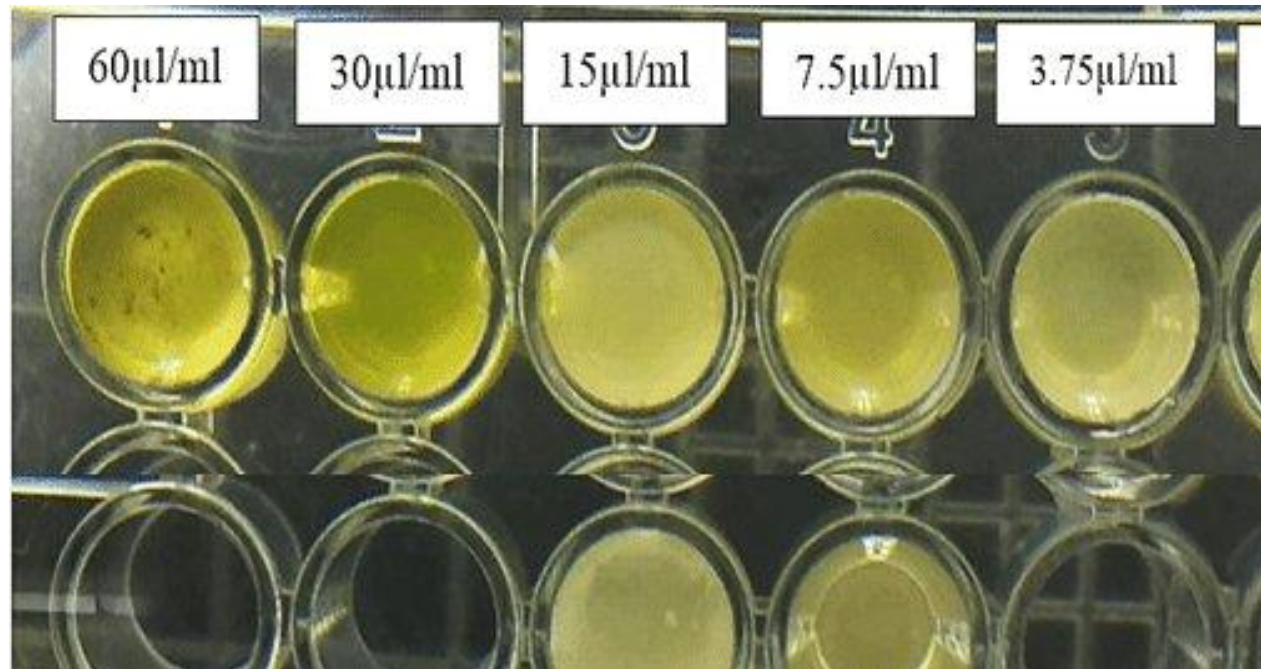


1.A. Método de dilución en agar

Permite la determinación de la CMI en un medio sólido (cuantitativo)

1. Preparación de placas de agar con distintas concentraciones de antibiótico
2. Inoculación del microorganismo a una concentración determinada
3. Incubación
4. Lectura

La CMI será indicada por la placa con menor concentración que impida el crecimiento de colonias





1.B. Método de dilución en caldo

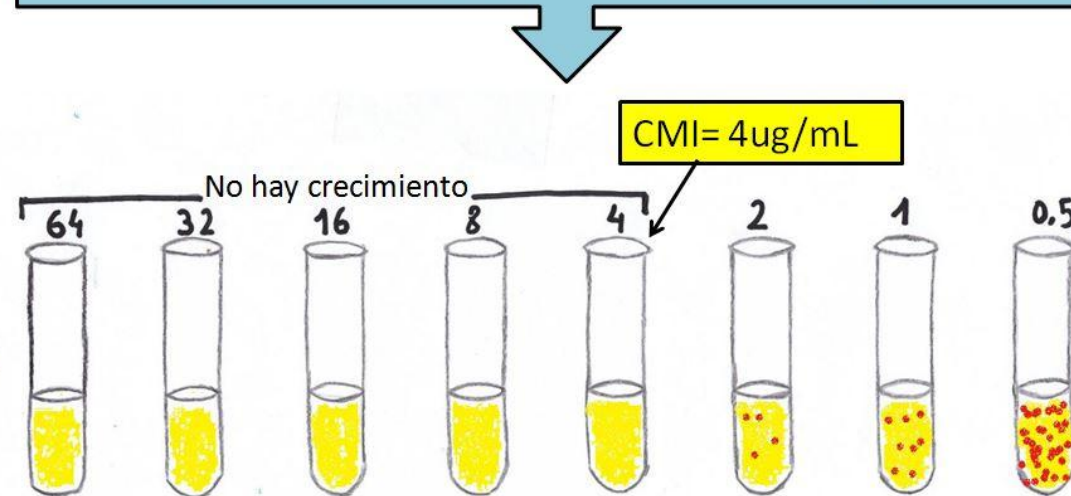
Permite la determinación de la CMI en un medio líquido (cuantitativo)

1. Preparación de distintas diluciones de antibiótico
2. Inoculación del microorganismo a una concentración determinada
3. Incubación
4. Lectura

CMI

(concentración mínima inhibitoria)

Es la mínima cantidad de un antibiótico que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo.



1.C. Método de dilución - microdilución



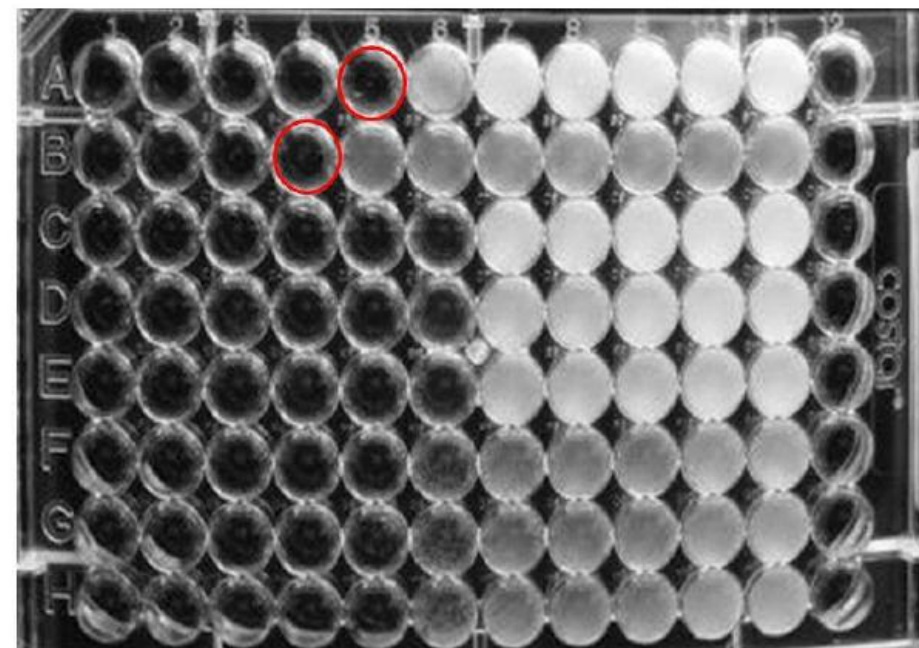
Permite la determinación de la CMI en un medio líquido (cuantitativo)

1. Preparación de distintas diluciones de antibiótico en una p96
2. Inoculación del microorganismo a una concentración determinada
3. Incubación
4. Lectura

Es el método más utilizado por estar comercializadas las placas con las diluciones de los antibióticos ya hechas

La lectura de este método se puede automatizar

- Espectrofotometría
- Turbidimetría



2.A. Método de difusión en agar por discos



Permite la determinación de la sensibilidad a un antibiótico en un medio sólido

1. Cultivo de las bacterias
2. Aplicación de discos con una concentración fija de antibiótico
3. Incubación
4. Medida del halo

La medida del halo se compara con los estándares del CLSI y EUCAST

No permite calcular la CMI

CUALITATIVO



2.A. Método de difusión en agar por E-test

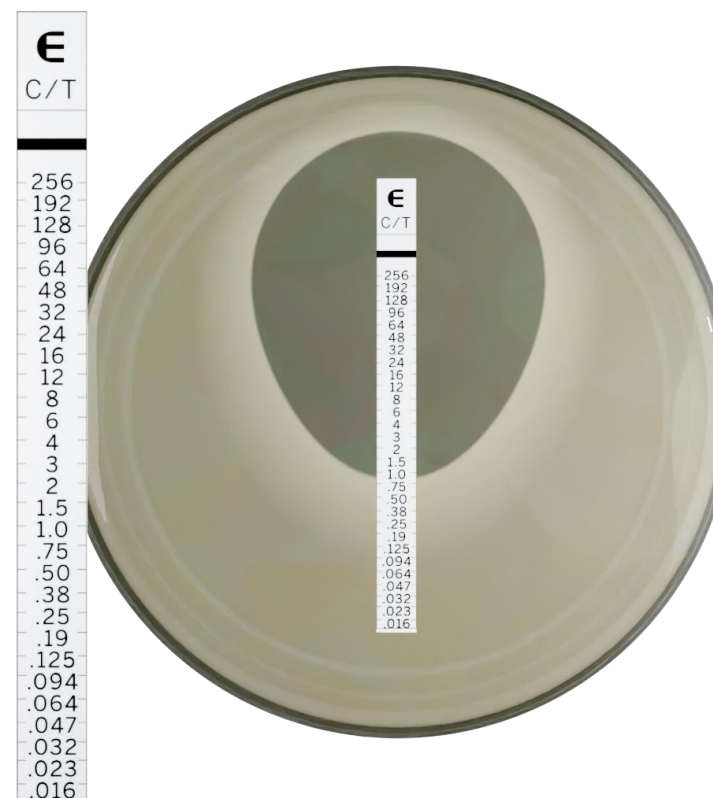


Permite la determinación de la CMI en un medio sólido

1. Cultivo de las bacterias
2. Aplicación de tiras E-test con un gradiente de concentraciones de antibiótico
3. Incubación
4. Medida del punto de intersección

El punto de corte con la banda indica la CMI

CUANTITATIVO



Controles del antibiograma



Se deben llevar a cabo unos controles diarios con cepas estandarizadas establecidas por las sociedades científicas con unos valores de CMI determinados

De esta forma se calibran los sistemas, especialmente los automatizados



Routine internal quality control as recommended by EUCAST
Version 3.1, valid from 2013-01-01

<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619
<i>Haemophilus influenzae</i>	NCTC 8468 ¹
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560

Informe del antibiograma



El informe ha de ser:

- Claro
- Conciso
- Fácil de leer

ÚTIL

En el informe no se incluye información cuantitativa, únicamente si la bacteria es:

Sensible: indica alta probabilidad de éxito terapéutico

Intermedia: indica un efecto terapéutico incierto

Resistente: indica una alta probabilidad de fracaso terapéutico

Informe del antibiograma



Resistencias intrínsecas: propias de una especie determinada

Citrobacter freundii
Enterobacter aerogenes
Enterobacter cloacae

Ampicilina
Amoxicilina clavulánico
Cefazolina
Cefoxitina

Proteus mirabilis

Nitrofurantoína

En caso de resistencia intrínseca no se probarán estos antibióticos en el antibiograma

Se incluirá en el informe la resistencia intrínseca

Informe del antibiograma



Fenotipos excepcionales de resistencia

Resistencias poco comunes a día de hoy (podrían ser más comunes en el futuro)

Enterobacterias

Carbapenemas

Gonococos

Ceftriaxona

Neumococos

Vancomicina

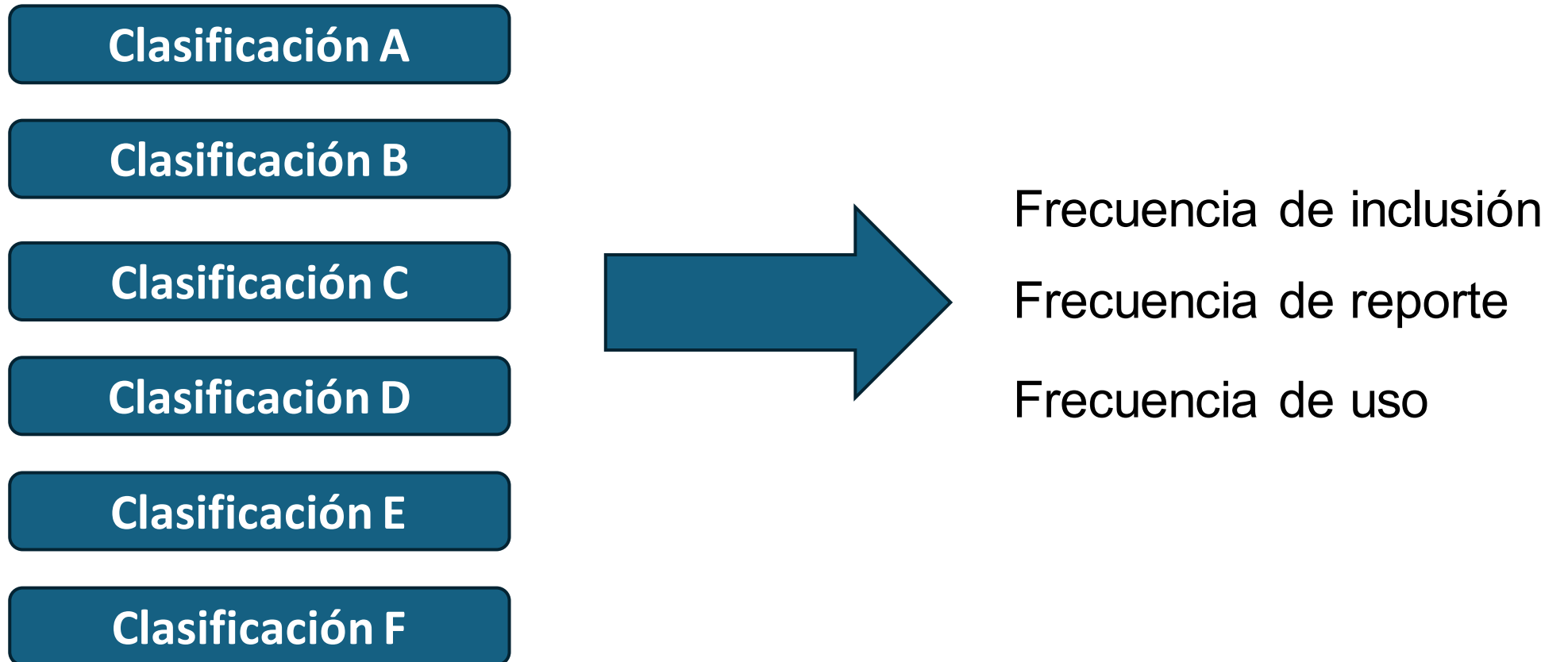
Es importantísimo confirmar estas resistencias antes de incluirlas en el informe

Selección de antibióticos a testar



No se prueban todos los antibióticos existentes

El CLSI los clasifican en 6 grupos a incluir en el antibiograma



Selección de antibióticos a testar



Clasificación A

Antibióticos de primera línea

Alta relevancia clínica
Buena eficacia
Disponibles para su uso

Siempre se incluyen

Siempre se reportan

Clasificación B

Antibióticos secundarios

Siempre se incluyen

Se reportan si:

Hay resistencia a grupo A
Pacientes con alergias a grupo A
Infección grave
Localización especial

Selección de antibióticos a testar



Clasificación C

Antibióticos complementarios

Uso limitado

Alternativa de **rescate**

Pueden tener mayor toxicidad

Se prueban en casos especiales

Se reportan en casos especiales

Clasificación D

Antibióticos suplementarios

Se prueban en contextos específicos

Se reportan en contextos específicos

D1: sitios específicos de infección

D2: microorganismos multirresistentes

Selección de antibióticos a testar



Clasificación E

Antibióticos para detectar resistencia

Se prueban para detectar
mecanismos específicos de
resistencia

No se reportan clínicamente

Clasificación F

Antibióticos no recomendados

No hay suficiente evidencia clínica
Uso experimental o no aprobado

No se prueban

No se reportan

Selección de antibióticos a testar



Grupo	¿Se prueban?	¿Se reportan?	Uso
A	Sí	Siempre	Primera línea
B	Sí	Selectivo	Alternativa
C	A veces	Casos especiales	Rescate
D	A veces	Contexto específico	Infecciones o resistencias particulares
E	Sí	No	Detección de resistencia
F	No	No	No recomendado

Sección II: Laboratorio de microbiología

TEMA 7

Hemocultivos

Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio

Nacho Escrig, PhD

Bacteremia y fungemia



Es una de las prioridades del servicio de microbiología clínica

Tienen una mortalidad de entre el 10 y el 30%

Bacteremia: presencia de bacterias en sangre

Fungemia: presencia de hongos en sangre, normalmente *Candida spp.*



Causas de la bacteremia y fungemia



El foco de infección puede ser:

Extravascular:

a través de los capilares o vasos linfáticos

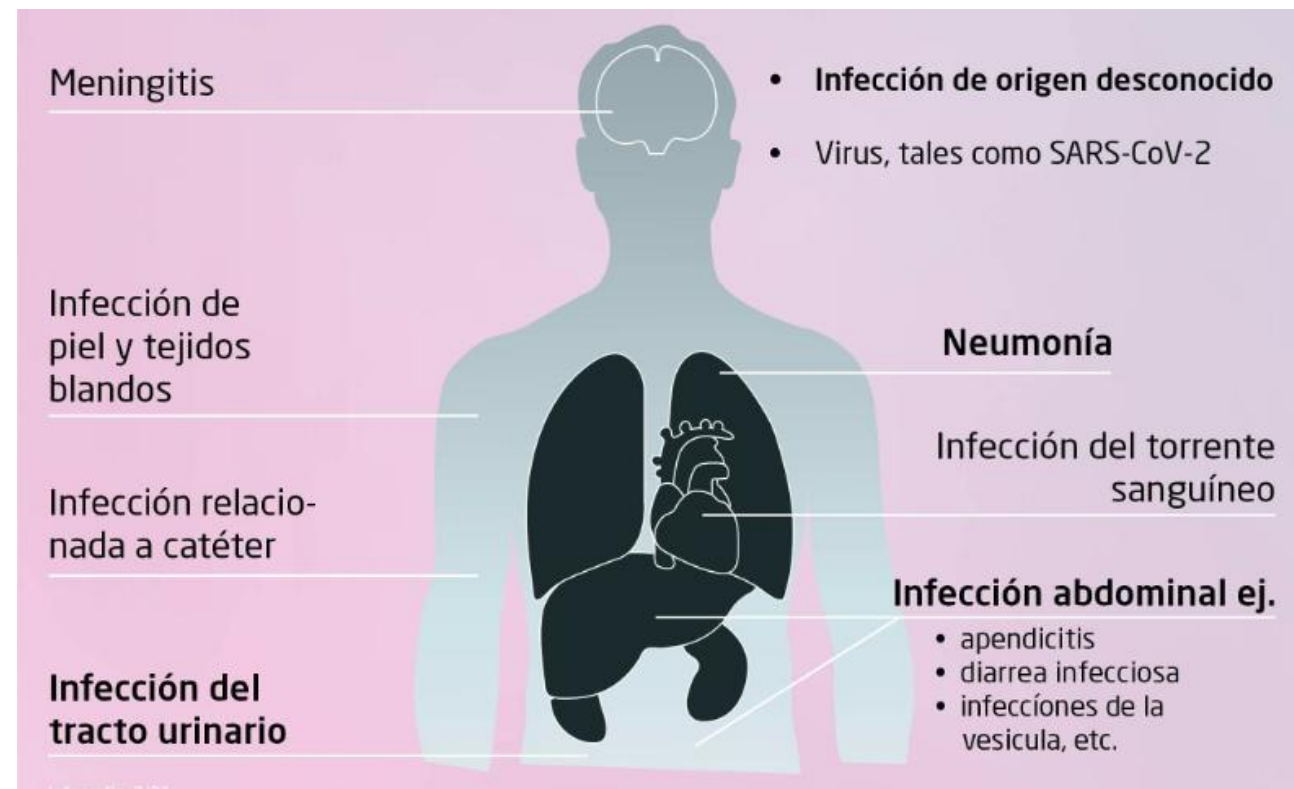
- Heridas quirúrgicas
- Infecciones gastrointestinales
- Infecciones genitourinarias

Intravascular:

a través de los propios vasos sanguíneos

- Endocarditis (infección en el corazón)
- Catéteres contaminados (fungemia)

El 25% de los casos tienen un origen desconocido



Grampositivas

Enterococcus
Staphylococcus
Streptococcus

Gramnegativas

Enterobacterias
(e.g. *escheriquia*
***o salmonella*)**

Sintomatología de la bacteremia y fungemia



Tras la infección y si el microorganismo llega a sangre se produce:

Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS)

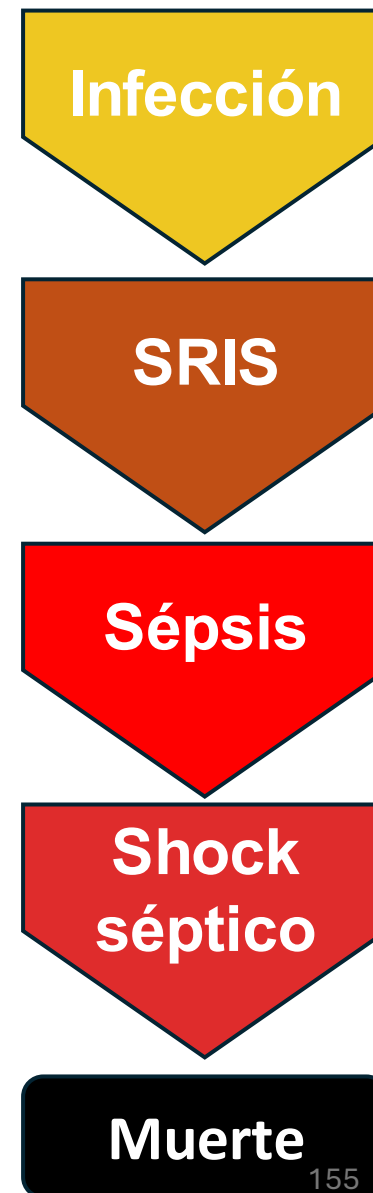
- Resulta de la activación general del sistema inmune
- Subida de temperatura, frecuencia cardíaca y respiratoria
- Aumento de recuento leucocitario (células inmunes en sangre)

Sepsis

- Disfunción orgánica que amenaza la vida del paciente
- Se monitoriza por una escala de sepsis

Shock séptico

- Alteraciones metabólicas, circulatorias y celulares
- Altas probabilidades de muerte



Sintomatología de la bacteremia y fungemia



Escala de SOFA: Sequential (Sepsis-Related) Organ Failure Assessment (Adaptada de Singer et al.)					
Abreviaturas: PaO ₂ (presión arterial de oxígeno), FiO ₂ (Fracción Inspirada de Oxígeno), Bb (Bilirrubina), SNC (Sistema Nervioso Central), GCS (Glasgow Coma Scale), PAM (presión arterial media), dosis de catecolaminas en µg/kg/min.					
SISTEMA	Puntuación 0	1	2	3	4
Respiratorio (PaO ₂ /FiO ₂) mmHg	≥400	≤ 400	≤ 300	≤ 200 Con soporte respiratorio	≤ 100 Con soporte respiratorio
Coagulación (Plaquetas x 10 ³ µL)	≥150	≤ 150	≤ 100	≤ 50	≤ 25
Hepático (Bb, mg/dL)	≤ 1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6-11,9	>12
SNC (GCS)	15	13-14	10-12	6-9	<9
Cardiovascular	PAM > 70 mmHg	PAM > 70 mmHg	Dopamina < 5 o dobutamina a cualquier dosis	Dopamina 5,1-15 o adrenalina < 0,1 o noradrenalina < 0,1	Dopamina > 15 o adrenalina > 0,1 o noradrenalina > 0,1
Renal Creatinina Diuresis	< 0,1	1,2-1,9	2,0 – 3,4	3,5 – 4,9 <500 mL/24h	>5 <200 mL/24h

Diagnóstico



El principal método de diagnóstico es el **HEMOCULTIVO**

Permite:

- Determinación de bacteremia/fungemia
- Aislamiento del microorganismo
- Aplicación de antibiograma



La concentración microbiana es extremadamente baja (0.1 UFC/ml), por lo que se debe usar un medio de cultivo altamente enriquecido

La sensibilidad depende de:

- Volumen de muestra
- Momento de extracción (SRIS, sepsis, shock)
- Ausencia de tratamientos antibióticos previos

La principal desventaja es que es un **método lento** en comparación con el rápido desarrollo de la patología

Flujo de trabajo



1. Toma de muestra
2. Transporte y conservación
3. Análisis de la muestra
4. Procesamiento de positivos

1. Toma de muestras

¿Cuándo?

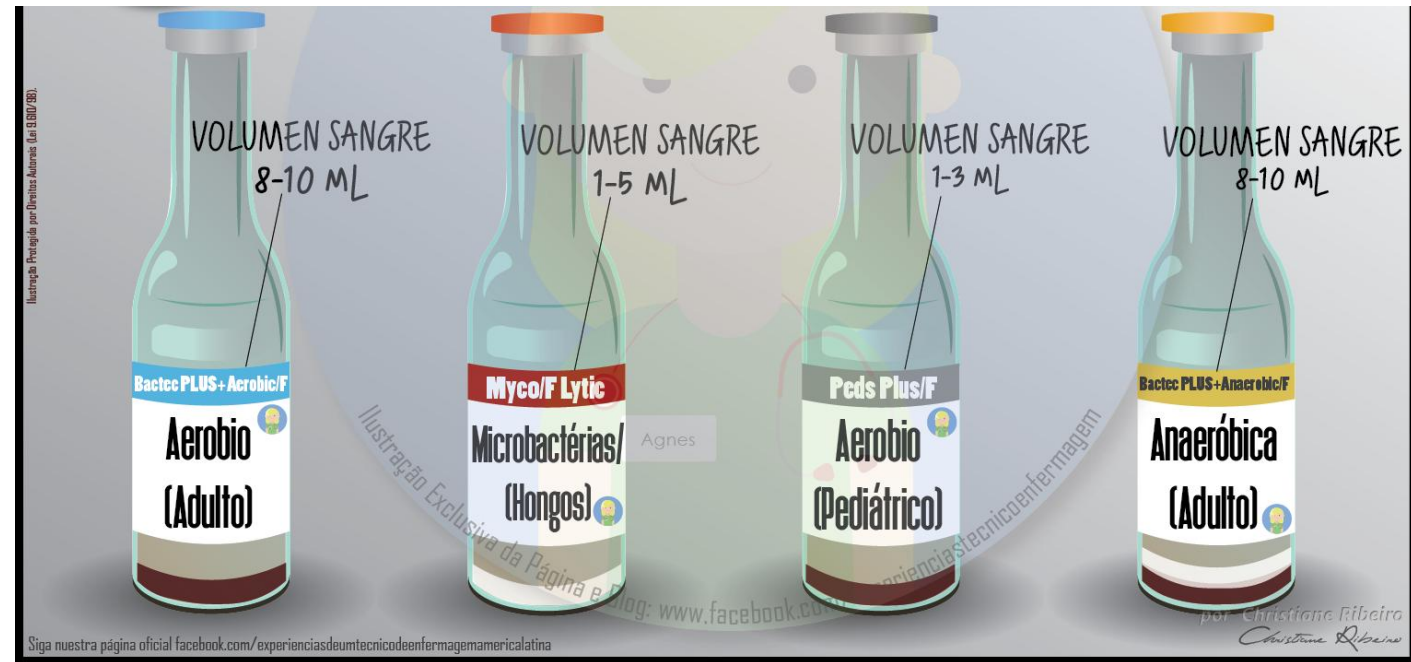
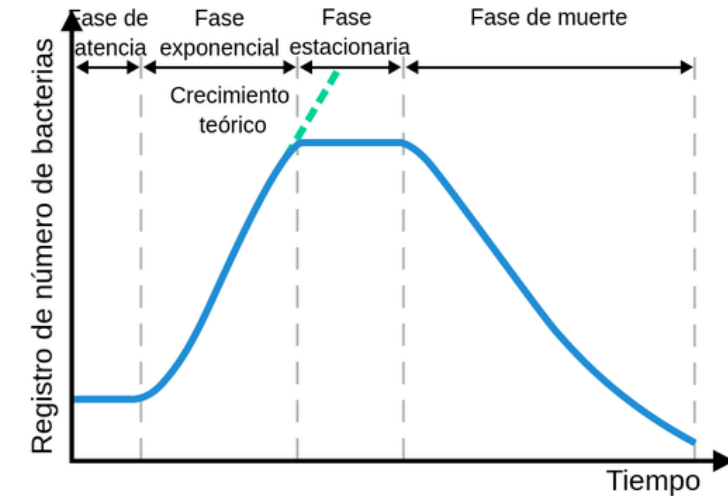
- Justo antes de que aparezca la fiebre
- 1h después de la entrada de microorganismos en sangre
- Punto marcado por comienzo de escalofríos
- Antes de administrar antibiótico

¿Cuánto?

- 10-20 ml en adultos
 - frasco aerobio y anaerobio
- 1-5 ml en niños
 - frasco aerobio

¿Cómo?

- Desinfectar la zona
- Toma rápida sin cambiar de aguja



1. Toma de muestras



Cuando haya un pico febril, o si se indica antes



Realizar antes de comenzar con el tratamiento antibiótico



Si existe bacteriemia, no importa cuando se haga la extracción

¿Qué necesito?



Frascos de hemocultivos



Jeringa de 20cc con aguja intravenosa y/o palomilla



Clorhexidina al 2%
Alcohol 70°



Gasas, guantes y paño
(TODO ESTÉRIL!)



Compresor, guantes no estériles
y esparadrapo

1. Toma de muestras



Tabla 1. Metodología a seguir para la extracción de un hemocultivo

- 1.- Utilización de guantes y mascarilla
- 2.- Limpieza con clorhexidina de los tapones de los viales
- 3.- Selección del lugar de la extracción (no obtener la sangre a través de catéter)
- 4.- Desinfectar la piel con clorhexidina y dejar actuar
- 5.- Realizar la punción sin tocar la piel del paciente con la mano
- 6.- No poner en contacto la aguja con el algodón
- 7.- Extraer la sangre necesaria para que se puedan añadir 10 ml de sangre en cada frasco en el caso de los adultos y entre 1 y 5 ml en el frasco pediátrico

- 8.- Inocular primero el frasco anaerobio evitando la entrada de aire
- 9.- Inocular después del frasco aerobio; no es necesario añadir aire
- 10.- Inocular el resto de los tubos si los hubiere (bioquímica, etc.)
- 11.- Agitar suavemente los dos frascos
- 12.- Llevar de forma urgente al Servicio de Microbiología
- 13.- Si no fuera posible, mantener a temperatura ambiente

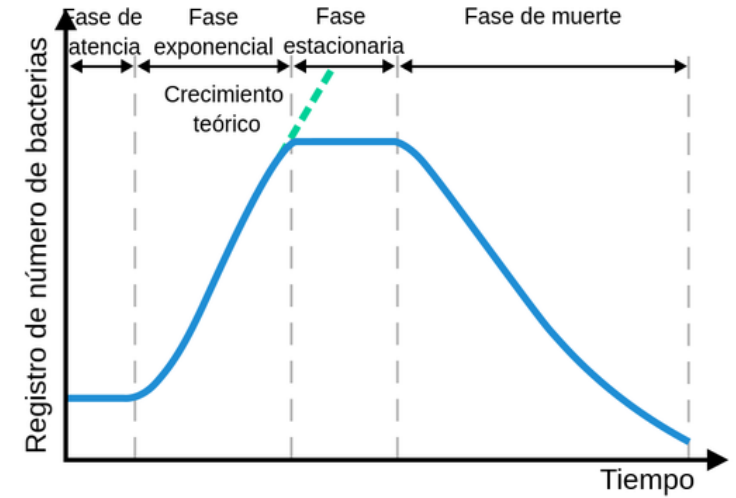
2. Transporte y conservación

Mantener a temperatura ambiente hasta llegar al laboratorio

NO guardar en nevera → muerte de los microorganismos

NO meter en incubador → podrían llegar a fase estacionaria impidiendo su posterior detección

Analizar antes de 2h desde su extracción

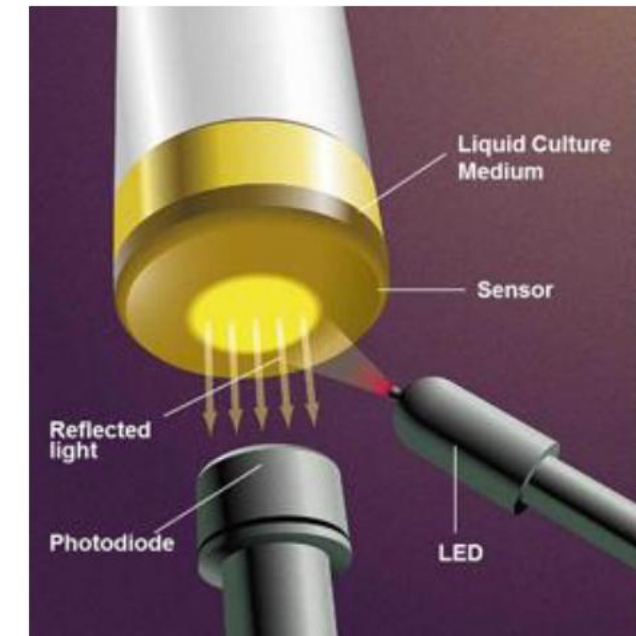


3. Análisis de la muestra

Los tubos contienen unas resinas que cambian de color por el crecimiento bacteriano

Esto se detecta automáticamente en un equipo que mantiene los frascos a 37°C y registra:

- Momento de entrada del frasco
- Curva de crecimiento del microorganismo
- Tiempo de positividad
- Cantidad de sangre que contienen



3. Análisis de la muestra



Precauciones:

- Muy importante verificar el estado de los frascos al entrar al laboratorio
- Un frasco en mal estado puede comprometer la detección dando falsos negativos
- El retraso de incubación puede comprometer la detección dando falsos negativos
- Los frascos se incuban 5 días antes de informarse como negativos
- Los positivos se procesan en cuanto el sistema comunique su positividad

3. Procesamiento de positivos

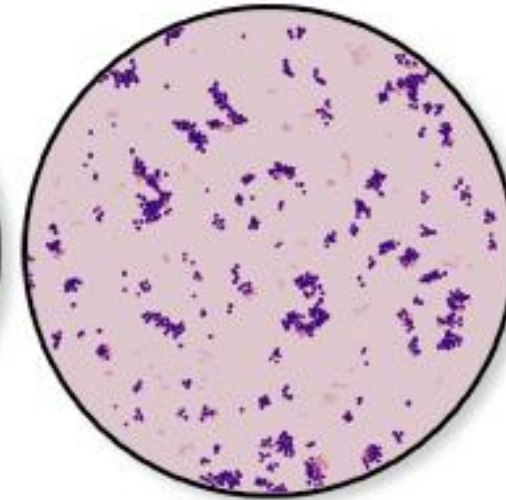


A. Tinciones:

Se lleva a cabo una **tinción de gram**

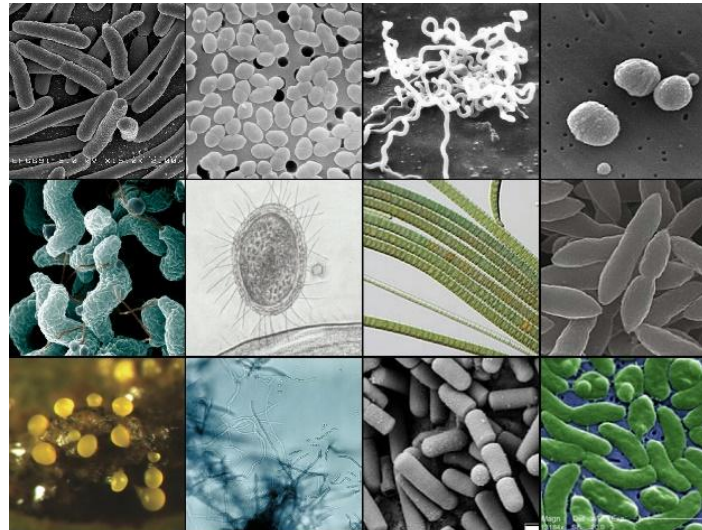


Gramnegativas



Grampositivas

Se observa al microscopio para extraer todas las **características morfológicas** que puedan contribuir al diagnóstico



3. Procesamiento de positivos



B. Subcultivos:

Se usan unas gotas del frasco para cultivarlas en distintos medios de cultivo

Siempre se incluye agar sangre y/o agar chocolate

Se mantienen a 37°C y se comprueban diariamente



Agar sangre

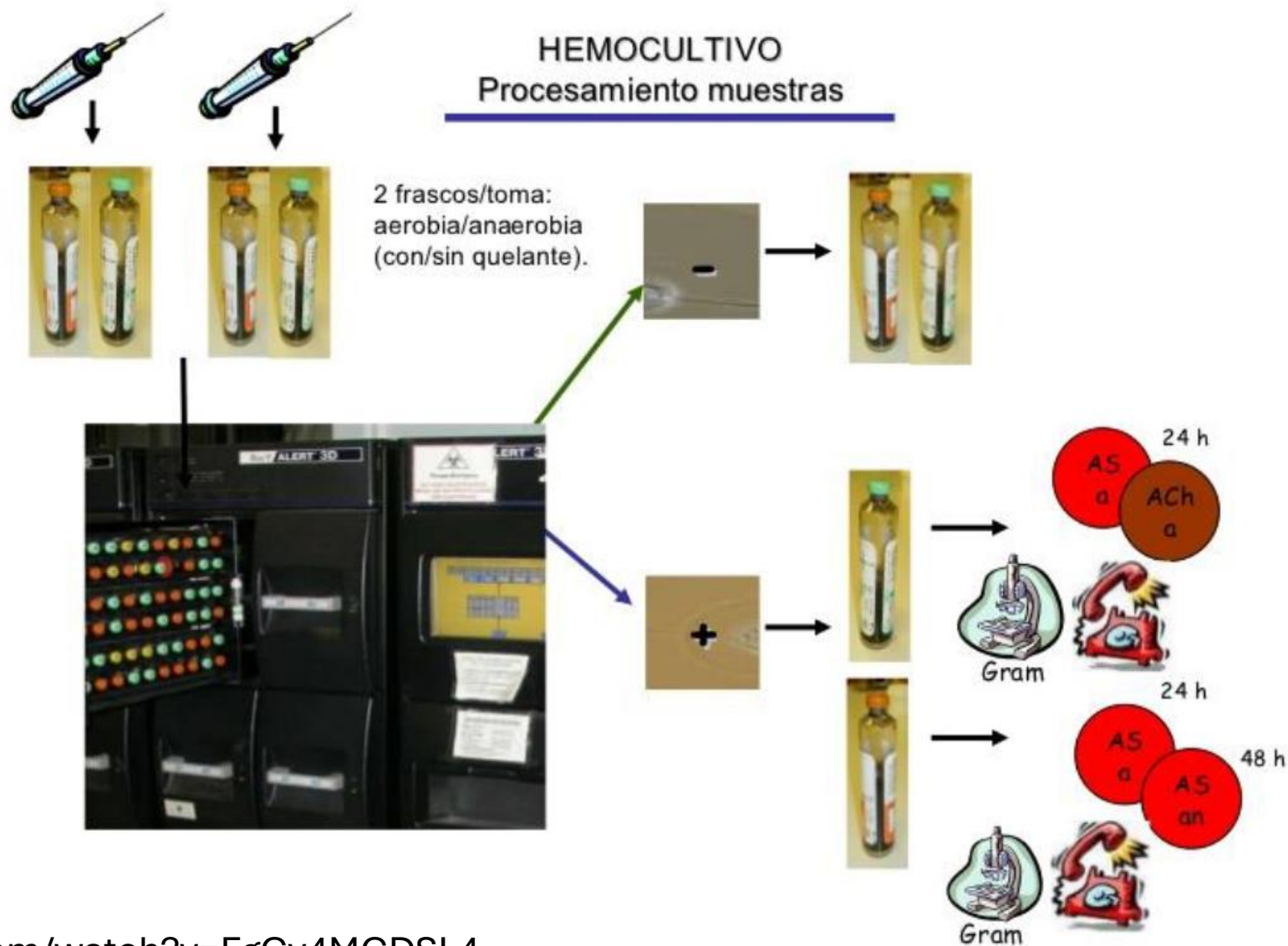


Agar chocolate

La sangre del frasco anaerobio se emplea para cultivos en atmósfera

- Anaerobia
- Microaerófila
- Capnófila

Flujo de trabajo (resumen)



Interpretación de los resultados



El informe de los resultados debe ser **CLARO, CONCISO y FACIL DE INTERPRETAR**

Falsos positivos:

- Normalmente por contaminación con flora de la piel
- Informar de la contaminación
- Volver a tomar muestra mejorando la asepsia

Resultados clínicamente relevantes

- Informar de forma inmediata (aún sin antibiograma)
- Incluir comentario que pueda ser importante en el resultado



Bioseguridad



La sangre de los frascos de hemocultivo puede contener otros agentes infecciosos

VIH

VH

Bacterias de categoría III (e.g. *Brucella spp*)

**SIEMPRE MANIPULACIÓN DE SANGRE
HUMANA EN CABINA DE FLUJO**

RESPETAR LAS NORMAS DE SEGURIDAD



Control de calidad



Se ha de mantener el **manual de procedimientos** actualizado y con la descripción exhaustiva de la metodología para llevar a cabo el hemocultivo

El laboratorio ha de trabajar para mejorar:

- Eficacia: aumentar el número de hemocultivos que puede hacer
- Efectividad: reducir contaminaciones
- Eficiencia: para mejorar la administración del tratamiento de forma precoz.



Objetivo: diagnóstico en menos de 6h tras la positividad del hemocultivo

**Documentar lo
que se hace**

**Hacer lo que
se documenta**

**Cumplir la Calidad
del producto
prometido**

Métodos de diagnóstico no basados en cultivo

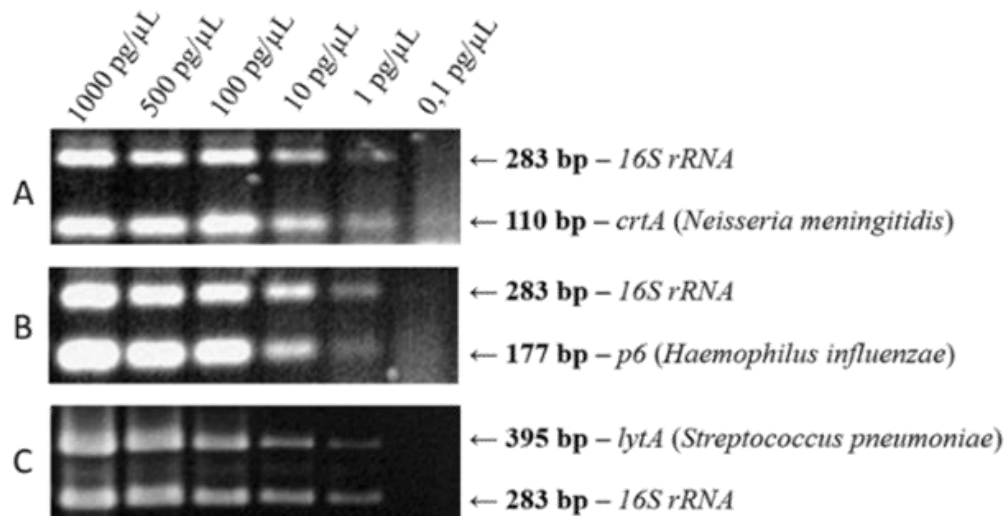


El diagnóstico rápido de sepsis condicionan la evolución del paciente

La gravedad de la sepsis ha hecho que se implementen nuevos métodos para la detección de bacterias y hongos directamente en:

- Muestras de sangre periférica
- Hemocultivos positivos

Métodos de amplificación de ADN



Espectrometría de masas

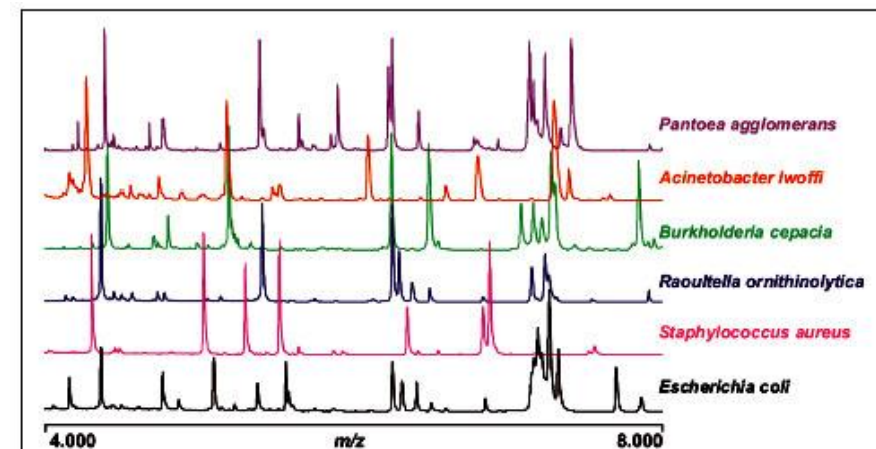


Figura 1. Diferentes perfiles de proteínas obtenidas para diferentes bacterias por MALDI-TOF MS (cortesía bioMérieux).

Métodos de estudio de sensibilidad a antimicrobianos



La instauración del tratamiento rápidamente condiciona la evolución del paciente

Normalmente el antibiograma se haría sobre los subcultivos tras el positivo del hemocultivo

Para reducir tiempos se emplean:

- | |
|--------------------------------------|
| 1. Métodos fenotípicos |
| 2. Métodos de amplificación genómica |
| 3. Métodos de imagen |
| 4. Citometría de flujo |
| 5. Análisis de bioluminiscencia |



Presente



Futuro

Métodos de estudio de sensibilidad a antimicrobianos

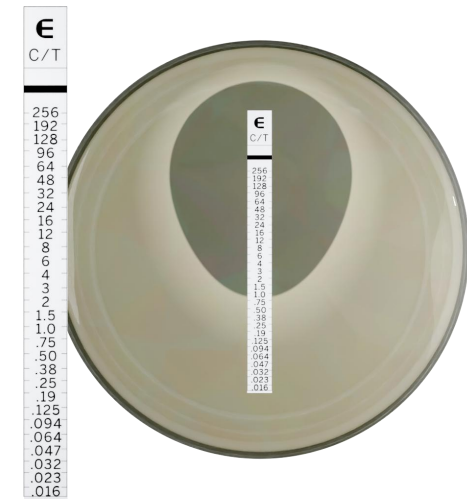


1. Métodos fenotípicos

Se aplican directamente desde el frasco de hemocultivo positivo

Se usan principalmente:

- Antibiograma de difusión en discos
- Antibiograman de diffusion E-Test



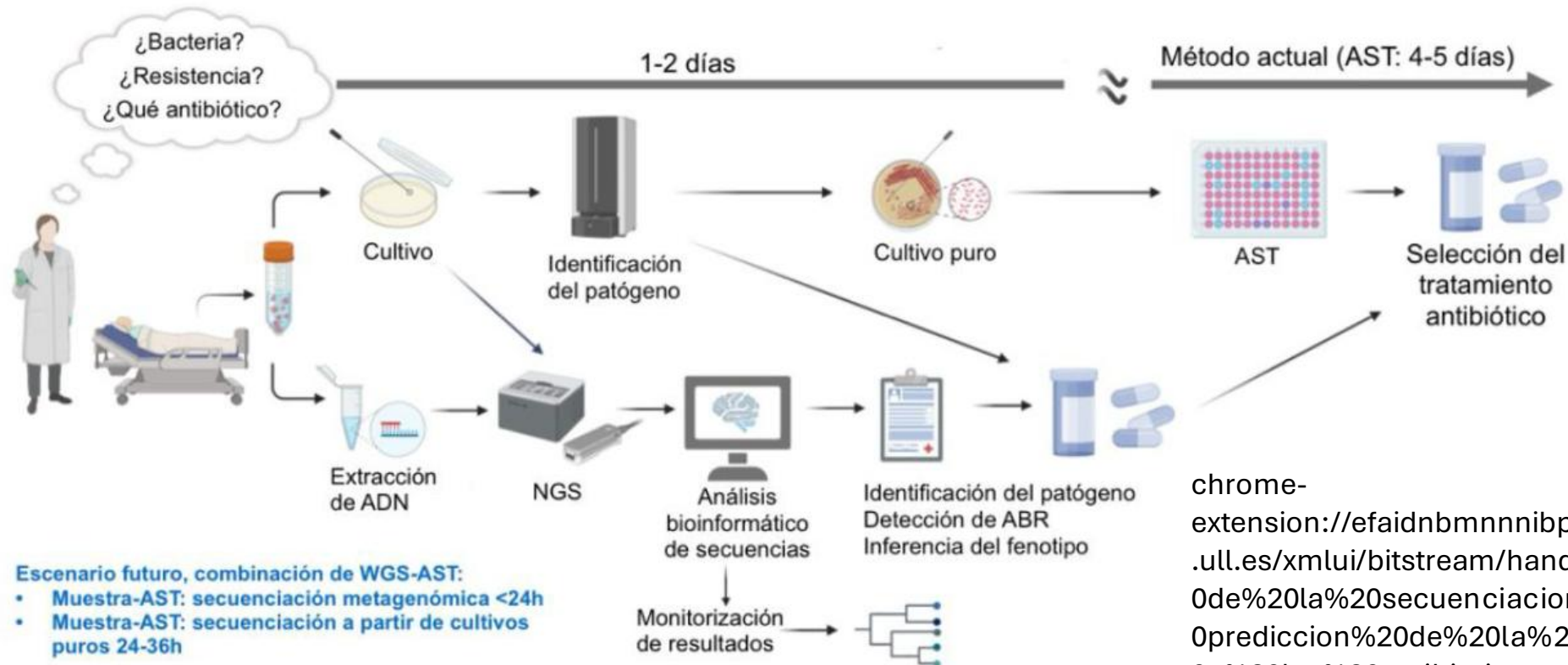
Estos métodos no están avalados por las sociedades científicas pero muchos estudios han demostrado excelentes resultados

Métodos de estudio de sensibilidad a antimicrobianos



2. Métodos de amplificación genómica

- Detectan la presencia de microorganismos patógenos
- Detectan la presencia de genes asociados a resistencias a antibióticos



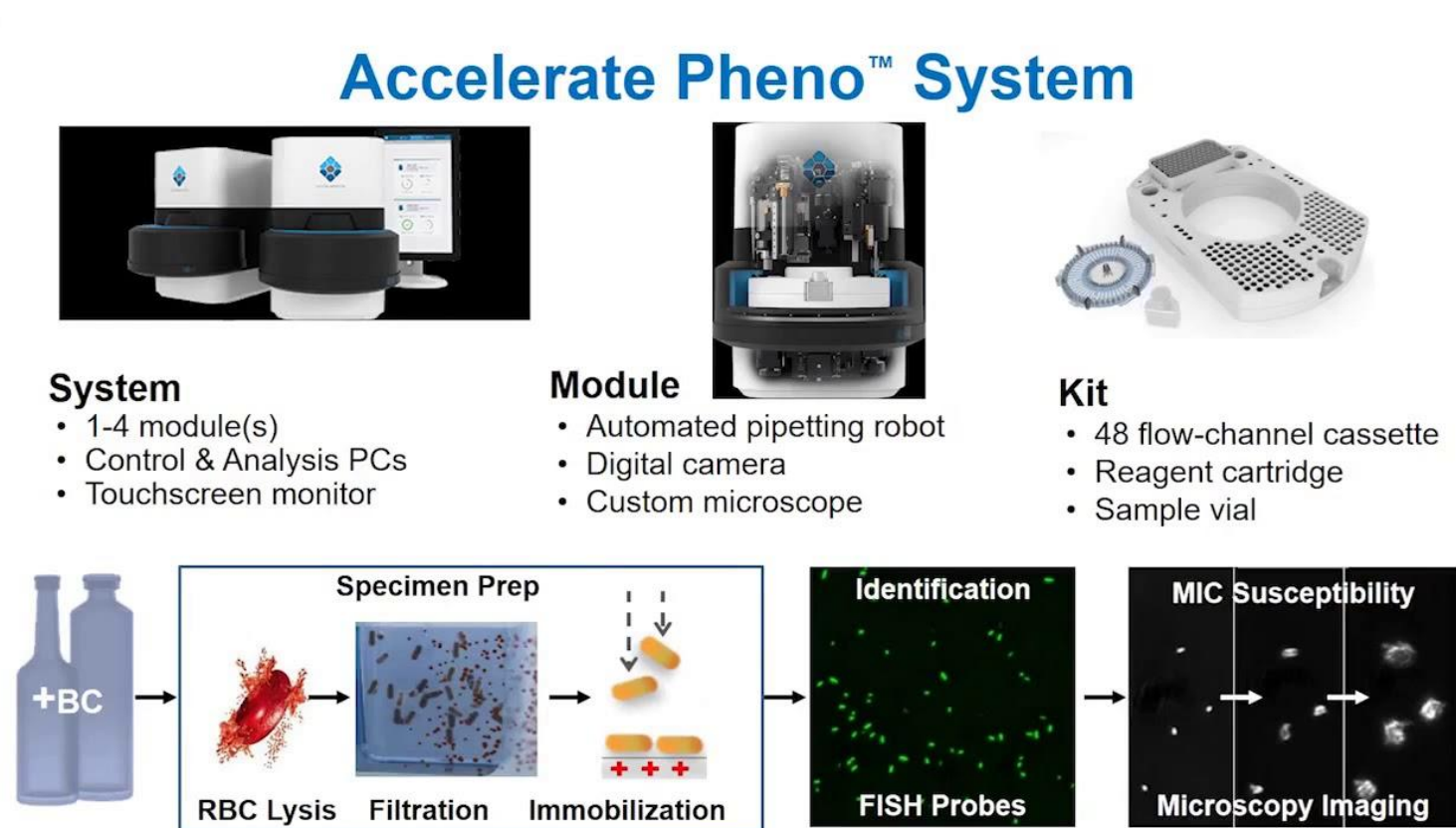
chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/41870/Aplicaciones%20de%20la%20secuenciacion%20masiva%20para%20la%20prediccion%20de%20la%20resistencia%20bacteriana%20a%20los%20antibioticos.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Métodos de estudio de sensibilidad a antimicrobianos



3. Métodos de imagen

- Basado en una combinación de electrofiltración en gel y FISH (hibridación in situ fluorescente)
- Permite identificar 10 especies bacterianas en 90 minutos
- Si se combina con antibióticos se puede determinar la CMI en unas 7 horas

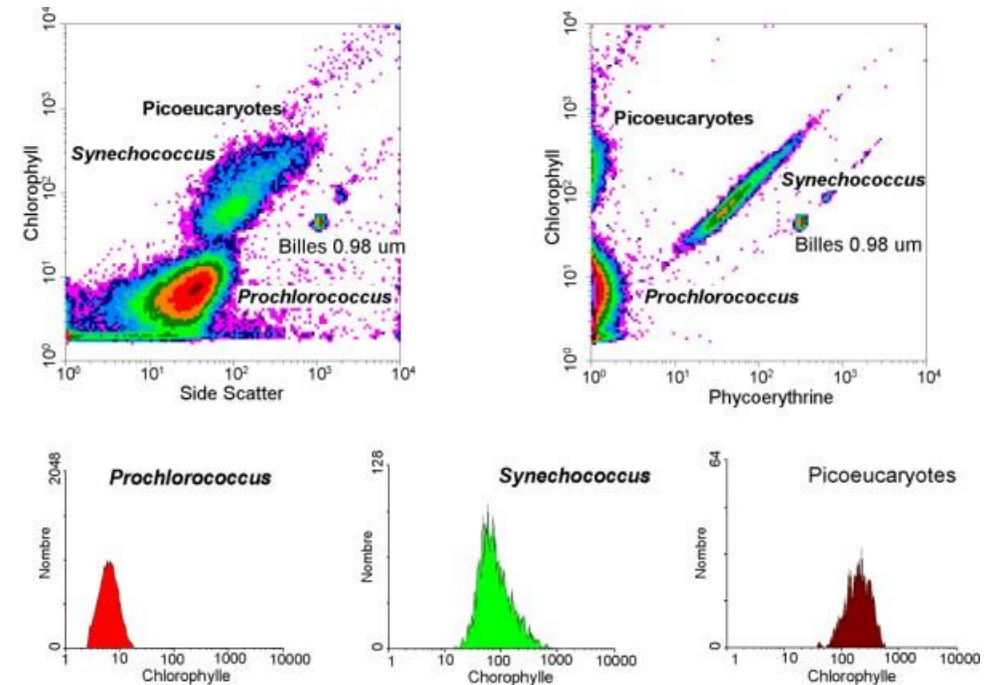
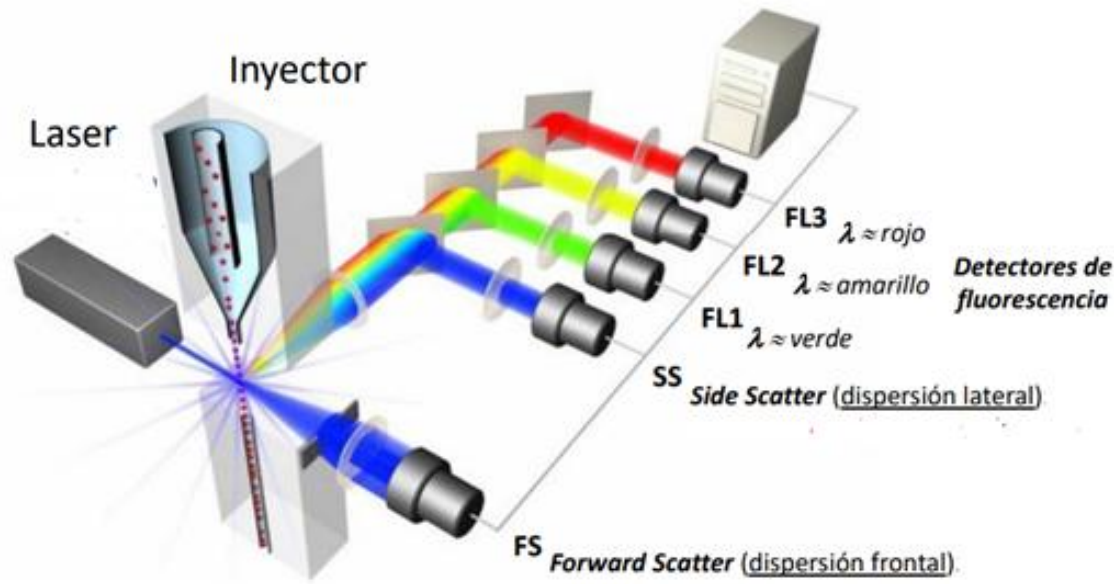


Métodos de estudio de sensibilidad a antimicrobianos



4. Citometría de flujo

- Basado en el uso de distintos fluorocromos para la identificación bacteriana
- Si se combina con antibióticos se podría determinar la sensibilidad
- Es un método costoso y necesita mucha especialización

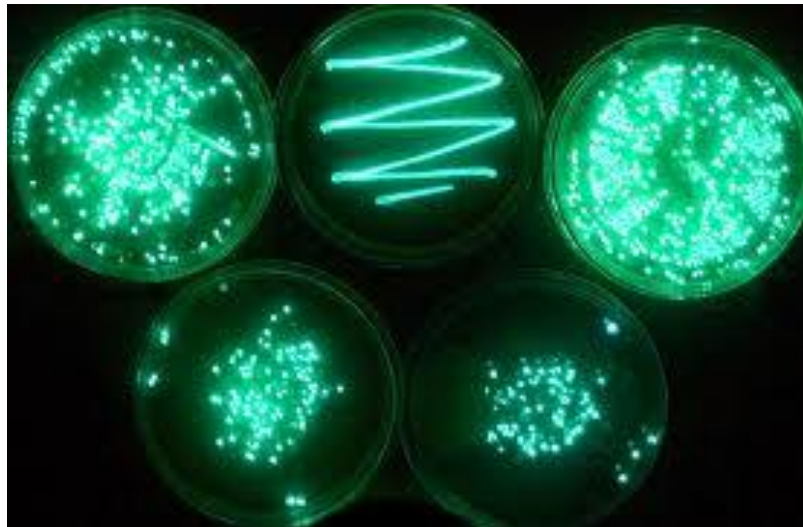


Métodos de estudio de sensibilidad a antimicrobianos

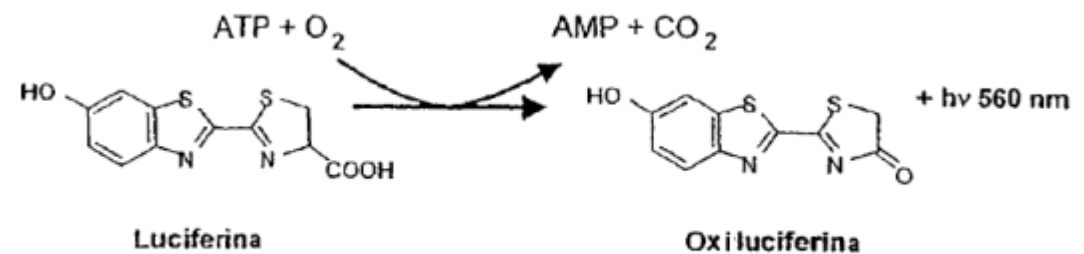


5. Análisis de bioluminiscencia

- Basado en el uso de luciferina para producir bioluminiscencia
- Si se combina con antibióticos se podría determinar la sensibilidad
- No identifica el patógeno
- Puede dar interferencias el ATP humano
- Es costoso



Luciferina



Reacción de luciferina a oxiluciferina mediante luciferasa de luciérnaga con emisión de luz de 560 nm de longitud de onda.

Sección II: Laboratorio de microbiología

TEMA 8

Microbiota

Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio

Nacho Escrig, PhD

Microbiota y Microbioma



MICROBIOTA

Es el conjunto de microorganismos (bacterias, hongos, virus, arqueas, parásitos) que habitan en nuestro cuerpo

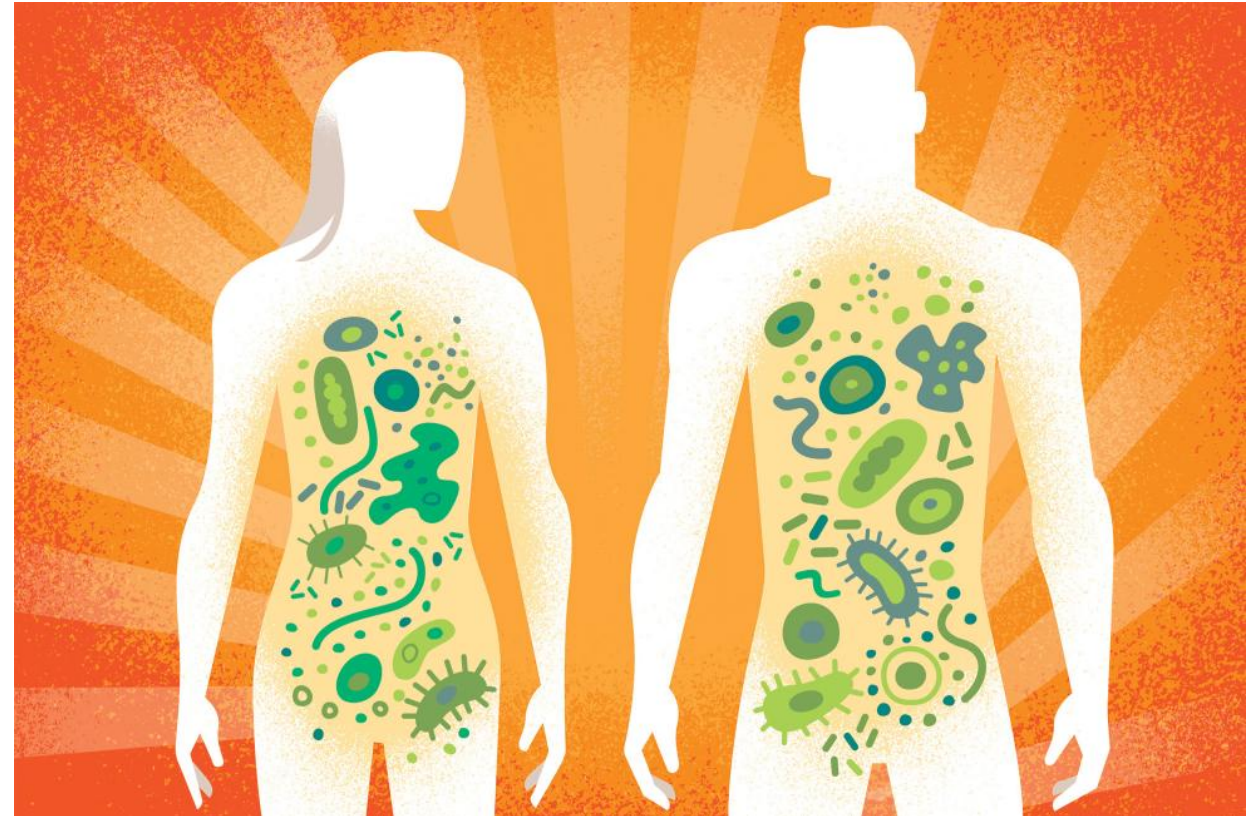
- Comensal
- **Mutualista**
- Patógena

SIMBIOSIS

MICROBIOMA

Ambiente relacionado con la microbiota

En un individuo adulto se estima que el número de bacterias es del mismo orden que el de células humanas.



Microbiota y Microbioma

La microbiota se encuentra en diversas localizaciones corporales que constituyen **microbiomas complejos y adaptados** al ambiente

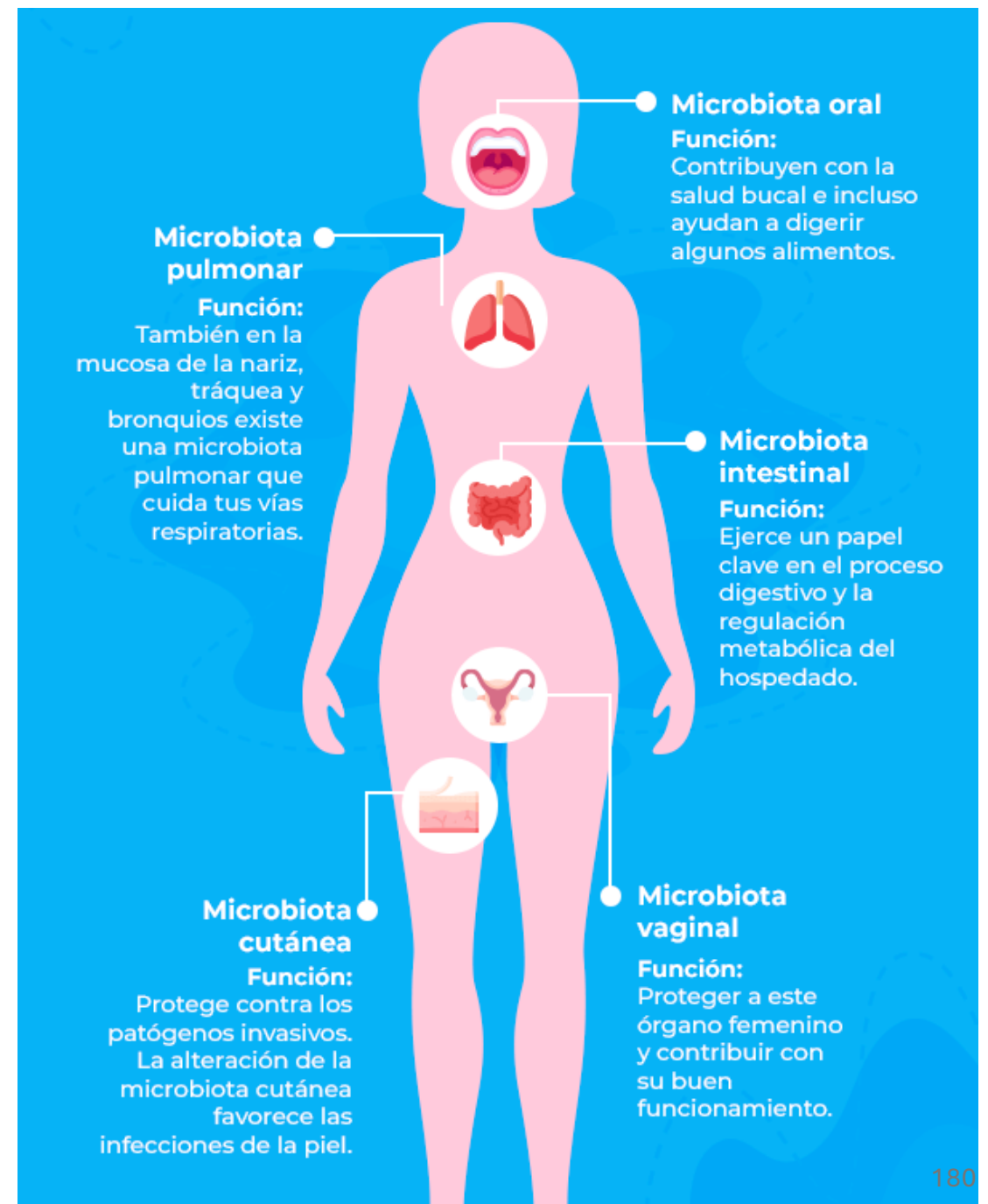
La microbiota **intestinal es la más compleja y abundante**

El comportamiento de la microbiota es **mutualista y simbiótico**

La microbiota y el microbioma de cada persona es **único**

Se está estudiando como **herramienta terapéutica** → Trasplante de heces

No cultivable → secuenciación rRNA 16S



Microbiota y Microbioma



El ser humano tiene EL MISMO
NÚMERO de células que de bacterias



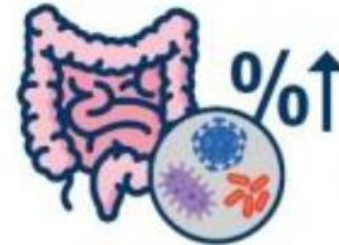
Nuestra microbiota
PESA APROXIMADAMENTE 1KG



El microbioma
de cada individuo ES ÚNICO



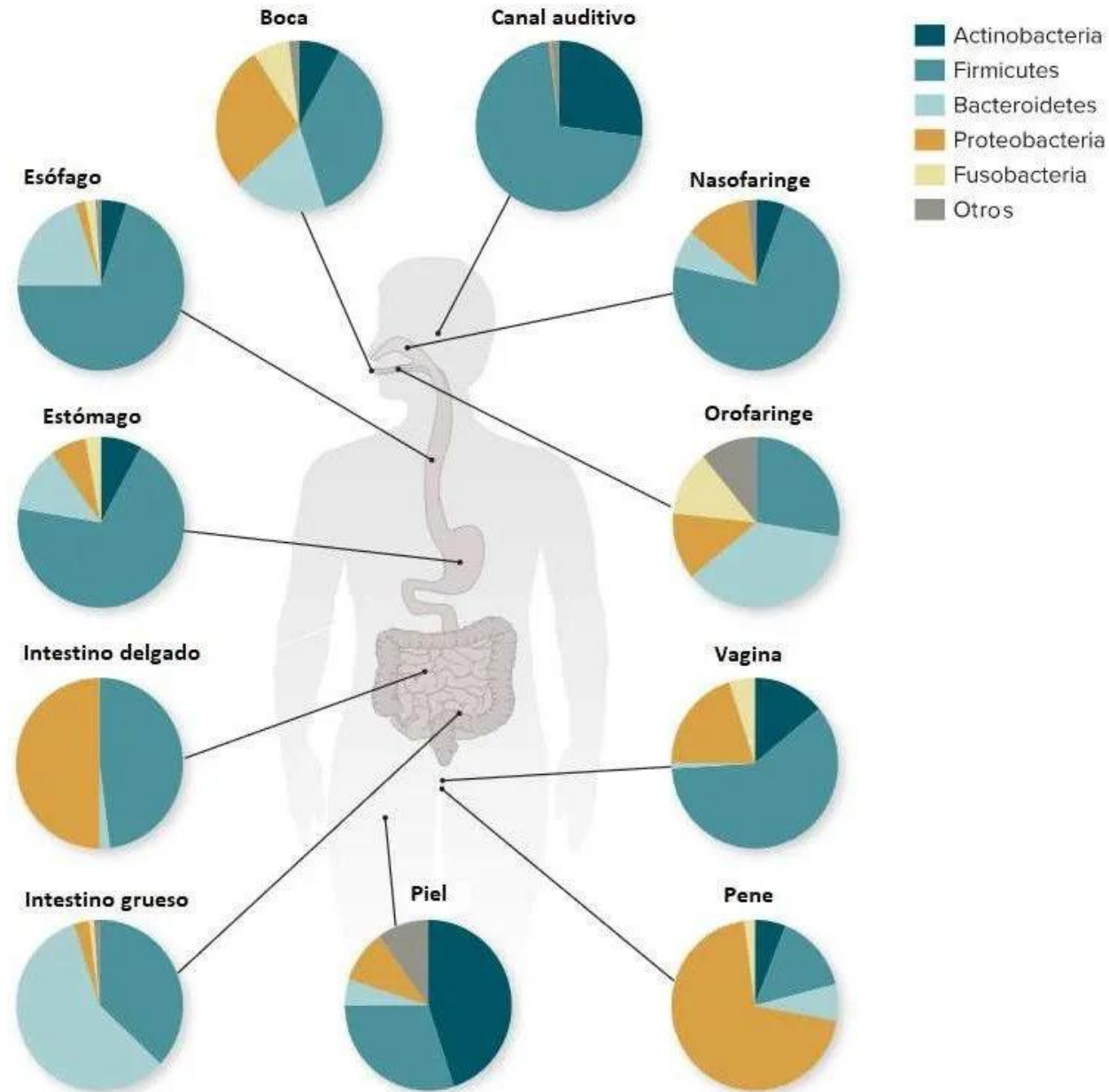
NO PODRÍAMOS VIVIR
SIN nuestro microbioma



La mayor parte de nuestro microbioma
SE ENCUENTRA EN EL INTESTINO

www.barcelonamaculafound.org

Microbiota y Microbioma



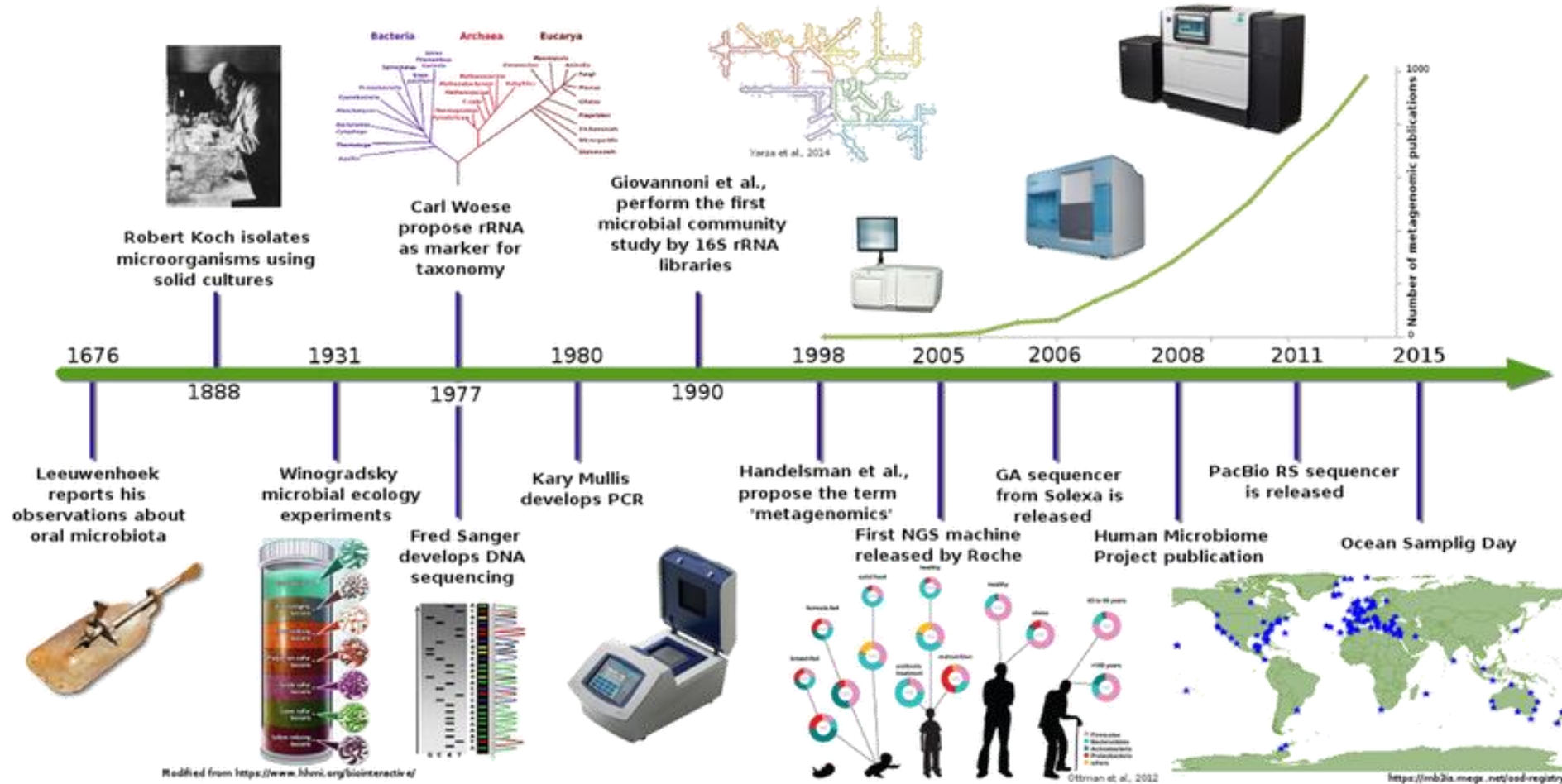
Determinación de microbiota



Para determinar la microbiota se han usado cultivos microbiológicos

Hoy sabemos que muchas bacterias de la microbiota no son cultivables

Por ello se usan técnicas de secuenciación masiva (rRNA 16S) y análisis masivo de datos (ómicas)



Eubiosis y disbiosis



La **eubiosis** es el equilibrio saludable de las poblaciones que forman la microbiota

- Diversidad microbiana adecuada (5.000 especies en todo el organismo)
- Predominancia de microorganismos beneficiosos

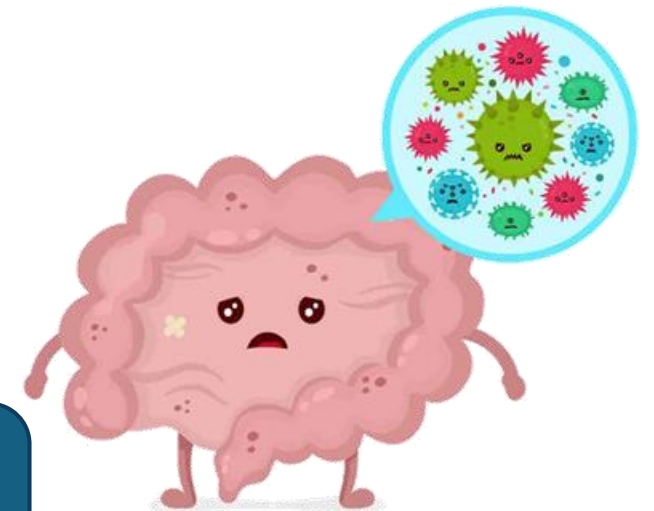
La **disbiosis** es el desequilibrio de las poblaciones que forman la microbiota

- Pérdida de diversidad o funcionalidad microbiana
- Disminución de microorganismos beneficiosos
- Se asocia con el desarrollo de enfermedades

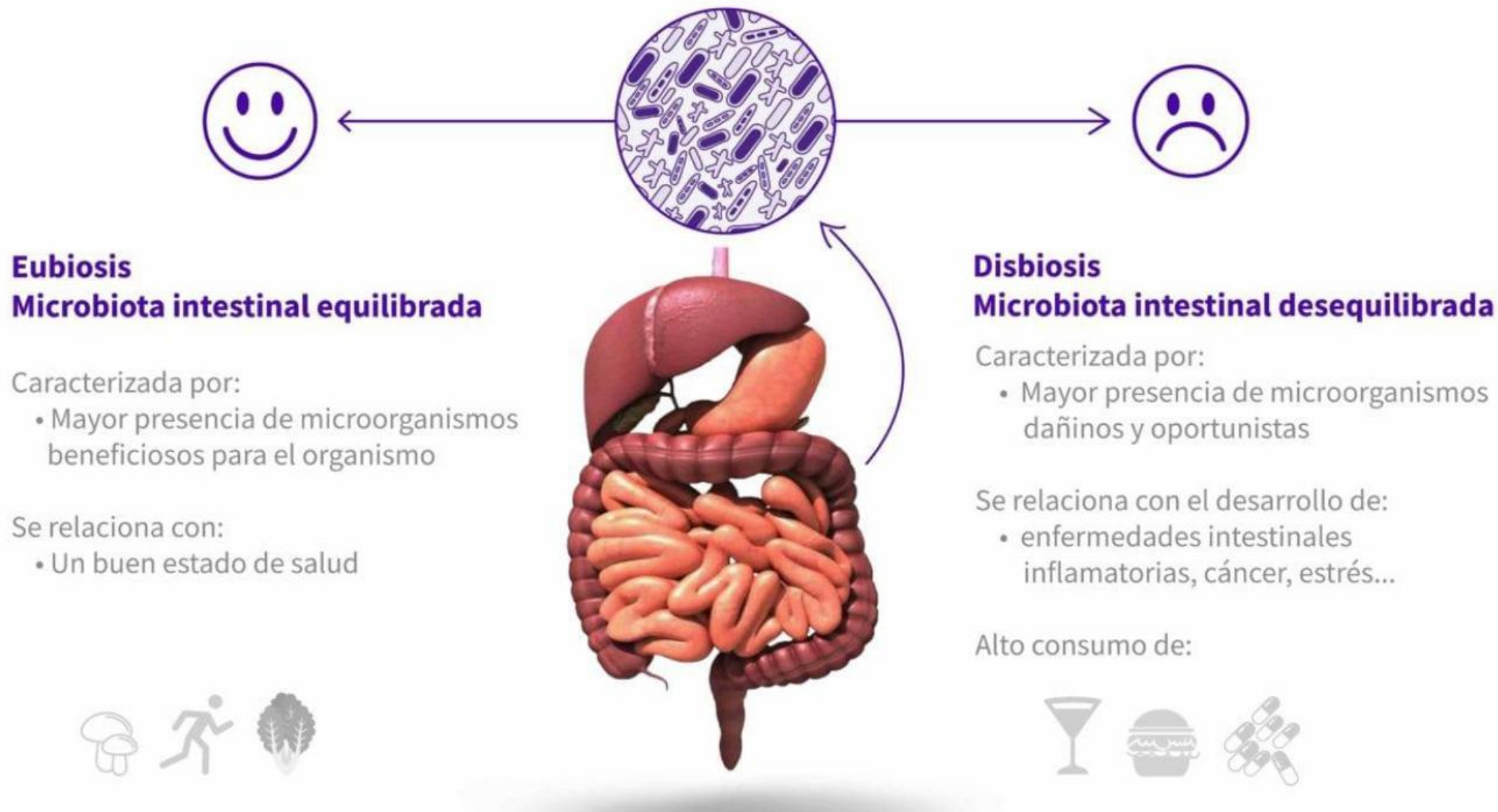
La **disbiosis** tiene distintas causas entre las que se encuentran:

- Uso de antibióticos
- Malos hábitos alimenticios
- Estrés
- Infecciones

Se mide por el ratio entre
bacterias positivas y
negativas



Eubiosis y disbiosis



Microbiota intestinal

Es la más abundante

Se origina en el útero gracias a la **flora placentaria**

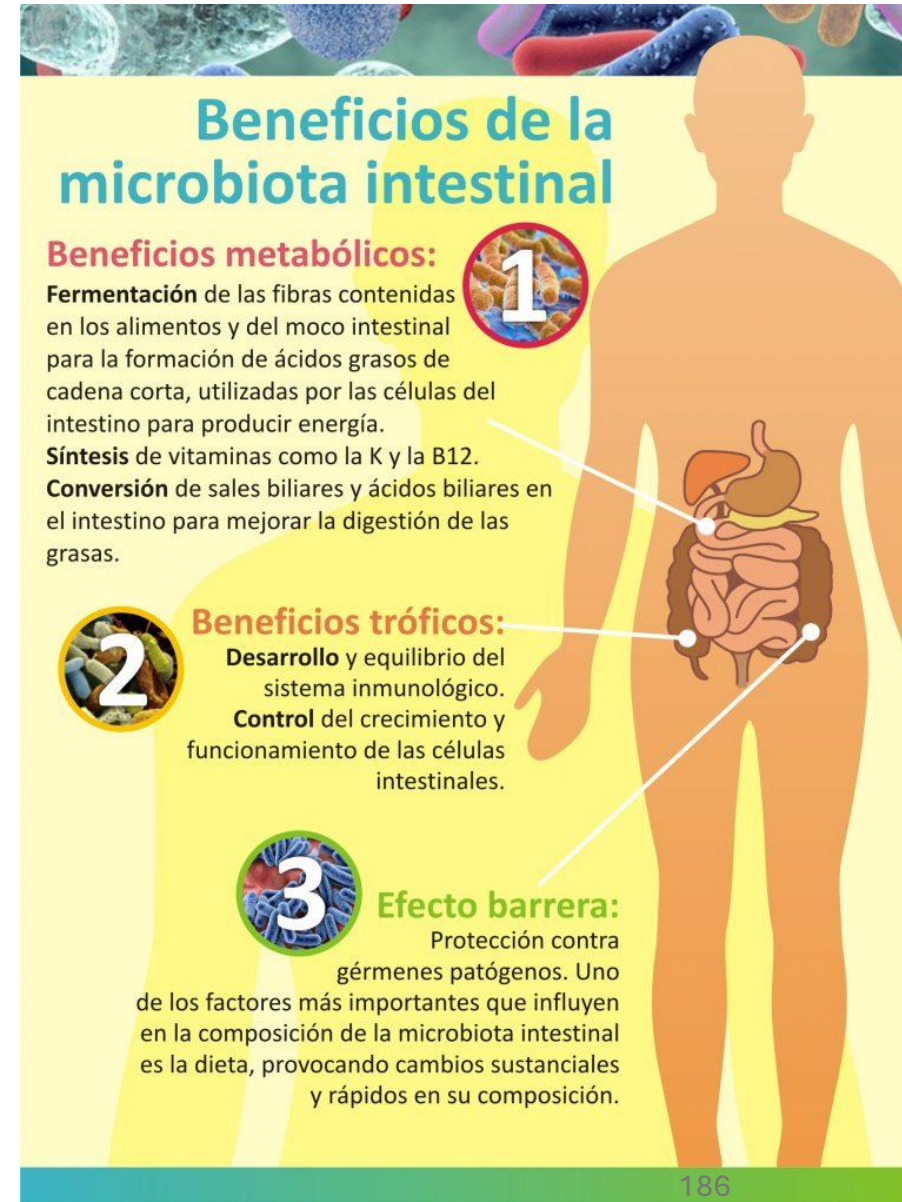
Alcanza su madurez con la alimentación sólida (2-3 años)

No existe un “estado normal” → alta variedad interpersonal

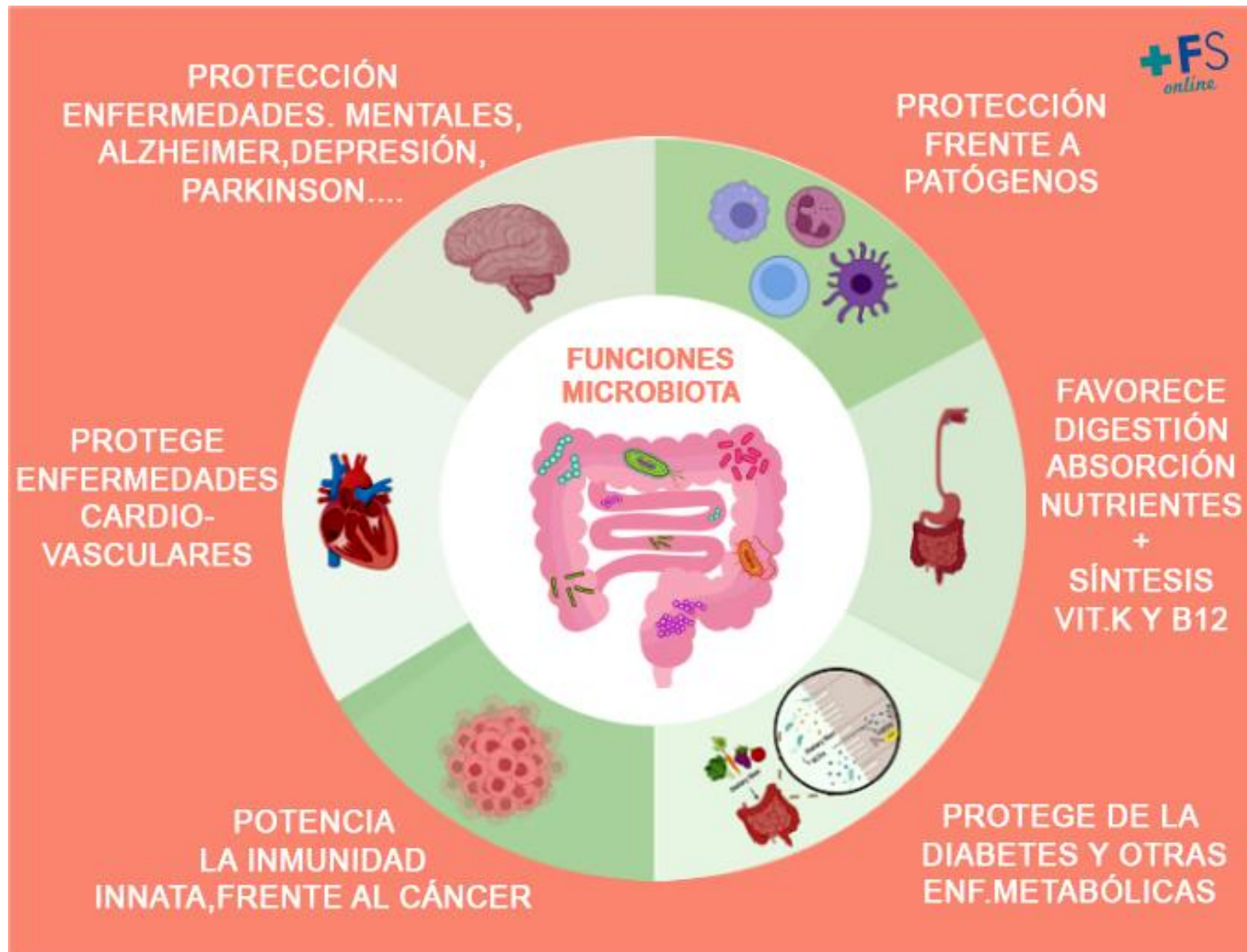
La diversidad y el equilibrio entre especies definen su salubridad

Funciones:

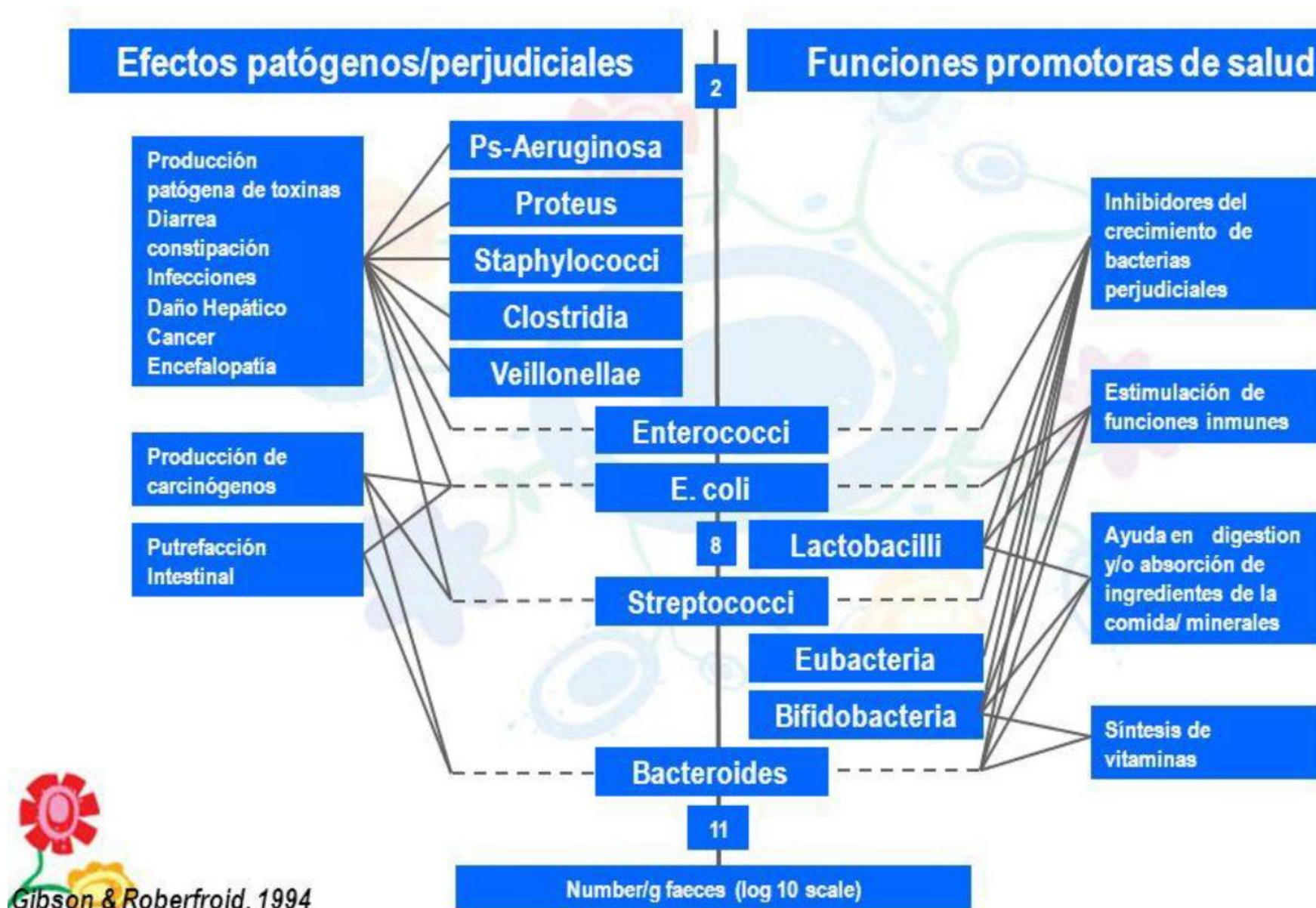
- Protegen de microorganismos patógenos
- Ayuda en la digestión
- Producción de vitaminas (B y K)
- Estimula el sistema inmune



Microbiota intestinal



Composición de microbiota intestinal



Microbiota intestinal y sistema inmune



Mantienen una relación mutualista

Microbiota



Sistema inmune

- Ayuda a la maduración y educación del sistema inmune
- Induce tolerancia inmunológica
- Produce metabolitos inmunomoduladores
- Protege frente a patógenos

- Controla la cantidad microbiana → IgA
- Mantiene la barrera intestinal
- Controla a los microorganismos patógenos

Microbiota Intestinal y salud

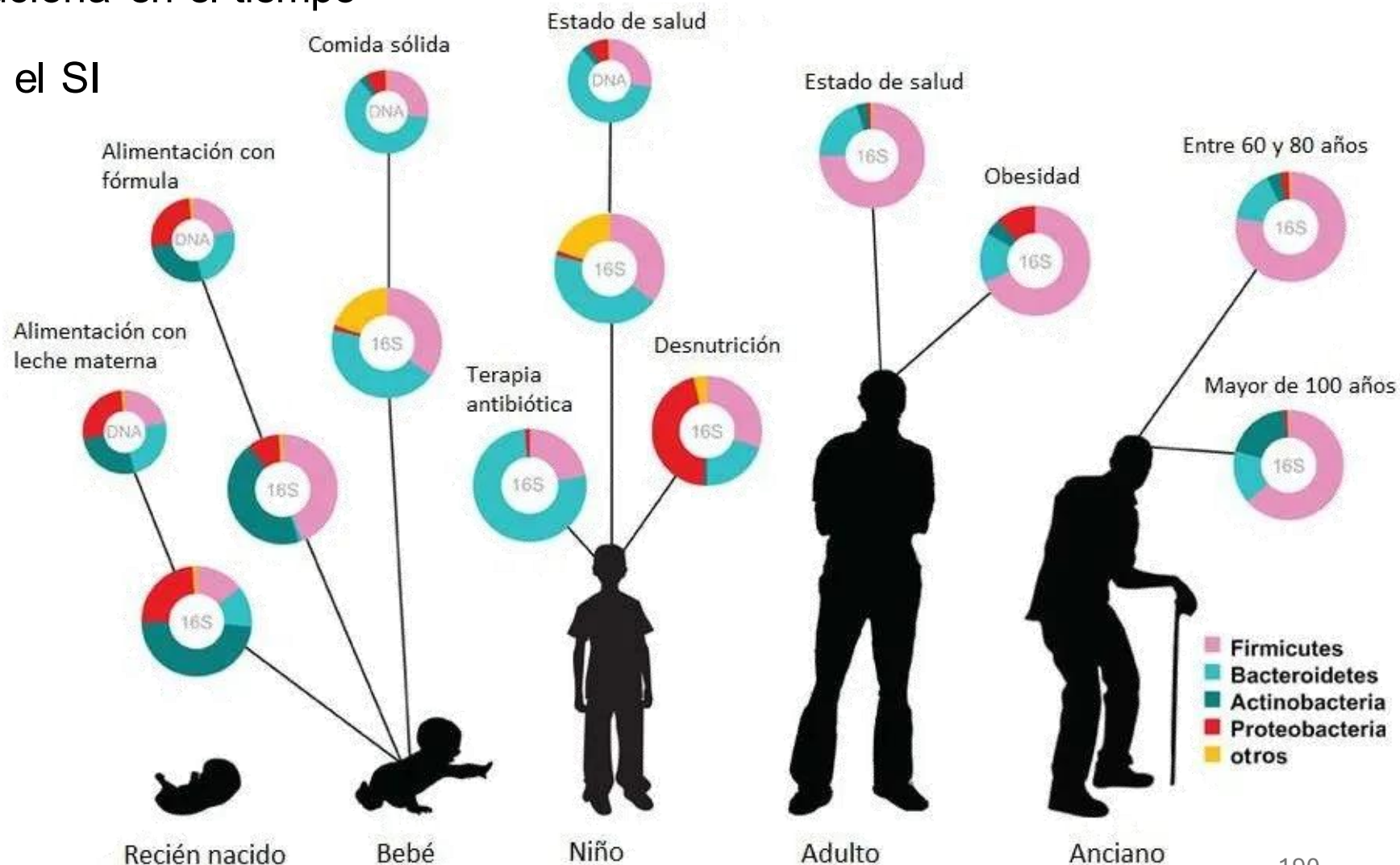
La microbiota varía y evoluciona en el tiempo

Mantiene un equilibrio con el SI

Si el equilibrio se rompe



Patologías



Microbiota intestinal y sistema nervioso central



La microbiota intestinal y el SNC se comunican influyendo en diversas funciones

➤ Balance microbiano

Estrés

Motilidad

Secreciones

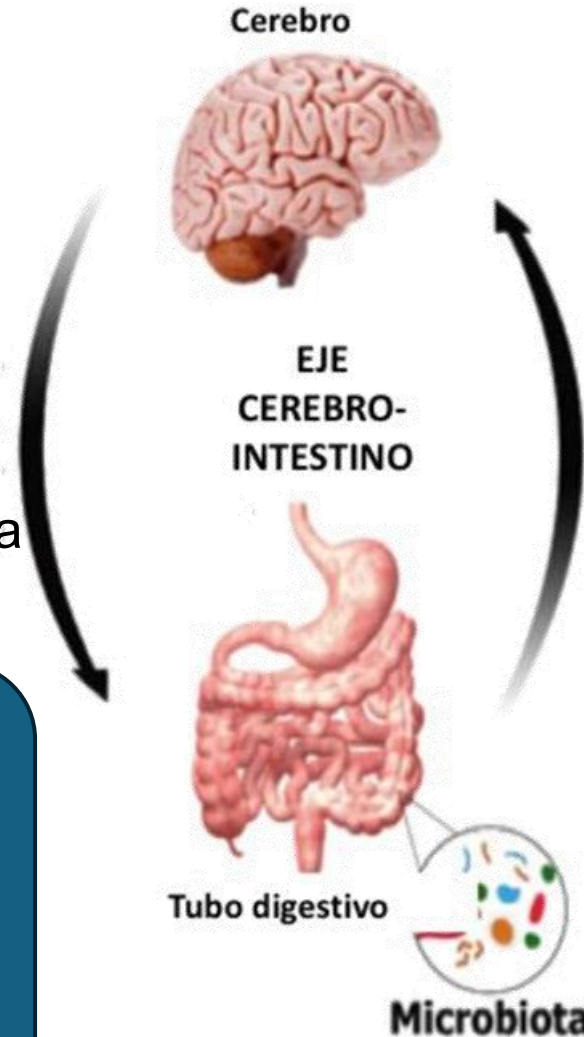
➤ Uso de nutrientes

Control de apetito e ingesta

Ritmos circadianos

Disbiosis se asocia a:

- **Depresión y ansiedad**
- **TAE**
- **Parkinson y Alzheimer**
- **Síndrome del intestino irritable con componente psicológico**



➤ Estado de ánimo, estrés y comportamiento

Estimulación de las terminaciones intestinales del nervio vago

➤ Neuroinflamación

Producción de citoquinas pro y anti-inflamatorias

➤ Estimulación del SNC

Producción de metabolitos como: butirato, propionato, triptófano, GABA, dopamina

Microbiota urinaria

El aparato urinario tiene una microbiota **comensal** formada por entre 20 y 500 especies

Varía según sexo y edad

Funciones:

- Protección frente a patógenos
- Mantenimiento del epitelio
- Modulación del sistema inmune

Disbiosis:

- | | | |
|-----------------------|---|---------------------------|
| ➤ Antibióticos | ➔ | ➤ Infecciones recurrentes |
| ➤ Relaciones sexuales | | ➤ Incontinencia |
| ➤ Catéteres | | ➤ Cistitis |
| | | ➤ Dolor pélvico |

» MICROBIOTA URINARIA:

LAS BACTERIAS BUENAS PUEDEN PROTEGER TU TRACTO URINARIO

La microbiota urinaria es un conjunto de bacterias beneficiosas que viven en el tracto urinario y lo mantienen sano.

- Evita el crecimiento de bacterias dañinas.
- Mantiene un ambiente urinario equilibrado.
- Disminuye el riesgo de infecciones recurrentes.
- Apoya la respuesta inmunológica del tracto urinario.

El uso de antibióticos sin supervisión, los cambios hormonales y la mala hidratación son algunos factores que contribuyen a su alteración.

Dr. Felipe de Jesús Chavira Rodríguez
UROLOGÍA INTEGRAL / CIRUGÍA DE MÍNIMA INVASIÓN

Hospital Puebla | Atlixcáyotl, Heroica Puebla de Zaragoza
Consultorio 1023
222 • 388 • 3803

Fifty Doctors Hospital | Torre Médica | San Manuel
Blvd. 14 Sur Consultorio 106
222 • 694 • 1134

COFEPRIS: 2421062002A00095

Microbiota vaginal

Formada por más de 280 especies

La principal es **Lactobacilus spp.**

- Mantenimiento de pH ácido (ácido láctico)
- Generación de H₂O₂ y bacteriocinas
- Protección contra patógenos (Cándida)
- Favorece la secreción de mucosa

Varía con la edad y con influencias hormonales

Disbiosis

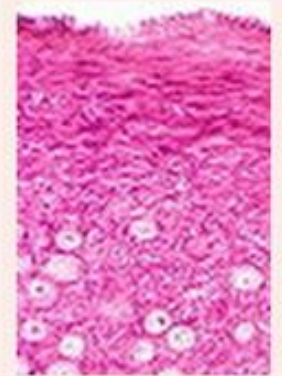
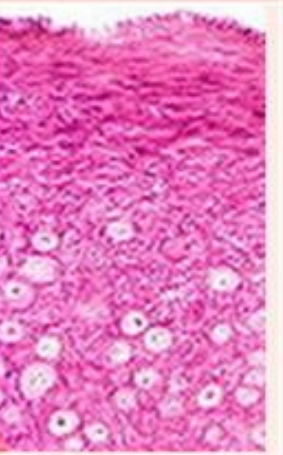
- | | | |
|-----------------------|---|------------------------|
| ➤ Antibióticos | | ➤ Candidiasis |
| ➤ Relaciones sexuales | | ➤ Vaginosis bacteriana |
| ➤ Ciclo hormonal | | ➤ ETS |
| ➤ Embarazo | ➔ | |
| ➤ Duchas vaginales | | |
| ➤ Estrés | | |



Microbiota vaginal

Variaciones hormonales



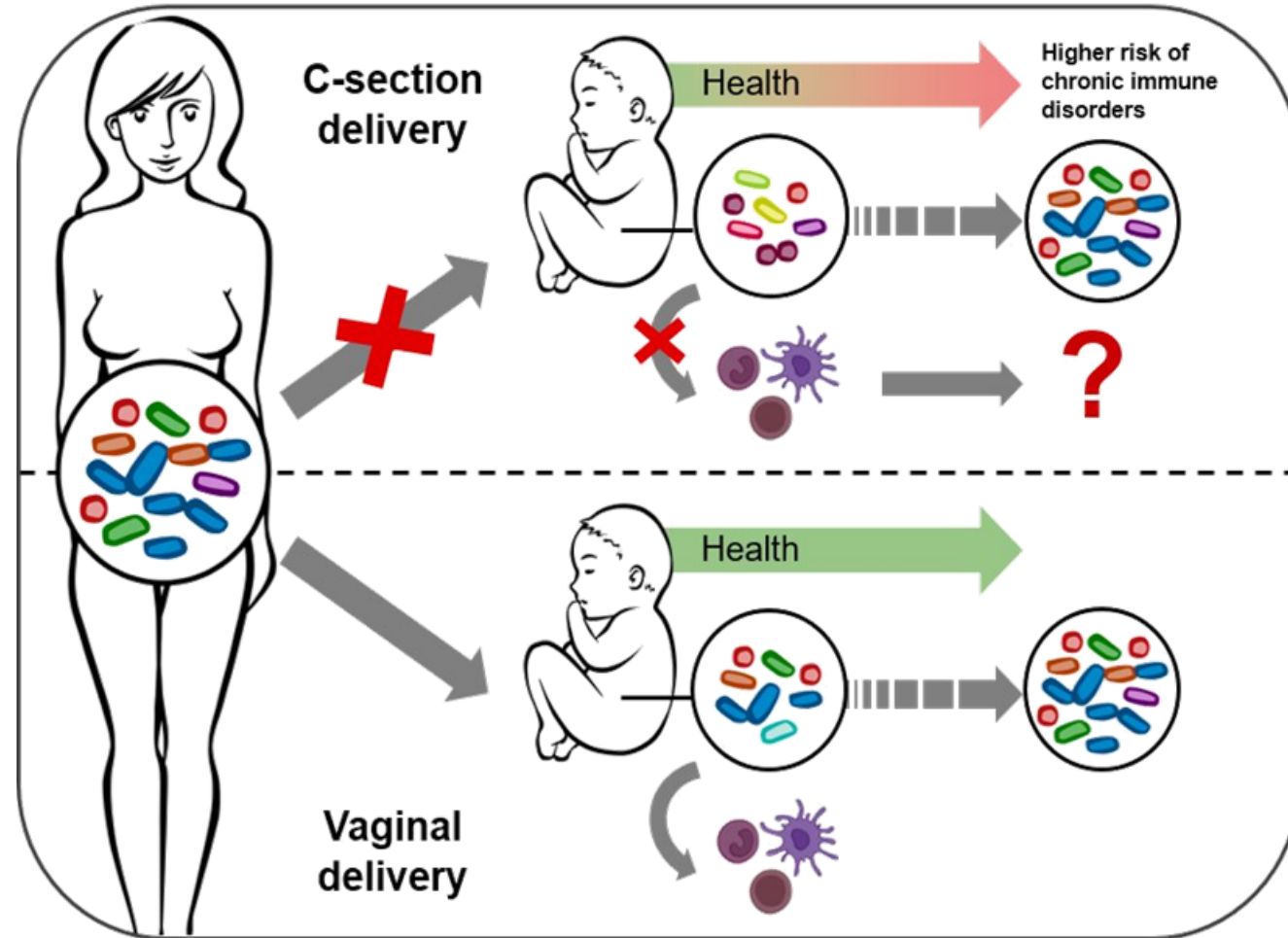
	NEONATA	1 MES	PUBERTAD	MADUREZ SEXUAL	EMBARAZO	MENOPAUSIA
ESTRÓGENOS	++	-	+	++	+++	-
EPITELIO						
GLUCÓGENO	+	-	-  +	+	++	-
pH	4-5	7	7  5	4-5	3,5-4,5	6-7
MICROBIOTA	Estéril <i>Lactobacillus</i>	Escaso	Mixto	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>	Mixto

Álvarez-Calatayud et. al. Nutrición hospitalaria. 2015

Microbiota vaginal



Coloniza al recién nacido durante el parto para instaurar su microbiota



Microbiota del tracto respiratorio



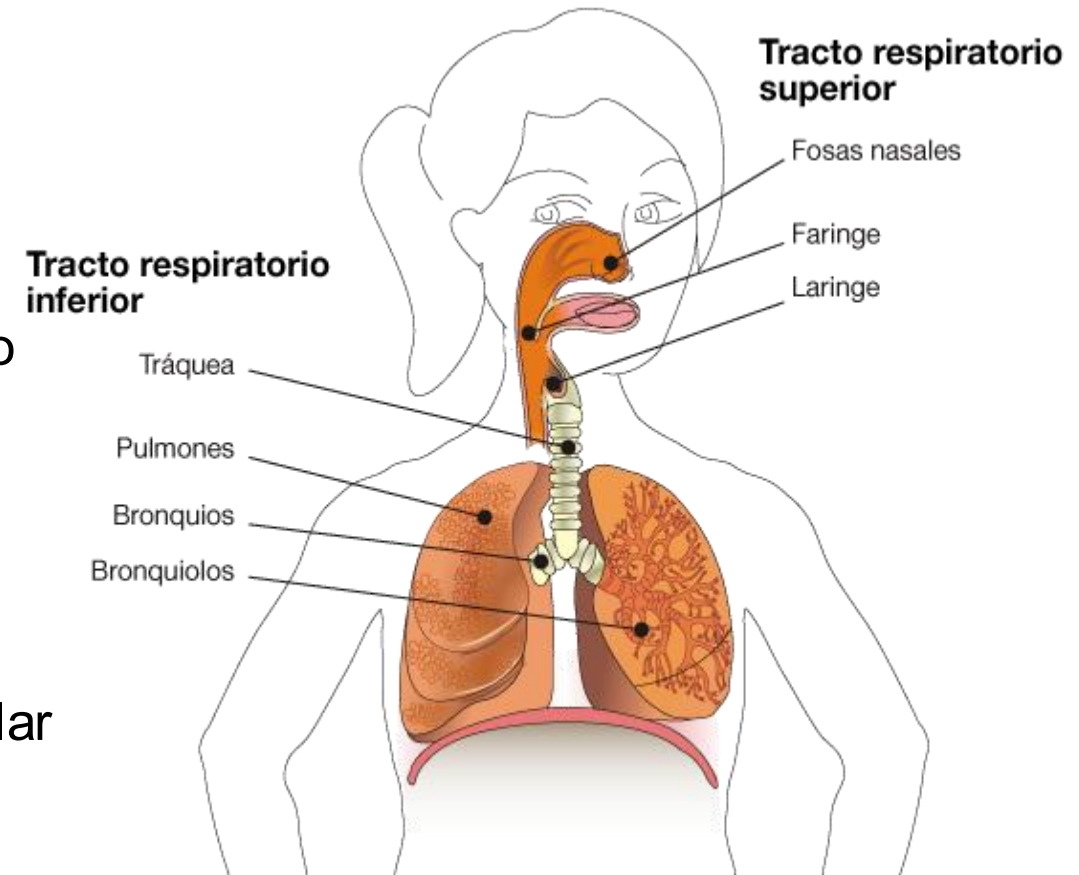
Es una microbiota algo desconocida en un sistema que se pensaba estéril

Tracto respiratorio superior:

- Microbiota más abundante y diversa
- Es más estable
- Papel clave como primera defensa
- Regula el equilibrio biológico del sistema respiratorio

Tracto respiratorio inferior:

- Microbiota menos abundante abundante y diversa
- Es más transitoria
- Prioriza la eliminación rápida para evitar daño alveolar
- Selecciona y elimina



Se estudia con muestras nasales, esputos o lavados broncoalveolares

Microbiota del tracto respiratorio



Microbiota bucal

- Alta diversidad y cantidad (>600 especies)
- Forma biopelículas → caries
- Predomina el género **Streptococcus**

Disbiosis en el tracto respiratorio:

- Antibióticos
- Tabaquismo
- Contaminación
- Edad

Consecuencias:

- Asma
- EPOC
- Rinitis y sinusitis crónica
- Infecciones recurrentes

MICROBIOTA BUCAL

Está formada por microorganismos que habitan en la boca y ayudan a mantener su equilibrio, funcionamiento y prevenir enfermedades.

Se desarrolla a las primeras horas del nacimiento

EXISTEN DIFERENTES MICROBIOTAS EN LA BOCA

- LABIOS**
 - Staphylococcus epidermis
 - Kocuria
 - Micrococcus
- LENQUA**
 - 45% son cocos grampositivos: Streptococcus salivarius, Streptococcus Mitis y grupo Streptococcus anginosus (grupo milleri)
 - 16% de especies de veillonella
 - 12% de Actinomyces spp
 - Lactobacillus fusobacterium
- PALADAR BLANDO**
 - Haemophilus
 - Corynebacterium
 - Streptococcus pyogenes
 - Streptococcus viridans
- PALADAR DURO**
 - Streptococcus sanguinis, mitis y salivarius
 - TAMBIÉN**
 - Haemophilus

CONOCE LA PARTE MÁS PROPENSA DE TU BOCA A LA COLONIZACIÓN BACTERIANA

Superficies dentales, Surco gingival

EL DESEQUILIBRIO MICROBIANO PUEDE PROVOCAR:

Caries, Enfermedad periodontal

FACTORES QUE ALTERAN LA CONSTITUCIÓN DE LA MICROBIOTA BUCAL

Hábitos alimenticios, tabaquismo, alcoholismo, higiene bucal deficiente, restauraciones dentales (resinas, prótesis o implantes) y embarazo.

LAMUELASAS

Microbiota de la piel

La piel contiene muchos microhábitats

Microbiota depende de la zona de la piel

1×10^7 bacterias por cm^2 de piel $\rightarrow$ 150 especies

Predominan **Corynebacterium**,
Propionibacterium y **Staphylococcus**

Las bacterias comensales y patogénicas no se consideran microbiota de la piel

Disbiosis:

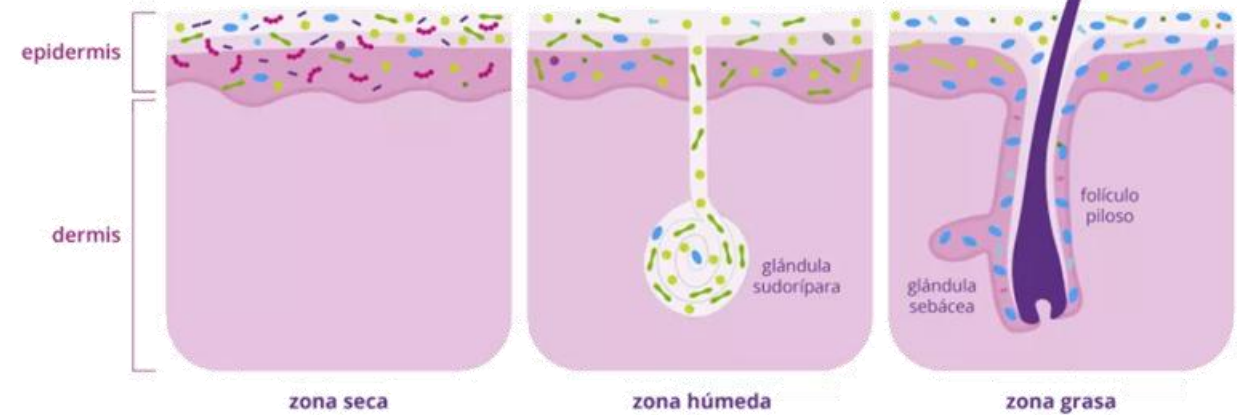
- Alteraciones en la barrera
- Productos cosméticos
- Higiene
- Factores ambientales
- Antibióticos



- Infecciones cutáneas
- Inflamación (acné, dermatitis, rosácea)
- Piel seca propensa a irritaciones

COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA CUTÁNEA

una composición microbiana cutánea para cada zona de piel



BIOCODEX
Microbiota Institute



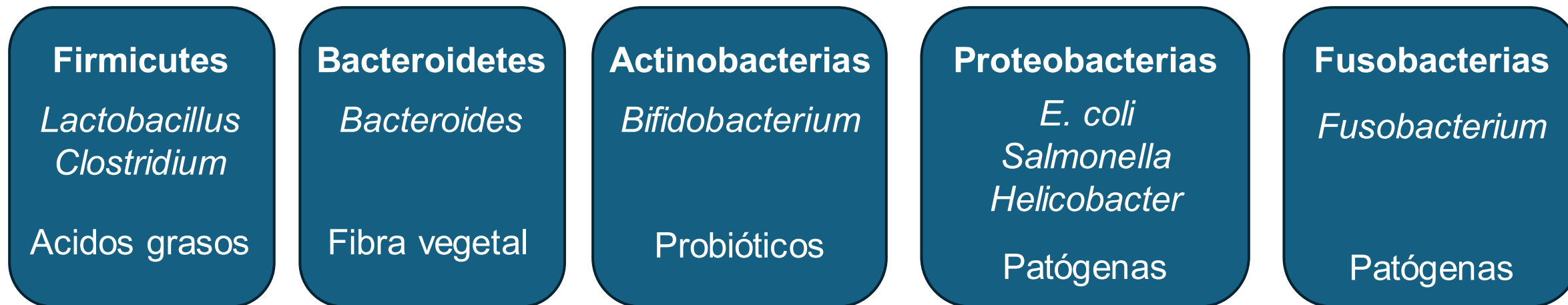
Microbiota y salud



La eubiosis de la microbiota intestinal está muy relacionada con un buen estado general de salud

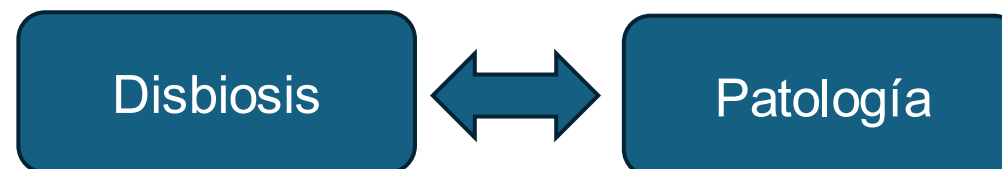
Esta eubiosis depende de la biodiversidad y de la cantidad total de bacterias

Algunas bacterias muy abundantes son muy sensibles a los cambios → indicadores de biodiversidad

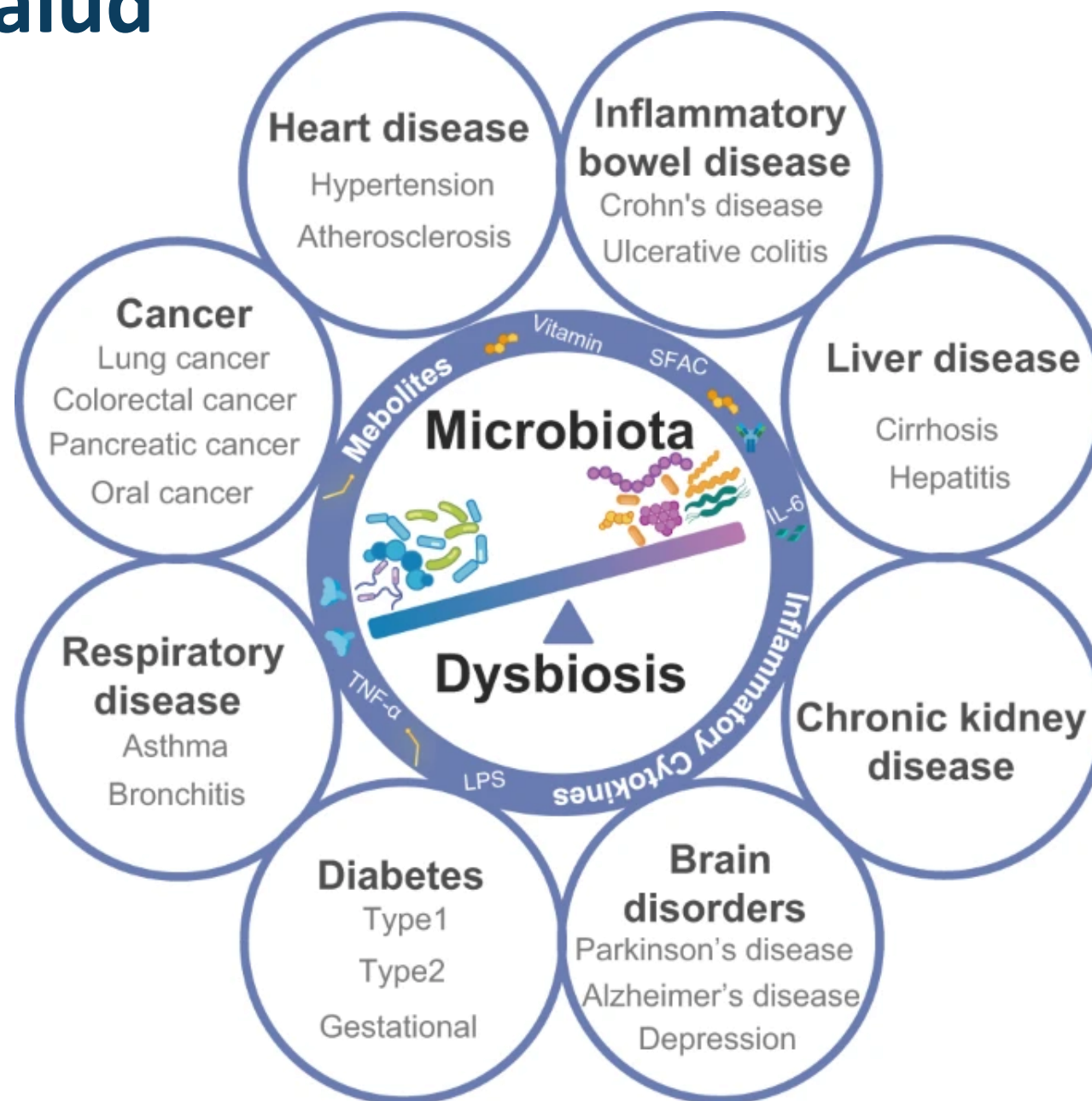


- Cáncer colorrectal
- Enfermedad inflamatoria intestinal
- Enfermedades metabólicas
- Alergia y asma
- Diarrea por *Clostridium difficile*

¿Qué va antes?



Microbiota y salud



https://mpunti.es/blogs/salud-digestiva/microbiota-y-cancer-la-influencia-invisible-en-la-salud-y-la-enfermedad?srsltid=AfmBOophsY9LuPDvQpf72KPZjA1Hxh9_ms909xY9HE8m7YZIWKBNdmCm

Disbiosis y cáncer colorrectal



En la relación de la microbiota con el cáncer colorrectal hay dos teorías

Teoría de metabolitos tóxicos

Producción de sulfuro de hidrógeno

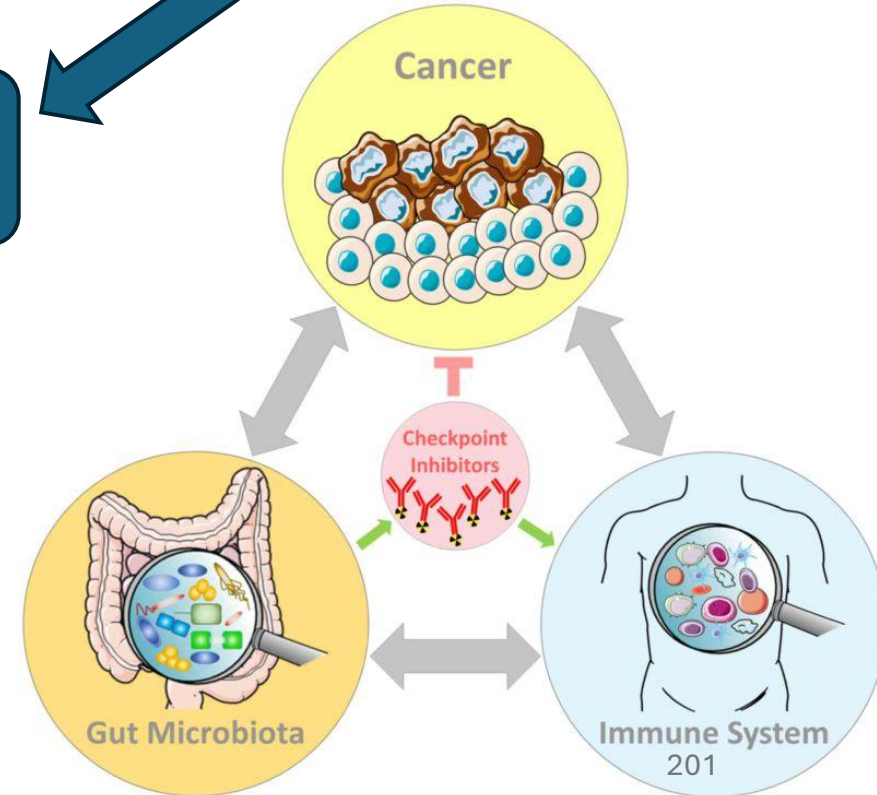
Teoría del sistema inmune

Estimulación del sistema inmune

Daño en células intestinales

La patología se relaciona con:

- Incremento de *Streptococcus gallolyticus*
- Dietas ricas en grasas y proteínas
- Dietas pobres en fibra (frutas y verduras)



Disbiosis y enfermedad inflamatoria intestinal

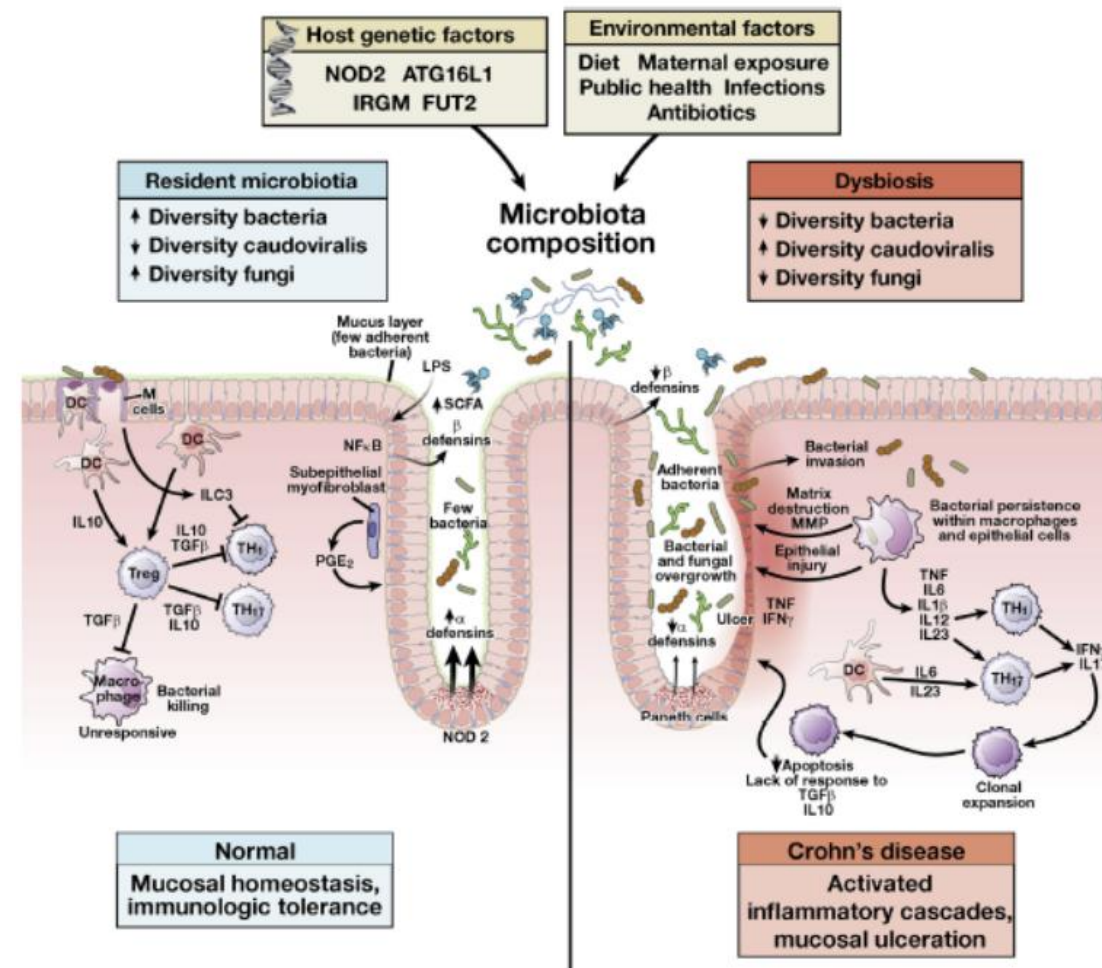


La enfermedad inflamatoria intestinal agrupa desórdenes crónicos de etiología no bien definida que dan lugar a brotes de inflamación intestinal (e.g. colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn)

Relacionada con:

- Alteración de la barrera intestinal
- Aumento de bacterias proinflamatorias
- Disminución de bacterias protectoras
- Activación inmune desregulada
- Producción de metabolitos dañinos

**Reducción importante
de la diversidad**



Disbiosis y enfermedades metabólicas



Se asocian a la alteración digestiva por parte de la microbiota

Obesidad

- Pacientes con una mayor recuperación energética
- Su microbiota puede degradar fibras insolubles
- Toma de antibióticos durante primeros meses de vida

Diabetes tipo II

- Reducción de bacterias productoras de butirato
- Disbiosis funcional



Disbiosis y alergia y asma



Hipótesis de la higiene: la reducción de la exposición a microorganismos durante el periodo neonatal y los primeros años de vida empobrecen la biodiversidad de la microbiota y por tanto la estimulación del sistema inmune

La microbiota intestinal de niños de 3 semanas atópicos tiene una menor proporción de **bifidobacterias**

La diversidad de la microbiota intestinal de niños con enfermedad atópica siempre es menor



Disbiosis y diarrea por *Clostridium difficile*



C. difficile desplaza a las bacterias positivas produciendo diarrea

Las alteraciones de la microbiota contribuyen a la colonización por *C. difficile* y a las recurrencias de la patología

El trasplante de heces ha demostrado una mejora de la sintomatología



Análisis de microbiota intestinal



1. Elección de la muestra

Normalmente se usan **heces o exudados rectales**

No representa la totalidad de las poblaciones intestinales

Para una mejor zonación se pueden llevar a cabo de **biopsias de intestino**

2. Transporte de la muestra

Se ha de hacer a -80°C para evitar cambios en las comunidades microbianas

3. Extracción de los ácidos nucleicos

Importante homogeneizar debido a los distintos microambientes en la muestra

Protocolo de extracción es crítico para buena calidad y cantidad de ácidos nucleicos sin arrastrar sustancias que puedan interferir en la PCR

Análisis de microbiota intestinal



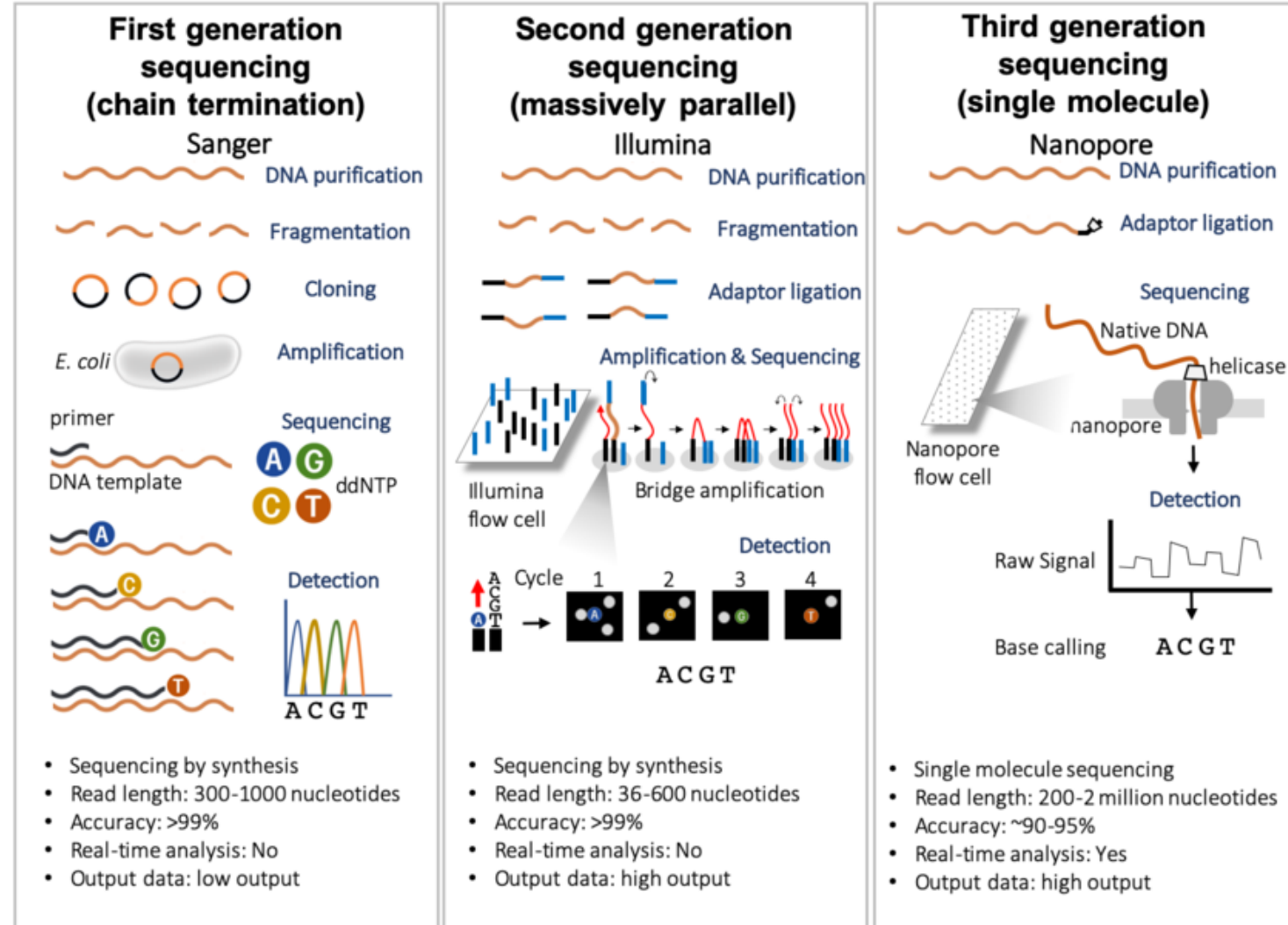
4. Secuenciación

Se hace por next generation sequencing (NGS)

Principalmente se usan métodos de 2ª generación (Illumina)

Los métodos de 3ª generación son más rápidos pero no son coste efectivos

Los métodos de 3ª generación no necesitan amplificación previa de los fragmentos



Estudio de la microbiota intestinal



El estudio de la microbiota intestinal se puede enfocar en distintos ámbitos

- A. Metataxonomía
- B. Metatranscriptómica
- C. Metagenómica
- D. Metabolómica
- E. Estudio de los ácidos grasos de cadena corta



A. Metataxonomía



- Es técnica de análisis para identificar microorganismos presentes en una muestra sin cultivarlos
- Es la más utilizada
 1. Extracción y secuenciación de gen codificante del rRNA 16S total de muestras de heces (DNA)
 2. Se usan cebadores universales y se secuencian los amplicones
 3. Finalmente se alinean los resultados con bases de datos para identificar los grupos taxonómicos
- **NO** permite distinguir los microorganismos vivos de los muertos
- **NO** permite identificar con precisión la función metabólica

¿Quién está ahí?



B. Metatranscriptómica

- También llamada **metataxonomía de la fracción activa**
- Analiza el RNA para identificar qué genes se están expresando activamente
 1. Extracción del rRNA 16S total de muestras de heces
 2. Secuenciación del cDNA 16S total de muestras de heces
 3. Se usan cebadores universales y se secuencian los amplicones
 4. Finalmente se alinean los resultados con bases de datos para identificar genes expresados
- **SÍ** permite distinguir los microorganismos vivos de los muertos
- **SÍ** permite identificar con una potencial función metabólica
- La detección de RNA **NO** implica una proteína final activa
- Más costosa y mayor complejidad técnica

¿Qué genes expresan?

C. Metagenómica



- Estudia el **conjunto total de genes** de una comunidad microbiana
 1. Extracción del DNA total de muestras de heces
 2. Se secuencian sin especificidad (shotgun)
 3. Finalmente se alinean los resultados con bases de datos para identificar los grupos taxonómicos
- **NO** permite distinguir los microorganismos vivos de los muertos
- **SÍ** permite identificar el potencial metabólico
- Más costosa y mayor complejidad técnica que la metataxonomía
- Mejor resolución taxonómica que la metataxonomía

¿Qué podrían hacer?

D. Metabolómica



- Estudia el conjunto total de metabolitos producidos por la microbiota en una muestra
 1. Extracción de metabolitos
 2. Análisis por espectrometría de masas o resonancia magnética nuclear
 3. Identificación y cuantificación de los compuestos
- **NO** permite identificar las poblaciones microbianas
- **SÍ** permite identificar el potencial metabólico
- No se usa de forma estandarizada
- Complejidad por la mezcla con metabolitos procedentes de alimentos

¿Qué metabolitos
generan?

E. Estudio de ácidos grasos de cadena corta



- Estudia unos ácidos grasos específicamente generados por la fermentación bacteriana
 - Acetato
 - Propionato
 - Butirato
- Se analizan por cromatografía de gases o cromatografía líquida (HPLC)
- Estos ácidos grasos de cadena corta (SCFA) tienen distintas propiedades funcionales
- Este análisis permite:
 - Confirmar actividad metabólica funcional
 - Evaluar salud de microbiota
 - Relacionar la microbiota con efectos sistémicos

¿Qué metabolitos
generan?

Sección II: Laboratorio de microbiología

TEMA 9

Control serológico de la gestante

Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio

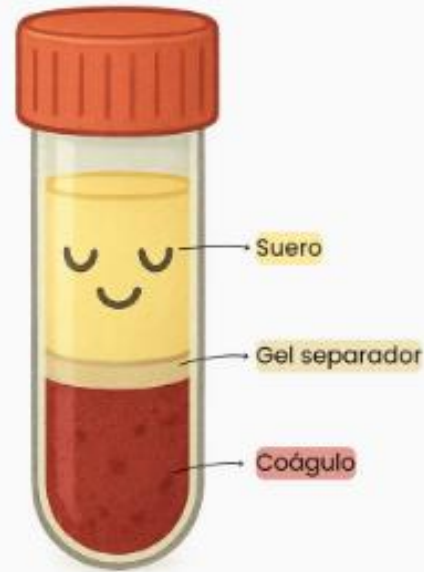
Nacho Escrig, PhD

Suero vs Plasma



La mayor parte de determinaciones clínicas se hacen sobre el suero

Suero

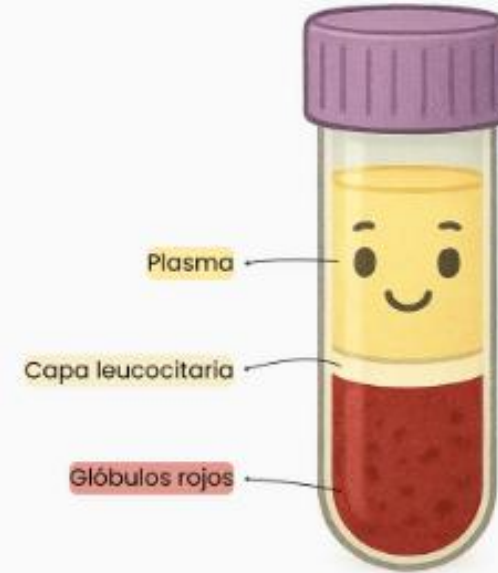


- Sin anticoagulante

- Sin factores de coagulación (sin fibrinógeno)

- Obtenido por centrifugación de sangre coagulada

Plasma



- Con anticoagulante (ej: EDTA, heparina...)

- Con factores de coagulación (con fibrinógeno)

- Obtenido por centrifugación de sangre no coagulada

SUERO = PLASMA - factores de coagulación

Transmisión vertical



Es el paso de una infección o enfermedad durante el **embarazo**, durante el **parto** o durante el **periodo posnatal**

Las infecciones en embarazadas suelen ser **infecciones locales**

La llegada de estas infecciones al feto puede comprometer su salud

Programas mundiales preventivos:

- Campañas de vacunación
- Educación sanitaria
- **Control serológico**

Estas infecciones pueden ocurrir a distintas **edades gestacionales**

Se pueden transmitir al feto por varios **mecanismos**



Definiciones



Embarazo: período de desarrollo de un feto en el útero materno, desde la concepción hasta el parto, durando unas 40 semanas (aproximadamente 9 meses) y se divide en tres trimestres.

Periodo perinatal: etapa que abarca desde la semana 22 hasta los primeros días tras el parto

Periodo neonatal: etapa que abarca desde el nacimiento de un bebé hasta los primeros 28 días (las primeras cuatro semanas) de vida

Periodo postnatal: fase que abarca desde las primeras horas hasta aproximadamente 6 a 8 semanas después del parto

Infecciones locales: infección bacteriana, fúngica o viral limitada a un área corporal (infección urinaria)

Infecciones sistémicas: infecciones que afectan a todo el cuerpo (VIH)

Control serológico: análisis del suero de la gestante para la identificación y prevención de agentes de transmisión vertical. Su intención no es diagnosticar a la madre sino prevenir al feto.

Edad gestacional: etapa del embarazo

Definiciones

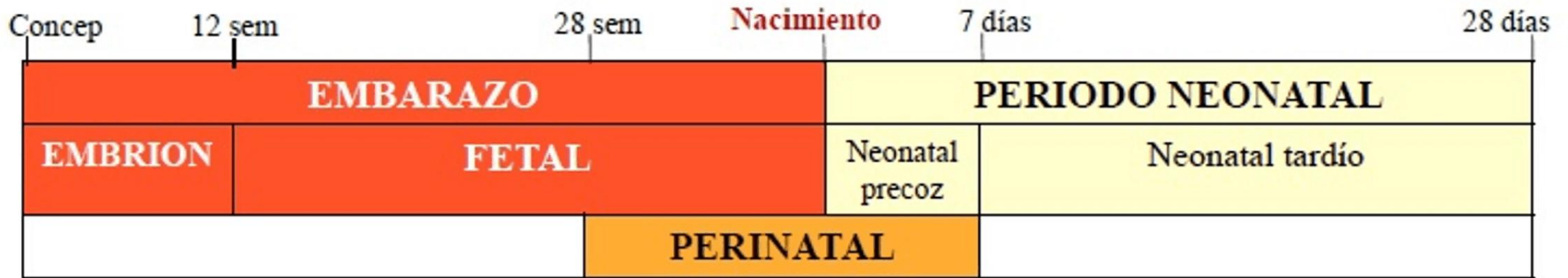


Embarazo: período de desarrollo de un feto en el útero materno, desde la concepción hasta el parto, durando unas 40 semanas (aproximadamente 9 meses) y se divide en tres trimestres.

Periodo perinatal: etapa que abarca desde la semana 22 hasta los primeros días tras el parto

Periodo neonatal: etapa que abarca desde el nacimiento de un bebé hasta los primeros 28 días (las primeras cuatro semanas) de vida

Periodo postnatal: fase que abarca desde las primeras horas hasta aproximadamente 6 a 8 semanas después del parto



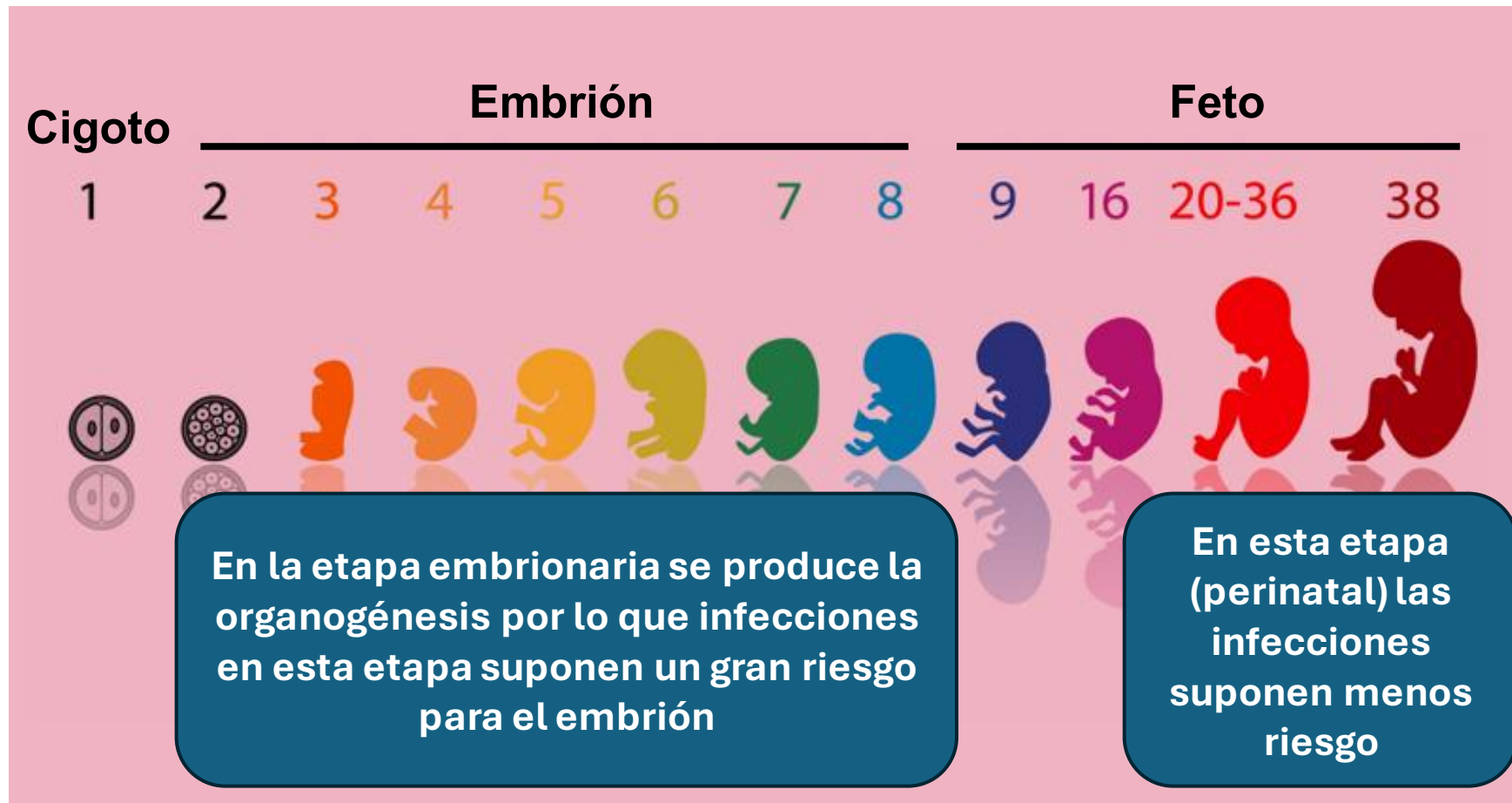
Fases del desarrollo embrionario



La fecundación marca el comienzo del desarrollo embrionario.

Hasta la 8ª semana el ser humano se denomina embrión

A partir de la 8ª semana el ser humano se denomina feto



Clasificación de infecciones de transmisión vertical



1. Infecciones prenatales o congénitas

Adquirida en el útero por dos vías:

- Vía hemática transplacentaria: Toxoplasmosis, sífilis, rubeola, parvovirus, CMV, Varicela zoster (VVZ)
- Vía líquido amniótico: Zika

2. Infecciones neonatales

Adquiridas durante el parto natural por contacto o por deglución o aspiración

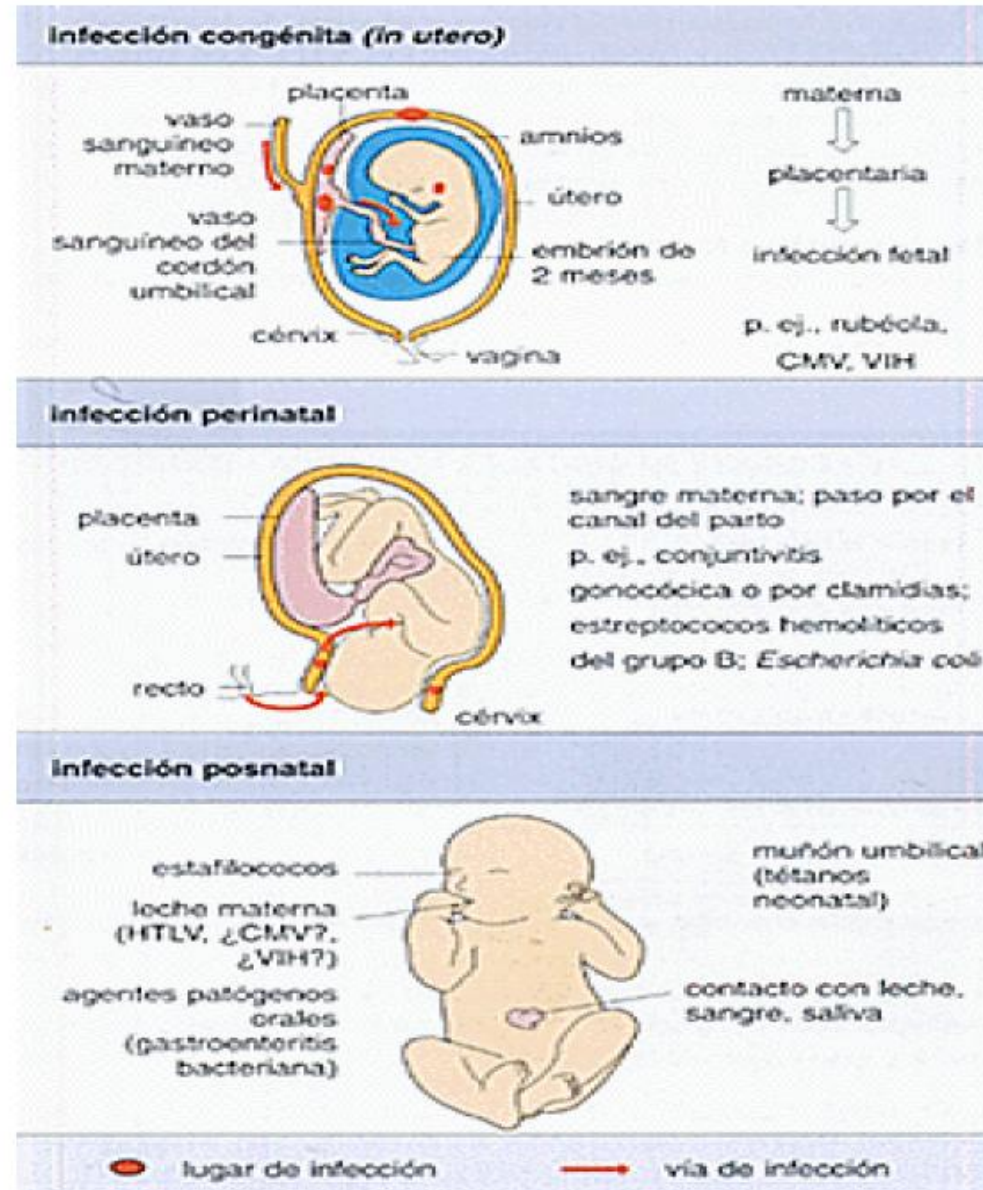
Sífilis, VIH, VHB, VHC, virus herpes simple (VHS), Streptococcus

3. Infecciones postnatales

Adquiridas en el primer mes tras el nacimiento

- Contacto: VVZ
- Lactancia: VIH
- Transfusiones: CMV

Clasificación de infecciones de transmisión vertical



Infecciones perinatales
transmitidas de madre a hijo

chrome-
extension://efaidnbmnnnibpcajpcg
lclefindmkaj/https://www.redalyc.
org/pdf/5517/551757266015.pdf

Clasificación de infecciones de transmisión vertical



Tabla 1. Principales microorganismos que causan infección de transmisión vertical en humanos.

Microorganismo	Formas de transmisión	Infección en la gestante asociada con riesgo de transmisión vertical	Patología en el neonato	Riesgo de transmisión		Tratamiento específico en el embarazo	Vacuna disponible
				Semana de gestación	Infección fetal%		
Rubéola	Transplacentaria	Primoinfección	Rubéola congénita	3-12 13-16 > 16	85% 35% Mínimo	No	Sí
<i>Toxoplasma gondii</i>	Transplacentaria	Primoinfección	Toxoplasmosis congénita	< 6 6-12 13-24 25-36 >37	1% 14% 29% > 60% 90%	Sí	No
<i>Treponema pallidum</i>	Transplacentaria Intraparto	Primaria o secundaria Latente temprana Latente tardía	Sífilis congénita Sífilis	Muy eficaz después de la cuarta semana	75% 40% 10%	Sí	No
Virus de la hepatitis B	Intraparto	HBsAg (+) Mayor riesgo HBe-Ag (+)	Hepatitis neonatal	Parto	20% si Anti-HBe(+) 90% si HBeAg (+)	No	Sí
VIH	Transplacentaria Intraparto	Viremia (más riesgo si es elevada)	SIDA pediátrico VIH		25% sin tratamiento <5% con tratamiento	Sí	No
Virus de la hepatitis C	Intraparto	Viremia elevada Mayor riesgo si VIH +	Hepatitis C		< 5-10% VIH (-) 20-30% VIH (+)	No	No
Citomegalovirus	Transplacentaria	Primoinfección	CMV congénita ^a	12 24 >24	25-35% 35-45% 45-75% 0,5%	No	No
		Reactivación o reinfección					
		Reactivación o reinfección	CMV perinatal ^b	Parto y lactancia	20-50%		
Virus herpes simple 1 y 2	Transplacentaria Intraparto	Primoinfección Reactivación Reinfección	Herpes neonatal	Próxima al parto	40-50% 1-3% 1-3%	No	No
Virus varicela zóster	Transplacentaria Intraparto	Primoinfección	Varicela congénita Varicela perinatal	< 28 28-36 >36	5-12 % 25 % 50 %	No	Sí
Parvovirus B19	Transplacentaria	Primoinfección	Pérdida fetal	< 4	0 %	No	No
			<i>Hydrops foetalis</i>	5-16	15 %		
				> 16	25-70 %		

^aLos cuadros graves se asocian con la primoinfección materna durante los tres primeros meses de gestación.

^bLa infección perinatal no se asocia con consecuencias graves para el recién nacido, al menos a corto y medio plazo.

Grupos de agentes infecciosos verticales



Las distintas infecciones dependen del momento en que la gestante haya sido infectada

- Primoinfección
- Congénitas
- Latentes → reactivación

Las infecciones tienen distinta probabilidad de afectar al feto según el estado de desarrollo en el que se produce la primoinfección

No todas las infecciones tienen tratamiento o vacunación efectiva durante el embarazo

- Grupo I: causan primoinfección en la gestante (e.g. toxoplasma, rubeola, parvovirus B19)
- Grupo II: causan infección crónica en la gestante (e.g. VIH, VHB, VHC, sífilis)
- Grupo III: causan infección latente siendo fuente de infección tras la reactivación (e.g. VHS, CMV, VZZ)

Objetivos del control serológico



Su intención no es diagnosticar a la madre sino prevenir al feto.

Estrategias:

Grupo I: primoinfección

- Detectar si la gestante es seronegativa para prevenir la infección
- Medidas higiénicas preventivas

Grupo II: infección crónica

- Detectar infecciones crónicas
- Reducir viremia al máximo

Grupo III: infección latente

- El control serológico no da mucha información
- Recurrir al historial clínico
- Evitar la exposición a situaciones que puedan dar lugar a la reactivación



Objetivos del control serológico



Su intención no es diagnosticar a la madre sino prevenir al feto.

Agentes de infección vertical a **INCLUIR** en el control serológico:

1. Rubeola
2. Toxoplasma
3. Treponema
4. VIH
5. VHB

Agentes prevenibles o con tratamiento

Agentes de infección vertical a **EXCLUIR** en el control serológico :

1. Herpesvirus
 - A. CMV
 - B. VVZ
 - C. VHS
2. VHC
3. Parvovirus B19
4. Listeria monocytogenes

**Agentes no prevenibles, sin
tratamiento o asintomáticos**

Agentes a EXCLUIR en el control serológico



1.A CMV

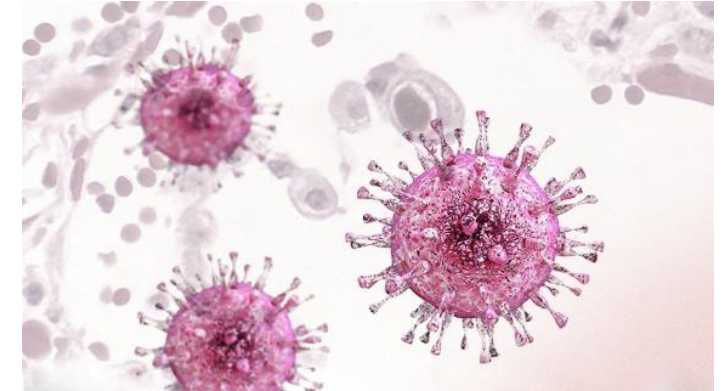
Es de las causas más comunes de infección (50% de la población española)

Es de las causas más comunes de infección congénita (0,5% de los recién nacidos)

La infección puede resultar de:

- Primoinfección materna
- Reactivación
- Reinfeción

La mayoría de las infecciones son asintomáticas



El análisis de anticuerpos no es capaz de ofrecer datos útiles para la prevención y transmisión porque:

1. No existen claras medidas preventivas higiénico-sanitarias eficaces
2. No hay tratamiento efectivo
3. Solo un 30-50% de los fetos se ven afectados por transmisión vertical
4. El 80% no tienen secuelas
5. No existe vacuna
6. No se puede saber cuando hay reactivación o reinfeción en gestantes seropositivas

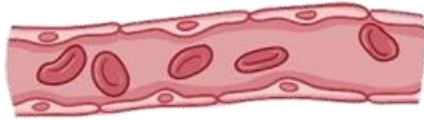
Agentes a EXCLUIR en el control serológico

1.A CMV



CONGENITAL CYTOMEGALOVIRUS

FETAL INFECTION → BIRTH DEFECTS



- └ CYTOPATHIC EFFECT
- └ BLOOD VESSEL INJURY



PETECHIAE JAUNDICE HEPATOSPLENOMEGALY MICROCEPHALY



SENSORINEURAL
HEARING LOSS
EYE ABNORMALITIES
INTELLECTUAL DISABILITY
DEVELOPMENTAL DELAYS
BEHAVIORAL DISORDERS
MOTOR DISABILITIES
SEIZURES

TREATMENT: SYMPTOMATIC NEWBORN

- └ GANCICLOVIR
- └ VALGANCICLOVIR

LONG TERM

- └ THERAPIES

CMV is short for **cyto-megalo-virus**

CMV is preventable



Pregnant women who already have young children, or who work with young children, are at highest risk of catching CMV

CMV is found in home and daycare settings



Avoid contact with saliva - Kiss kids under the age of 6 on the forehead instead of lips or cheek



75% of toddlers have CMV in their urine or saliva in studies at child-care settings



Wash your hands after contact with bodily fluids of kids under the age of 6



Don't share utensils, drinks, or toothbrushes with kids under the age of 6

NATIONAL
CMV
FOUNDATION

Agentes a EXCLUIR en el control serológico



1.B VVZ

Causa dos enfermedades

- Varicela
 - Infección primaria
 - Puede producir problemas en el feto o recién nacido
- Herpes zoster
 - Reactivación de virus latentes
 - No se asocia con morbilidad fetal o materna significativa



Casi toda la población en edad gestante está vacunada → incidencia baja

Riesgo de transmisión vertical de varicela es del 8-25%, no siempre afectando al feto

- Síndrome de varicela congénita:
 - 0.4-2.8% casos de varicela gestacional
 - Más incidencia en la primoinfección antes de las 20 semanas de embarazo
- Varicela neonatal
 - Consecuencia de primoinfección alrededor del momento del parto

Agentes a EXCLUIR en el control serológico



1.C VHS

VHS1

- Labial
- 10% de los casos de VHS
- Menor riesgo de transmisión vertical

VHS2 (5-10% población española)

- Genital
- 90% de los casos
- Tercera ETS más frecuente
- Mayor incidencia en mujeres
- Mayor riesgo de transmisión vertical

Incidencia en neonatos muy baja en España (1/3.000 – 1/20.000)

90% de las infecciones transmitidas durante el parto

Baja seroprevalencia → infección latente

Morbimortalidad elevada y/o secuelas permanentes neurológicas



Agentes a EXCLUIR en el control serológico



2. VHC

Seroprevalencia en España en mujeres en edad fértil <2%

Riesgo de transmisión vertical <5%

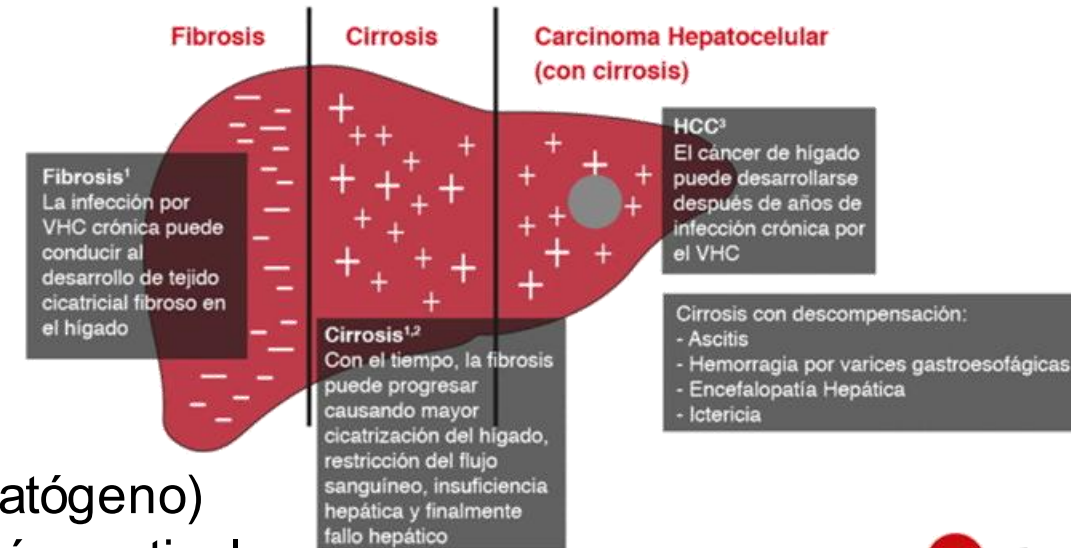
Mayor riesgo durante el parto

Detección serológica desaconsejada por:

- Ausencia de riesgo añadido de la infección neonatal
- Tratamiento no se aconseja antes de los 3 años (teratógeno)
- No hay medidas profilácticas para evitar la transmisión vertical
- No hay vacuna

NO se aconseja tampoco la cesárea programada ni la retirada de la lactancia

La infección crónica por el VHC puede conducir a enfermedad hepática crónica y cáncer de hígado



Agentes a EXCLUIR en el control serológico



3. Parvovirus B19

Riesgo de transmisión vertical del 25% si hay primoinfección al carecer de anticuerpos

Primoinfección en la gestante asociada a:

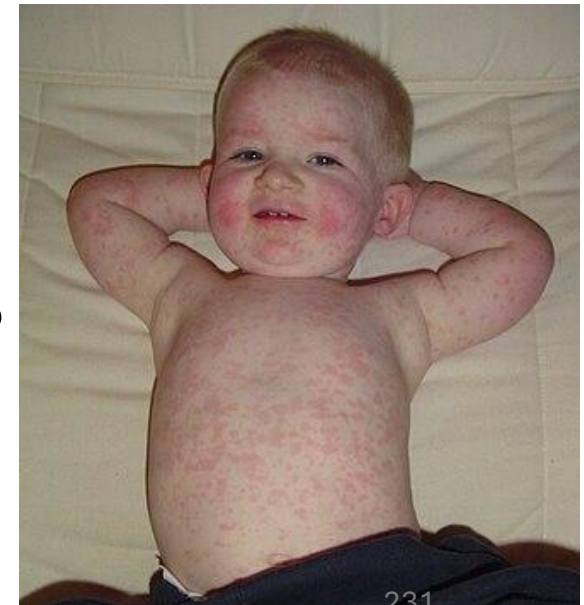
- Hidroplesia fetal: acumulación de líquido en cavidades fetales
- Hepatoesplenomegalia
- Insuficiencia cardíaca
- Anemia severa
- Aborto espontáneo o muerte fetal

La inmunidad materna protege de la transmisión vertical en reinfecciones

Seroprevalencia en mujeres en edad fértil de la Comunidad de Madrid del 72%

No existe vacuna eficaz

Bastante común en niños en edad escolar con síntomas eritomatosos





Agentes a EXCLUIR en el control serológico

4. Listeria monocytogenes

El control serológico no es fiable pues:

- No permite distinguir infecciones pasadas o presentes
- Reacciones cruzadas con otras bacterias dan falsos positivos
- Respuesta humoral variable

Es poco frecuente en el embarazo (0.5-1 casos por millón de habitantes)

No hay beneficio del cribado

Falsos positivos podrían llevar a tratamientos antibióticos innecesarios

Importante la prevención higiénico dietética:

- Lácteos no pasteurizados
- Embutidos y carnes poco hechas
- Pescados crudos o poco cocinados

Agentes a EXCLUIR en el control serológico



4. Listeria monocytogenes

SÍNTOMAS



Dolor de cabeza



Dolor muscular



Fiebre



Náuseas o diarrea



barazada contagiada de listeria

CONSECUENCIAS

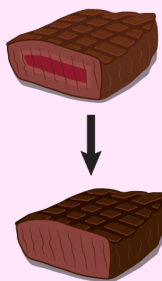


Riesgo de parto prematuro



Riesgo de muerte fetal intrauterina

PREVENCIÓN



Cocinar bien los alimentos



Lavar verduras, frutas y hortalizas



Lavarse las manos

Realización del control serológico



1. Consulta preconcepcional

- Preparar vacunas
- Conocer el estado serológico de la madre
- Informar a la mujer de los riesgos y precauciones que correspondan

2. Cada trimestre de la gestación

- Es lo más común pues lo anterior no suele darse

3. Momento del parto

- En embarazos no controlados
- Evitar la transmisión de enfermedades durante el parto
- Sífilis, VHB y VIH
- Se realizan con urgencia



Determinación serológica primera visita



Consulta preconcepcional o 1er trimestre de gestación

Se hacen análisis de anticuerpos contra:

- Rubeola (IgG)
 - Identificar pacientes seronegativas → precauciones higiénicas
 - Si dan positivo se consideran protegidas y por tanto también el feto
- Toxoplasma gondii (IgG)
 - Identificar pacientes seronegativas → precauciones higiénicas
 - Si dan positivo se consideran protegidas y por tanto también el feto
- Treponema pallidum (sífilis)
 - Si dan positivo se pone tratamiento
- VIH
 - Si dan positivo se pone tratamiento

Determinación serológica 2º y 3º trimestre



2º Trimestre

Se repiten análisis de anticuerpos contra:

- Toxoplasma gondii (IgG)

3º Trimestre

- Toxoplasma gondii (IgG)
- VIH
- VHB

Gestantes sin controlar

- Sífilis
- VIH
- VHB

Sección II: Laboratorio de microbiología

TEMA 10

Diagnóstico del VIH

Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio

El VIH – generalidades y patogenia

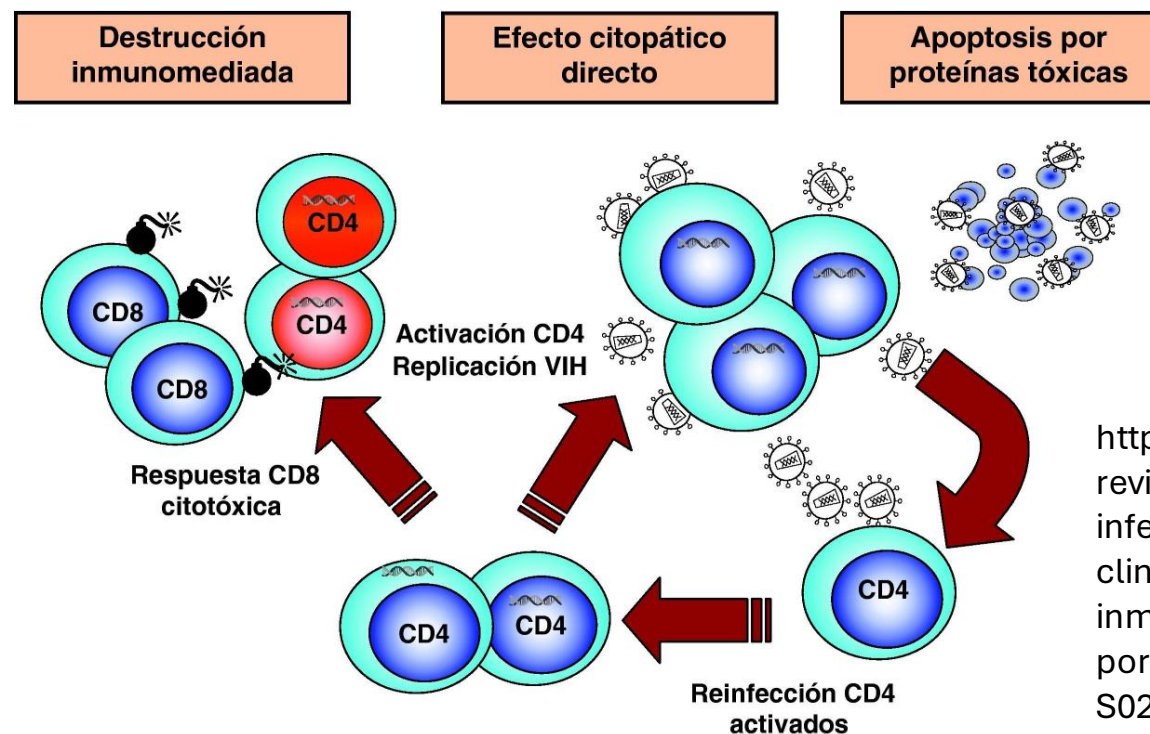
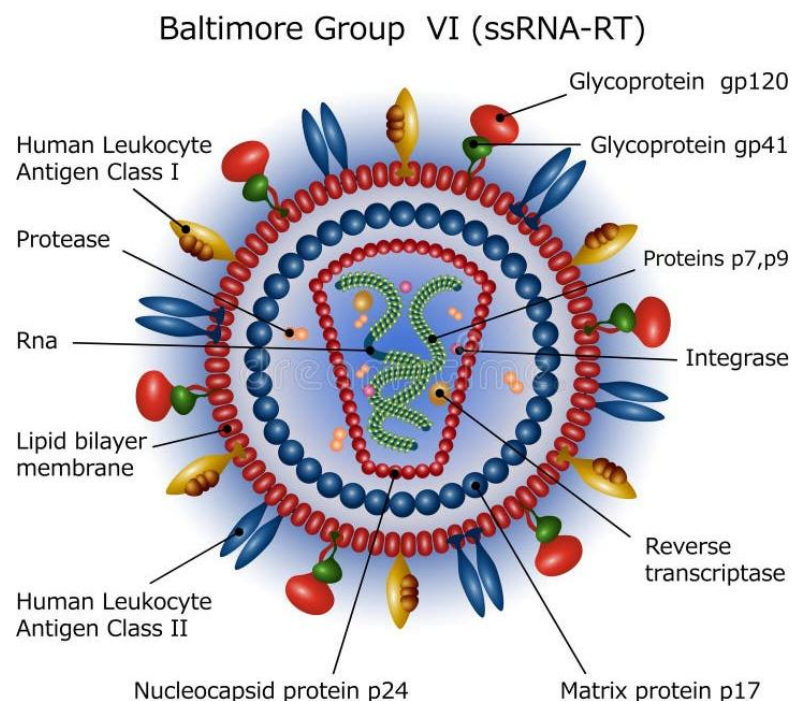


Virus de inmunodeficiencia humana

Identificado en 1983 → técnicas de diagnóstico microbiológico

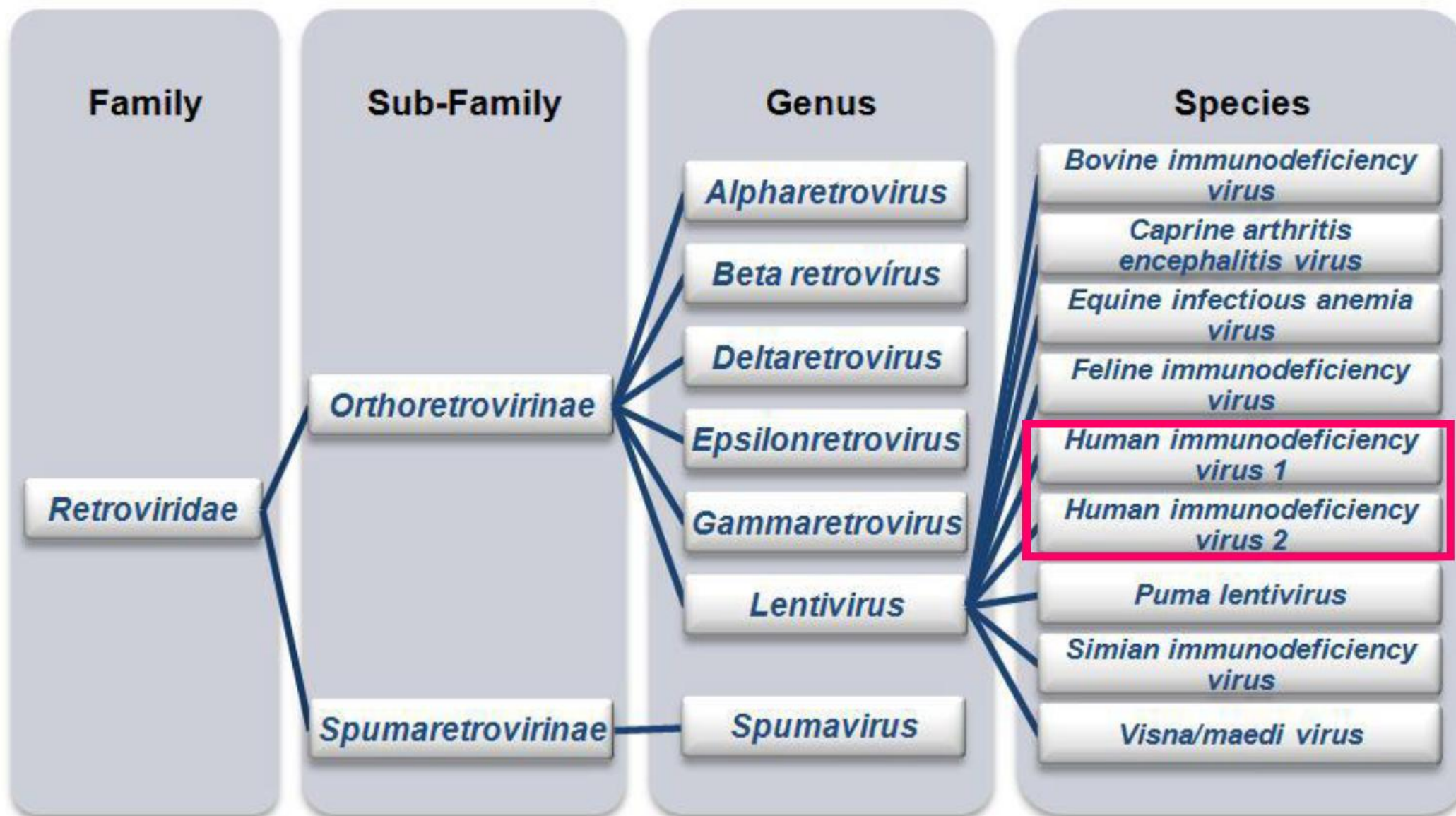
Década de los 90 determinación de carga viral plasmática (CVP)

Principios de siglo técnicas de secuenciación para identificar resistencias a antirretrovirales



<https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-inmunopatogenia-infeccion-por-el-virus-S0213005X11000073>

El VIH - filogénesis



El VIH - variantes

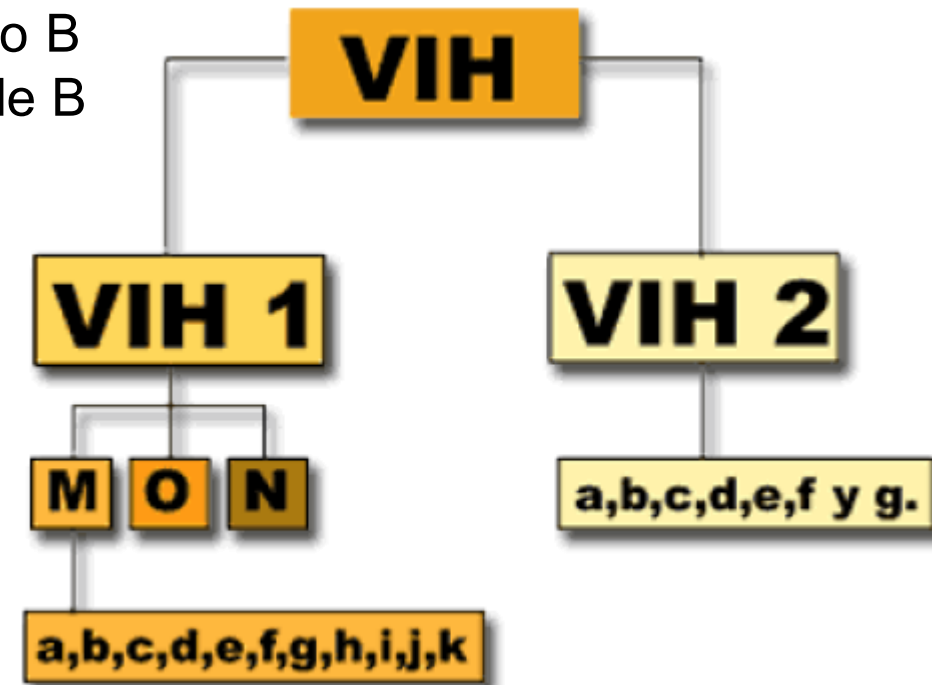


VIH Variante 1

- Se divide en tres grupos M (main), O (outlier) y N (no M no O)
- El grupo M tiene 11 subtipos A-K
- En España y Portugal la mayoría de los aislados son subtipo B
- A nivel mundial los más habituales son subtipo A, seguido de B
- El subtipo A es más patogénico
- El subtipo B tienen una virulencia intermedia
- Los subtipos C-G son menos virulentos

VIH Variante 2

- Tiene 7 subtipos A-G
- Se localiza principalmente en países africanos
- El epicentro de infección está en Guinea-Bissau



El VIH - estructura

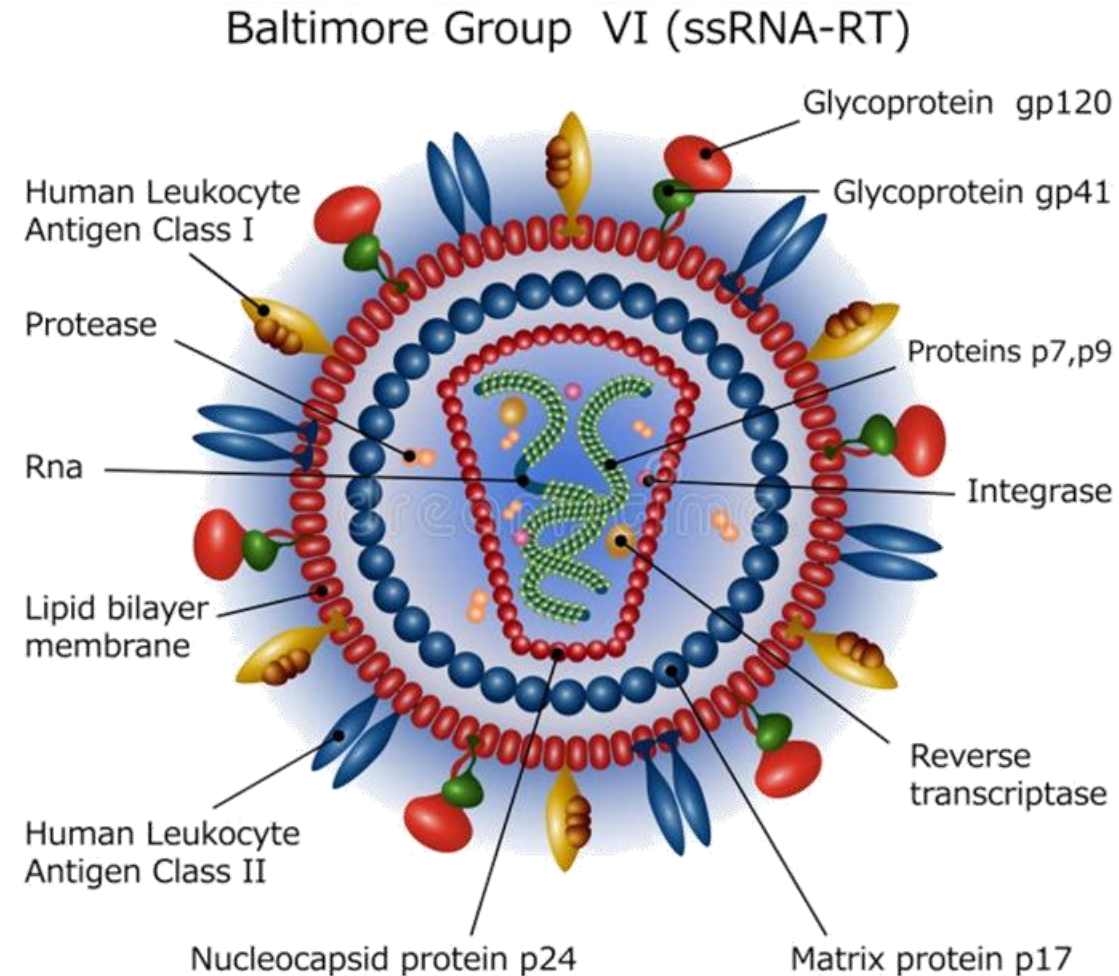


Envoltura lipídica

- gp120
 - Se une al receptor CD4 y a los correceptores CCR5 o CXCR4
 - Es uno de los principales antígenos detectados
- gp41
 - Permite la fusión del virus con la célula
 - Genera anticuerpos detectables

Cápside

- p24
 - Proteína que conforma la cápside
 - El antígeno p24 aparece en sangre antes que los anticuerpos
 - Se usa en las pruebas de 4ª generación
 - Fundamental para reducir el periodo ventana



Sensibilidad VS Especificidad



Sensibilidad: capacidad de detectar correctamente a individuos enfermos

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

Especificidad: capacidad de detectar correctamente a individuos sanos

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{FP + VN}$$

	Condición o enfermedad presente	Condición o enfermedad ausente	
Prueba positiva	VP	FP	Total de sujetos con prueba positiva
Prueba negativa	FN	VN	Total de sujetos con prueba negativa
	Total de sujetos enfermos	Total de sujetos sin enfermedad	n Total de sujetos incluidos

Infección aguda y periodo ventana



Inicialmente el virus se replica sin resistencia inmune

Aumento del RNA viral

Aumento antígeno p24

Carga viral disminuye por aumento de anticuerpos

Periodo ventana: periodo de tiempo en que la infección aguda no es detectable debido la sensibilidad de la técnica

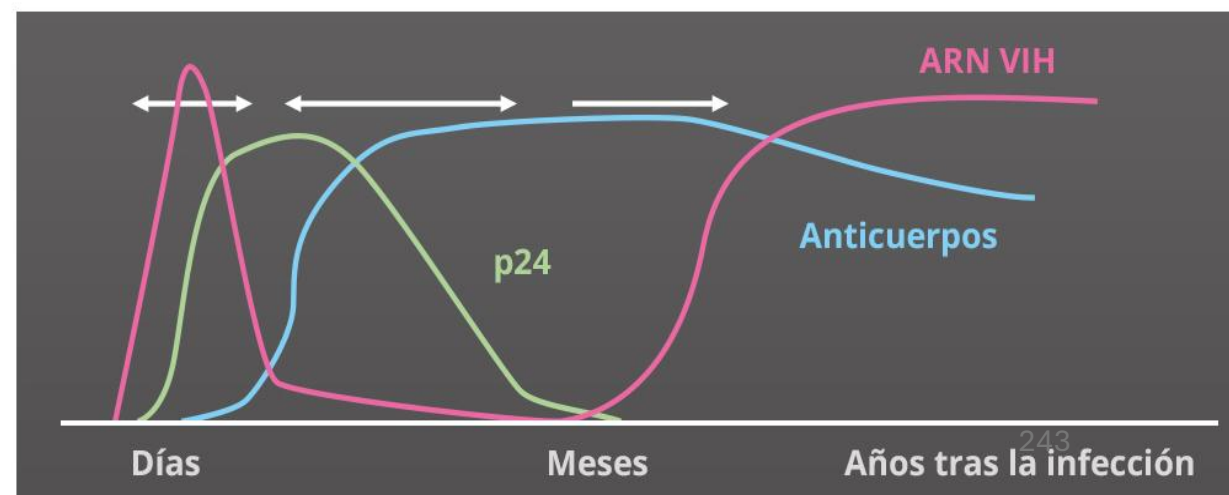
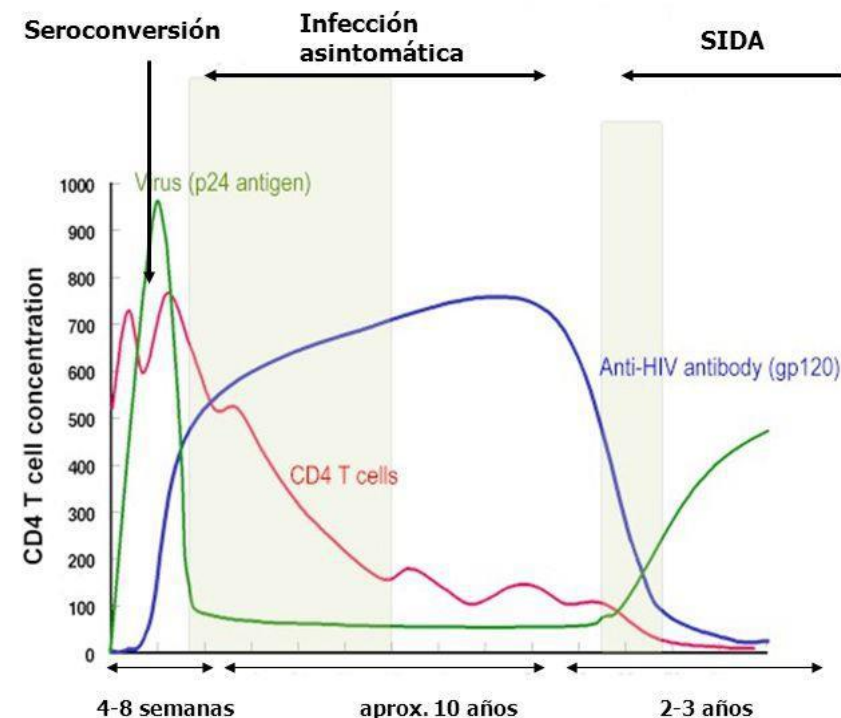
Sin tratamiento el sistema colapsa:

Aumento del RNA viral

Aumento p24

Caída de CD4

Caída de producción de anticuerpos





Detección de anticuerpos específicos en suero o plasma

1. Recogida de la muestra
2. Transporte
3. Recepción en el laboratorio
4. Análisis
5. Interpretación
6. Informe de los resultados



1. Recogida de la muestra



A partir de **sangre** del paciente

El personal de los puntos de extracción tiene que:

- Identificar minuciosamente la muestra
- Guardar la confidencialidad
- Llevar a cabo la extracción con medidas de seguridad
- Mantener un sistema de registro que minimice errores



A partir de muestra de **saliva**

Más empleada en test de autodiagnóstico

Se obtiene mediante un isopo → pruebas rápidas

Deben ser confirmadas en un laboratorio clínico



2. Transporte de la muestra



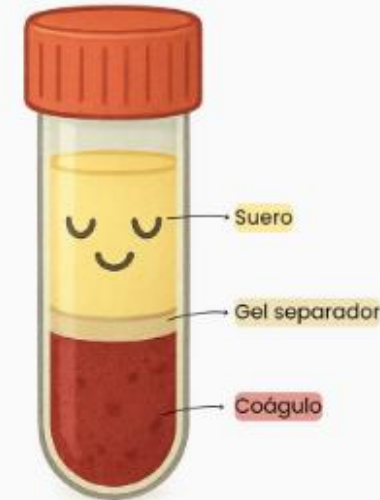
El suero:

No puede estar más de 24h a temperatura ambiente

No puede estar más de 7 días en nevera (2-8°C)



Suero

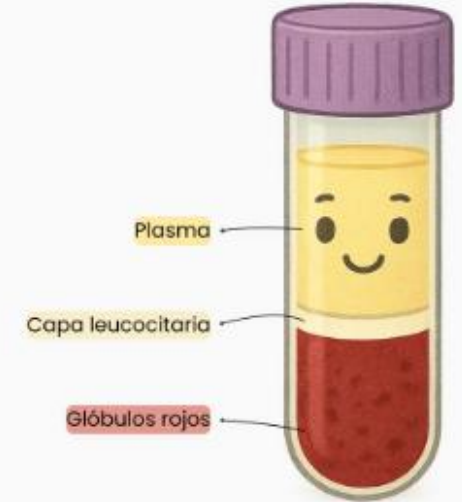


- Sin anticoagulante

- Sin factores de coagulación (sin fibrinógeno)

- Obtenido por centrifugación de sangre coagulada

Plasma



- Con anticoagulante (ej: EDTA, heparina...)

- Con factores de coagulación (con fibrinógeno)

- Obtenido por centrifugación de sangre no coagulada

SUERO = PLASMA - factores de coagulación

3. Recepción de la muestra



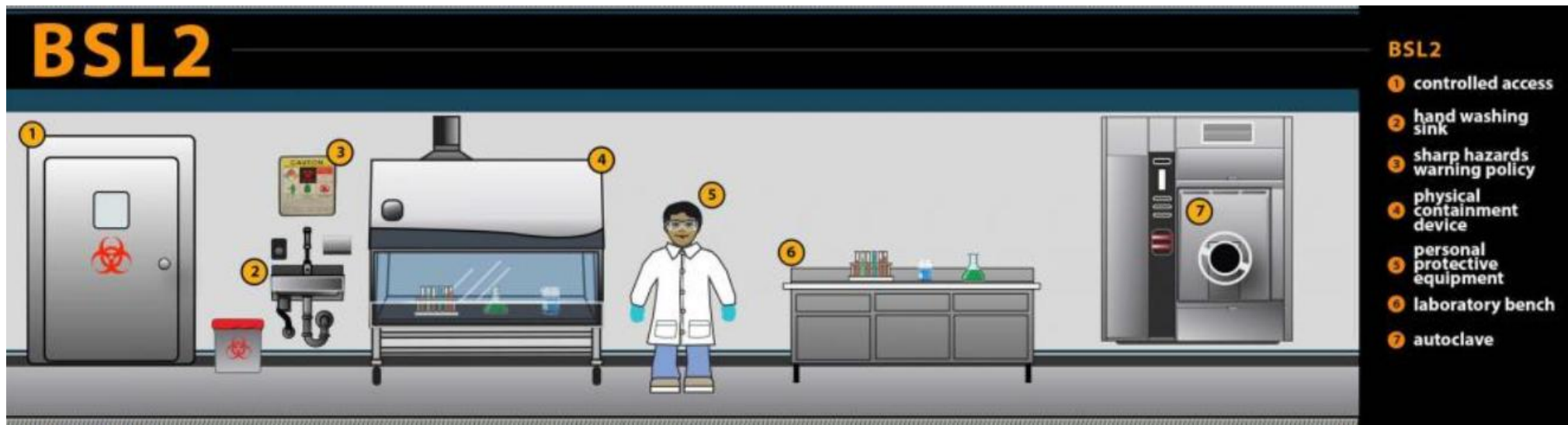
El laboratorio receptor tiene que tener un sistema de recepción y registro para evitar errores

Utilizar equipos de bioseguridad nivel 2 para evitar contagios

Todas las muestras humanas se manipulan como potencialmente infecciosas

EPIs:

- Guantes
- Gafas protectoras
- Bata
- Contenedores de residuos
- Mascarilla
- Cabina de flujo de nivel 2



4. Análisis



Detección de anticuerpos anti VIH-1 o VIH-2

Detección de anticuerpos anti VIH-1 o VIH-2
+
Detección del antígeno p24 del VIH-1

Los ensayos serológicos pueden tener fines:

➤ De **cribado**

- Identifican muestras reactivas
- Tienen una mayor sensibilidad → pocos falsos negativos
- CLIA (Chemoluminescence immunoassay)

➤ De **confirmación**

- Permiten conocer si las muestras reactivas contienen anticuerpos específicos para VIH1 o VIH2
- Tienen una mayor especificidad → pocos falsos positivos
- WB (Western blot), LIA (Lineal immunoassay)

4. Análisis – Cribado



Las técnicas tienen una alta sensibilidad para identificar a todos los pacientes que puedan ser positivos para el VIH

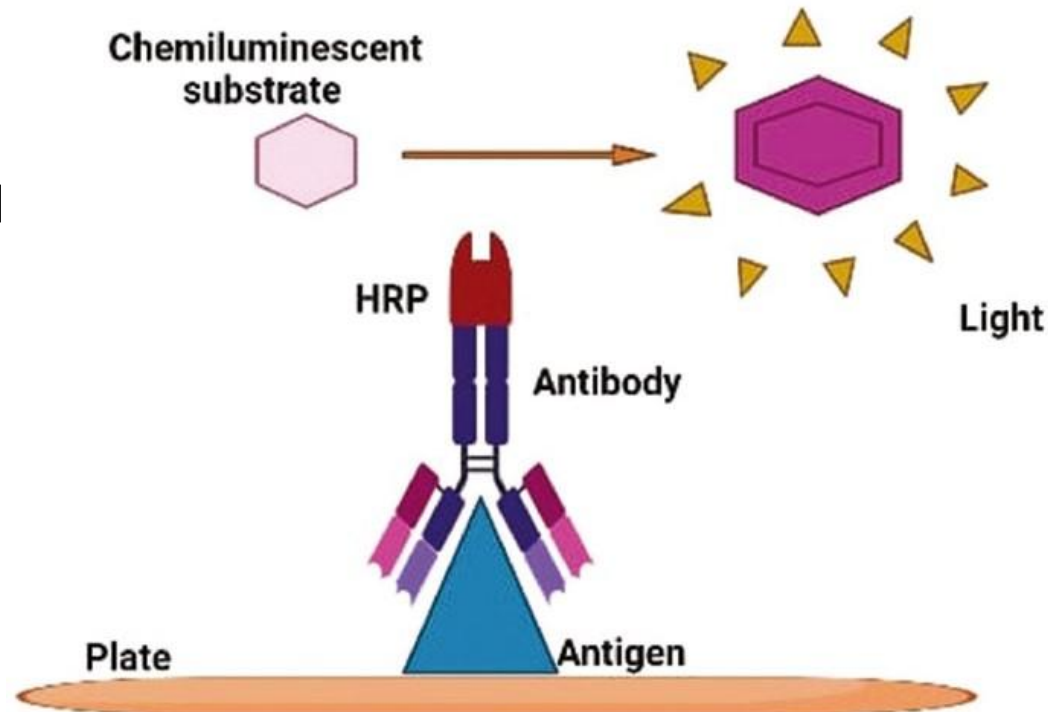
Puede dar falsos positivos, pero estos se descartarán con las pruebas de confirmación

La técnica más utilizada es la CLIA por medio de equipos automáticos

No diferencia entre VIH-1 y VIH-2

Han ido evolucionando en sensibilidad

- 1ª generación
- 2ª generación
- 3ª generación
- 4ª generación



4. Análisis – Cribado



1ª generación

Detecta IgG frente VIH-1

Antígeno: lisado viral (gp120, gp41, p24)

Baja sensibilidad

Reacciones cruzadas → más falsos positivos

Periodo ventana de 6-8 semanas

2ª generación

Detecta IgG frente VIH-1 y VIH-2

Antígeno: péptidos sintéticos (gp120, gp41, p24)

Más sensible que la 1ª

Menos falsos positivos

Periodo ventana de 4-6 semanas

3ª generación

Detecta IgM e IgG frente VIH-1 y VIH-2

ELISA tipo sandwich

Alta sensibilidad

Periodo ventana de 3-4 semanas

4ª generación

Detecta IgM e IgG frente VIH-1 y VIH-2 y antígeno p24

ELISA y CLIA combinados

Alta sensibilidad y especificidad

Prueba estándar de cribado hoy en día

Periodo ventana de 2 semanas

4. Análisis – Confirmación



Diferencia ambas variantes mediante la detección de anticuerpos contra antígenos específicos

VIH-1: gp160, gp41, p31 y p24

VIH-2: gp140, gp36

Western blot (WB)

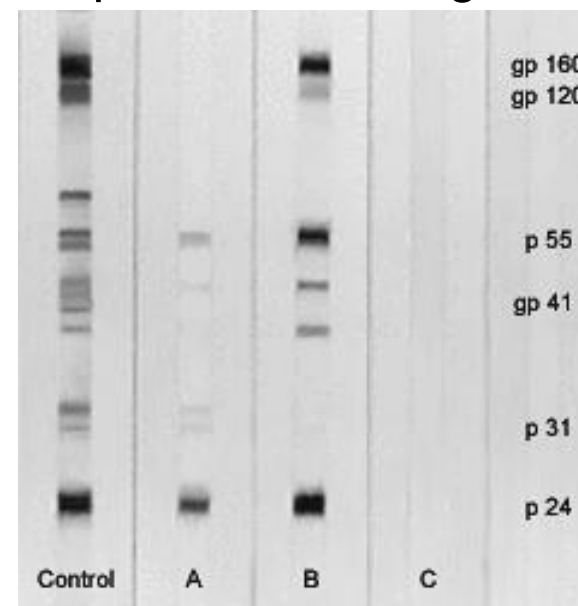
Muy específico

Detección directa de antígenos

Interpretación compleja y subjetiva

Técnica laboriosa

En desuso



Inmunoensayo en línea (LIA)

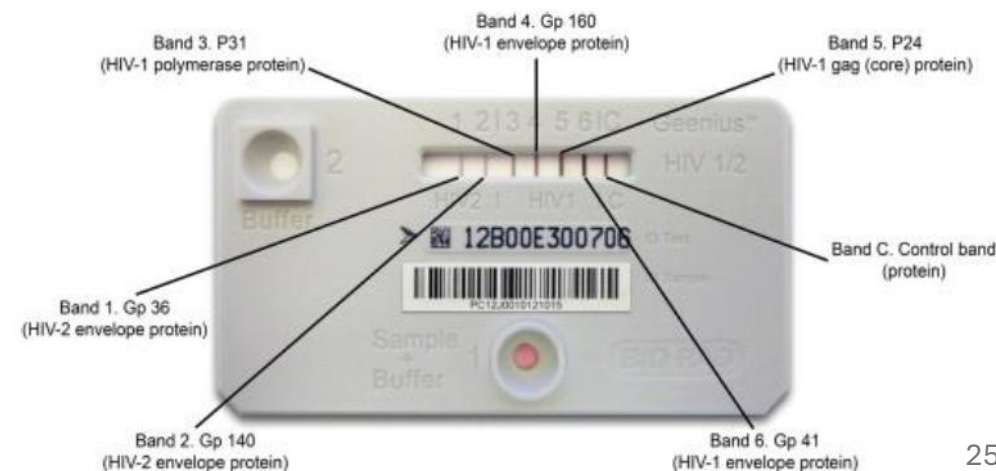
Muy específico

Detección de anticuerpos específicos

Mejor estandarización que WB

Fácil de interpretar

Uso hoy en día



5. Interpretación de resultados



La combinación de pruebas de cribado y de confirmación hace que la sensibilidad y especificidad del diagnóstico sea superior al 99%

Aún así se pueden dar falsos positivos por:

- Enfermedades autoinmunes
- Errores de identificación de la muestra
- Hemólisis
- Otras infecciones virales

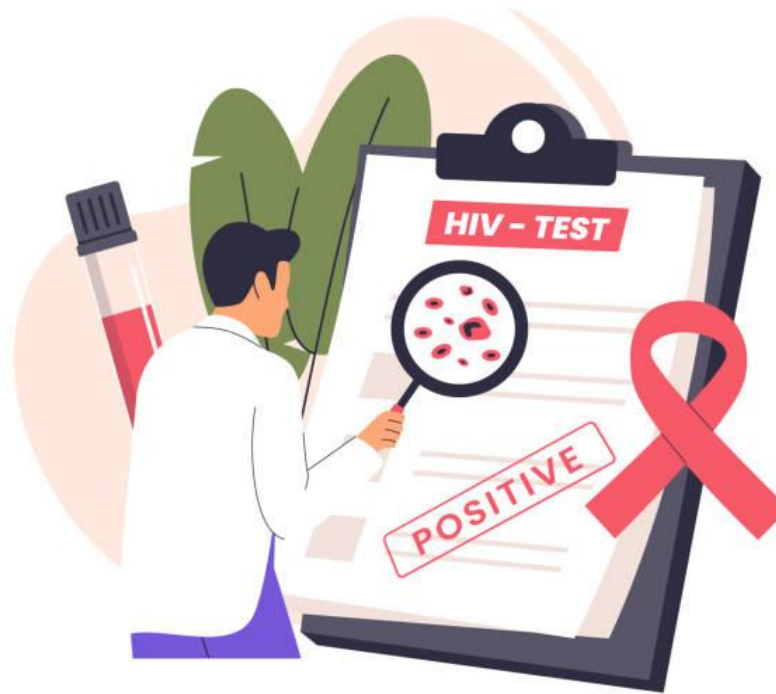
	Condición o enfermedad presente	Condición o enfermedad ausente	
Prueba positiva	VP	FP	Total de sujetos con prueba positiva
Prueba negativa	FN	VN	Total de sujetos con prueba negativa
	Total de sujetos enfermos	Total de sujetos sin enfermedad	n Total de sujetos incluidos

6. Informe de los resultados

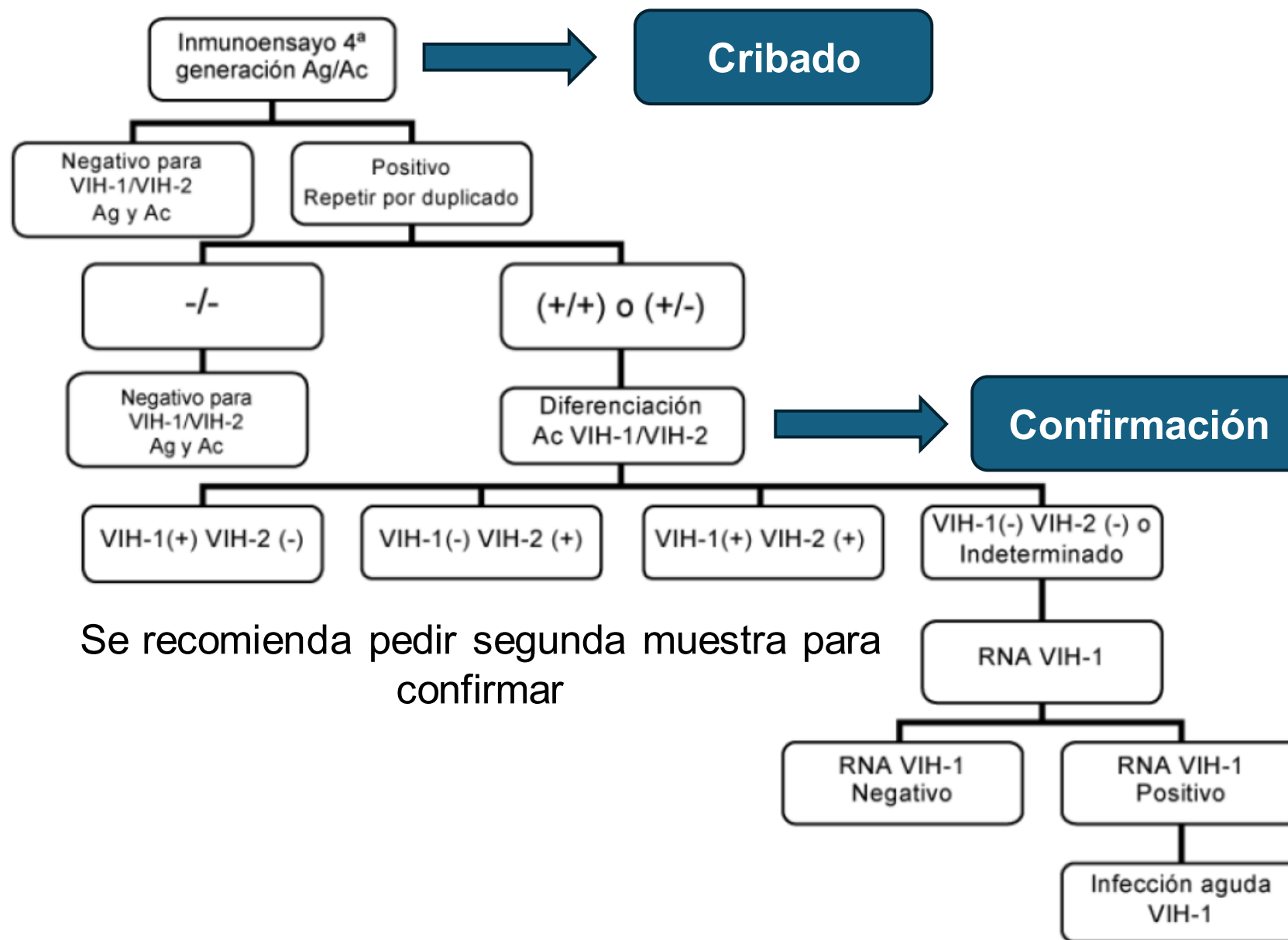


El informe debe ser **claro, conciso y fácil de interpretar**

Si no se llega a una conclusión se debe llevar a cabo el protocolo necesario para un diagnóstico concluyente



Algoritmo de diagnóstico



Pruebas de diagnóstico rápido



Están consideradas como pruebas de cribado

Detectan la presencia de anticuerpos VIH-1, VIH-2 y/o antígeno p24 del VIH-1

Inmunocromatografías rápidas (15-30 mins)

Se hacen con saliva o sangre de punción digital

Tienen que confirmarse en el laboratorio porque:

- Lectura es subjetiva
- Sensibilidad y especificidad menores a las pruebas de laboratorio
- Tienen un periodo ventana mayor a las pruebas de cribado de 4ª generación



Profilaxis postexposición



En la exposición accidental al VIH se puede aplicar profilaxis

Aún así se hace seguimiento a los 20 días por serología

3.196 nuevos casos de VIH en 2023

3.340 nuevos casos de VIH en 2024

La existencia de tratamiento y profilaxis hace descender la percepción de riesgo

La incidencia es mayor en HSH y en inmigrantes siendo desafíos importantes para la prevención

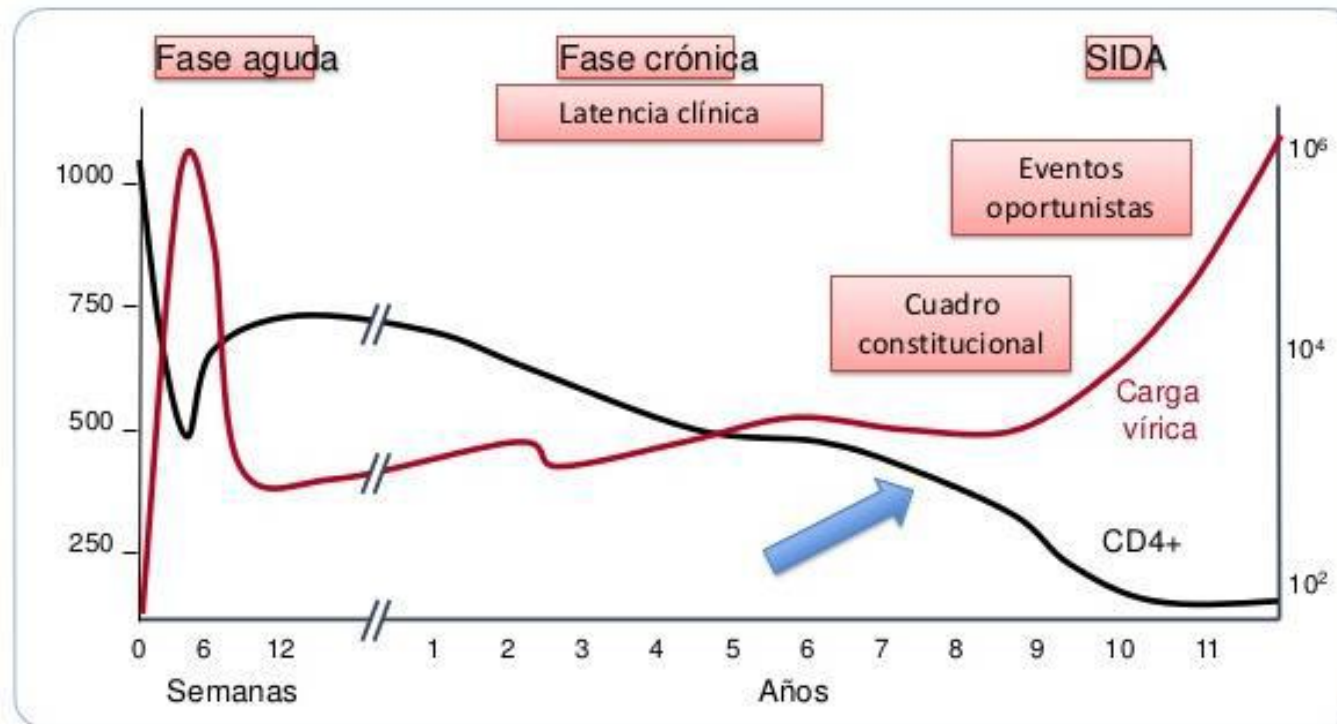


Seguimiento de la efectividad antirretroviral



Para el seguimiento de la efectividad del tratamiento antirretroviral se emplean:

- Carga viral plasmática: logaritmo del número de copias de RNA por ml de sangre
- Numero de linfocitos CD4



La disminución del número de linfocitos T CD4 conduce al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)

Aplicaciones del análisis genómico del VIH



El análisis genómico del VIH es más costoso que los inmunoensayos

Sin embargo, se usa para:

1. Determinación de la carga viral plasmática
2. Diagnóstico neonatal
3. Diagnóstico de resistencia a antirretrovirales
4. Determinación de tropismo viral



1. Determinación de la carga viral plasmática



Se hace por medio de una PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

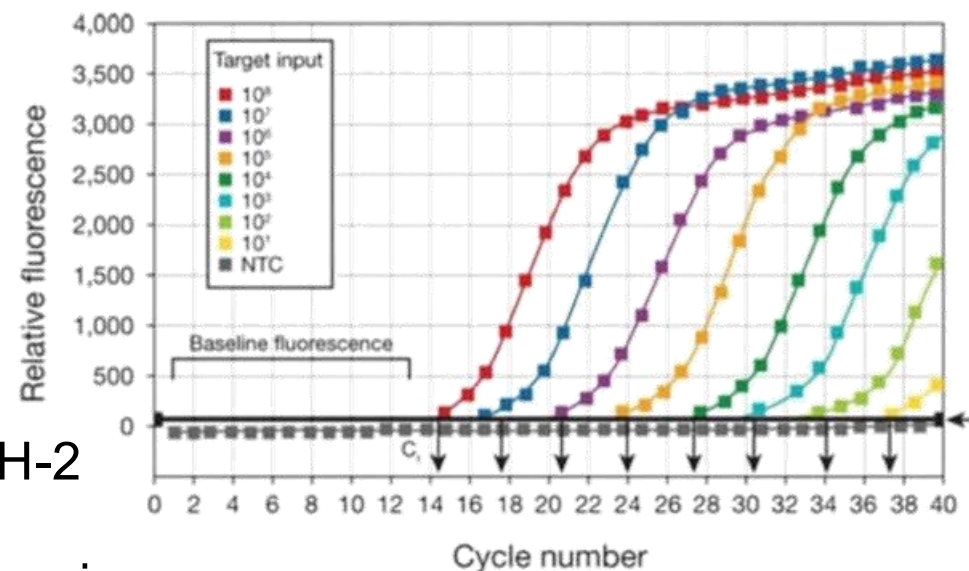
Están automatizadas para

- Extracción de ARN
- Amplificación
- Cuantificación

Detecta VIH-1 pero no el VIH-2

Umbral en clínica de 15-20 copias

En los laboratorios de investigación son más sensibles



SYBR Green

Denaturation

Primer

SYBR Green I

Primer

Annealing

Extension

1. Determinación de la carga viral plasmática



El objetivo del tratamiento es reducir la CVP a valores por debajo de límites de detección en 16-24 semanas

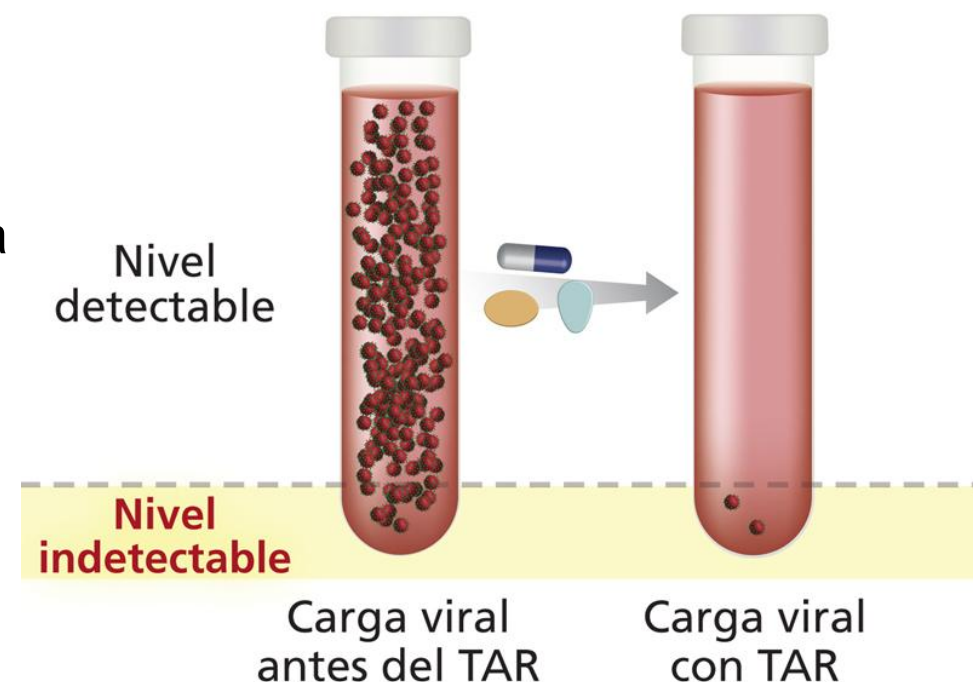
El fracaso de este objetivo supone resistencia a la terapia antirretroviral

Una alta carga viral implica mayor posibilidad de transmitir la enfermedad

La transmisión es poco probable con carga viral plasmática inferior a 1.000 copias por ml de sangre

La determinación de carga viral para el diagnóstico solo se usa cuando el test confirmatorio es negativo tras un test de cribado positivo

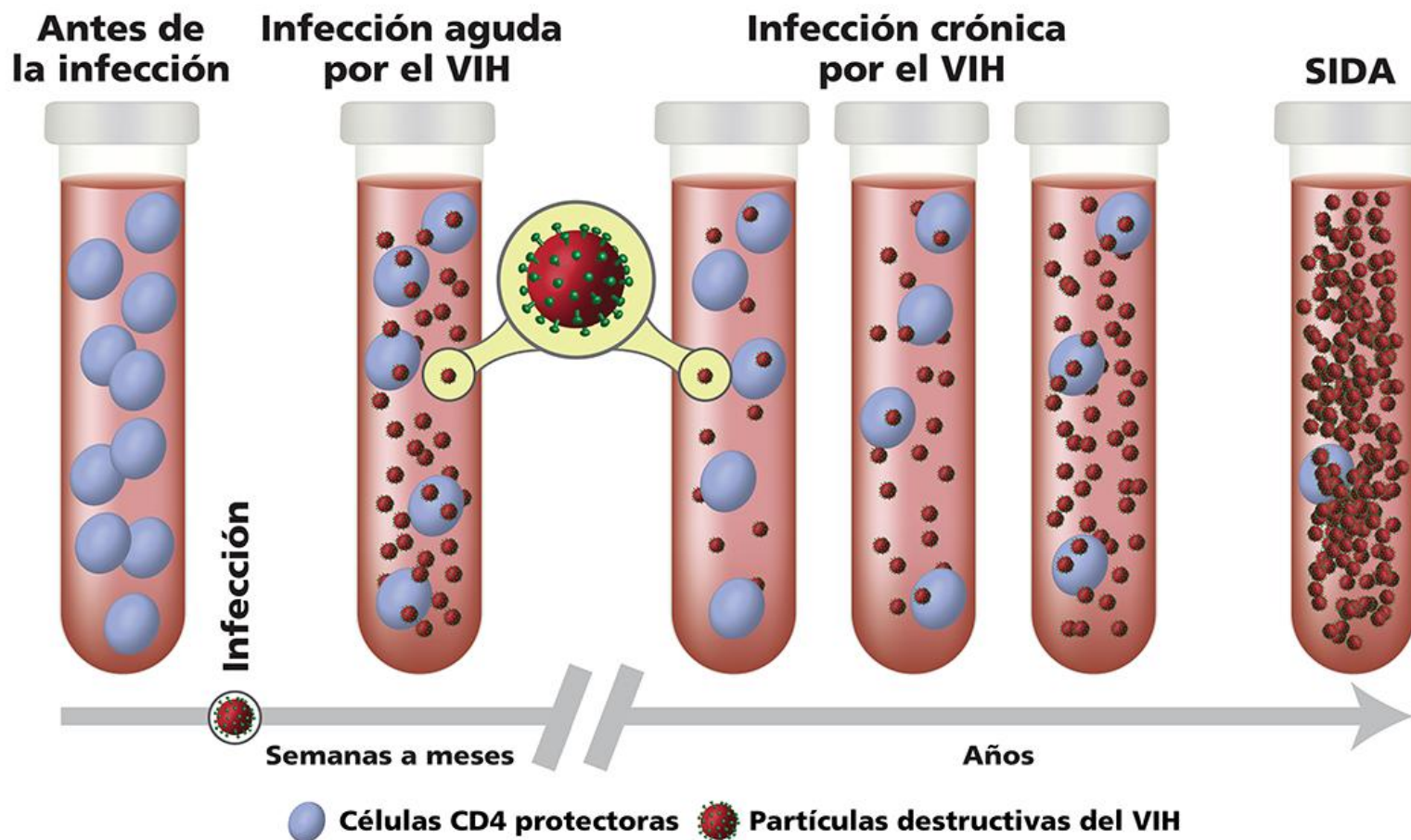
Carga viral indetectable



1. Determinación de la carga viral plasmática



Evolución de la infección por el VIH



Para obtener más información, visite HIVinfo.NIH.gov/es.



2. Diagnóstico neonatal



Reciben IgG de la madre por lo que pueden dar falsos positivos

Detección de contagio por medio de antígeno p24

El procedimiento habitual es detectar la viremia por qPCR

Se hace seguimiento serológico y viral durante 6 meses - 1 año hasta que se negativice



La cuantificación de RNA viral no se hace como prueba de cribado por no ser coste efectiva (adelanta el diagnóstico en unos 3-5 días solamente)

3. Diagnóstico de resistencias



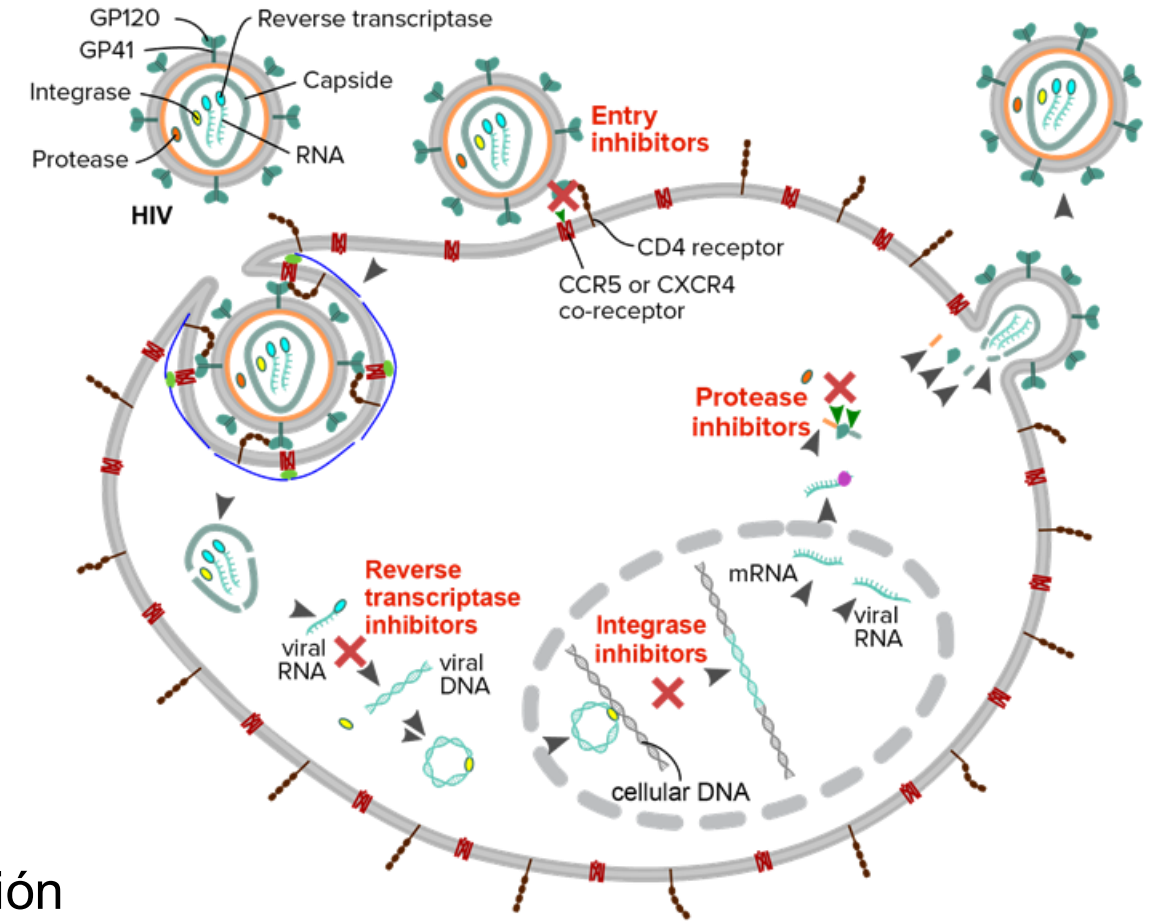
Para detectar resistencias se usan:

Métodos fenotípicos

- De forma empírica por fracaso de TAR

Métodos genotípicos

- Identificación de mutaciones que producen resistencia por secuenciación
- Mutaciones complejas y diversas
- Mutaciones no estandarizadas
- Informe ha de ir acompañado de interpretación de facultativo



3. Diagnóstico de resistencias



ARV	Polimorfismos naturales en VIH-2	Impacto clínico
Inhibidores de la transcriptasa inversa	T69N, V75I, T215S, K219E (RT)	Sensible a ITIAN
Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleótidos	Y181I/V, Y188L, G190A (RT)	Resistencia natural a NVP/EFV No recomendados ETR/RPV
Inhibidores de la proteasa	L10V, V32I, M36I, M46I, I47V, Q58E, A71V/I, G73A, V82I, L89I/V (PR)	Sensibles LPV/DRV/SQV No recomendados APV/ATV/TPV
Enfuvirtida	N42Q y N43Q (gp41)	Resistencia natural a T20
Inhibidores de la integrasa	L74I (IN)	Sensibles RAL/EVG/DGV
Maraviroc	Uso varios co-receptores	Actividad <i>in vitro</i> en aislados R5

4. Determinación de tropismo viral



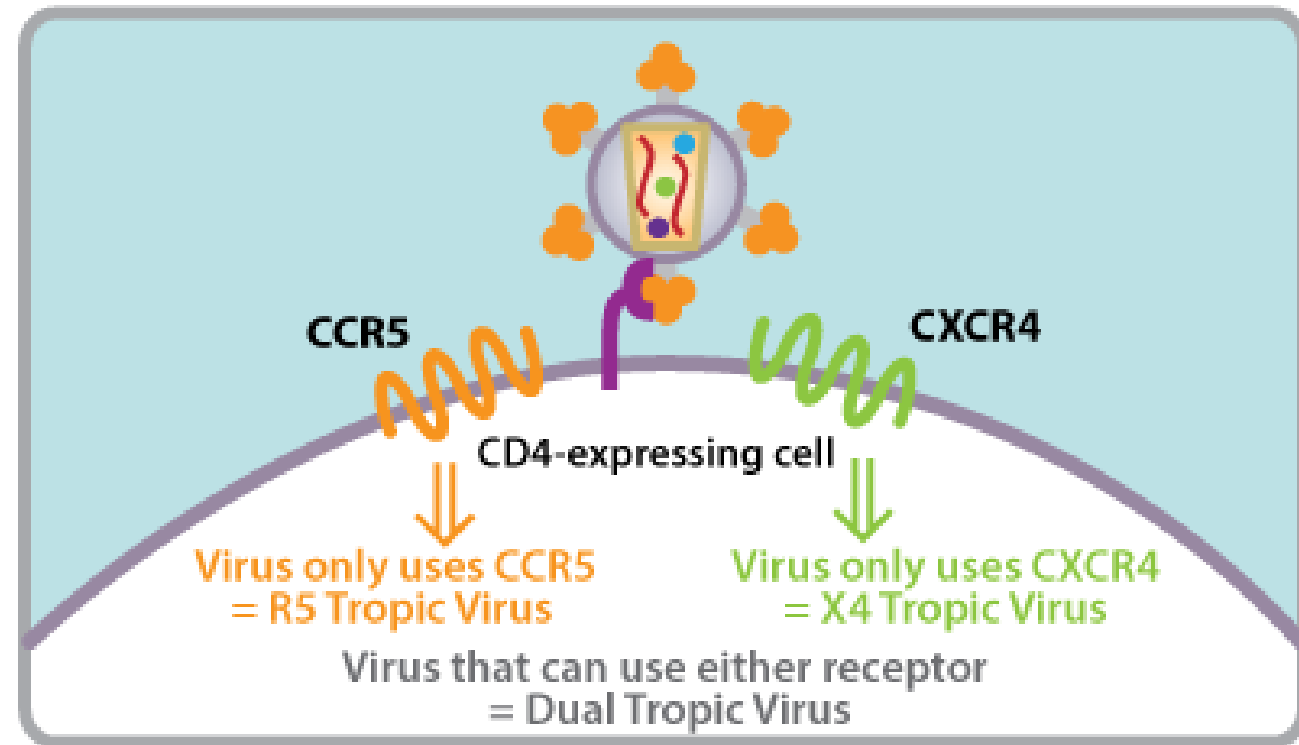
El VIH puede valerse de los receptores de quimioquinas CCR5 o CXCR4 para entrar en las CD4

Esto determina las variantes

- R5-trópicas
- X4-trópicas
- Duales o mixtas

El interés de la identificación de este tropismo viral reside en el desarrollo de terapias antirretrovirales que bloquean estos receptores impidiendo la entrada del virus

El maraviroc bloquea CCR5 siendo eficaz contra variantes R5-trópicas pero ineficaz contra variantes X4 trópicas



4. Determinación de tropismo viral



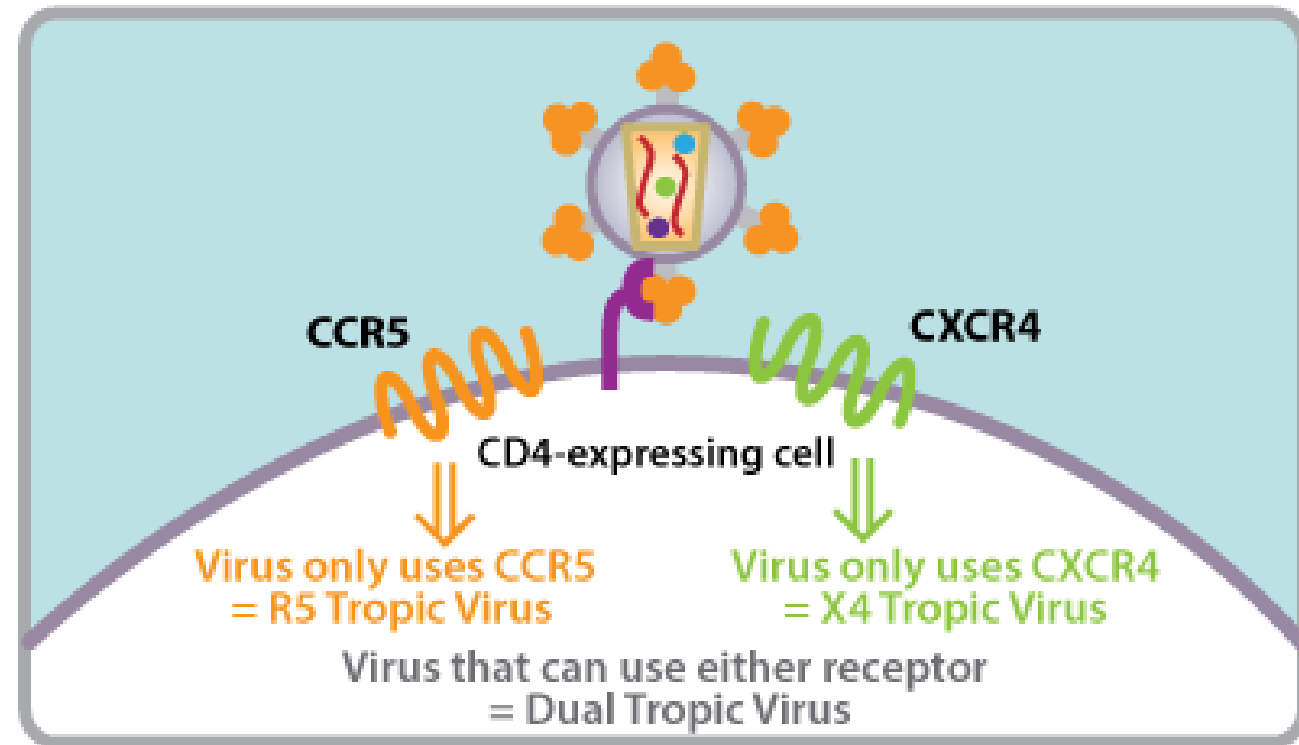
El tropismo viral se puede determinar por métodos

Fenotípicos

- Costosos
- Complicados técnicamente
- Complicados logísticamente

Genotípicos

- Análisis de secuenciación gp120
- Más rápidos
- Más factibles
- Más económicos



Se hacen estas determinaciones en pacientes con fracaso en el tratamiento con antagonista de CCR5 (Maraviroc)

Sección II: Laboratorio de microbiología

TEMA 11

Diagnóstico de la gripe

Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio

Nacho Escrig, PhD

El virus de la gripe



Pertenece a la familia *Orthomyxoviridae* que incluye:

Thogotovirus

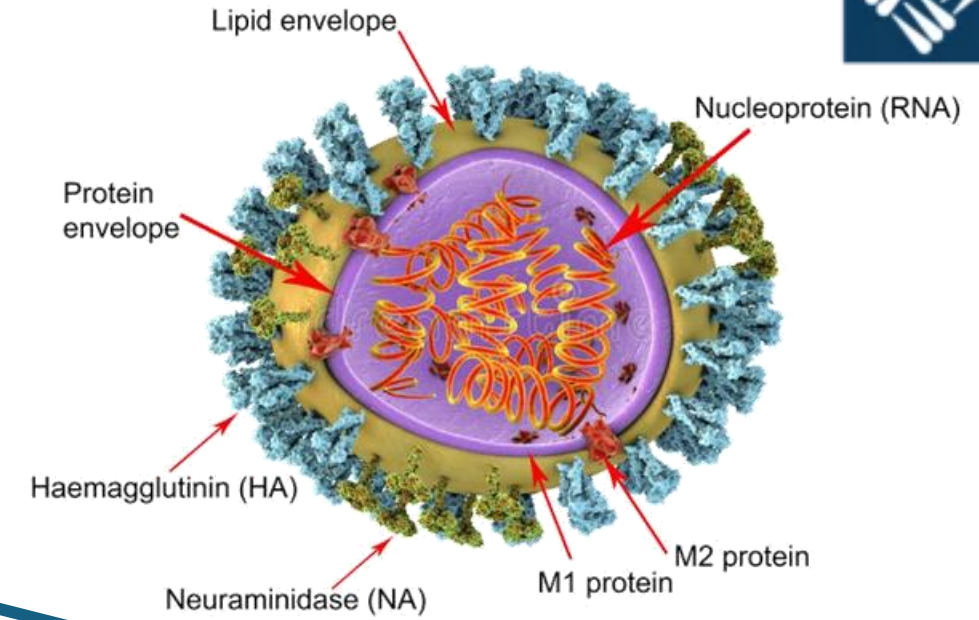
Isovirus

Influenza → causante de la gripe

TIPO A

TIPO B

TIPO C

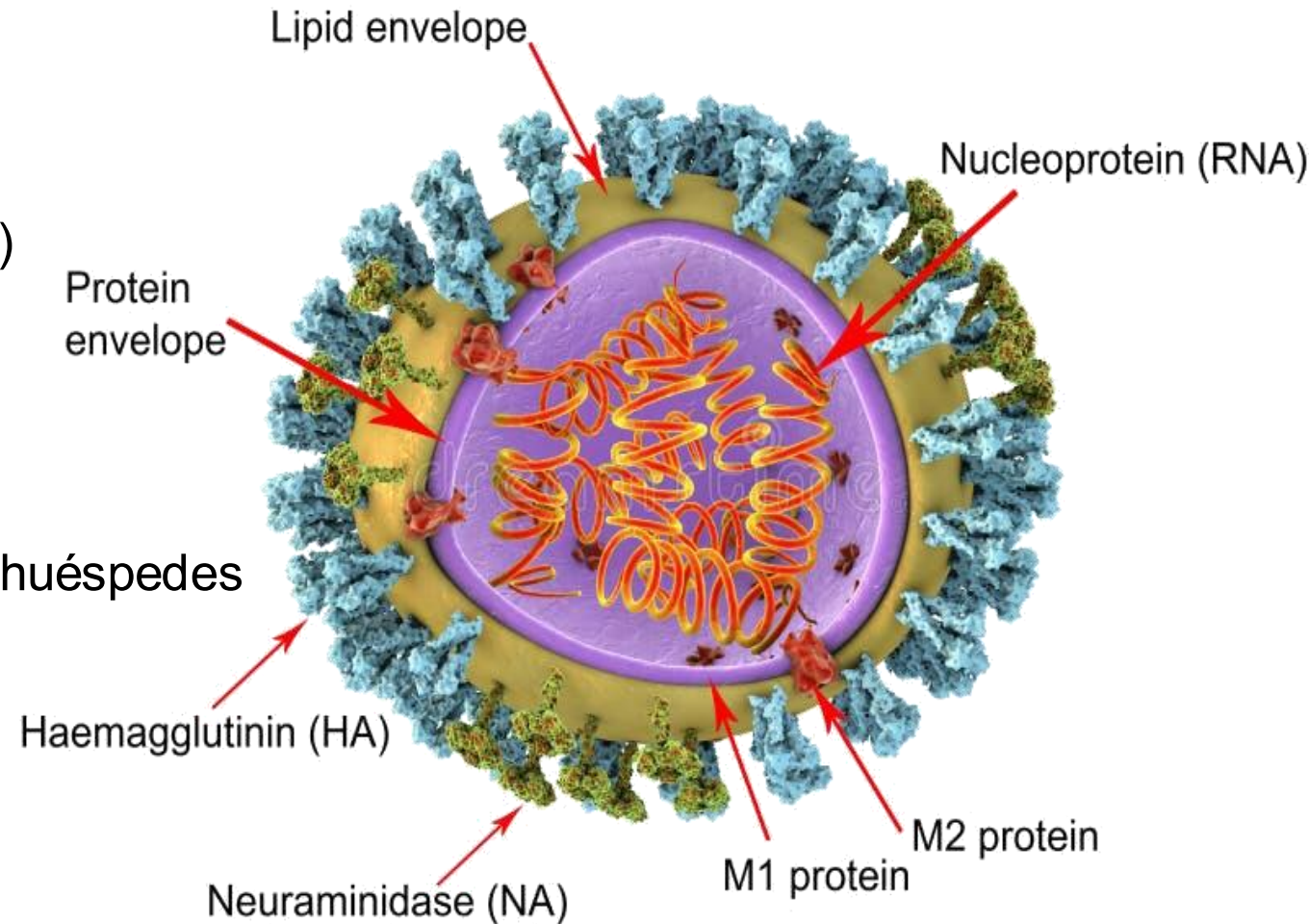


Morfología

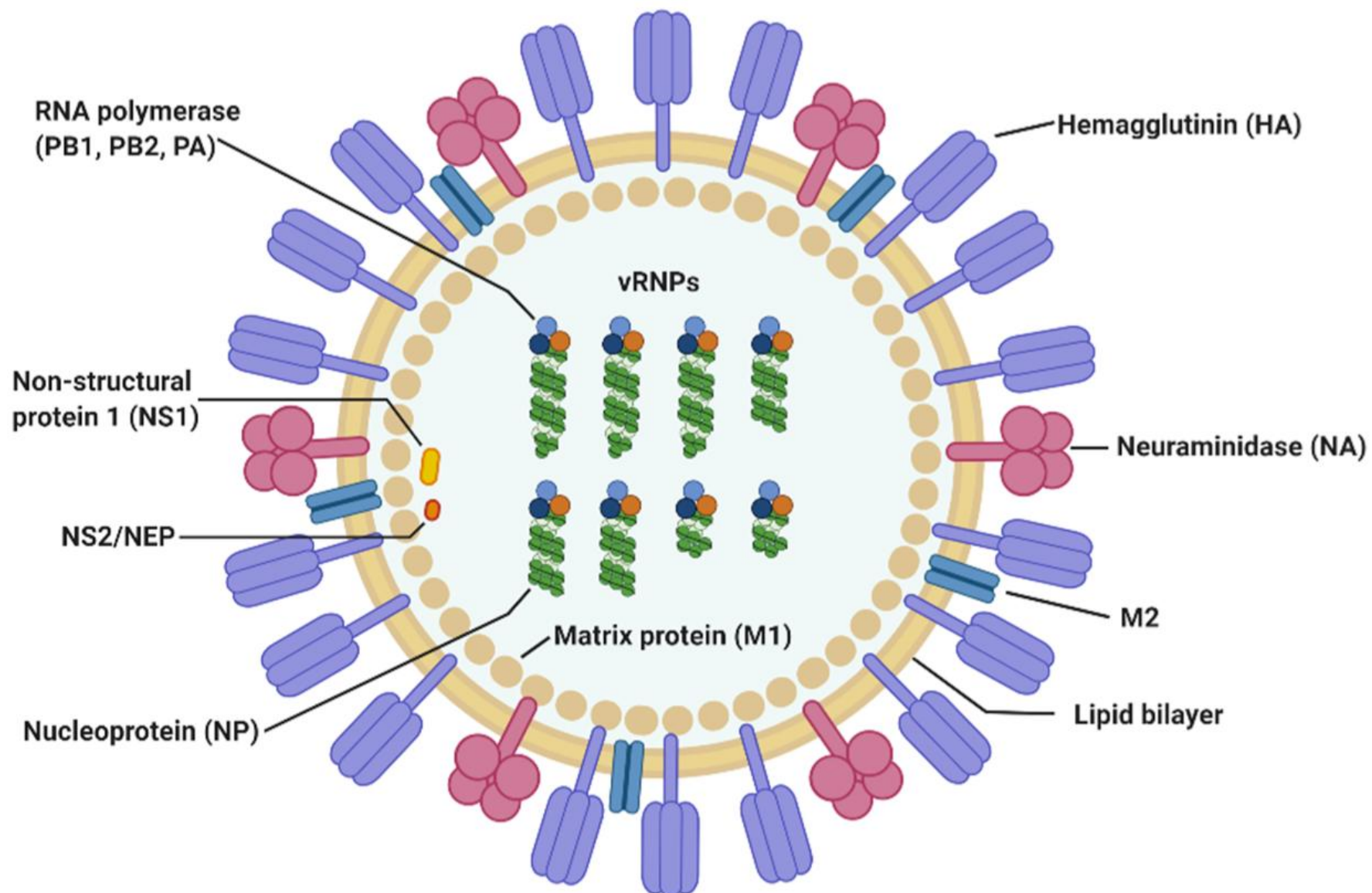


Virus envueltos con RNA de cadena sencilla y polaridad negativa

- RNA está **segmentado** en:
 - 8 segmentos: Influenza A y B
 - 7 segmentos: Influenza C
- El RNA se asocia a **nucleoproteínas** (NP) formando complejos
- **Nucleocápside** (RNA+NP+Polimerasas) de simetría **helicoidal**
- **Envuelta lipídica** derivada de las células huéspedes
- **Glicoproteínas de superficie**
 - Hemagglutinina (HA)
 - Neuraminidasa (NA)
 - Proteína M2
- **Proteína matriz** (M1)



Morfología



Morfología



Hemagglutinina (HA):

- Es importante para producir la reacción inmune
- Se une a los ácidos siálicos de las células del huésped
- Estimula la fusión de las membranas para entrar en las células
- Puede aglutinar hematíes

Neuraminidasa (NA):

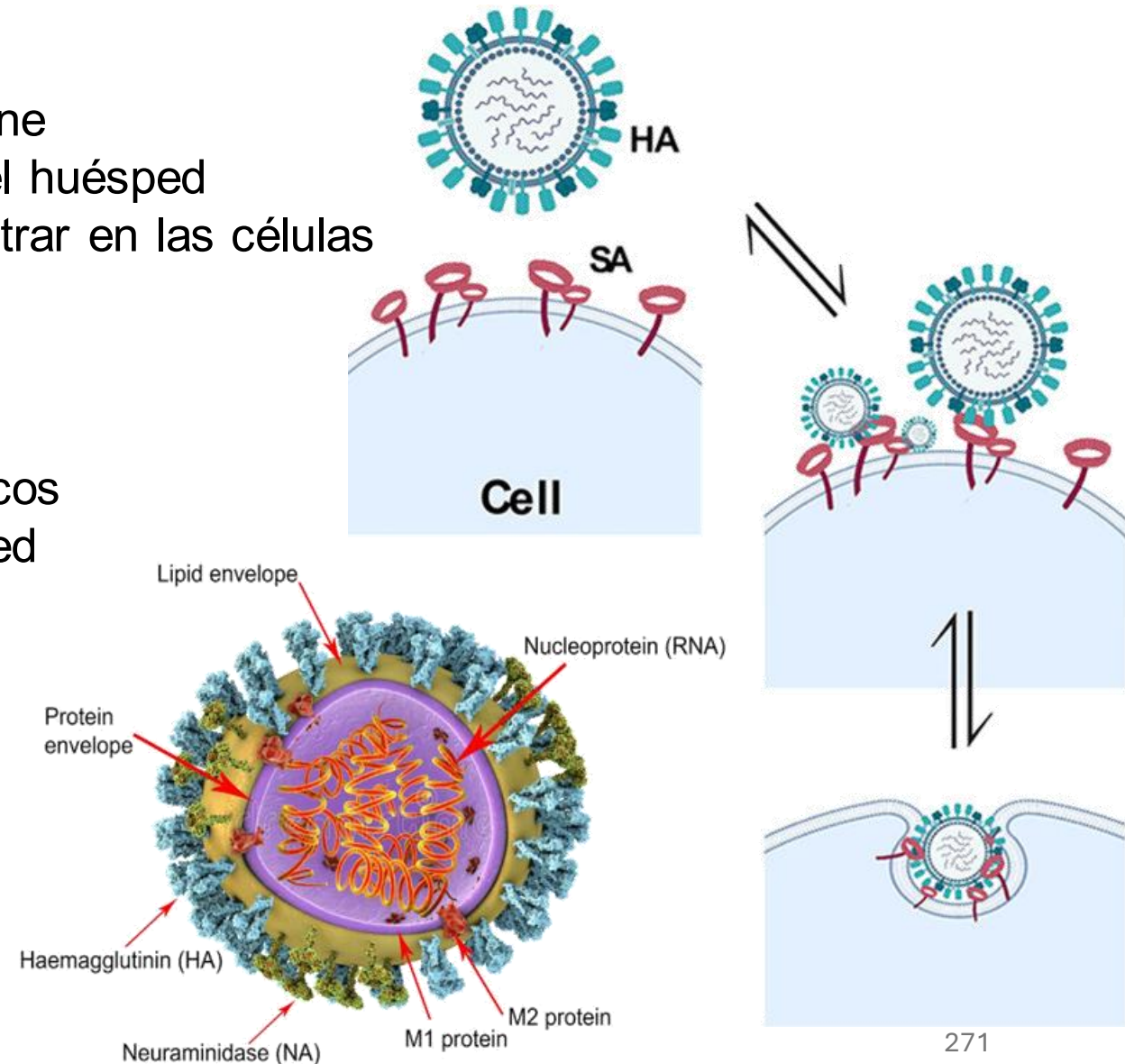
- Rompe la unión entre la HA y los ácidos siálicos
- Permite la salida del virus de la célula huésped
- Segunda proteína antigénica más importante

Proteína M2:

- Forma un canal iónico

Proteína M1:

- Da estructura al virión



Diferencias entre Influenza A, B y C



TIPO A

8 segmentos de ARN

Tiene HA y NA

Tiene proteína M2

Aves, cerdos y algunos mamíferos

Grandes variaciones en HA y NA

**4 subtipos en humanos
H1N1, H2N2, H3N2, H5N1**

Pandemias

TIPO B

8 segmentos de ARN

Tiene HA y NA

Tiene proteína M2 distinta (BM2)

Solo humanos

Pequeñas variaciones en HA y NA

Epidemias regionales

TIPO C

7 segmentos de ARN

No tiene HA y NA separadas

Tiene proteína M2 distinta (CM2)

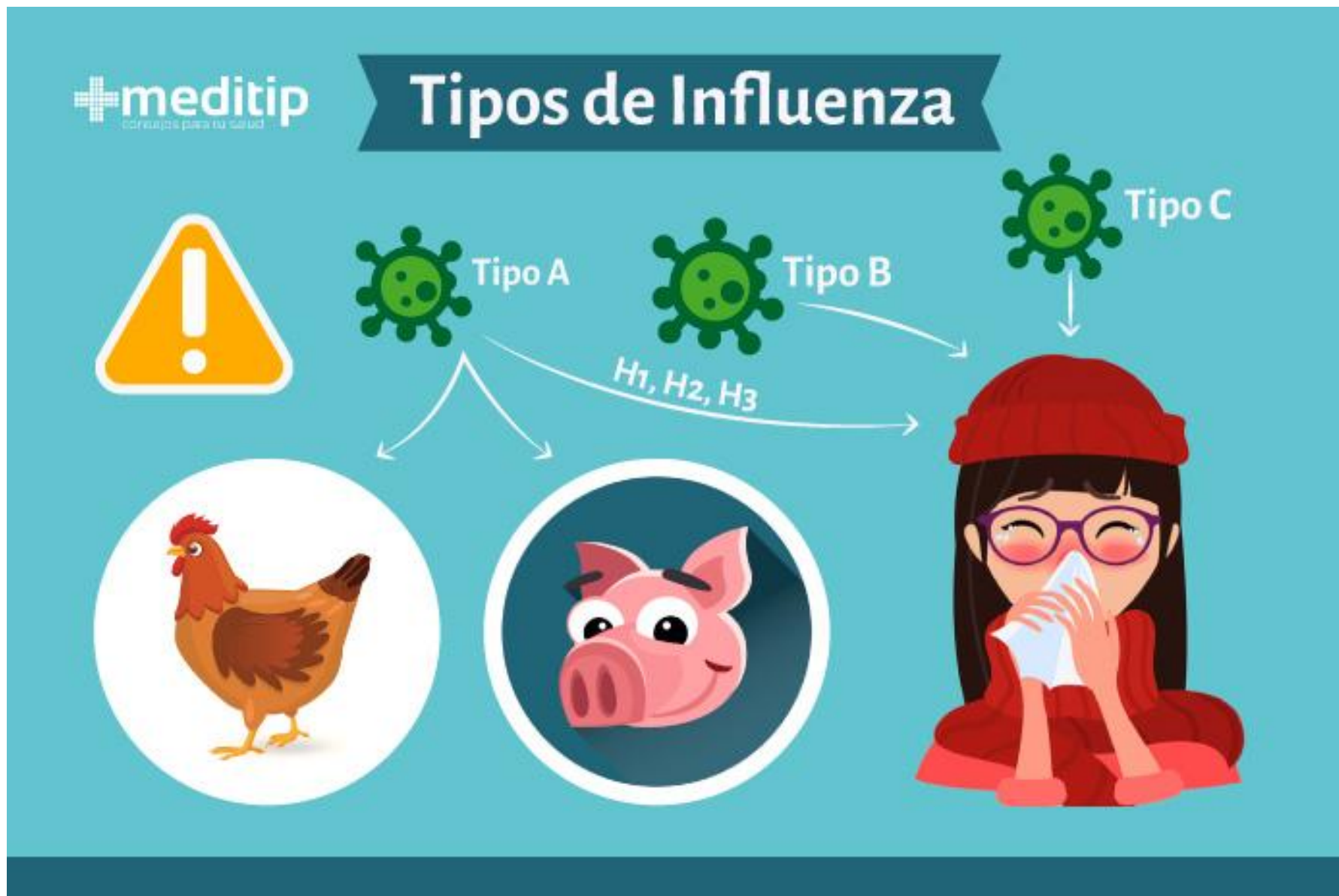
Solo humanos

Baja variabilidad

Infecciones en niños

No causa enfermedad seria

Diferencias entre Influenza A, B y C



Influenza A

- Es el más relevante a nivel epidemiológico
- Hay distintos subtipos según la combinación de hemaglutinina y neuraminidasa
 - 16 tipos de HA
 - 9 tipos de NA
- Para nombrarlos se sigue el siguiente sistema:

Tipo / Lugar de aislamiento / nº de referencia de la cepa / año de aislamiento / subtipo

A/Sydney/5/97/H3N2
- Los subtipos que mas circulan entre humanos son de los linajes H1, H3, N1 y N2

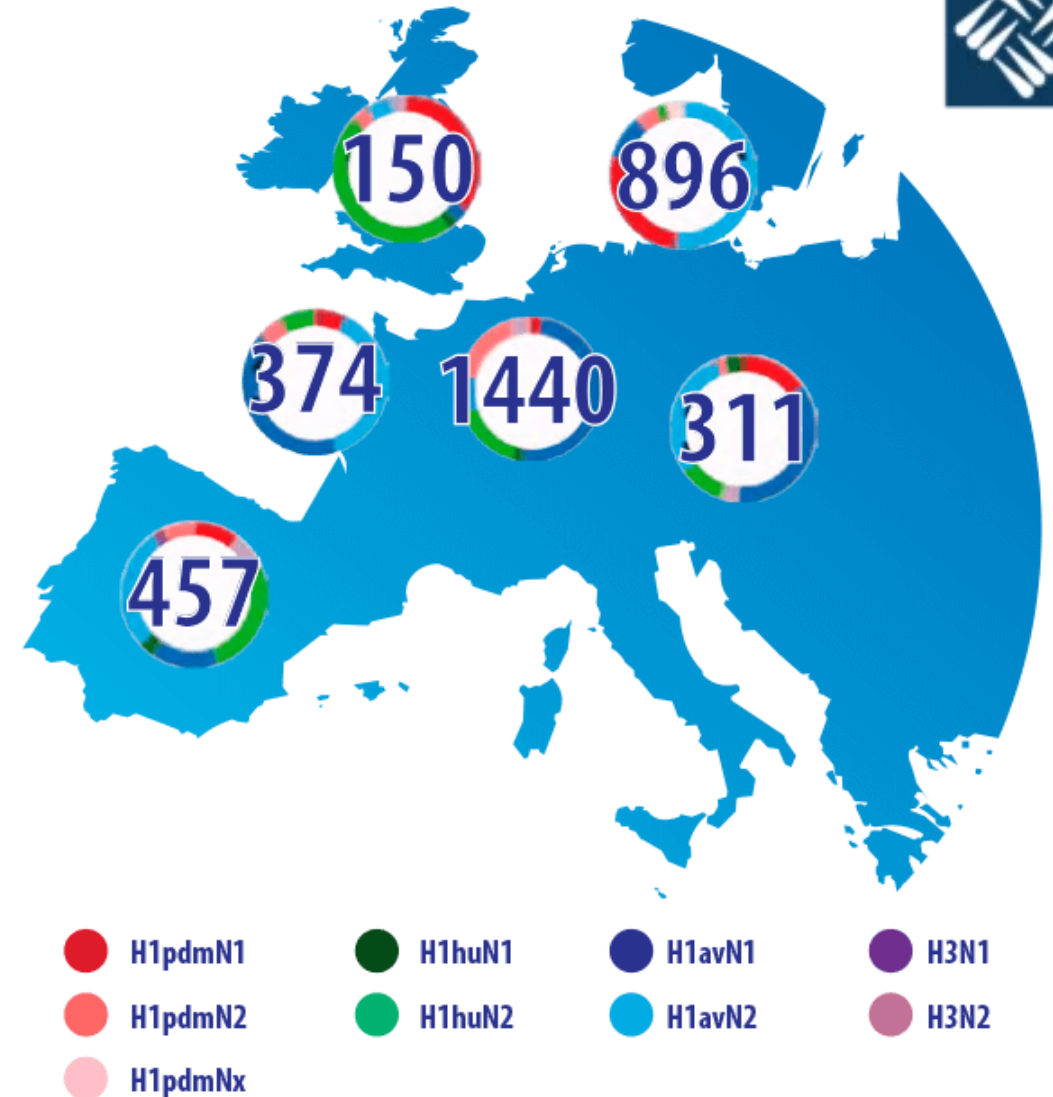
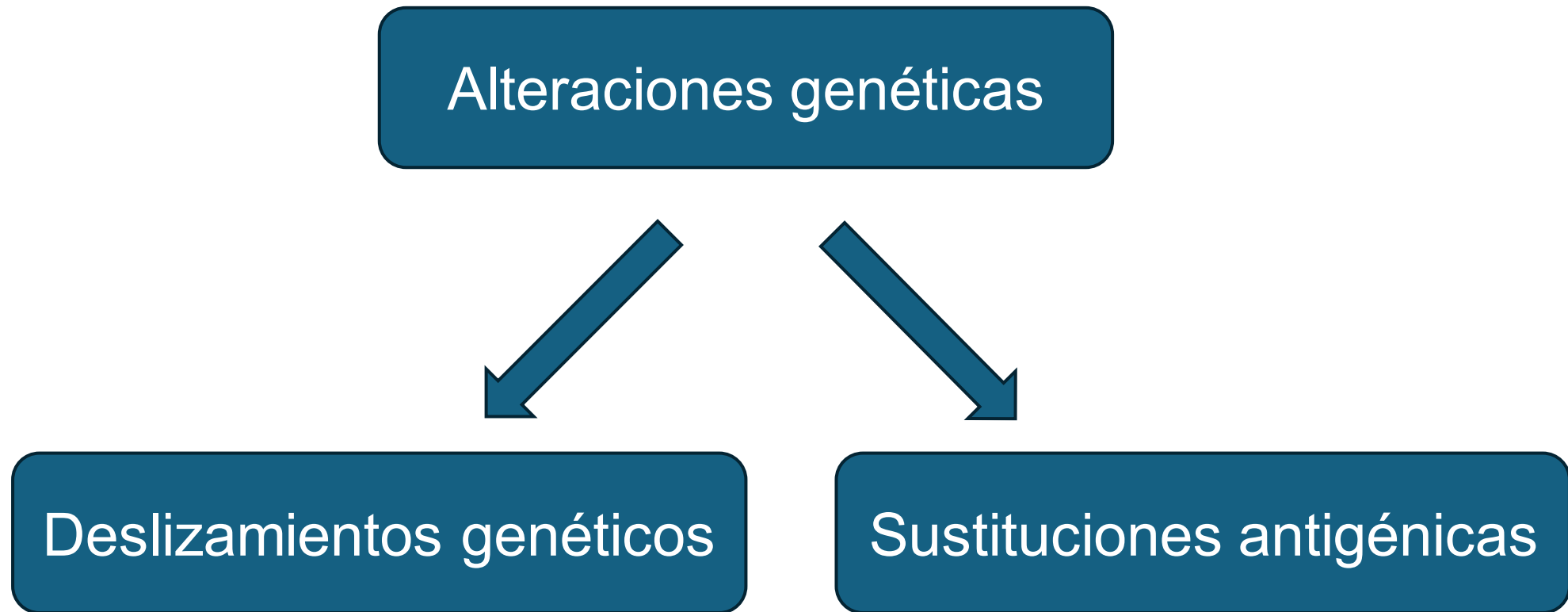


Figura 1. Distribución de subtipos y linajes de swIAV en Europa (2018 - junio 2023).

Variabilidad genética



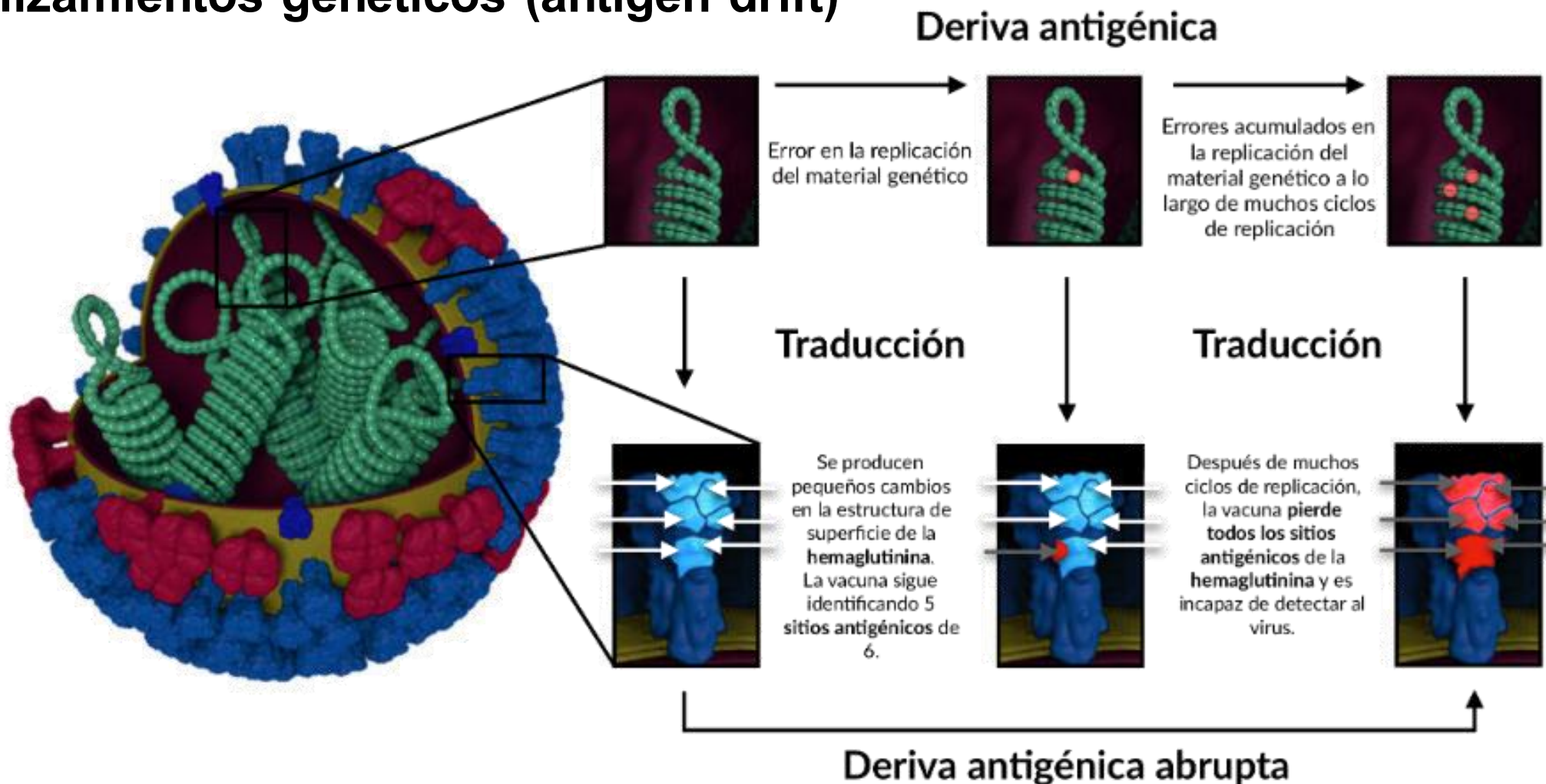
El virus de la gripe A tiene una alta variabilidad genética debida a cambios en las proteínas de superficie NA y HA



Variabilidad genética



Deslizamientos genéticos (antigen drift)



Variabilidad genética



Deslizamientos genéticos (antigen drift)

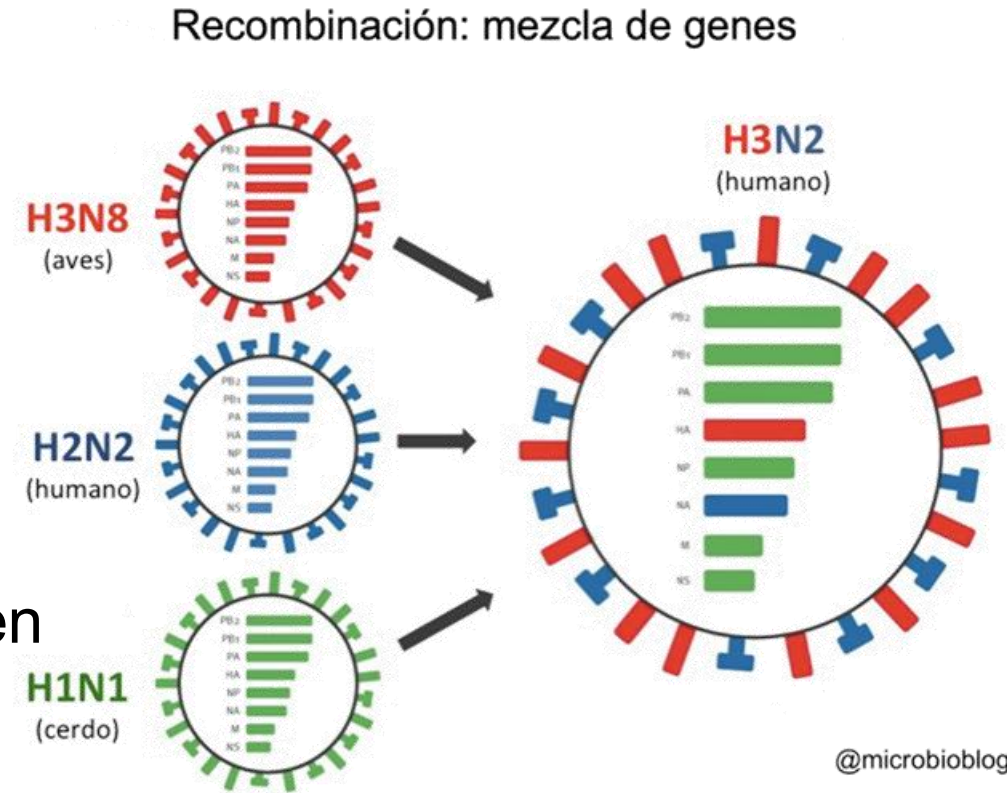
- Alteraciones menores
- Fruto de acumulación gradual de mutaciones en HA y NA
- Anticuerpos generados contra cepas anteriores ineficaces
- Producen epidemias anuales → gripe estacional
- La nueva variante reemplaza a la cepa previa

Variabilidad genética



Sustituciones genéticas (antigen shift)

- Alteraciones mayores
- Fruto de recombinación entre segmentos genéticos provenientes de virus de distintos animales
- Pueden no afectar al ser humano
- Si afecta al ser humano las defensas no sirven
- Responsables de las **pandemias**

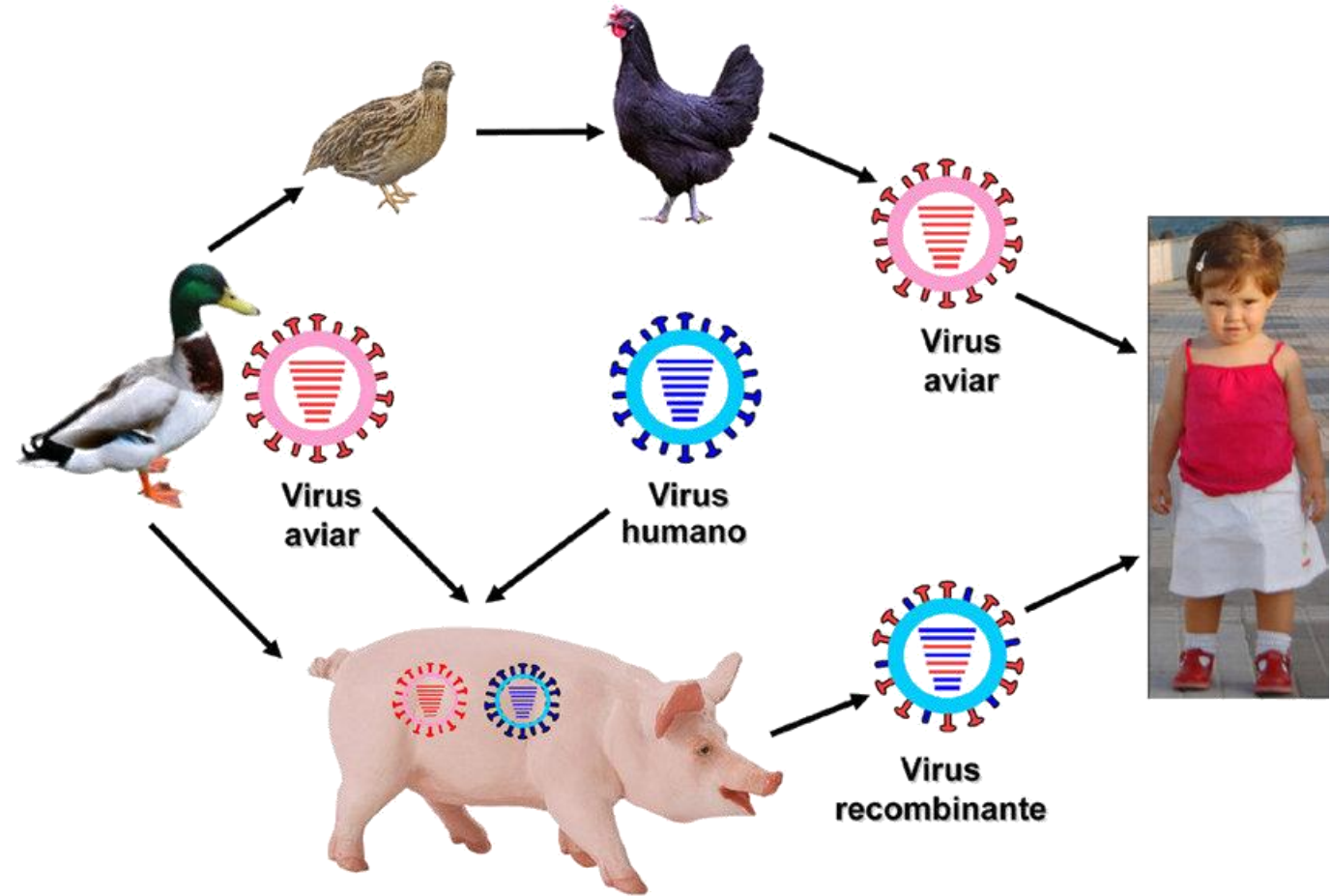


Variabilidad genética



Origen de los virus pandémicos

- Transmisión de un virus de las aves a humanos
- Transmisión de un virus de las aves a humanos por medio de intermediarios (cerdo)
- Coinfección + recombinación
- Reaparición de virus antiguos

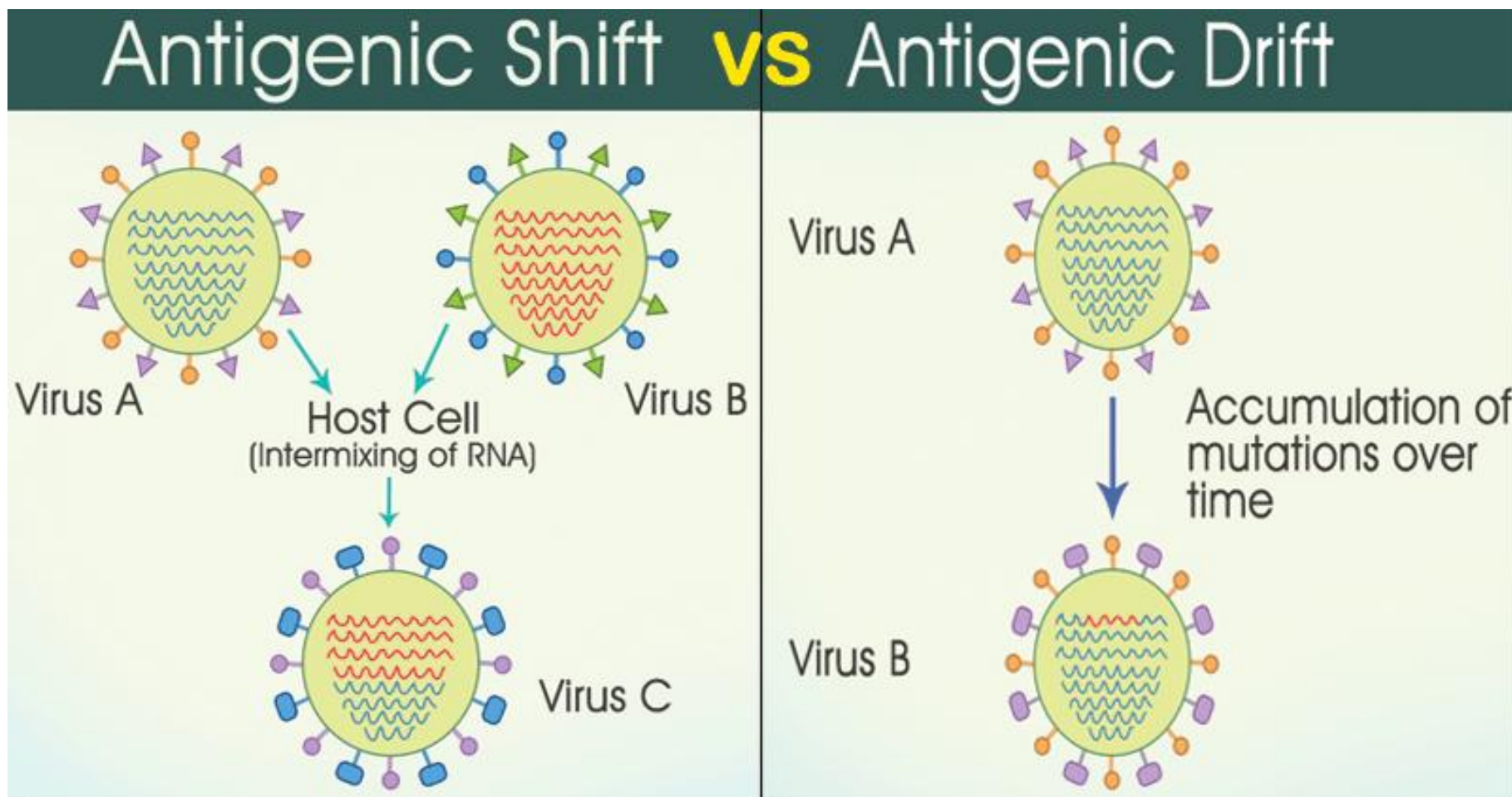


Variabilidad genética



SUSTITUCIÓN

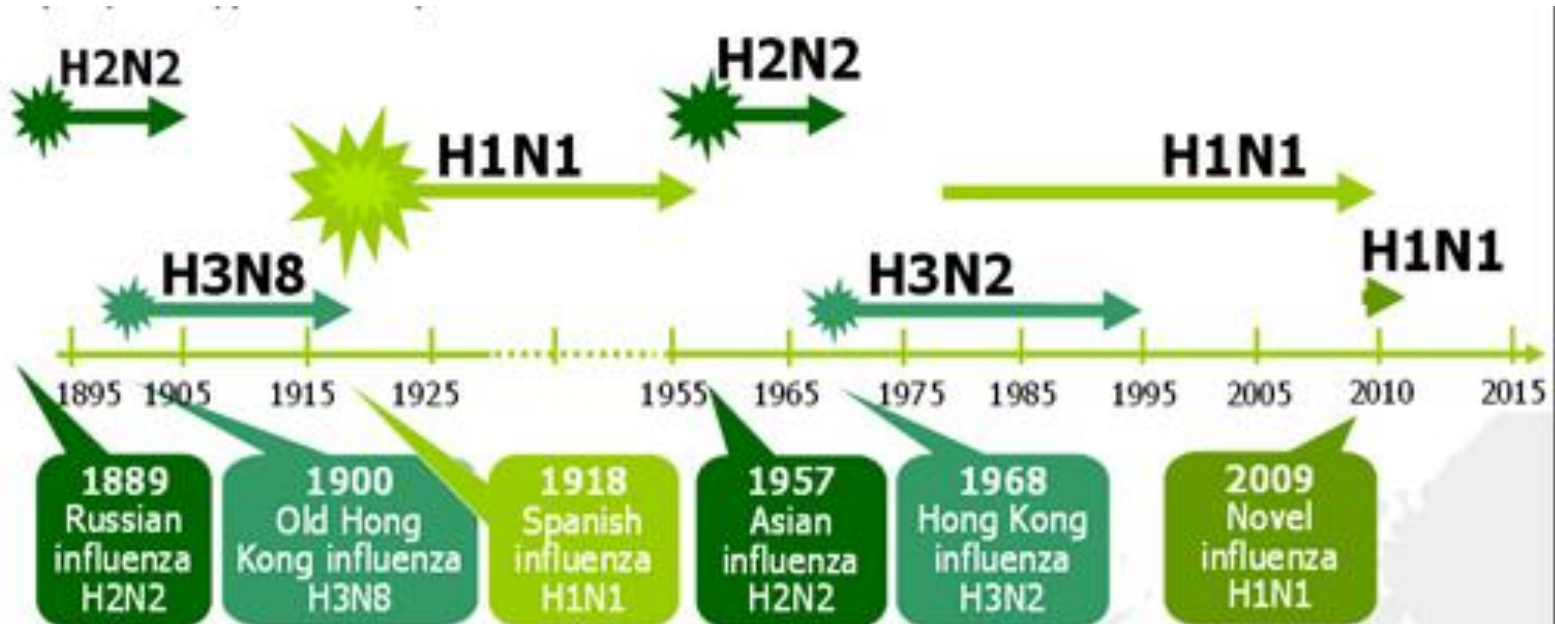
DESLIZAMIENTO



Pandemias de gripe en la historia



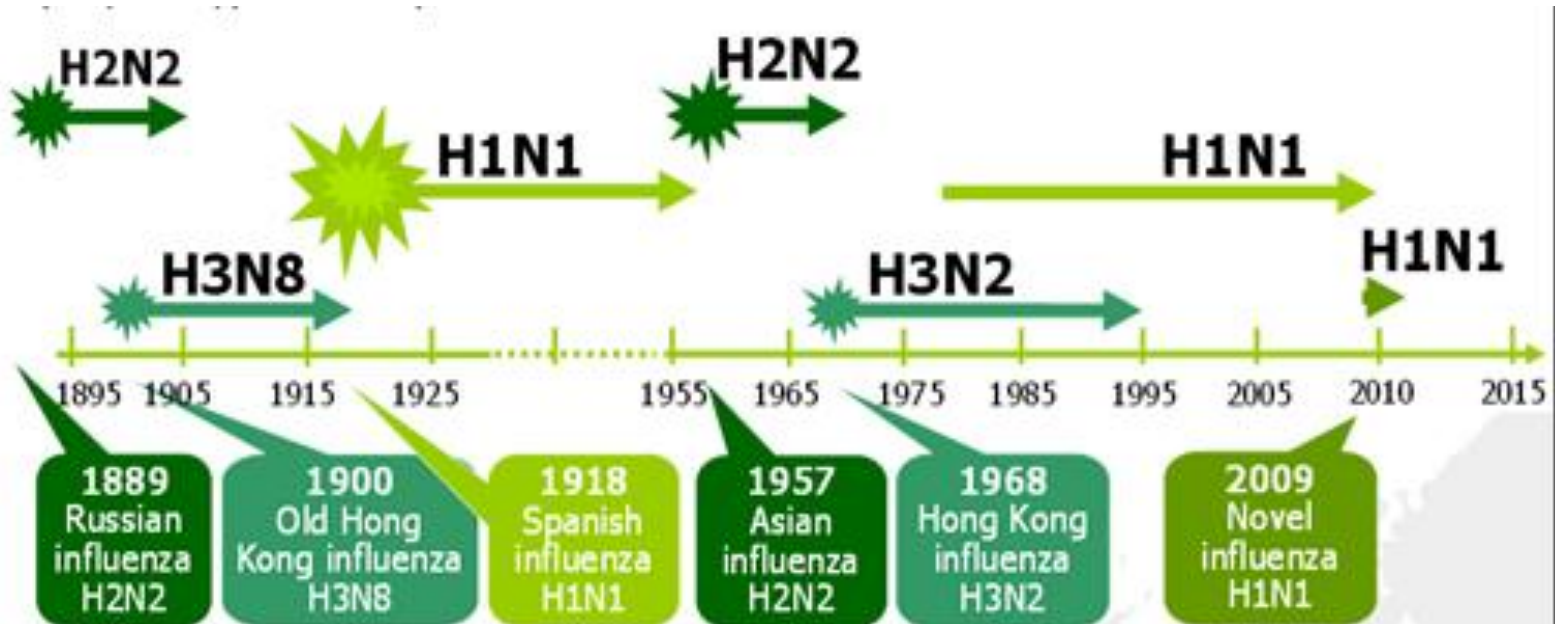
- 1889 Gripe Rusa
 - Probablemente causada por virus influenza H2N2 o H3N8
 - Extensión mundial por transporte marítimo y ferrocarril moderno
 - 1 M de muertes
- 1900 Gripe de 1900
 - Debida a una evolución del virus de 1889
 - Cifras imprecisas
 - Posible origen equino



Pandemias de gripe en la historia



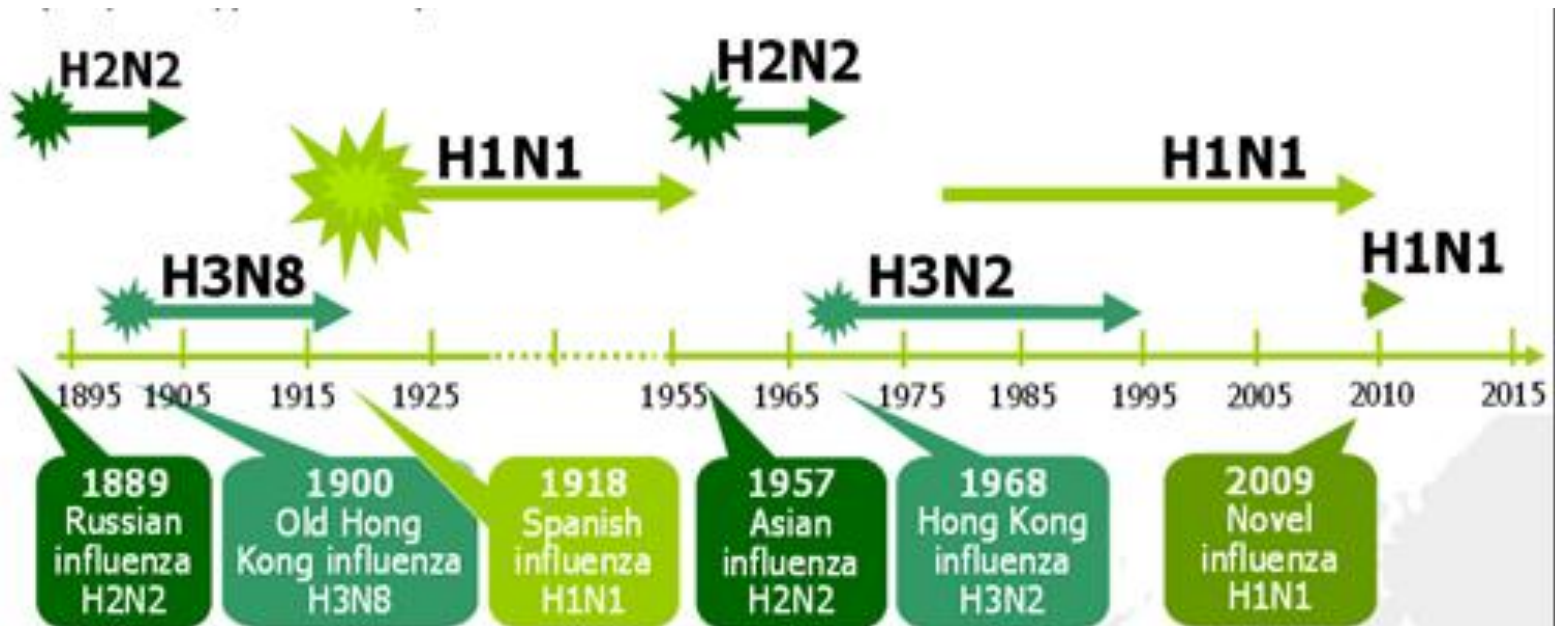
- 1918 Gripe Española
 - Debida a un nuevo subtipo de la gripe (A/H1N1)
 - 20-40% de población mundial infectada
 - 50 M de muertes
- 1957 Gripe Asiática
 - Debida a un nuevo subtipo de la gripe (A/H2N2)
 - 4 M muertes
 - Menos letal que la de 1918



Pandemias de gripe en la historia



- 1968 Gripe de Hong Kong
 - Debida a un nuevo subtipo de la gripe (A/H3N2)
 - 4 M muertes
 - Menos letal que anteriores, pero más impacto en edades avanzadas
- 2009 Gripe Porcina
 - Debida a virus H1N1 recombinado entre cerdo, aves y humanos
 - 600 K muertes
 - Menor letalidad, mayor difusión





Síntomas de la gripe



Tos



Fiebre



Congestión
nasal



Secreción
nasal



Dolor de
garganta



Dolor de
cabeza



Dolor
muscular



Cansancio

Epidemiología



El síndrome gripal es causado por los virus influenza A y B

Su alta variabilidad asegura el mantenimiento del virus por alta proporción de personas inmunológicamente desprotegidas

Tasas de ataque más altas en jóvenes, pero mortalidad más alta a partir de 65 años

Virus muy resistente → hasta 24h en superficies

Sensible a temperaturas elevadas

Transmisión por pequeñas gotículas emitidas al hablar

Factores de riesgo:

- Enfermedades cardiovasculares
- Enfermedades pulmonares
- Enfermedades metabólicas
- Disfunción renal
- Inmunodepresión



Obtención de la muestra

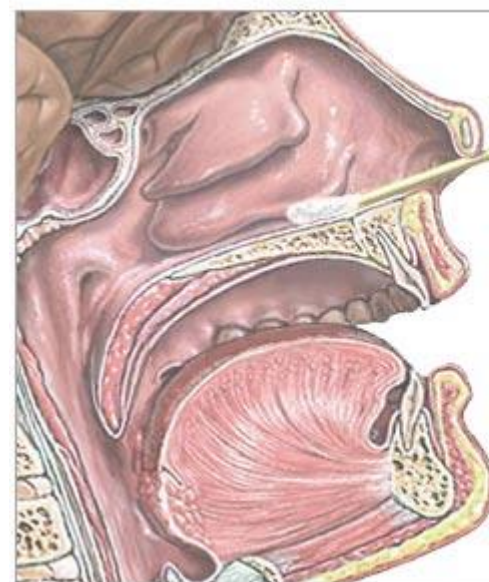
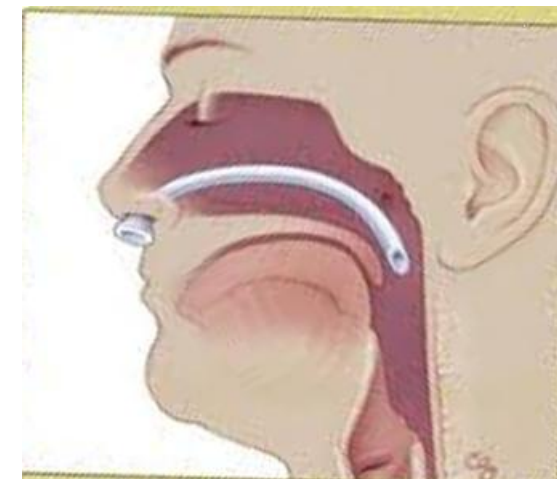


La clave para diagnosticar la gripe es recoger una **muestra respiratoria** adecuada

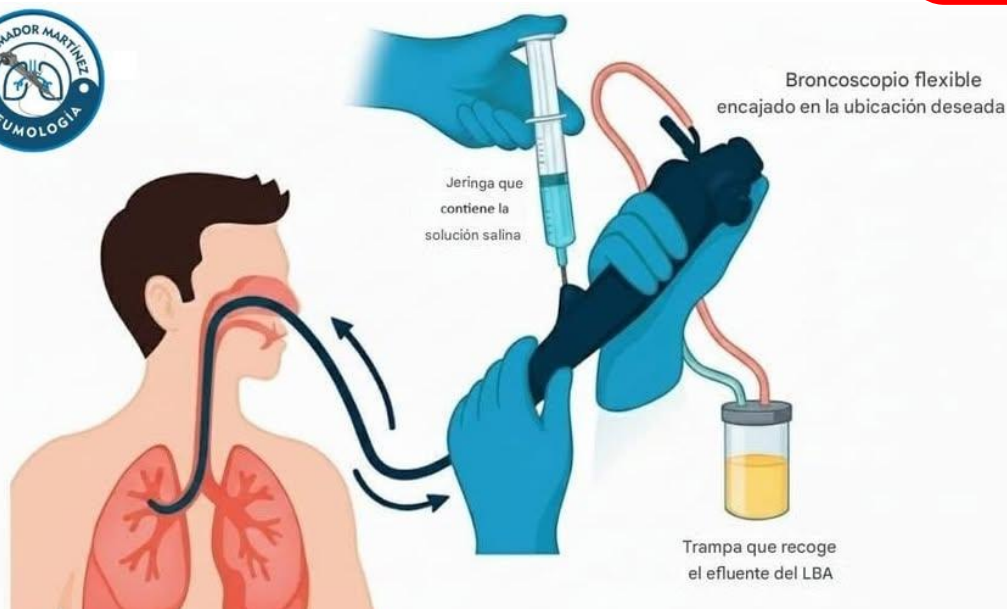
¿Cómo?

- Aspirados nasofaríngeos: en menores de 3 años
- Frotis nasofaríngeos
- Lavados broncoalveolares

Los esputos no se consideran muestra adecuada



Se introduce con cuidado un palillo de algodón esterilizado a través de la fosa nasal, hacia la nasofaringe



Obtención de la muestra



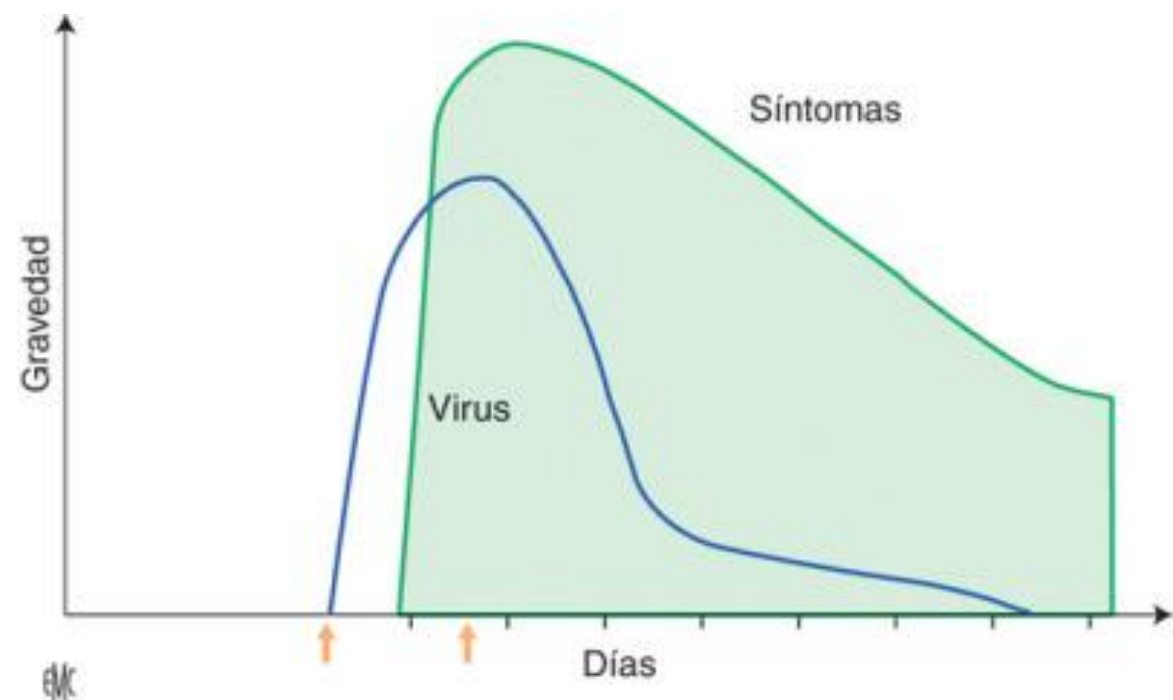
La clave para diagnosticar la gripe es recoger una **muestra respiratoria** adecuada

¿Cuándo?

Al inicio del cuadro clínico

Carga viral máxima a las 48-72h tras inicio de sintomatología

Tratamiento solo es eficaz si se administra de forma temprana (48 h desde inicio de síntomas)



Transporte



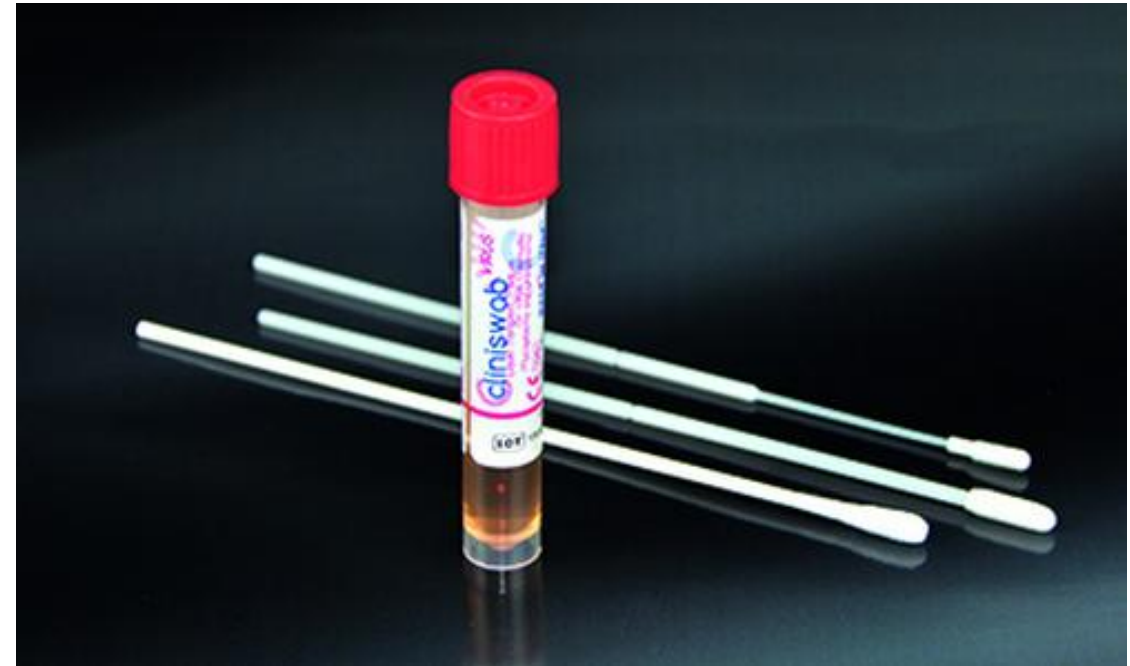
Se usan contenedores que mantienen la viabilidad del virus

Tubos donde se introduce el hisopo

Llevar rápidamente al laboratorio

Conservar a 4°C si se va a procesar en horas

Conservar a -80°C si se retrasa el análisis



Diagnóstico



1. Serología
2. Cultivo
3. **Detección de antígenos virales** → más usado
4. Microscopía electrónica
5. **Amplificación genómica**



1. Técnicas serológicas

Detectan los niveles de anticuerpos frente al virus influenza en la sangre del paciente

Los anticuerpos se hacen detectables dos semanas tras la infección y alcanzan niveles máximos a las 4-7 semanas, tras las que disminuyen lentamente

Para diagnosticar el virus influenza se requiere detectar una seroconversión:

Seroconversión: aumento significativo de anticuerpos específicos contra el virus (IgG)

- Primera muestra: en la fase aguda
- Segunda muestra: 2-4 semanas después

Estos tiempos reducen la efectividad de la técnica para la detección aguda

Se emplean para realizar estudios de seroprevalencia

Seroprevalencia: porcentaje de población que tienen anticuerpos específicos contra un microorganismo

2. Cultivo celular



Permite observar la presencia del virus a través del efecto citopático característico sobre una línea celular adecuada (MDCK)

Es el método de referencia, pero se está sustituyendo por técnicas moleculares

Permite estudiar el virus → muy utilizado en investigación



Desventajas

- Tarda de 3 a 14 días, por lo que no es útil para el diagnóstico
- La sensibilidad depende de la cantidad de virus presente en la muestra
- Técnicas estandarizadas pero costosas
- Nivel de bioseguridad Tipo II

2. Cultivo celular



Nivel de bioseguridad tipo II

- Personal con entrenamiento específico para agentes patógenos
- Acceso laboratorio restringido
- Precauciones extremas con punzocortantes contaminados

En situaciones de pandemia se debe elevar el nivel de seguridad a nivel III

- Bata impermeable
- Doble guante
- Protección ocular
- Eliminación de todo material usado en el proceso



2. Cultivo celular



Shell-Vial

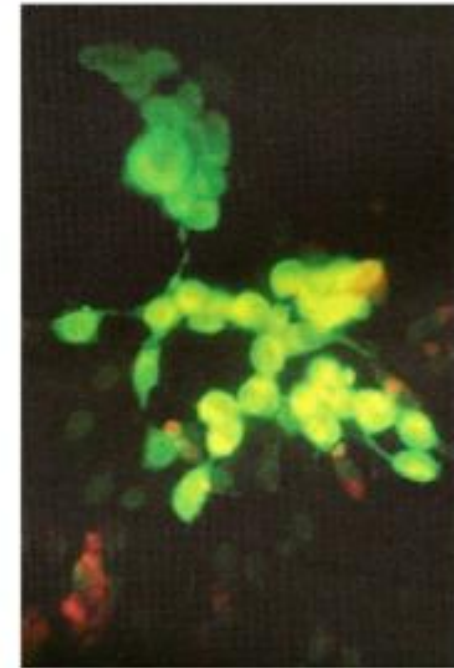
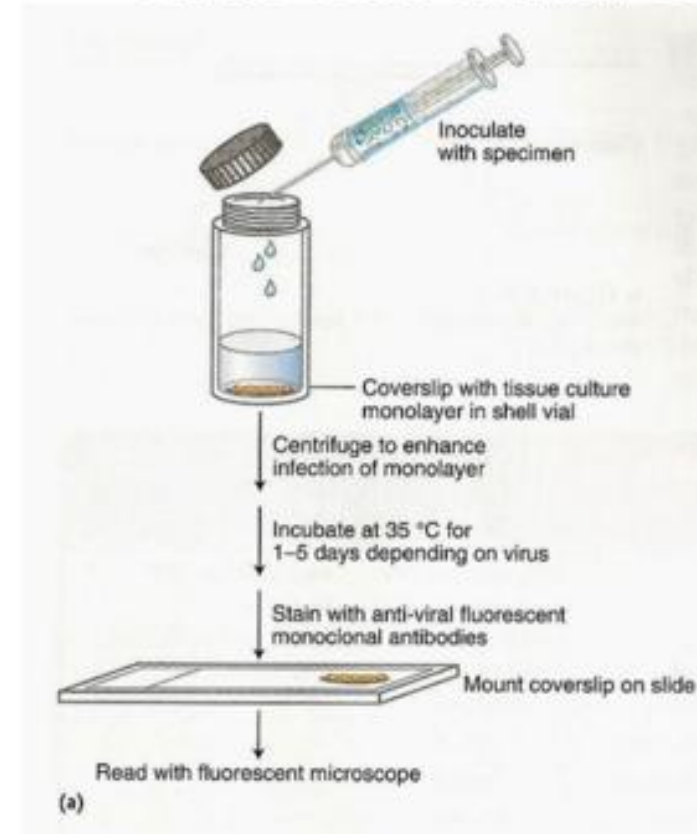
Técnica de cultivo viral rápida 24-48 horas

1. Inoculación de la muestra en un cultivo celular
2. Centrifugación de la muestra sobre una línea celular: favorece la entrada del virus en las células y su replicación
3. Tinción de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales específicos

Desventajas

- Requiere mucha especialización
- Más lenta que técnicas moleculares
- Menor sensibilidad que técnicas moleculares

Virus Cell Culture - Shell Vial



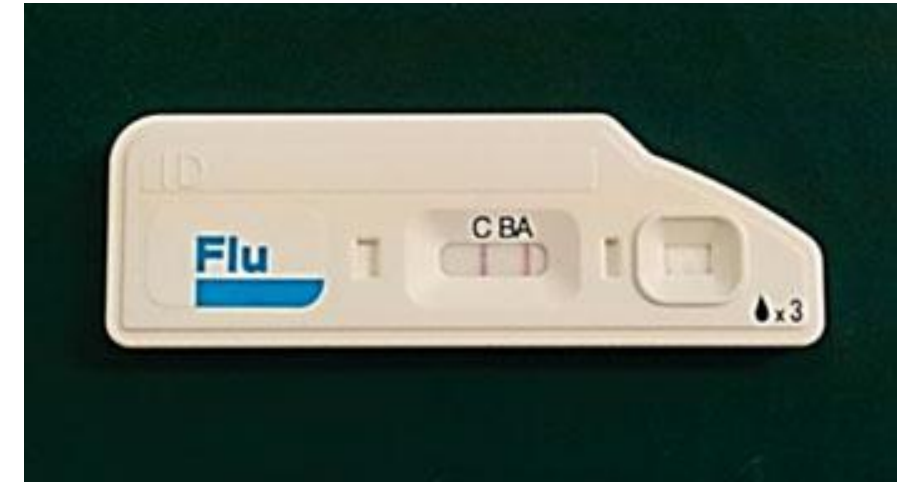
3. Detección rápida de antígenos



A. Técnicas de inmunocromatografía

Tienen anticuerpos monoclonales que detectan la nucleoproteína viral de virus influenza fijados a una tira de nitrocelulosa

Permiten diferenciar entre virus influenza A y B



B. Técnicas de inmunofluorescencia

La unión de los anticuerpos fijados en la tira de nitrocelulosa con el antígeno emite una señal fluorescente captada por el lector del instrumento

Son sistemas de lectura automática



3. Detección rápida de antígenos



A. Técnicas de inmunocromatografía

Tienen anticuerpos monoclonales que detectan la nucleoproteína viral de virus influenza fijados a una tira de nitrocelulosa

Permiten diferenciar entre virus influenza A y B

B. Técnicas de inmunofluorescencia

La unión de los anticuerpos fijados en la tira de nitrocelulosa con el antígeno emite una señal fluorescente captada por el lector del instrumento

Son sistemas de lectura automática

Ventajas

Rapidez (15-30 min)

Sencillez

Fácil realización

Inconvenientes

Sensibilidad variable (40-80%)

Dependiente de cantidad

No distingue variantes de influenza A

4. Microscopía electrónica



Se emplean anticuerpos contra HA, NA o NP conjugados con partículas de oro

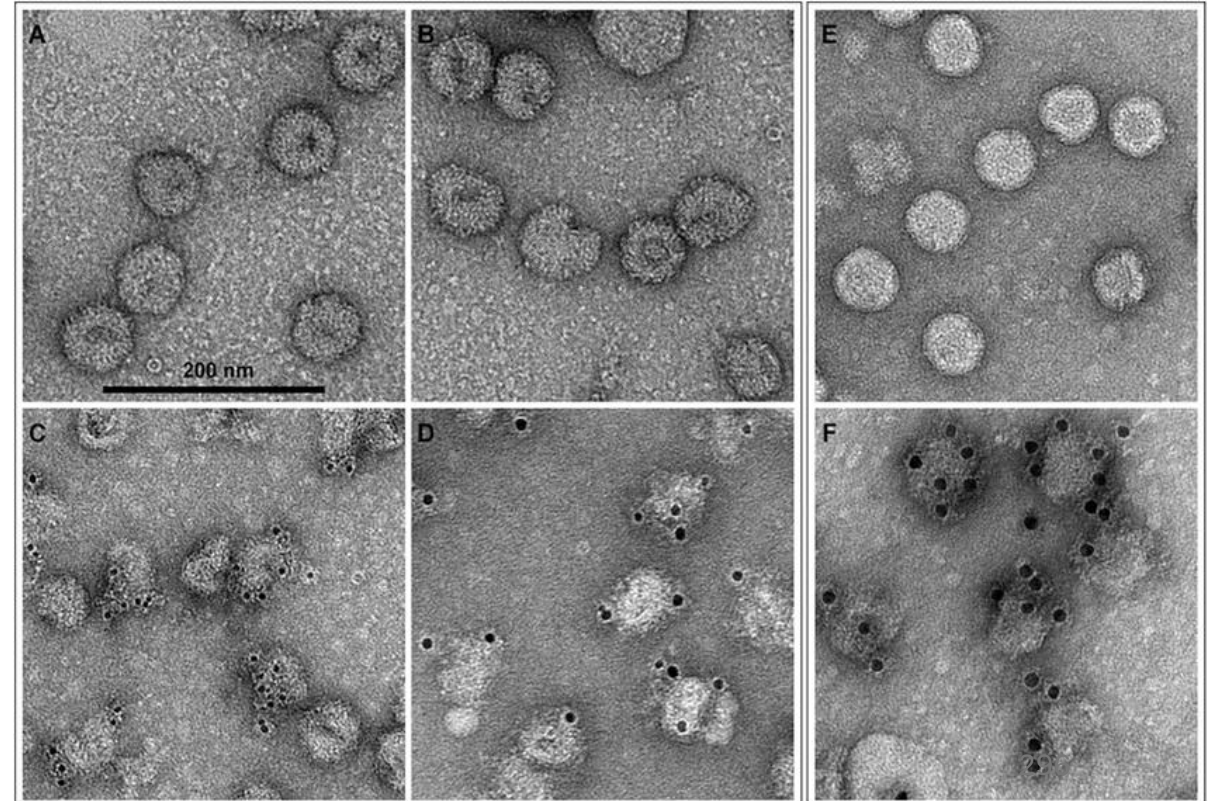
Se observan como puntos negros en el microscopio electrónico

Se pueden usar tanto en tejidos como en cultivos celulares

Sensibilidad de entre el 60 y el 100%

Desventajas

- Se necesita un microscopio electrónico
- Es laborioso
- Requiere personal entrenado
- Tarda 2-4 horas en obtener resultados



5. Diagnóstico molecular

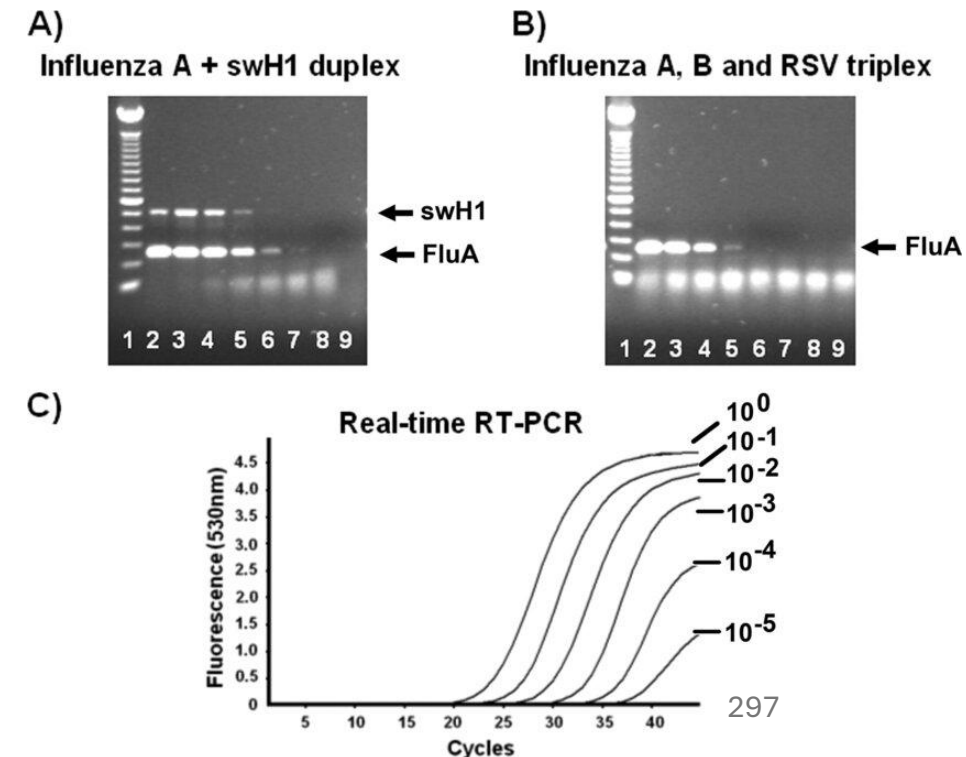


Es gold estándar para el diagnóstico de la gripe

1. Extracción del material genético vírico de la muestra
2. Mezcla con reactivos de PCR y primers frente a regiones conservadas (M1 o NP)
3. Amplificación por PCR

Es muy importante incluir un control interno para excluir presencia de inhibidores de la PCR y asegurar que los negativos son verdaderos

- Se pueden emplear para distinguir subtipos de Influenza A
- Alta sensibilidad
- Rapidez
- Permiten detectar coinfecciones virales
- Sistemas multiplex



Sección II: Laboratorio de microbiología

TEMA 12

Diagnóstico de legionelosis

Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio

Nacho Escrig, PhD

Legionella



El género *Legionella* contiene 48 especies y 70 serogrupos

Serogrupo: subclasificación microbiana basada en las diferencias de antígenos de superficie, que serán reconocidas por el sistema inmune

Más de la mitad de estas especies de bacteria causan enfermedad en el ser humano

Producen infecciones respiratorias

La principal especie causante de las infecciones (90%) es *Legionella pneumophila*

- Tiene 16 serogrupos
- Serogrupo 1 más prevelante (80% casos)
- Bacilo gram negativo
- Presente en ambientes acuáticos
- Produce legionelosis



Manifestaciones clínicas

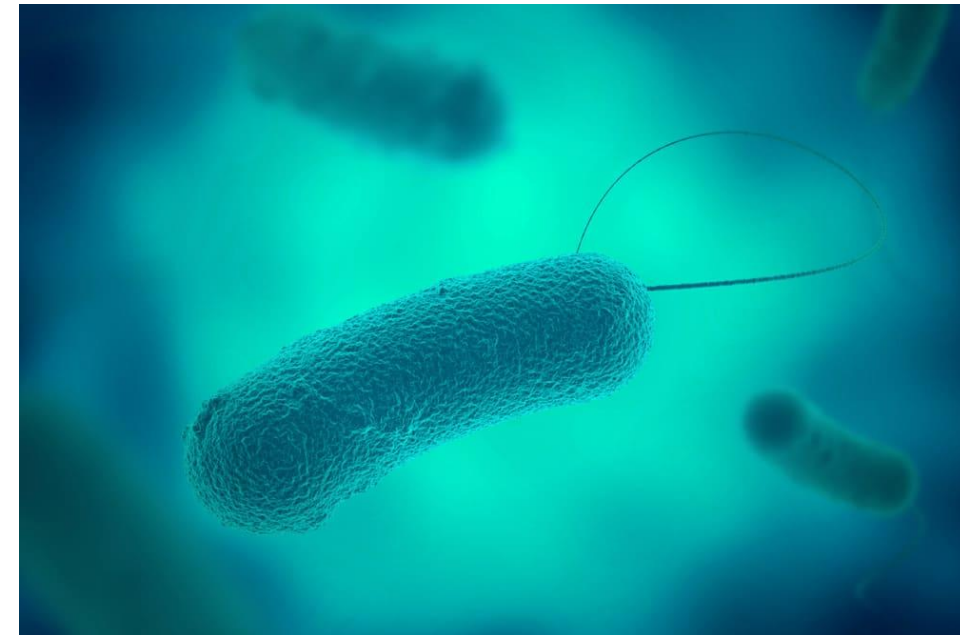


Enfermedad respiratoria producida cuando individuos sensibles inhalan la bacteria contenida en aerosoles

Tiene dos manifestaciones clínicas

- Enfermedad del legionario: neumonía con dos desarrollos
 - Leve – moderado
 - Grave → produce fallo multiorgánico
- Fiebre de Pontiac: cuadro gripal poco importante
 - Fiebre
 - Escalofríos
 - Mialgia
 - Malestar
 - Cefalea

**No se diferencia
clínicamente de otros
patógenos que producen
neumonía**



Manifestaciones clínicas



FIEBRE DE PONTIAC

Se caracterizaba por los síntomas antes mencionados, pero no curso **ninguna evidencia clínica** de neumonía.

Los síntomas se desarrollaron a lo largo de un periodo de 12 horas, se mantuvieron entre 2 a 5 días, y remitieron espontáneamente con una morbilidad mínima **sin causar ninguna muerte.**



LEGIONELOSIS

Responsable de una notable mortalidad, que con frecuencia culmina en la muerte del **15 % de los individuos sanos** y hasta el **75 % de los pacientes inmunodeprimidos.**

Los signos de una enfermedad aguda, se inician después de un **periodo de incubación de 2 a 10 días.** Es frecuente la enfermedad multiorgánica con afectación del tubo digestivo, el sistema nervioso central, el hígado y los riñones. La manifestación principal es la **neumonía.**



Legionella Pneumophila

Legionelosis



Tiene un periodo de incubación de entre 2 y 10 días

Cursa con un comienzo abrupto de:

- Fiebre
- Malestar
- Debilidad
- Mialgias
- Dolor de cabeza
- Tos no productiva

Puede derivar en insuficiencia respiratoria y renal

Tiene tratamiento antibiótico, pero es importante aplicarlo de forma temprana

El retraso en el tratamiento se asocia con aumento de mortalidad



Epidemiología



1.300 casos en 2025

Aumento del 13% con respecto al año 2024

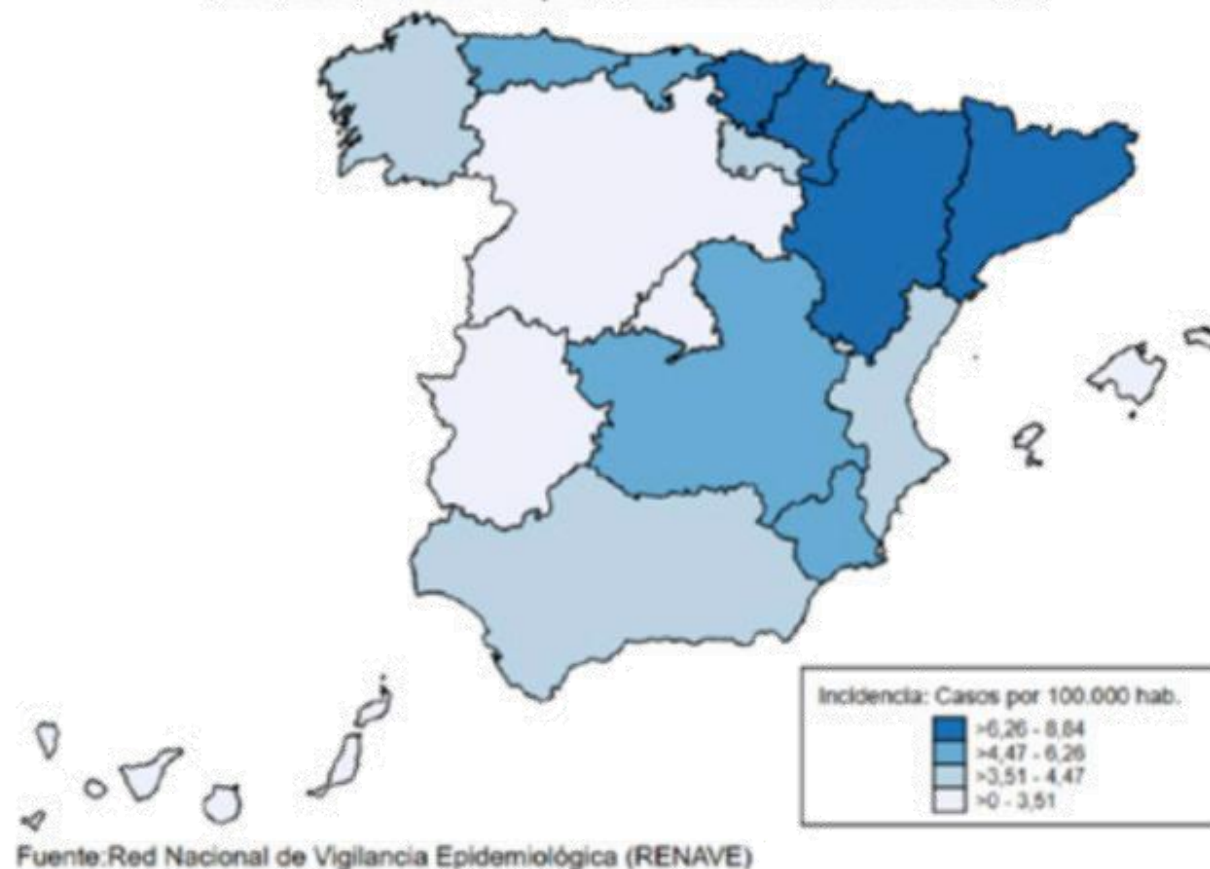
Media de 4.7 casos por 100.000 habitantes

Aumento de los casos en verano

Factores de riesgo

- Hombre (2-3 veces más)
- Edad (40-70 años)
- Inmunodepresión
- Diabetes
- Enfermedades pulmonares previas
- Fumadores
- Alcohólicos

Vigilancia de Legionelosis. Ambos sexos. España. 2023
Tasa de notificación por Comunidades Autónomas.



Epidemiología



Suele ser una infección intrahospitalaria (nosocomial)

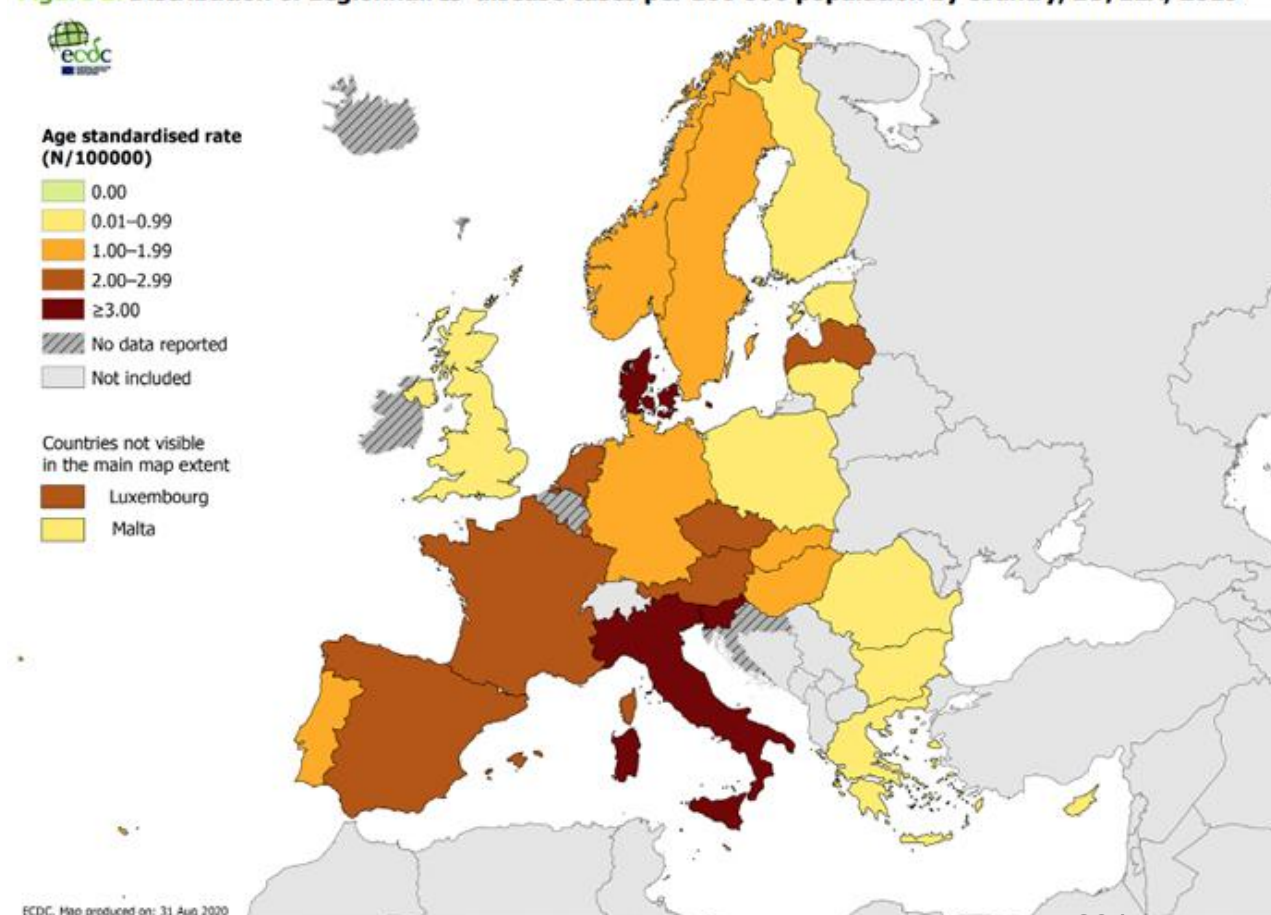
También pueden darse brotes en la comunidad

Enfermedad de declaración obligatoria

Aumento de los casos por aumento de

- Aires acondicionados
- Sistemas de refrigeración
- Agua micronizada

Figure 1. Distribution of Legionnaires' disease cases per 100 000 population by country, EU/EEA, 2019



Epidemiología



En los últimos años se ha producido un aumento del diagnóstico de casos de legionelosis, tanto en España como en el mundo

El diagnóstico por detección de antígeno en orina facilitado la disminución de la mortalidad

1995: la legionelosis se establece como enfermedad de declaración obligatoria

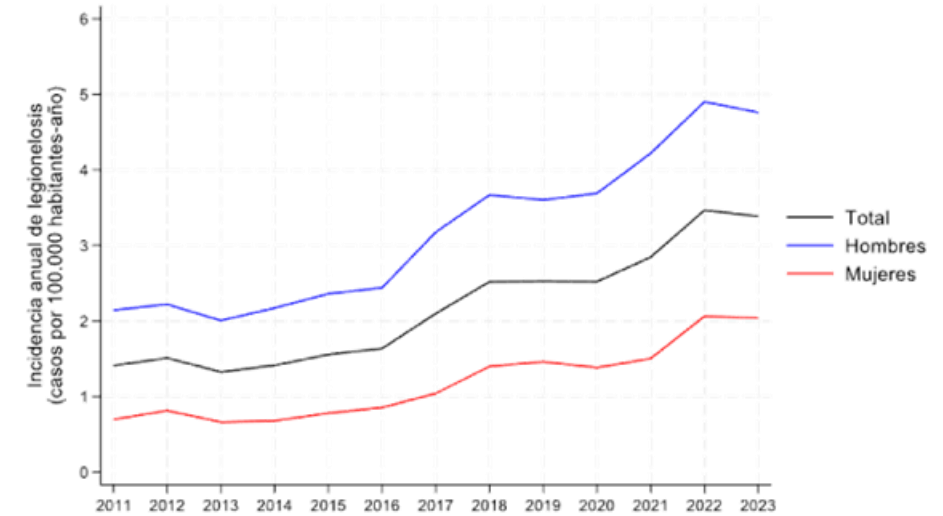
2000: se declaran 752 casos, 1,91 por 100.000 habitantes

2004: se declaran 1.074 casos, 2,62 por 100.000 habitantes

2025: se declaran 1.300 casos, 4,7 por 100.000 habitantes

Los brotes también han ido en aumento

Figura 2. Incidencia anual de legionelosis esporádica (casos por 100.000 habitantes) total y por sexo en España (2011-2023)



Transmisión



Legionella pneumophila es una bacteria muy resistente a condiciones ambientales

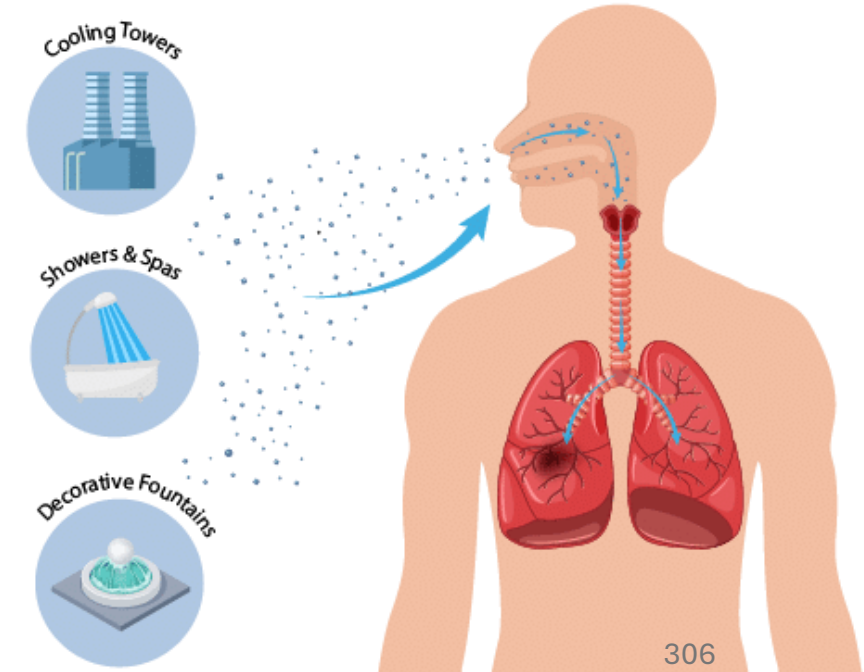
- Se multiplica entre 20 y 45°C
- Se inactiva por encima de 70°C
- Se alimenta de microorganismos formadores de biocapas

Está asociada a sistemas acuáticos artificiales → temperatura por encima de la ambiental

No se contagia de persona a persona

No hay evidencia de reservorios animales

Se contagia por la aspiración de aerosoles contaminados



Transmisión



ENFERMEDAD DEL LEGIONARIO

La enfermedad del legionario, un tipo de neumonía grave, es causada por inhalar pequeñas gotitas de agua con Legionella

¿QUÉ ES?

También llamada legionela o legionelosis, es una infección pulmonar causada por la bacteria LEGIONELLA, que se desarrolla en ambientes húmedos y muchas veces con altas temperaturas



PRINCIPALES SÍNTOMAS



FORMA DE CONTAGIO

Por el aire, por lo general se adquiere por respirar vapor de agua que contiene bacterias. No se contagia de una persona a otra.



DIAGNÓSTICO

Algunas veces es necesario una radiografía de tórax para diagnosticarla, por su similitud con otros tipos de neumonías

TRATAMIENTO

La mayoría de las personas se recupera con antibiótico

GRANDES FUENTES DE CONTAGIO

Edificios, hoteles, hospitales que tengan humidificadores, aires acondicionados, torres de refrigeración, o cualquier reserva de agua



PERSONAS EN MAYOR RIESGO

- Con más de 50 años
- Si son fumadores
- Si tienen alguna enfermedad crónica
- Si tienen un sistema inmunológico débil

10%

Muere por complicaciones de la infección

Toma de muestra y conservación



Se puede detectar en varias muestras

Muestras respiratorias

Espuito

- Cultivo, PCR o tinción directa

Aspirado broncoalveolar

- Útil para pacientes graves o intubados
- Cultivo o PCR

Biopsia pulmonar

- Solo en casos complicados

Orina

- Detección del antígeno de legionela
- Rápida, no invasiva

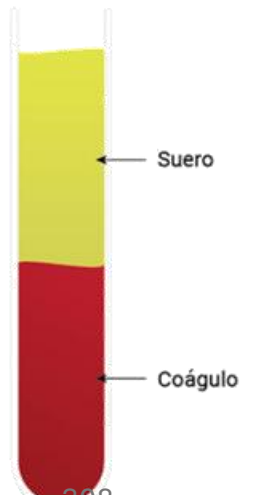
4°C,
-20°C
ó
-70°C

Sangre

- Serología
- Requiere dos muestras
- Útil de forma retrospectiva

2-8°C
ó
-70 °C

2-8°C
ó
-20°C



Diagnóstico en pacientes



Solo se puede diagnosticar por:

1. Cultivo
2. Serología
3. Detección de antígeno en orina
4. PCR

1. Cultivo



Es el método de referencia

Sirve como diagnóstico de confirmación

Permite detectar cualquier especie y cualquier serogrupo

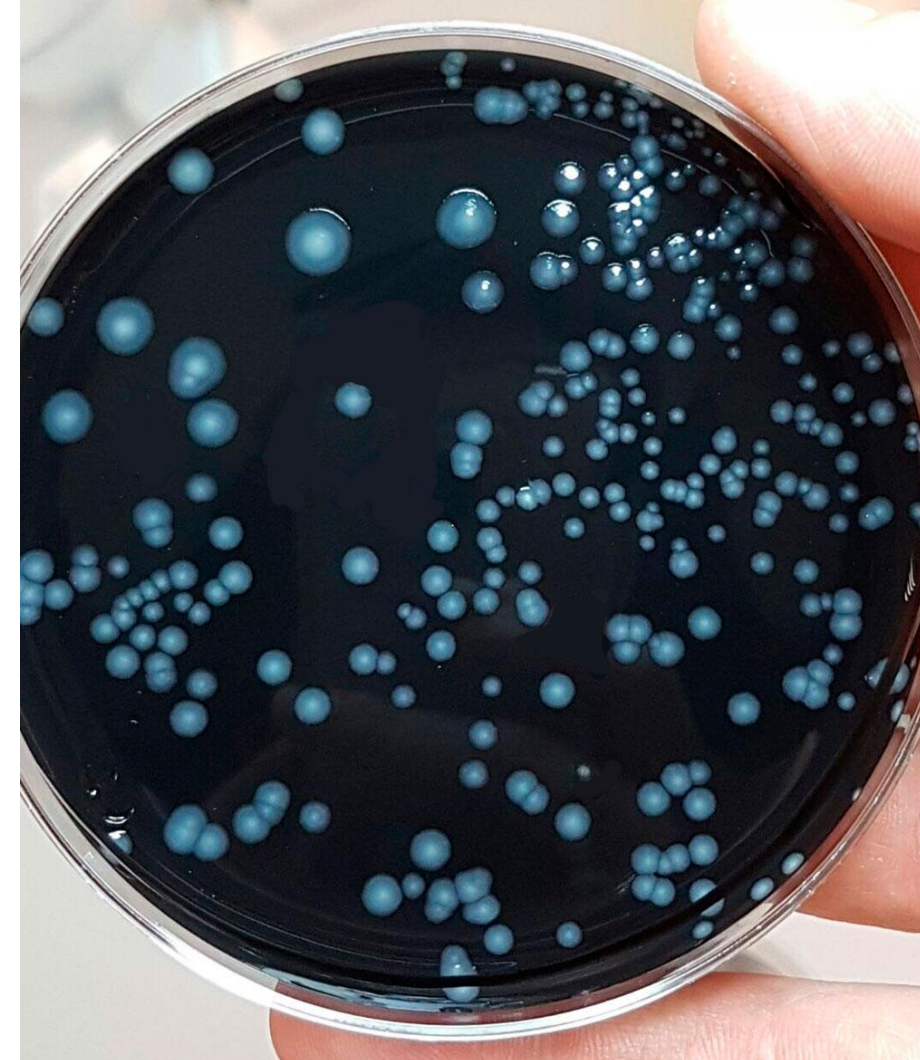
Baja sensibilidad (20-80%)

- Difícil crecimiento
- Requiere experiencia microbiológica
- Limitada supervivencia en la muestra
- Terapia antibiótica previa

Método lento

El crecimiento se puede empezar a ver a los 3 días

Se deja hasta el día 12 para confirmar el negativo



1. Cultivo



Medio BCYE

- Contiene hierro y cisteína

Medio BCYE con antibióticos

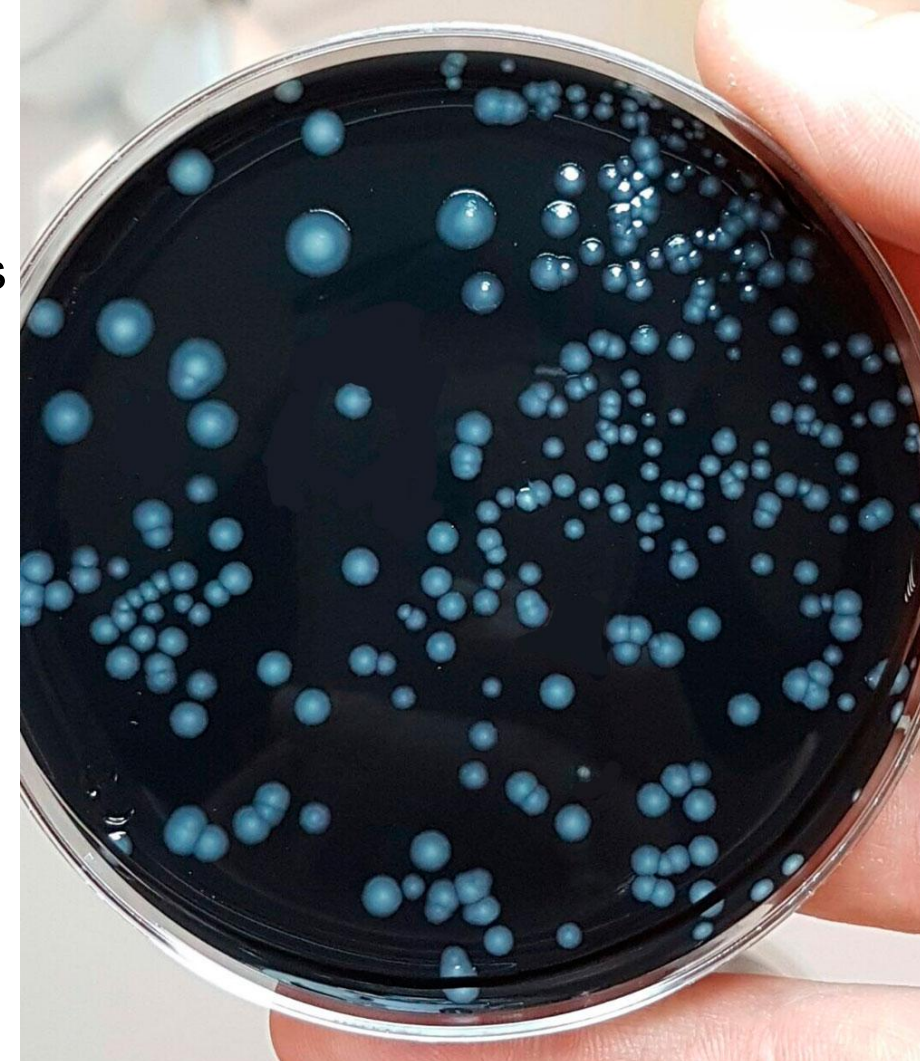
- Inhibe el crecimiento de otras bacterias en muestras mixtas

Necesita condiciones ambientales

- 35-37°C
- Aerobiosis
- Humedad

Tras el positivo se ha de confirmar que es legionella

- MALDI TOF
- PCR
- Bioquímica: no se utiliza mucho



2. Serología

Detecta anticuerpos generados por el paciente en suero

Inmunofluorescencia indirecta

Anticuerpos marcados con fluorescencia directamente en la muestra

Inmunoensayos de quimioluminiscencia

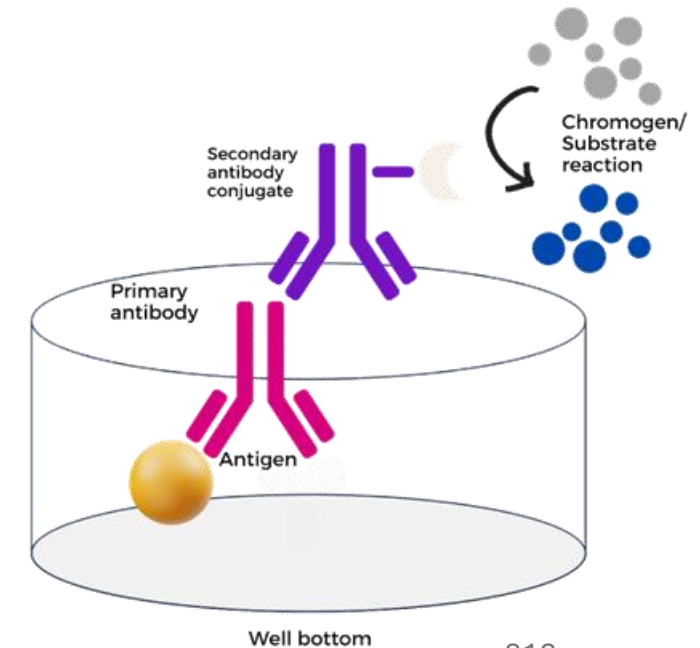
Anticuerpos unidos a enzimas que dan color

Se emplean para ver la **seroconversión** en suero

Se analizan las IgG porque las IgM no las generan todos los pacientes

Esta técnica se emplea para establecer la etiología de una neumonía

Un resultado negativo no descarta la enfermedad



3. Detección de antígeno en orina



Desde el inicio de la infección un componente de la pared de LPS puede ser detectado en orina

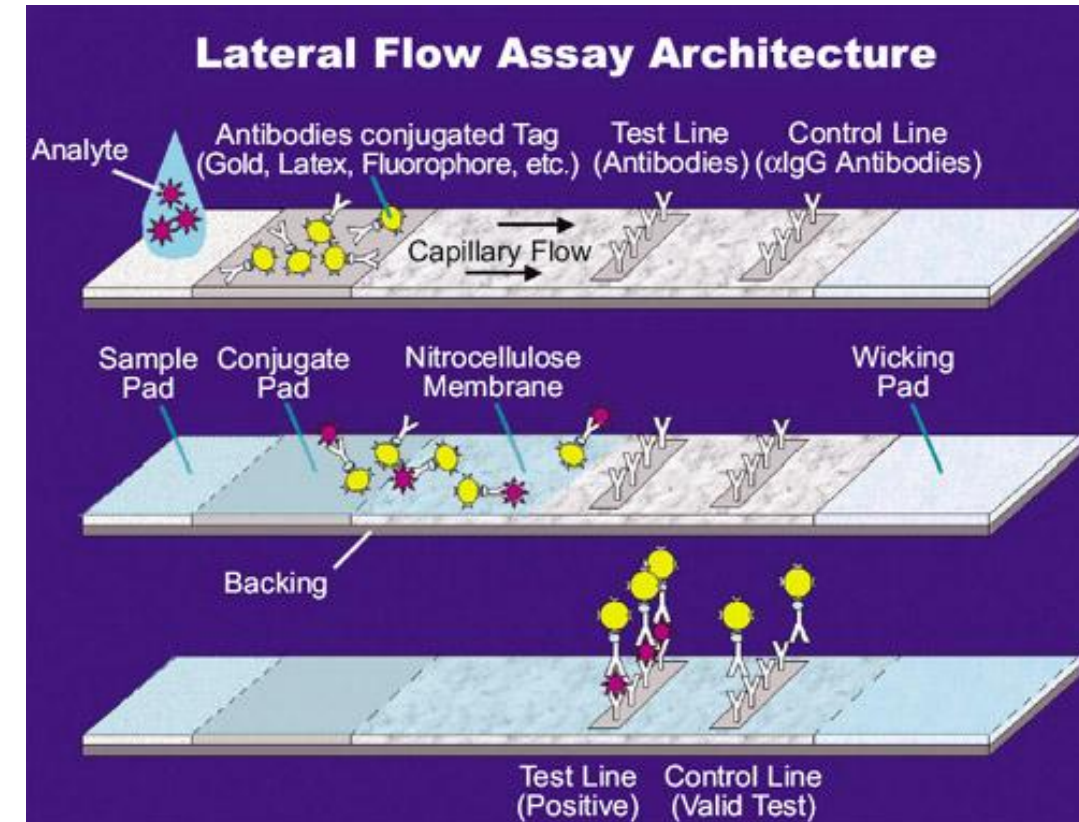
Se puede detectar hasta meses después → neumonía actual o pasada

Es la técnica más utilizada

Inmunocromatografía de orina

Ventajas

- Muy rápido (15-30 min)
- No se ve afectado por la toma de antibióticos



4. PCR



Se puede detectar directamente en la muestra respiratoria

- A partir de DNA bacteriano → no distingue vivas y muertas
- A partir de RNA bacteriano → distingue vivas y muertas

Se puede usar multiplex para detectar distintas bacterias

Sample no.	Source ^c	Culture result	DFA	Multiplex real-time PCR C _T value			
				<i>Legionella</i> spp. (<i>ssrA</i>)	<i>L. pneumophila</i> (<i>mip</i>)	<i>L. pneumophila</i> <i>sgl</i> (<i>wzm</i>)	Human DNA (RNase P)
1	Sputum	+	<i>sgl</i>	27.63	26.84	27.74	25.96
2	Lung	+	<i>sgl</i>	17.15	16.85	17.11	17.66
3	Lung	+	<i>sgl</i>	15.14	14.97	15.19	16.56
4	Br. swab	+	<i>sgl</i>	25.53	24.47	24.53	23.91
5	Lung	+	<i>sgl</i>	26.89	26.18	25.95	20.00
6	Lung	+	<i>sgl</i>	28.55	28.07	26.98	17.66
7	Lung	+	<i>sgl</i>	25.19	24.37	24.17	19.59
8	Lung	+	<i>sgl</i>	25.93	25.30	24.72	19.05
9	Lung	+	<i>sgl</i>	29.36	28.74	28.27	20.50
10	Lung	+	<i>sgl</i>	26.04	25.18	25.15	17.50
11	Lung	+	<i>sgl</i>	26.54	25.97	25.81	21.24
12	Lung	+	<i>sgl</i>	26.72	27.07	26.52	19.83
13	BAL	+	<i>sgl</i>	33.17	32.13	31.97	24.70
14	Sputum	+	<i>sgl</i>	27.88	27.21	26.66	16.75
15	Lung	+	<i>sgl</i>	28.18	27.24	26.95	20.48
16	OP swab	–	NT ^b	ND ^c	ND	ND	24.11
17	Urine	–	NT	ND	ND	ND	23.07
18	OP swab	–	NT	ND	ND	ND	25.17
19	NP swab	–	NT	ND	ND	ND	24.56
20	Sputum	–	NT	ND	ND	ND	22.26
21	Sputum	–	NT	ND	ND	ND	23.98

^a Br. swab, OP swab, and NP swab, bronchial, oropharyngeal, and nasopharyngeal swabs, respectively; BAL, bronchoalveolar lavage specimen.

^b NT, not tested.

^c ND, not detected.

Detección en muestras de agua/aire



El análisis diagnóstico se lleva a cabo como parte del control sanitario para

- Detectar fuentes de infección en brotes
- Determinar la eficacia de la esterilización
- Conocer el riesgo en los hospitales

La toma de la muestra y preparación posterior dependerá de la finalidad del análisis

Un resultado negativo no excluye la presencia de la bacteria

El microorganismo puede encontrarse por debajo del límite de detección

Un resultado positivo debe acompañarse de una medida correctora que elimine o disminuya la bacteria



Detección en muestras de agua/aire



Las técnicas de detección en aguas son similares a las de muestras biológicas

1. Cultivo
2. Detección de antígeno en el agua
3. PCR

1. Cultivo



Es más complicado que en muestras de pacientes

- La concentración suele ser muy baja
- Presencia de otros microorganismos en la muestra

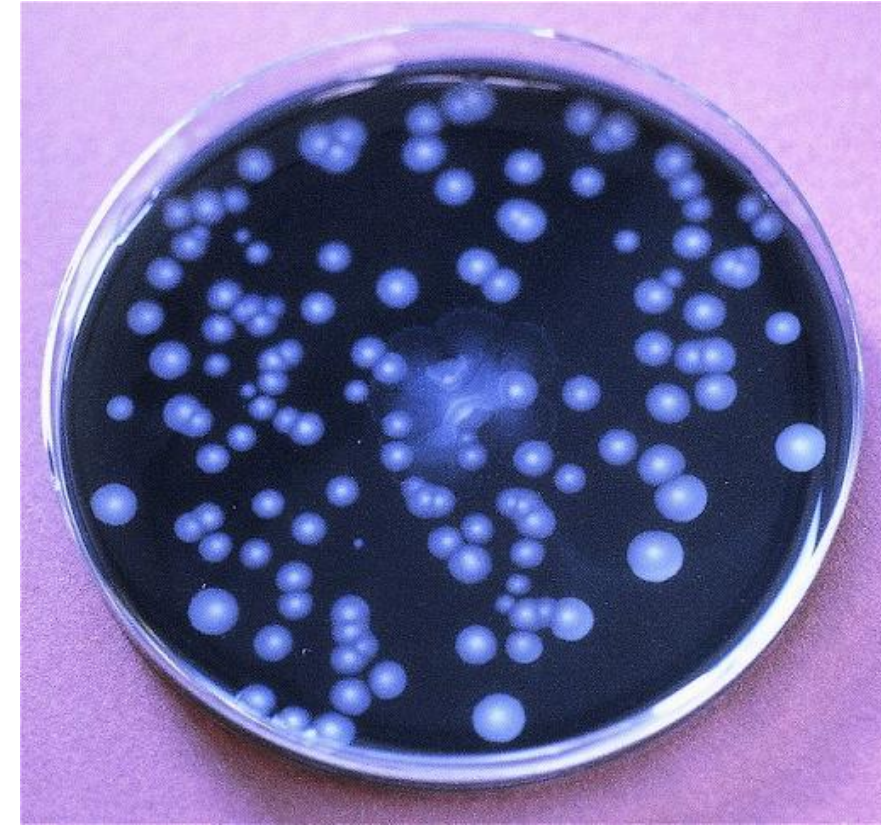
Hay que someter las muestras a un pretratamiento

- Centrifugación → concentrar
- Descontaminación → eliminar microbiota acompañante

Los medios son los mismos que en muestras biológicas (BCYE)

Inconvenientes

- No detecta bacterias no cultivables
- Enmascaramiento por otras bacterias
- Tiempo requerido



1. Cultivo



Anexo I: Detección de *Legionella* en muestras de agua mediante cultivo

PROCEDIMIENTO: En general, las muestras de agua son concentradas y descontaminadas antes de su inoculación en los medios de cultivo. Las muestras de aguas en las que se supone una alta concentración de *Legionella* se pueden sembrar directamente en los medios.

1) Concentración:

- a) En muestras limpias, filtrar mediante vacío, usando membranas de nylon, policarbonato o ésteres de celulosa de tamaño de poro 0,45 µm. Transferir el filtro a un frasco y lavar con 5 a 25 ml de diluyente (soluciones de Ringer o Page, muestra filtrada o agua destilada estéril). Suspender agitando vigorosamente durante 2 min, o cortando el filtro con tijeras estériles y agitando, o raspando con un raspador estéril, o en un baño de sonicación de 2 a 10 min. Anotar volumen de concentrado.

Cuando se sospecha una reducida microbiota acompañante se puede sembrar el filtro directamente en una placa de GVPC, evitando burbujas, o realizar el tratamiento ácido sobre el filtro antes de sembrarlo.

- b) En muestras con elevada turbidez, centrifugar a 6.000 xg durante 10 min (ó 3.000 xg durante 30 min) y resuspender el sedimento en 2 a 20 ml de diluyente.

Los sedimentos y las torundas de raspado se pueden sembrar directamente en los medios.

2) Descontaminación e inoculación de los medios de cultivo: Preparar 3 alícuotas:

- a) Sin tratamiento. Inocular de 0,1 a 0,5 ml de concentrado en una placa de GVPC.
- b) Tratamiento con calor. Transferir 0,5 ml de concentrado a un frasco con tapón de rosca y mantener en baño a 50°C durante 30 min. Inocular de 0,1 a 0,5 ml en una placa de GVPC.
- c) Tratamiento ácido. Se puede usar cualquiera de las siguientes dos opciones:
- Centrifugar de 1 a 10 ml de muestra a 6.000 xg durante 10 min (ó 3.000 xg durante 30 min.), eliminar la mitad del sobrenadante y agitar el sedimento vigorosamente, añadir tampón ácido (pH 2,2) hasta el volumen original, mantener en contacto durante 5 min, e inocular inmediatamente de 0,1 a 0,5 ml en una placa de GVPC. Anotar la dilución (1/2) y el volumen inoculado.
 - Diluir 0,1 ml de concentrado en 0,9 ml de tampón ácido y mantener en contacto 5 min, e inocular de 0,1 a 0,5 ml en una placa de GVPC.

El tratamiento ácido sobre el filtro se realizará de la siguiente manera: Añadir 20 ml de tampón ácido (pH 2,2) sobre el filtro antes de retirar el embudo, mantener en contacto 5 min, eliminar el tampón mediante filtración, lavar con 10 ml de agua destilada, e inocular el filtro directamente en una placa de GVPC.

Una vez secos los inóculos, se extenderán por toda la placa (excepto si se ha sembrado el filtro directamente).

3) Incubación:

- Incubar a 36°C con humedad durante 12-15 días, revisando las placas cada día.
- Subcultivar 2 ó 3 colonias sospechosas/placa GVPC en BCYE α y BCYE α sin cisteína, e incubar a 36°C durante al menos 2 días. Identificar en base a su morfología, ausencia de crecimiento en BCYE α sin cisteína y tinción de Gram (bacilo gramnegativo).
- Confirmar 5 ó 6 colonias/muestra de agua según el PNT-LP-02.

2. Detección de antígeno



El ensayo no es el mismo que el utilizado para muestras clínicas →

Es un ensayo rápido que dura menos de 1h

Se puede hacer en el mismo lugar de recogida de la muestra

Se emplean tubos de reacción que contienen el anticuerpo

1. Añadir muestra
2. Añadir anticuerpo conjugado con peroxidasa / fluoróforo
3. Lavar
4. Revelar con colorante / observar al microscopio

Se mide el cambio de color (azul – amarillo) mediante espectrofotometría

Técnica cuantitativa

Solo detecta el serogrupo 1

No diferencia entre vivas y muertas → no usar tras uso de biocidas

Quimioluminiscencia
ó
Inmunofluorescencia



3. PCR

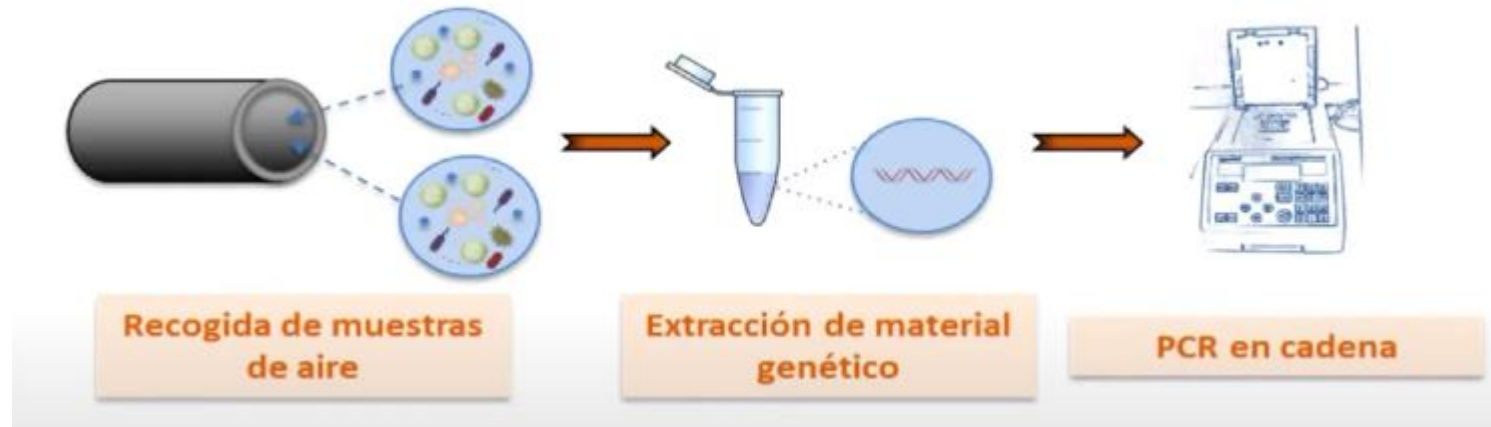


Es el método más empleado por su rapidez

- A partir de DNA bacteriano → no distingue vivas y muertas
- A partir de RNA bacteriano → distingue vivas y muertas

Con qPCR podemos conocer el número de bacterias presentes

ÚNICO método que puede confirmar resultados negativos



Procedimiento en brotes



La aparición de varios casos de legionelosis hace sospechar de un origen común

Iniciar investigación multidisciplinar para identificar el foco de aerosoles contaminados

- Epidemiológica
- Microbiológica
- Ambiental

El estudio del brote incluye

1. Definición del brote
2. Creación de un grupo de trabajo
3. Estudio epidemiológico
4. Estudio ambiental
5. Formulación de hipótesis
6. Medidas a tomar
7. Estudios moleculares
8. Elaboración de un informe

10 mayores brotes de legionelosis notificados, 2008-2012

Rank	Reporting country	Year of reporting	Number of cases	Probable setting of infection	Probable source
1	Spain	2010	51	Community acquired	Cooling tower
2	Spain	2012	39	Community acquired	Decorative fountain
3	Portugal	2012	36	Community acquired	Unknown
4	Spain	2009	25	Community acquired	Unknown
5	UK	2012	23	Community acquired	Spa pool
6	Spain	2010	22	Community acquired	Water system
7	Poland	2010	19	Community acquired	Water system
8	Spain	2012	18	Travel associated	Pool
9	UK	2010	15	Community acquired	Multiple unknown source
10	Spain	2008	14	Community acquired	Unknown

Procedimiento en brotes



1. Definición del brote

Un brote de legionelosis se define como la aparición de **2 o más casos relacionados** epidemiológicamente

2. Creación de un grupo de trabajo

Importante mantener una **estrecha colaboración** entre profesionales multidisciplinares

Realizar reuniones periódicas para **consensuar** pasos a seguir

Determinar si se ha de **informar** la a opinión pública o no

3. Estudio epidemiológico

Realizar **encuesta epidemiológica** que incluya variables de persona, lugar y tiempo

Incluir la exposición de los pacientes a **posibles fuentes de infección**

Procedimiento en brotes



4. Estudio ambiental

Se basa en la **investigación de posibles fuentes de infección** en el área geográfica relacionada con los casos

Toma de muestras de instalaciones revisadas para detectar la presencia de *Legionella*

La toma de muestras se deberá hacer **antes de 48 h** tras la detección del brote, de lo contrario no se tiene la seguridad de hacerlo en ausencia de desinfectantes

Si se han desinfectado, se tomará la muestra **15 días después**

5. Formulación de la hipótesis

La hipótesis sobre la posible fuente/s de infección ha de ser plausible

Esta hipótesis se comprobará posteriormente con estudios analíticos

Procedimiento en brotes



6. Medidas a tomar

Según los resultados del estudio ambiental y pendientes de comprobar la hipótesis, se toman las primeras **medidas de prevención**

- Limpieza
- Desinfección
- Reparación de defectos estructurales
- Paralización de la instalación

7. Estudios moleculares

L. pneumophila serogrupo 1 está muy diseminada en el ambiente, por lo que habrá que tipificar las cepas de los pacientes y las ambientales en estudios genotípicos

Genotipage de las **muestras de cultivos de pacientes** → objetivo a buscar en el **ambiente**

La comparación se hace con técnicas de epidemiología molecular (**genotipificación**)

8. Elaboración de un informe

Cerrado el brote y terminadas las investigaciones se elabora un informe con los aspectos más relevantes, aunque algunas investigaciones parciales continúen

Técnicas de genotipificación



PFGE: electroforesis en campo pulsado

Se digieren las muestras con enzimas de restricción de corte poco frecuente

Se separan mediante una electroforesis

Se comparan los patrones de bandas

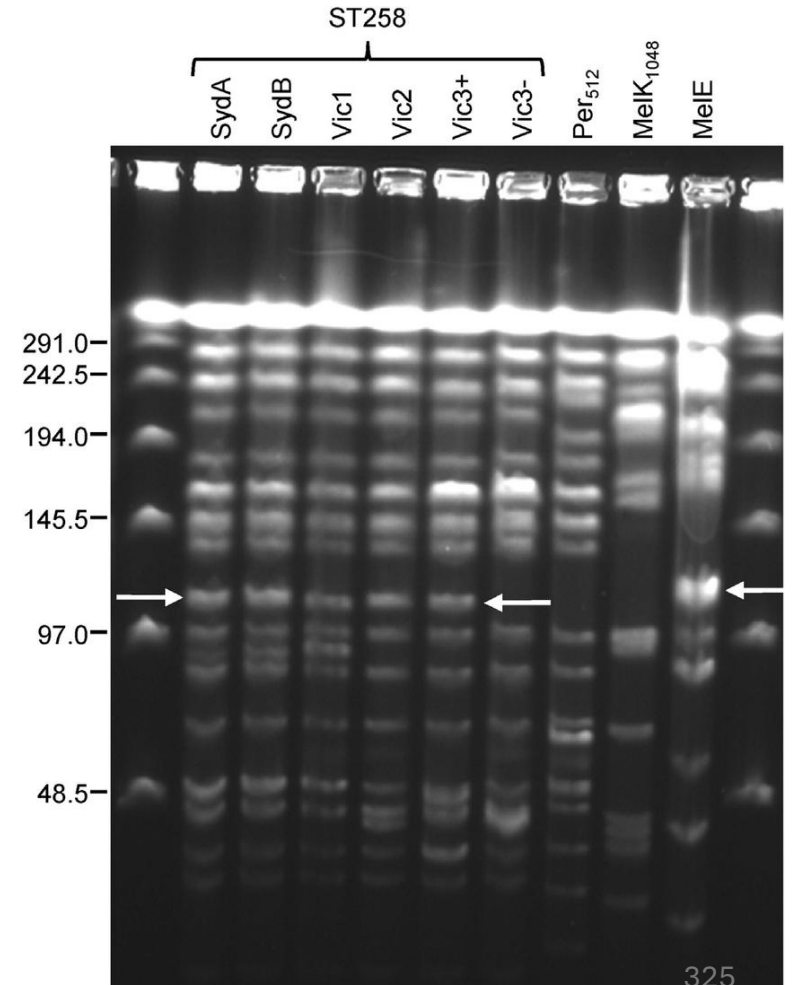
AFLP: digestión de ADN y amplificación de fragmentos

Se digieren las muestras con enzimas de restricción

Se amplifican fragmentos selectivos

Se separan mediante electroforesis

Se comparan los patrones de bandas



Técnicas de genotipificación



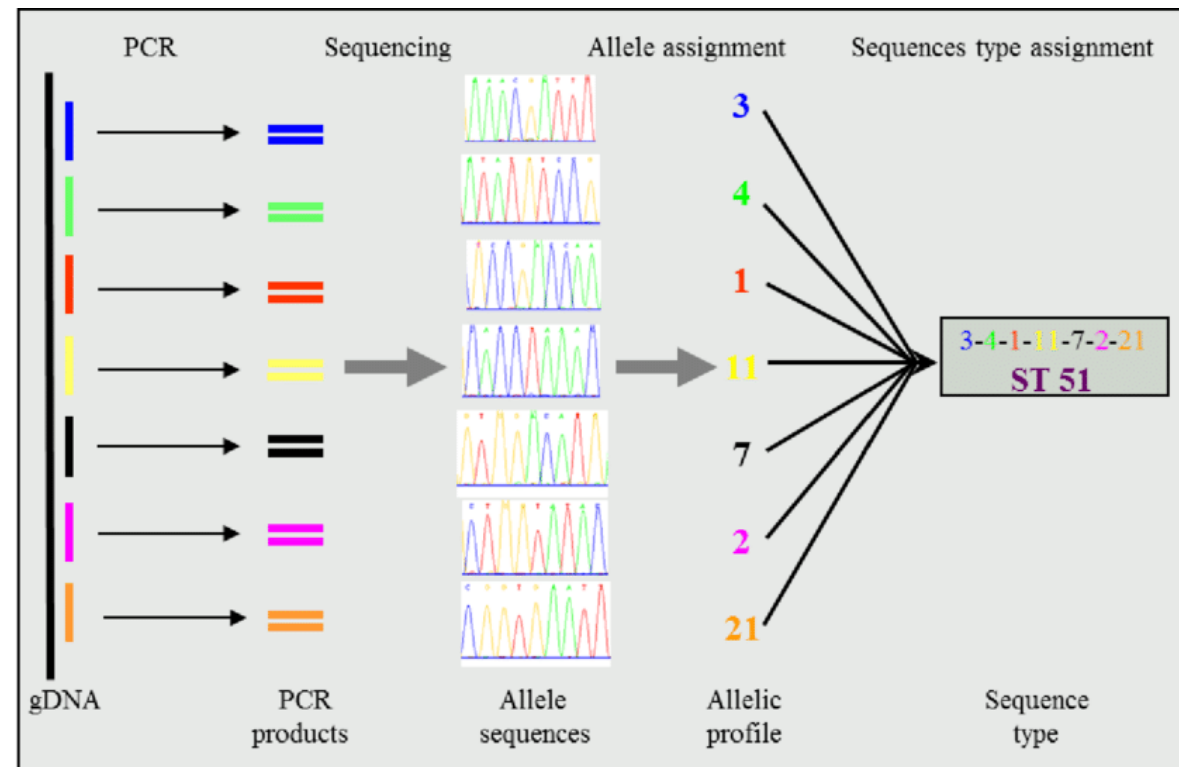
MLST: secuenciación de genes multilocus

Se amplifican genes housekeeping

Se secuencian

A cada variante secuenciada se le asigna un número generando un código

Se compara el código



TODAS ESTAS TÉCNICAS VAN SIENDO
SUSTITUIDAS POR LA SECUENCIACIÓN

Sección III: Laboratorio de hematología

TEMA 13

Hemograma

Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio

Nacho Escrig, PhD

Laboratorio de hematología

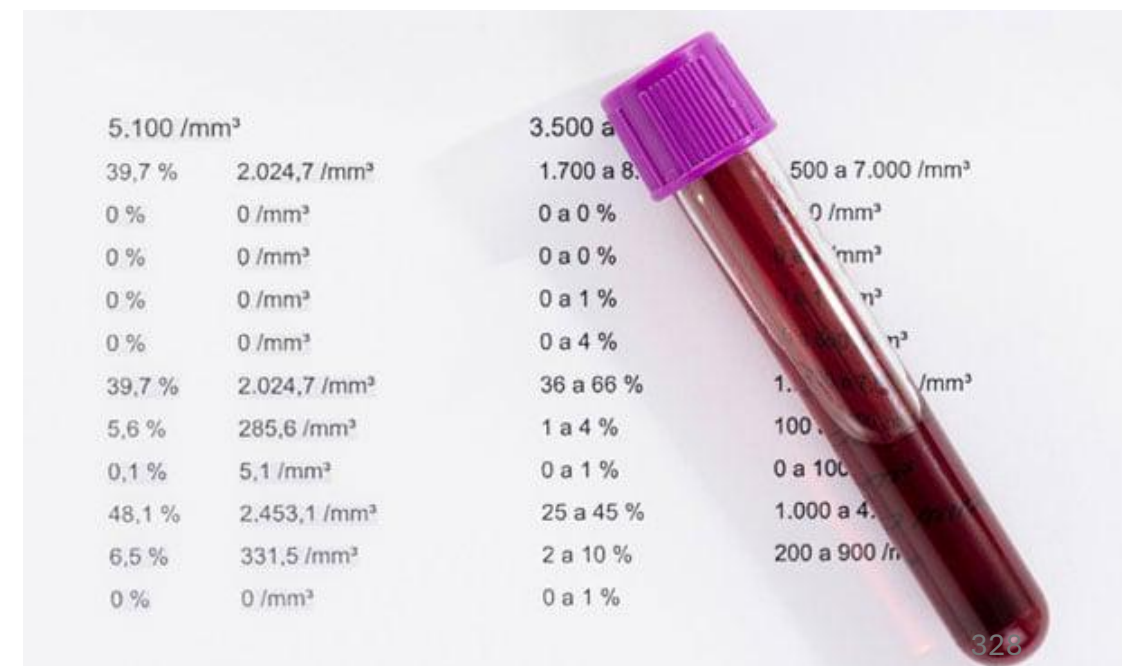


El laboratorio de hematología solo maneja la muestra de sangre

Su principal actividad son los hemogramas

- Es una de las pruebas más solicitadas pues los parámetros que de él se extraen aportan información muy importante sobre la homeostasis del paciente
- Permite tener una visión de la homeostasis del sistema hematopoyético
- En el hemograma se puede evaluar:
 - Serie roja → eritrograma
 - Serie blanca
 - Plaquetas

Estas células son producidas por la hematopoyesis



Hematopoyesis

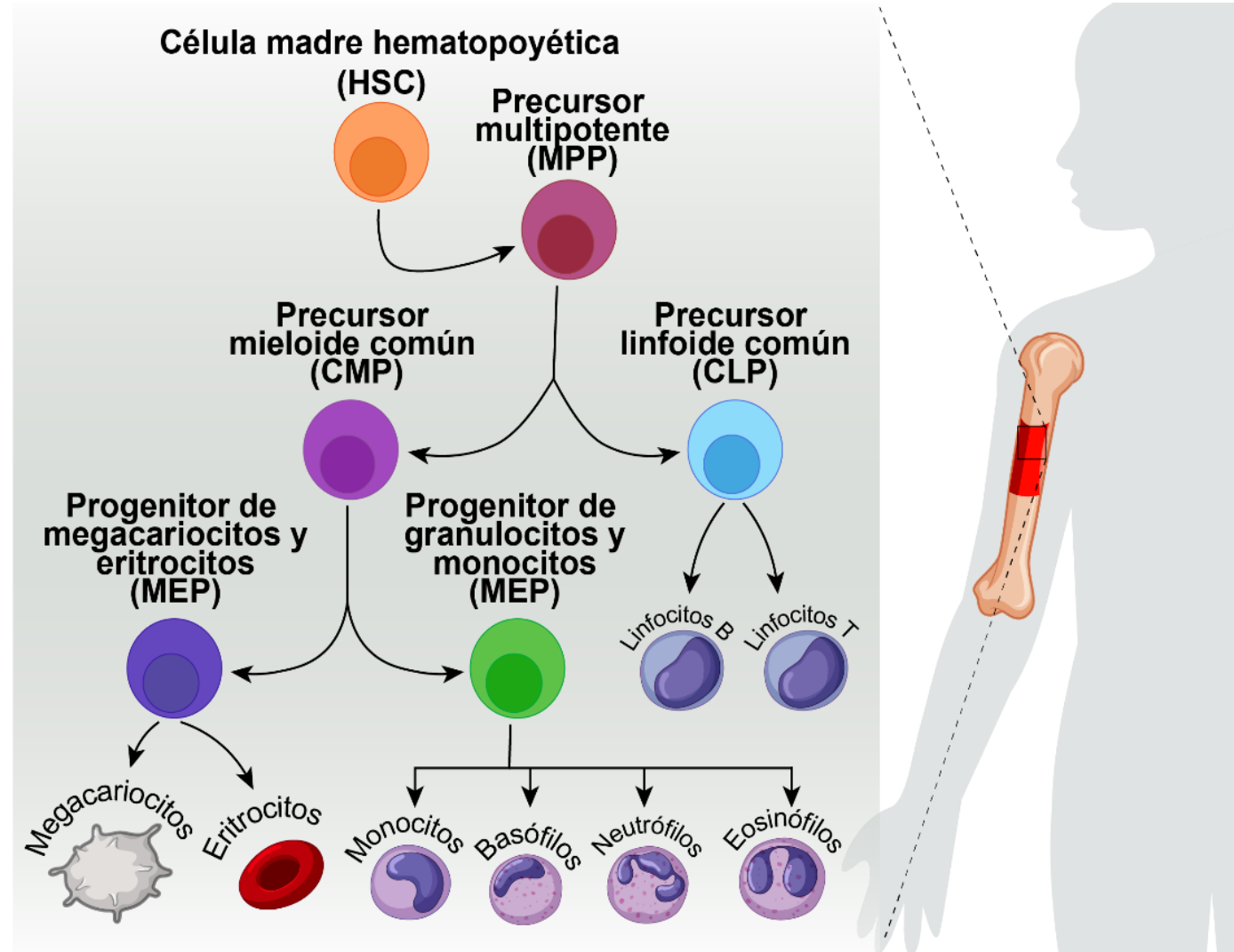


Es el proceso que regula la producción de células del sistema hematopoyético

Se produce en la médula ósea

Vida media celular

- Eritrocitos: 120 días
- Polimorfonucleados: 8-10 h
- Monocitos: 17 h
- Linfocitos: semanas o años
- Plaquetas: 10 días



Eritropoyesis



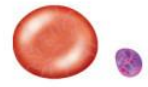
Es el proceso de generación de los glóbulos rojos

Tarda entre 5 y 7 días

Se produce en dos fases

- Generación de reticulocitos → médula ósea
- Maduración a eritrocitos → sangre periférica

Es un proceso estimulado por la **eritropoyetina**, hormona que se secreta por el parénquima renal

20 horas		20 horas	25 horas	30 horas	3 días		120 días
Hemocitoblasto	Proeritroblasto	Eritroblasto Basófilo	Eritroblasto Policromatófilo	Eritroblasto Ortocromatófilo (Normoblasto)	Normoblasto	Reticulocito	Eritrocito
							
Es una célula madre en la médula ósea	En condiciones normales ocupa un 1% a 4% de la médula ósea	Se forman ribosomas que comienzan a fabricar hemoglobina	Su contenido de hemoglobina ya es muy alto	Como no requiere acumular más hemoglobina, se reduce la cantidad de ribosomas presentes	El normoblasto pierde el núcleo	El reticulocito sale de la médula ósea y mantiene ribosomas y mitocondrias por 24 horas más	Luego de 1 día en el sistema circulatorio, el reticulocito pierde los ribosomas y mitocondrias para terminar madurando en eritrocito
6 DÍAS EN LA MÉDULA ÓSEA						EN SANGRE	

Eritrograma



Es el análisis cualitativo y cuantitativo de parámetros relacionados con los eritrocitos en sangre periférica

Incluye:

Parámetros clásicos

1. Recuento de eritrocitos
2. Hematocrito
3. Hemoglobina
4. Índices eritrocitarios
 - Volumen corpuscular medio (MCV)
 - Hemoglobina corpuscular media (MHC)
 - Concentración media de hemoglobina corpuscular (MCHC)
 - Ancho de distribución de eritrocitos (RDW)

Parámetros nuevos

1. Subpoblaciones eritrocitarias
2. Recuento de reticulocitos
3. Eritroblastos

Parámetros clásicos

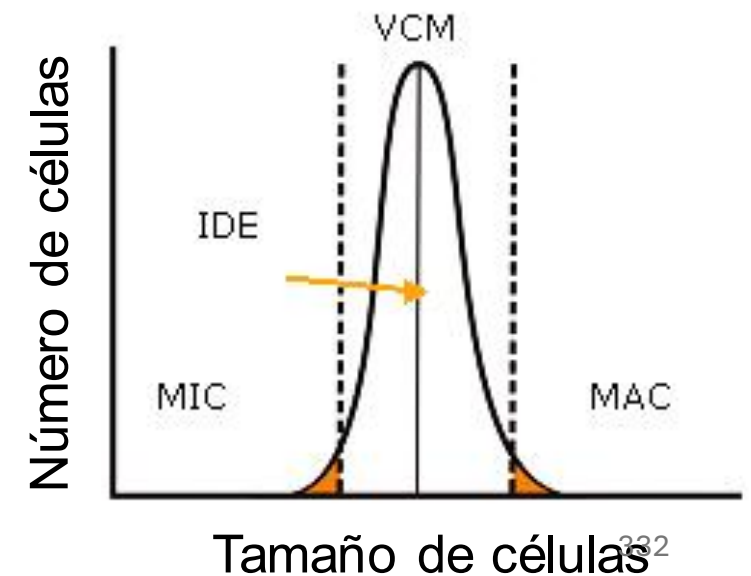
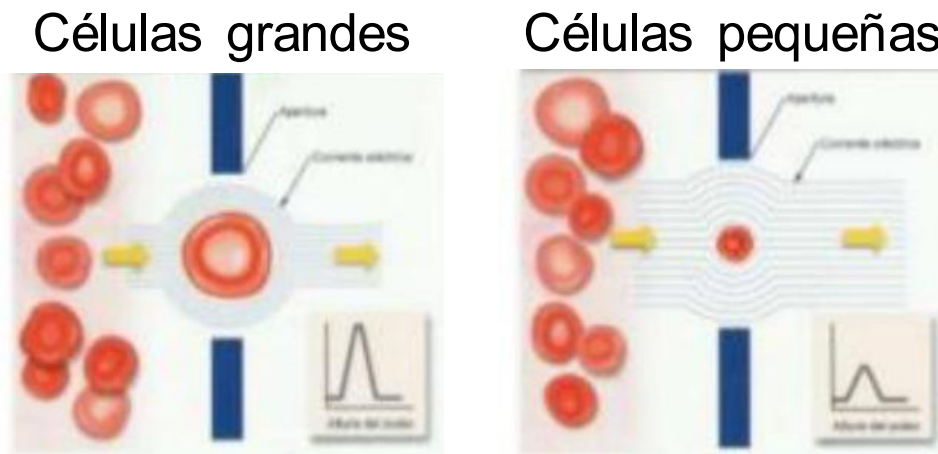


Se llevan a cabo por medio de autoanalizadores que analizan:

- Tamaño celular
- Número de células
- Concentración de hemoglobina

Para calcular el tamaño y el número se emplea la **impedancia eléctrica** o **método de Coulter**

- Se hacen pasar las células por un orificio por el que pasa una corriente eléctrica
- La corriente eléctrica se altera por la célula produciendo pulsos
 - El pulso es proporcional al tamaño
 - El número de pulsos indican el número de células



1. Recuento de eritrocitos

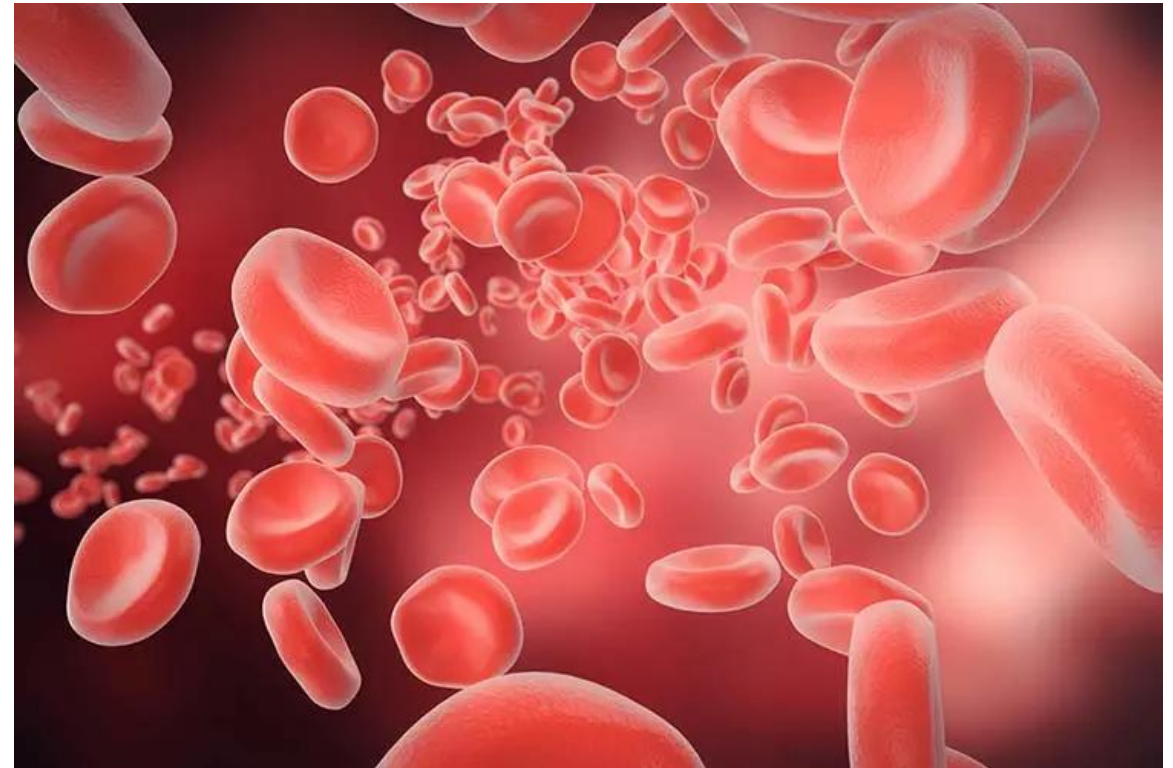


Es la cantidad de eritrocitos en sangre periférica por unidad de volumen

Tiene poca utilidad clínica

Se emplea para obtener otros parámetros como:

- **Hematocrito**
- **Volumen corpuscular medio**
- **Ancho de distribución de eritrocitos**





2. Hematocrito

Es la fracción del volumen eritrocitario.

Volumen ocupado por los glóbulos rojos en el volumen total de sangre.

Se puede expresar como porcentaje o como fracción decimal

$$\text{Hematocrito (\%)} = \frac{\text{Recuento de eritrocitos } \left(\frac{\text{células}}{\text{uL}} \right) \times \text{Volumen corpuscular medio (fL)}}{10}$$

Refleja la **concentración de eritrocitos**

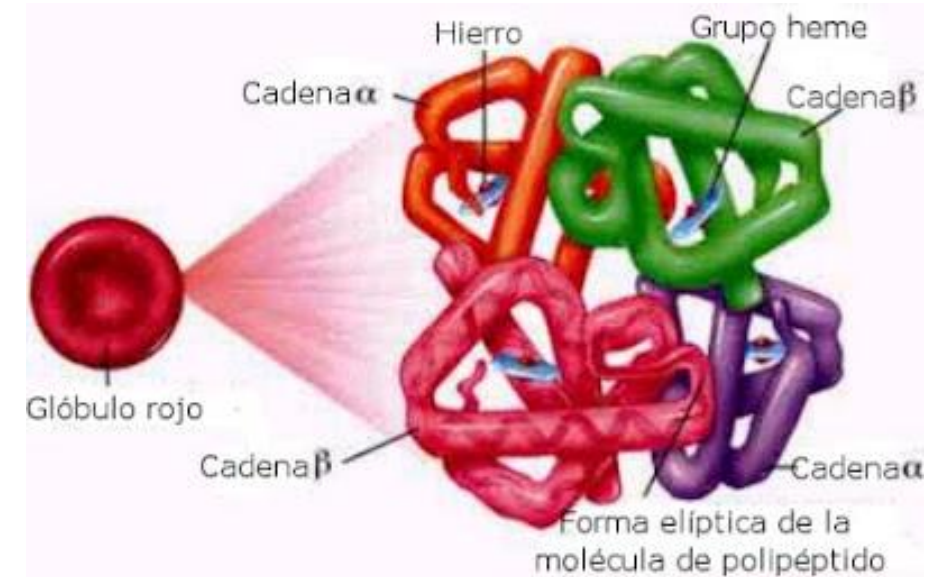
No refleja la masa de eritrocitos

Se emplea para diagnosticar **poliglobulia**, aumento de la concentración de eritrocitos

3. Hemoglobina



- La hemoglobina es el parámetro principal para definir el concepto de anemia
- Hace referencia a la capacidad de transportar oxígeno
- Los eritrocitos tienen una mezcla de hemoglobinas (metahemoglobina, oxihemoglobina, carboxihemoglobina...)
- La medición de la hemoglobina refleja el sumatorio de todas ellas
- Para calcularla se lisan los eritrocitos y se transforman todas las formas en **cianometahemoglobina**
- La cianometahemoglobina se puede medir por espectrofotometría (g/dL)
- La medición de la hemoglobina es importante para calcular otros parámetros como:
 - **Hemoglobina corpuscular media (HCM)**
 - **Concentración media de hemoglobina corpuscular (MCHC)**



4. Índices eritrocitarios



Volumen corpuscular medio (MCV)

- Es el tamaño de los eritrocitos
- Se expresa en fentolitros (fL) que equivalen a 10^{-15} L

$$\text{Volumen corpuscular medio (fL)} = \frac{\text{Hematocrito (\%)} \times 10}{\text{Recuento de eritrocitos} \left(\frac{\text{células}}{\text{uL}} \right)}$$

- Es un parámetro muy estable
- Variaciones superiores a 5 fL son significativas para el diagnóstico

4. Índices eritrocitarios



Hemoglobina corpuscular media (MCH)

- Es la media de la cantidad de hemoglobina de cada eritrocito
- Se expresa en picogramos (pg) que equivalen a 10^{-12} g

$$\text{Hemoglobina corpuscular media (pg)} = \frac{\text{Hemoglobina } \left(\frac{\text{g}}{\text{dL}}\right) \times 10}{\text{Recuento de eritrocitos } \left(\frac{\text{células}}{\text{uL}}\right)}$$

- Define los conceptos de
 - Hipocromía
 - Normocromía
 - Hiperchromía
- Combinada con el volumen corpuscular medio permite definir el tipo de anemia

4. Índices eritrocitarios



Concentración media de hemoglobina corpuscular (MCHC)

- Es la cantidad total de hemoglobina en la masa eritrocítica
- Se expresa en g/dL

$$\text{Concentración media de hemoglobina corpuscular } \left(\frac{\text{g}}{\text{dL}}\right) = \frac{\text{Hemoglobina } \left(\frac{\text{g}}{\text{dL}}\right) \times 100}{\text{Hematocrito } (\%)}$$

- También define los conceptos de
 - Hipocromía
 - Normocromía
 - Hiperchromía
- Combinada con el volumen corpuscular medio permite definir el tipo de anemia

4. Índices eritrocitarios



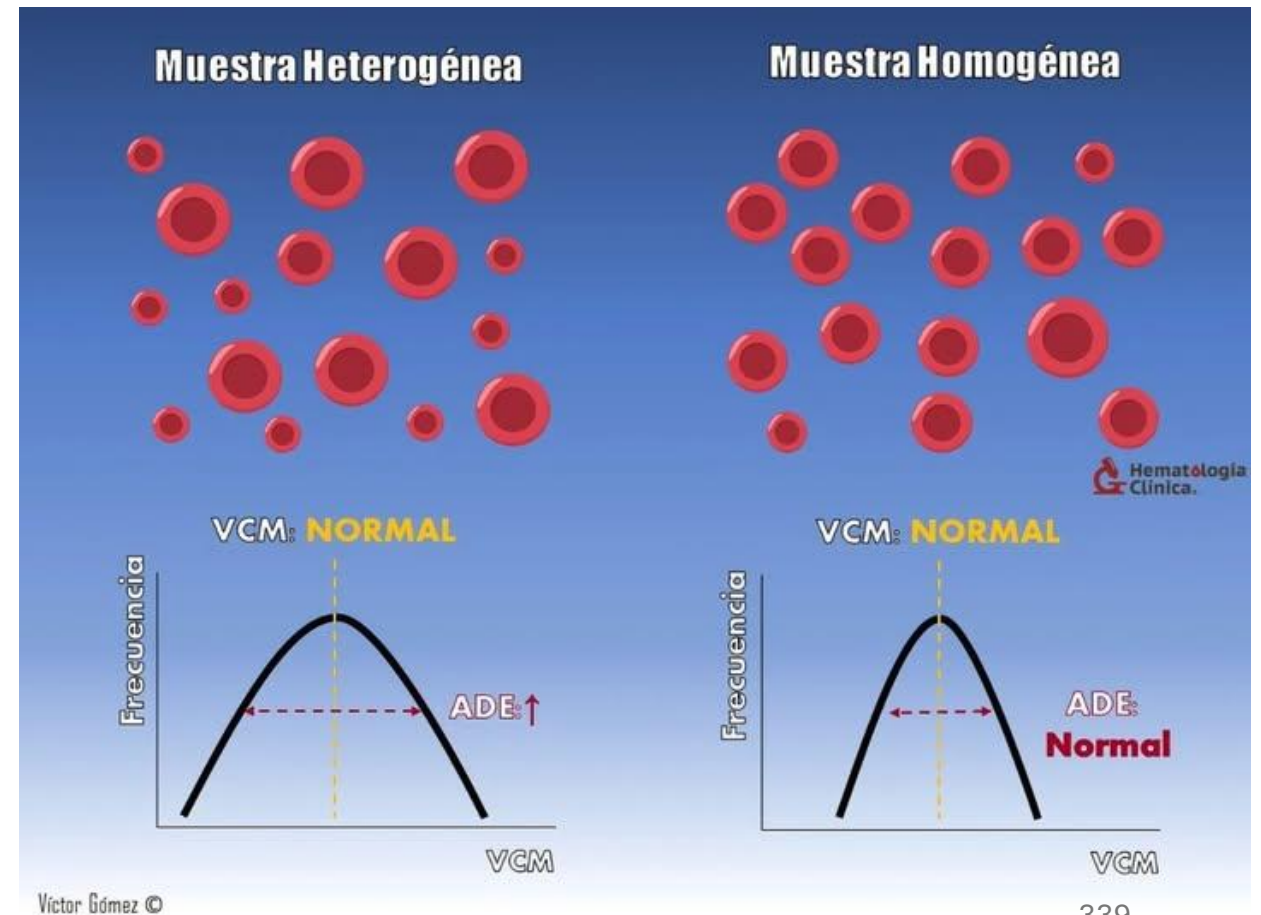
Ancho de distribución de eritrocitos (RDW)

➤ Indica el coeficiente de variación (%) del tamaño de los eritrocitos

➤ El volumen corpuscular medio puede ser irreal por ser una media

➤ El RDW refleja el grado de **anisocitosis**: desigualdad en el tamaño de los eritrocitos

➤ Un valor alto de RDW alerta de una enfermedad carencial, aún cuando no hay cambios en el MCV, MHC o MCHC



Parámetros clásicos



PARAMETRO HEMATOLOGICO	ABREVIATURA	VALOR DE REFERENCIA.	SIGNIFICADO
Recuento total de glóbulos rojos.	RBC	4.5-5.5 mill/mm ³	POLIGLOBULIAS ANEMIAS
Hemoglobina	Hbc	(M) 12-16gr/dl (H) 13.5-17gr/dl (RN) 15-20 gr/dL	
Hematocrito	Hto	(M) 36-48 % (H) 40.5-51 % (RN) 45-60 %	
Volumen corpuscular medio	MCV	80-100 fl	Micro, macro o Normocitos
Hemoglobina corpuscular media.	MCH	27-32 pg	Hipocromía Normocromía Hiperchromía
Concentración de Hemoglobina corpuscular media	MCHC	32-36 g/dL	
Ancho de distribución eritroide	RDW-CV	11.5-14.5 %	Anisocitosis

Nuevos parámetros hematológicos



Actualmente se aplican otras tecnologías para determinar los parámetros hematológicos clásicos

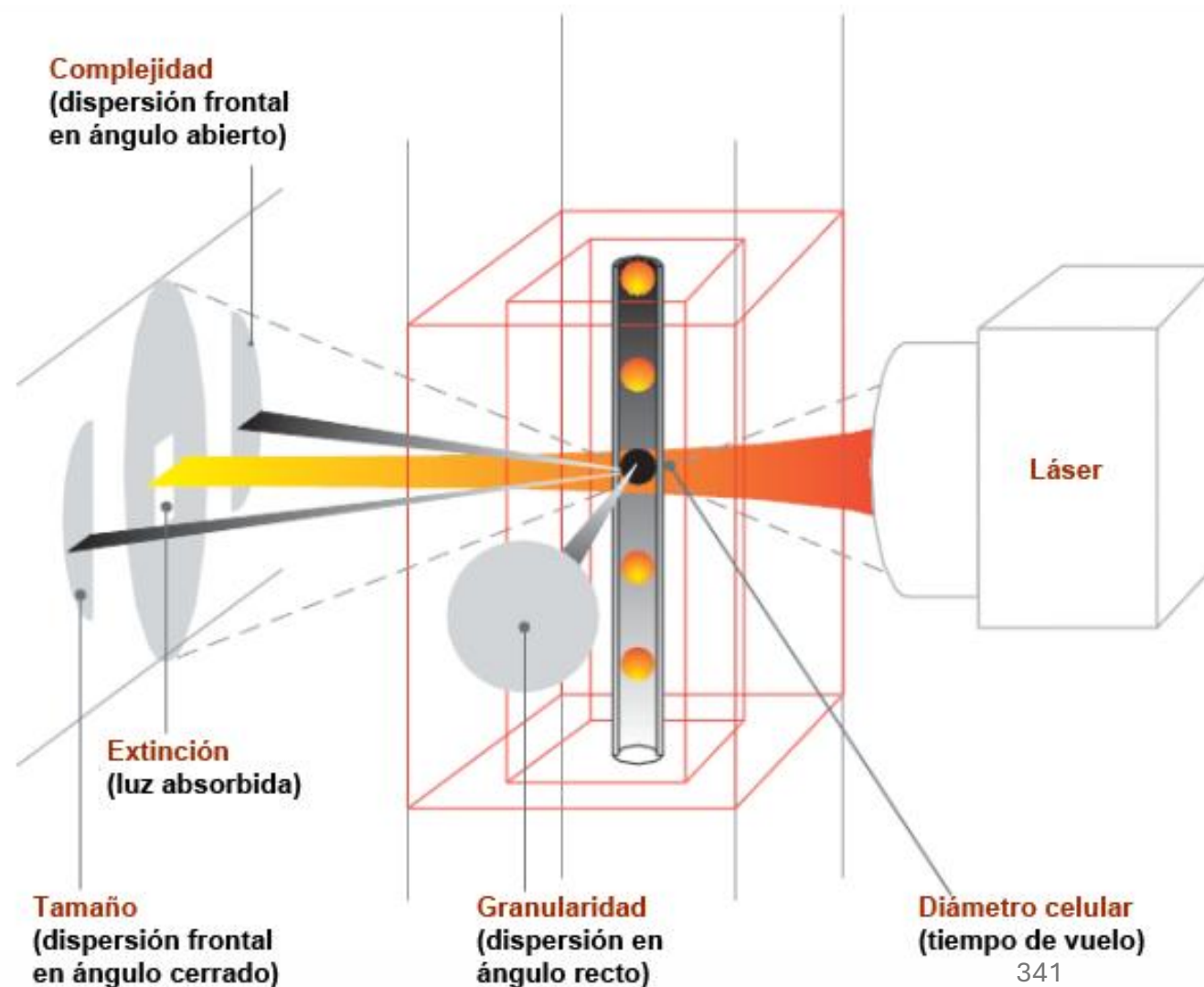
➤ Citometría de flujo y tecnología laser

Esta tecnología se usa para determinar parámetros físicos

- Recuento eritrocitos
- Tamaño de eritrocitos

Pueden calcular nuevos parámetros

1. Subpoblaciones eritrocitarias
2. Recuento de reticulocitos
3. Eritroblastos





1. Subpoblaciones eritrocitarias

La citometría de flujo puede analizar de forma muy precisa parámetros como

- Concentración de hemoglobina: combinando parámetros de refracción y dispersión
- Tamaño celular
- Complejidad interna

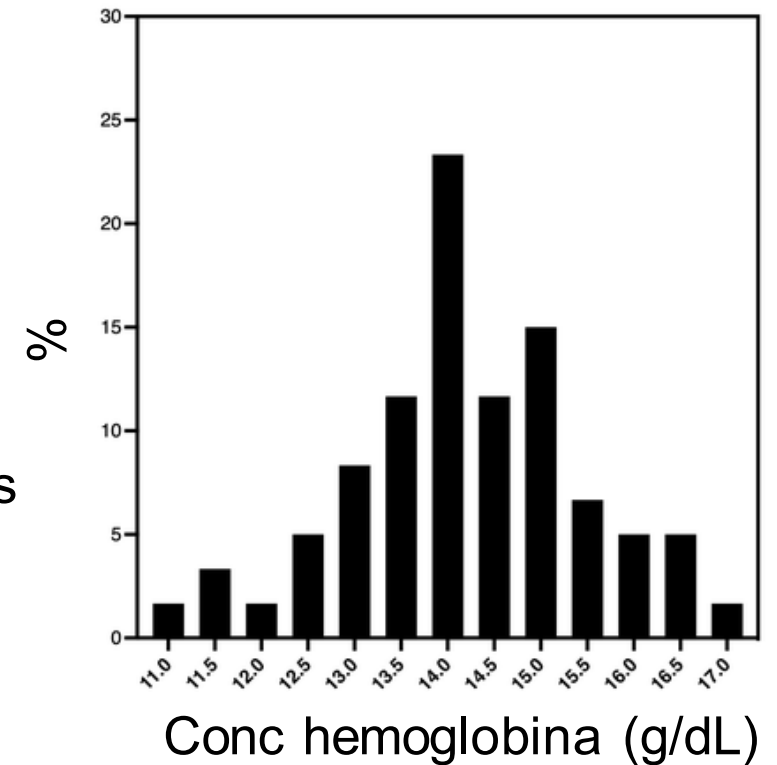
La concentración de hemoglobina permite calcular la **amplitud de distribución de hemoglobina (HDW)**

- Un valor bajo indica que los eritrocitos son **homogéneos** en cuanto a la concentración de Hb
- Un valor alto hace sospechar de **policromasia**: diversidad de la concentración de Hb en los eritrocitos

La amplitud de distribución de hemoglobina se observa en histogramas

Esto permite calcular el porcentaje de poblaciones eritrocitarias:

- **Hipocrómicas**: concentración de hemoglobina < 280 g/L
- **Hipercrómicas**: concentración de hemoglobina > 410 g/L



1. Subpoblaciones eritrocitarias

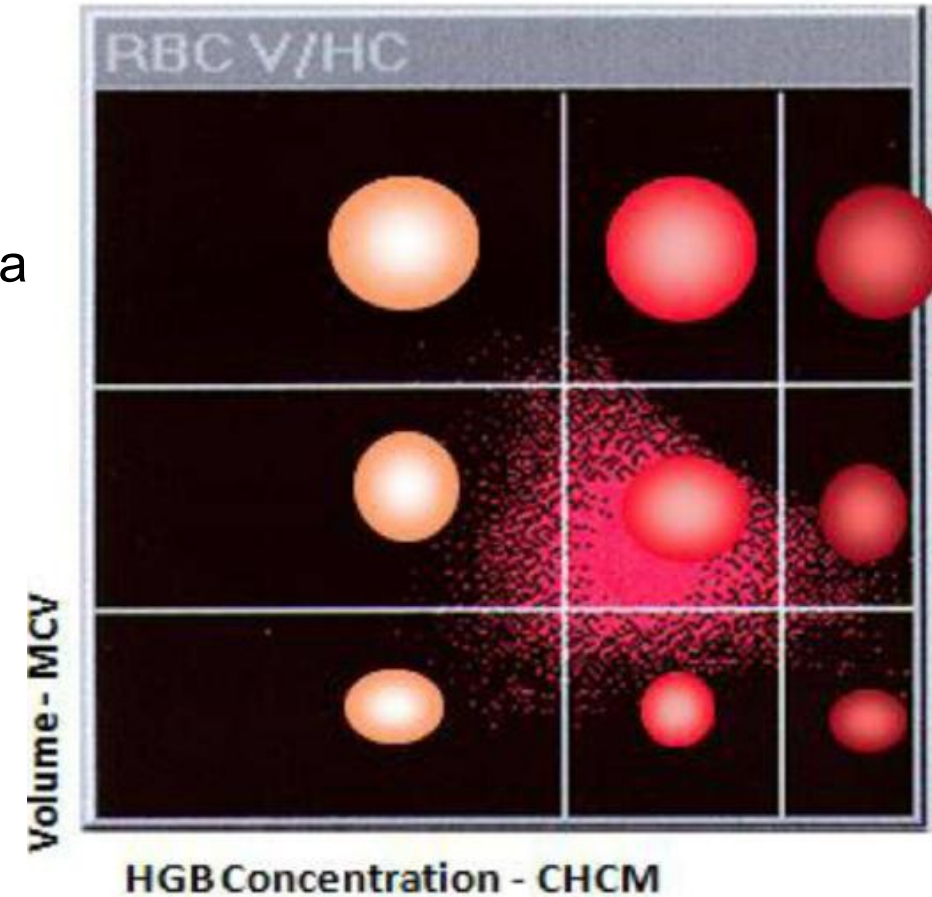


El tamaño de cada eritrocito permite calcular el porcentaje de subpoblaciones eritrocitarias:

- Macrocítricas: volumen >120 fL
- Microcítricas: volumen < 60 fL

De esta forma se evalúa el estado férrico y eritropoyético de una forma mucho más precisa que las medias poblacionales obtenidas en el **Volumen corpuscular medio** y **Hemoglobina corpuscular media**

Esta tecnología nos permite conocer el porcentaje de células con **valores extremos**, alejados de la media, siendo útil en déficits funcionales de hierro o anemias crónicas



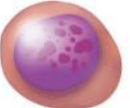
2. Recuento de reticulocitos



Los reticulocitos son eritrocitos jóvenes que conservan restos de ARN, ribosomas y mitocondrias que pueden ser marcados con sondas

Permanecen 2-3 días en la médula y 1-2 días en sangre hasta que maduran

La tasa de producción de eritrocitos en la médula ósea evalúa la actividad hematopoyética

	20 horas	20 horas	25 horas	30 horas		3 días	120 días
Hemocitoblasto	Proeritroblasto	Eritroblasto Basófilo	Eritroblasto Policromatófilo	Eritroblasto Ortocromatófilo (Normoblasto)	Normoblasto	Reticulocito	Eritrocito
							
Es una célula madre en la médula ósea	En condiciones normales ocupa un 1% a 4% de la médula ósea	Se forman ribosomas que comienzan a fabricar hemoglobina	Su contenido de hemoglobina ya es muy alto	Como no requiere acumular más hemoglobina, se reduce la cantidad de ribosomas presentes	El normoblasto pierde el núcleo	El reticulocito sale de la médula ósea y mantiene ribosomas y mitocondrias por 24 horas más	Luego de 1 día en el sistema circulatorio, el reticulocito pierde los ribosomas y mitocondrias para terminar madurando en eritrocito
6 DÍAS EN LA MÉDULA ÓSEA						EN SANGRE	

2. Recuento de reticulocitos



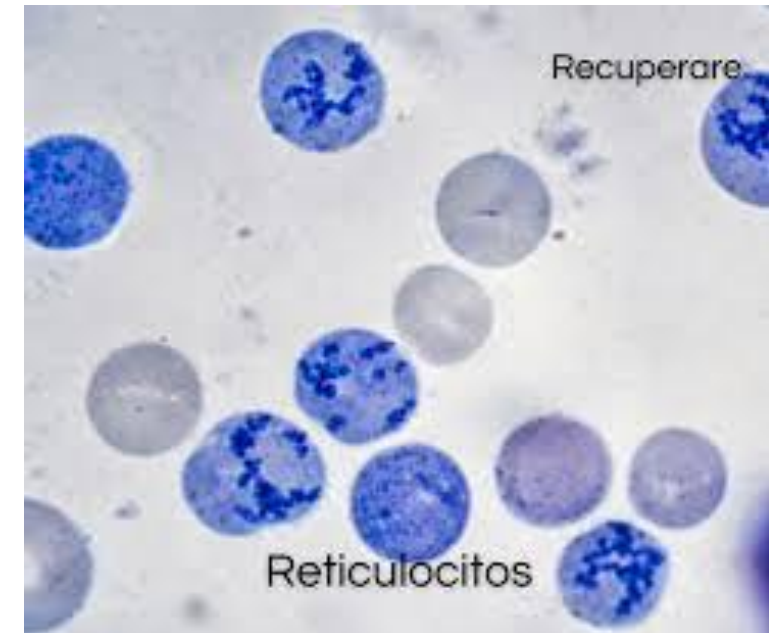
Se puede determinar:

➤ Fracción de reticulocitos inmaduros:

- Los reticulocitos se pueden clasificar por su morfología
- Este parámetro indica recuperación de la médula ósea de forma precoz, ya que estos aparecen antes que los eritrocitos maduros

➤ Hemoglobina en reticulocitos:

- Marcador de enfermedades deficitarias de hierro precoz
- Indica la situación actual de la disponibilidad de hierro
- Indica la calidad de la producción de glóbulos rojos



3. Eritroblastos

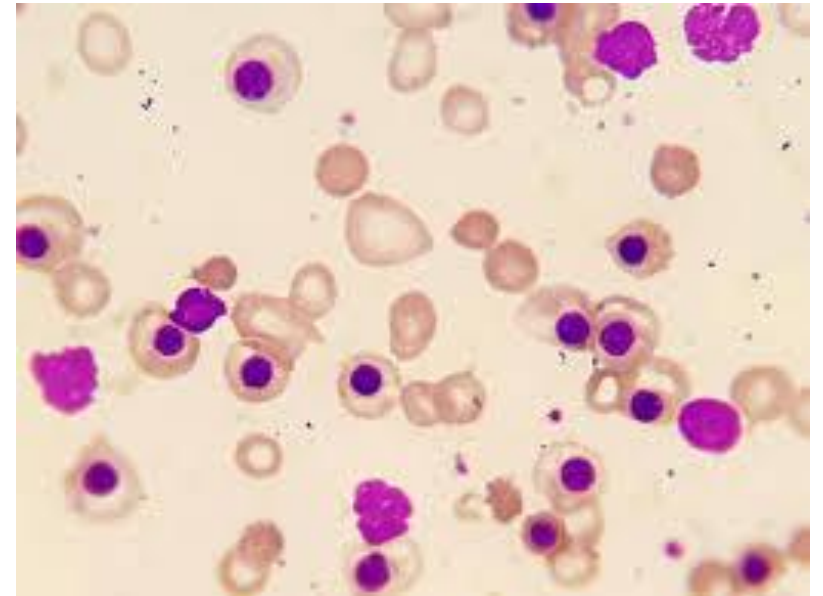
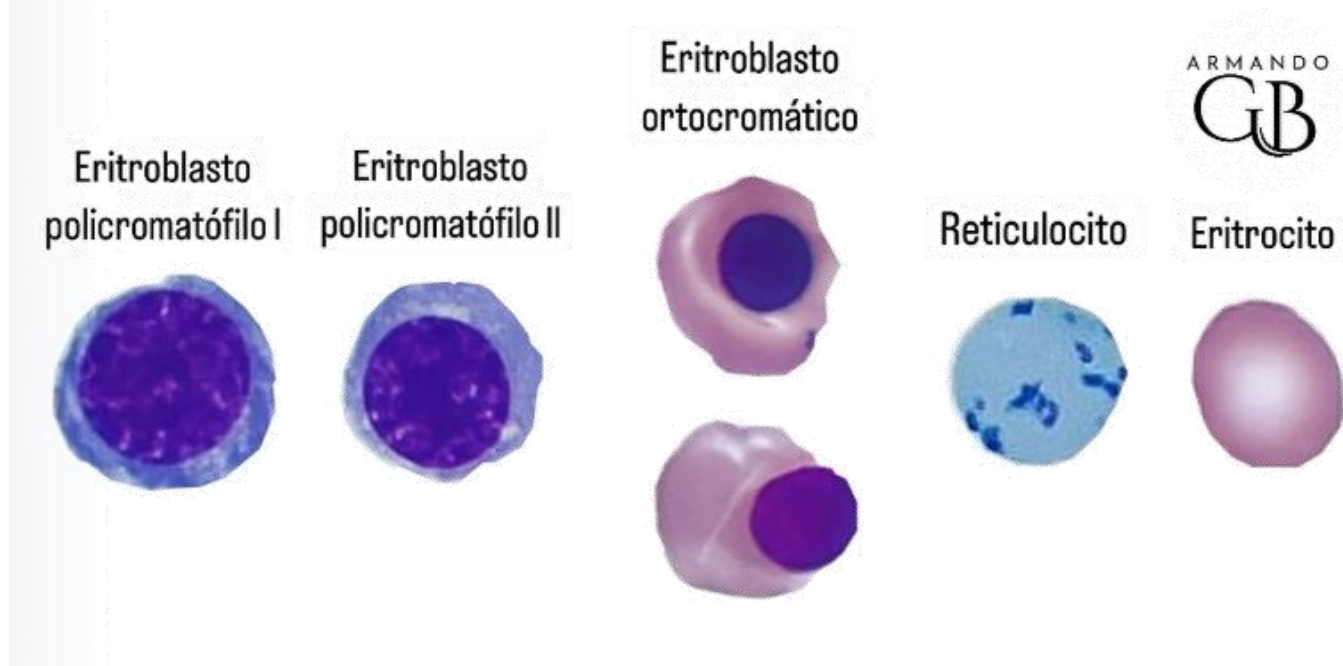


Son glóbulos rojos nucleados

NO deberían de existir en la sangre de adultos, solo en recién nacidos

Su presencia indica un aumento de actividad eritropoyética por:

- Hemólisis aguda
- Cáncer hematológico: leucemias, síndromes mielodisplásicos o linfomas



Anemias



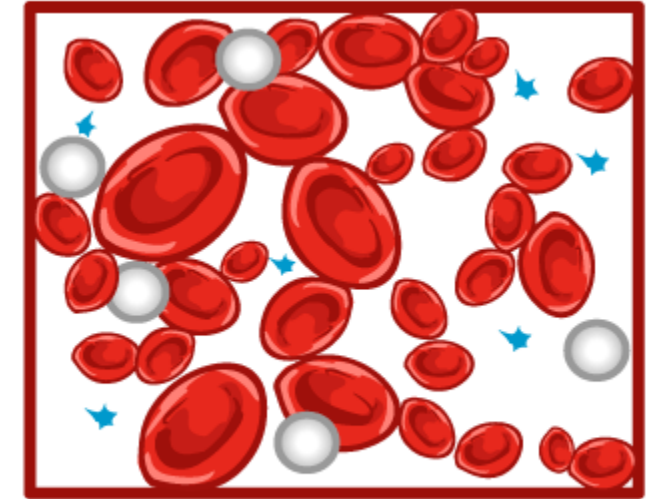
La anemia se produce por una disminución en el número de **glóbulos rojos** o en los **niveles de hemoglobina**

Las anemias pueden ser:

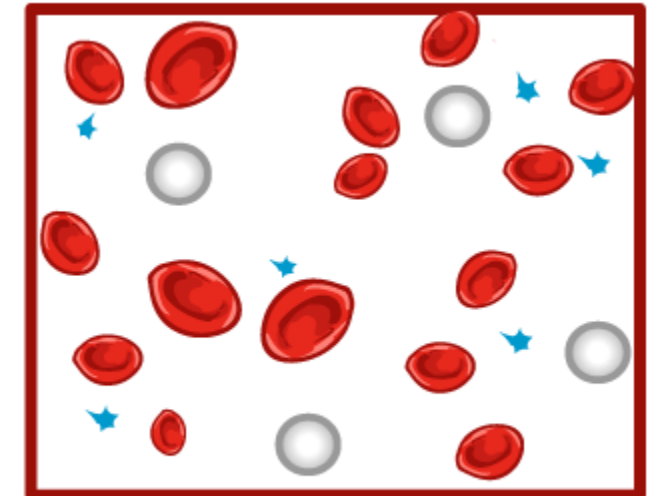
- Manifestación de enfermedad hematológica
- Manifestación secundaria a muchas enfermedades

Parámetros hematológicos normales

- Glóbulos rojos → 4,4-5,9 M/uL
- Hemoglobina → 11 – 17,7 g/dL
- Volumen corpuscular medio (MCV) → 80 – 100 fL
- Hemoglobina corpuscular media (MCH) → 27 – 32 pg



Sangre normal

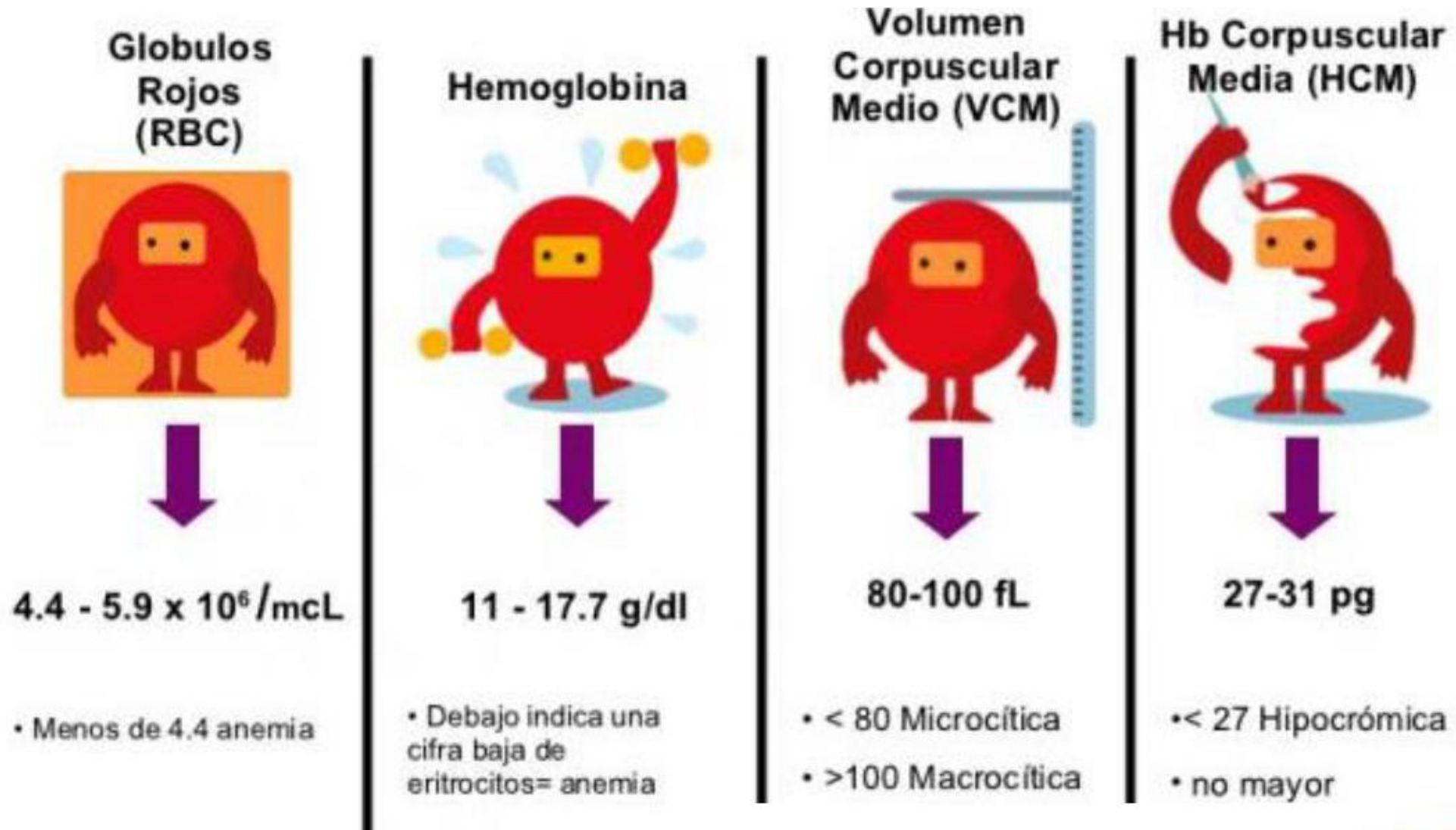


Anemia

Anemias



Parámetros del hemograma más empleados para clasificar anemias

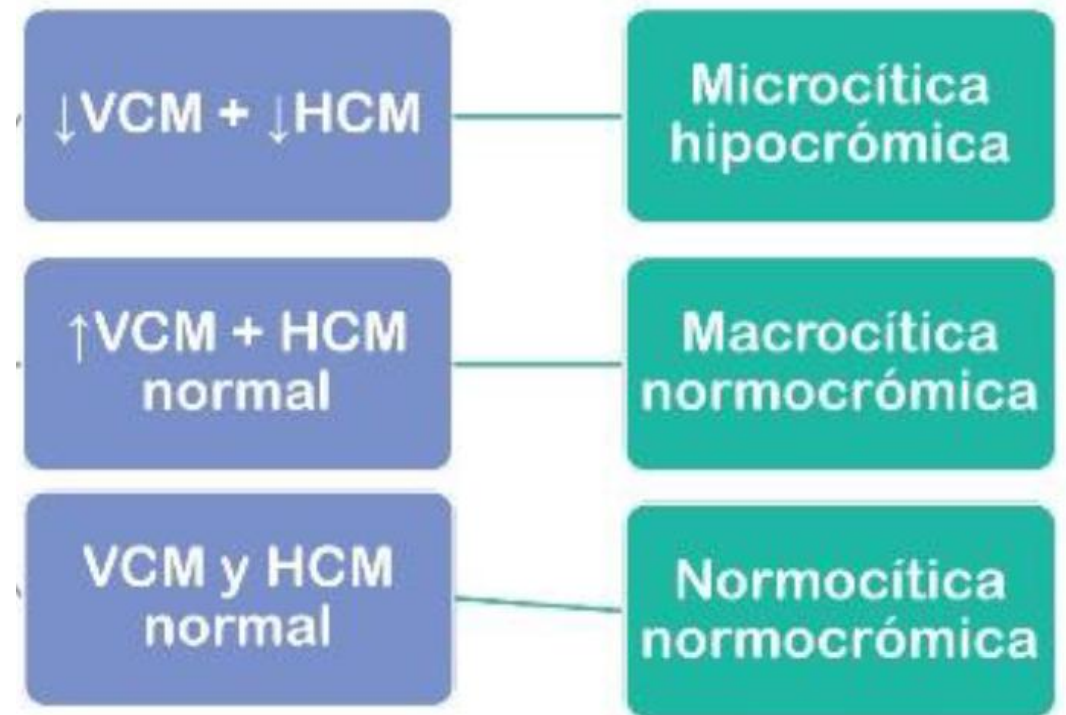


Anemias



Las anemias se clasifican por:

- Morfología: según el tamaño del eritrocito
 - Microcítica: $MCV < 100 \text{ fL}$
 - Normocítica: $80 \text{ fL} < MCV < 100 \text{ fL}$
 - Macrocítica: $MCV > 100 \text{ fL}$
- Concentración de hemoglobina
 - Hipocrómica: $MCH < 27 \text{ pg}$
 - Normocrómica: $27 \text{ pg} < MCH < 31 \text{ pg}$
 - Hiperocrómica: NO EXISTE. Si sucediera los eritrocitos se lisan por ósmosis
- Etiología
 - Carencia de producción
 - Trastornos en la maduración
 - Destrucción



Etiología de las anemias

Los glóbulos rojos pueden disminuir por

- Carenca de producción
 - Aplasias medulares
 - Infiltración medular de tumores
 - Déficit de hierro
 - Insuficiencia renal crónica
- Trastornos de maduración
 - Déficit de vitamina B12 o folatos
 - Anemias refractarias
- Destrucción / Pérdida
 - Hemorragias
 - Hemólisis intravascular mecánica o autoinmune
 - Alteraciones en la membrana del hematíe (hereditaria)
 - Alteraciones en la hemoglobina (hereditaria)



A	Alteraciones nutricionales Deficiencias de hierro, vitamina B12, y ácido fólico que afectan la producción de glóbulos rojos y la síntesis de hemoglobina.
N	Neoplasias y trastornos de la médula ósea Enfermedades como leucemia, mielodisplasia o infiltración de la médula ósea por cáncer, que alteran la producción de glóbulos rojos.
E	Enfermedades crónicas Condiciones como insuficiencia renal, enfermedades autoinmunes o inflamatorias, que afectan la producción y supervivencia de los glóbulos rojos.
M	Malabsorción Problemas en la absorción de nutrientes esenciales (hierro, vitamina B12, ácido fólico) debido a enfermedades como la celiaquía o cirugías gastrointestinales.
I	Infecciones Infecciones como malaria, leishmaniasis visceral o esquistosomiasis, que causan anemia por hemólisis, supresión de la médula ósea o pérdida crónica de sangre.
A	Anomalías hereditarias Trastornos genéticos como la anemia de células falciformes, talasemia o esferocitosis hereditaria, que causan hemólisis o producción defectuosa de glóbulos rojos.
S	Sangrado (Hemorragia) Pérdida aguda o crónica de sangre, como en úlceras gastrointestinales, menstruaciones abundantes o traumatismos.

Glóbulos rojos y hemoglobina

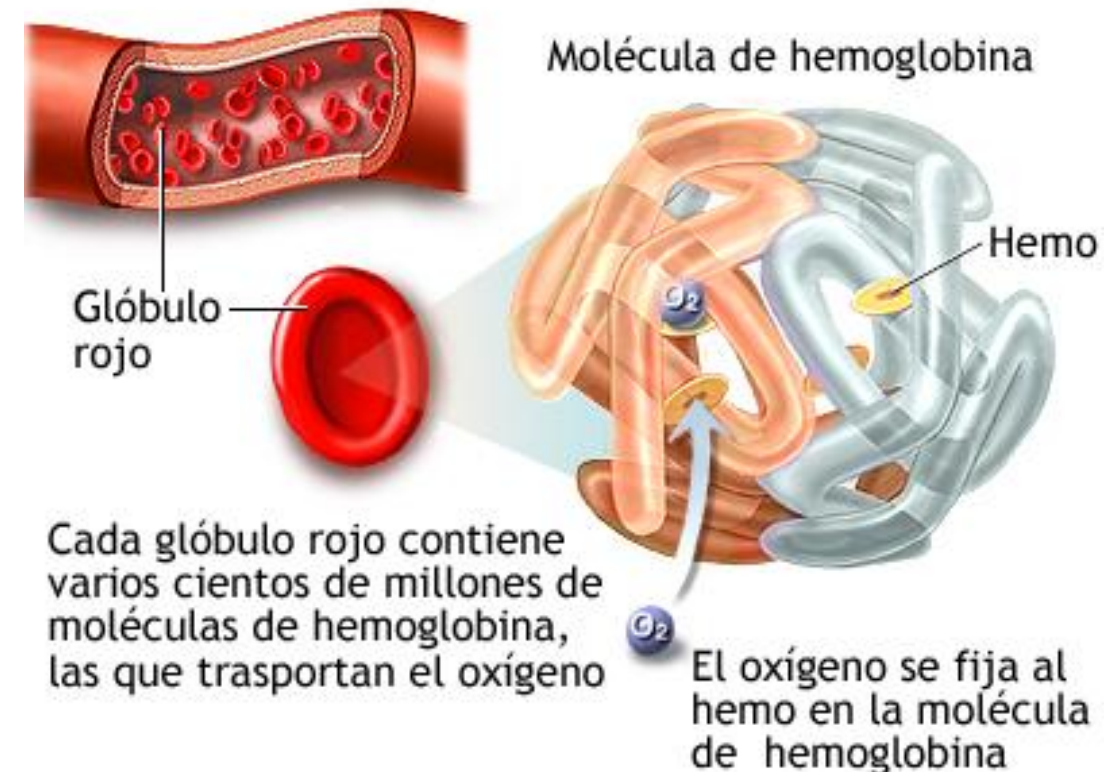


La principal función de los glóbulos rojos es el transporte de oxígeno en la sangre y su liberación en los tejidos

El oxígeno se transporta en el interior del hematíe unido a la hemoglobina

La hemoglobina está formada por dos cadenas alfa y dos cadenas beta denominadas **globinas**

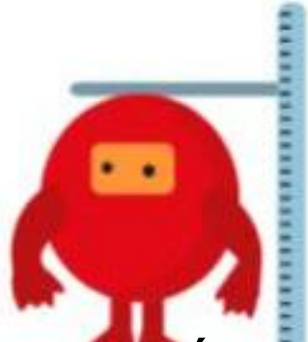
Cada globina tiene un **grupo hemo** que contiene un átomo de hierro en estado de oxidación ferroso (+2)



Clasificación de anemias



La mejor forma de clasificarlas es combinando los parámetros del hemograma con la etiología

 MICROCÍTICAS	 NORMOCÍTICAS	 MACROCÍTICAS
• Anemia ferropénica • Anemia de enfermedad crónica • Talasemias • Sideroblastia	• HEMOLÍTICAS • Esferocitosis • Deficiencia de G6PD • Células falciformes • NO HEMOLITICAS • Pérdida de sangre • Anemia aplásica	• MEGALOBLÁSTICAS • Deficiencia de Vitamina B12 • Deficiencia de ácido fólico • NO MEGALOBLASTICAS • Hipotiroidismo • Enfermedad hepática

Anemias microcíticas



Se caracterizan por la producción de glóbulos rojos más pequeños de lo normal ($VCM < 80 \text{ fL}$)

Su principal causa es la disminución o alteración en la producción de hemoglobina

Casi siempre son **hipocrómicas**

Clasificación:

1. Ferropénica
2. Enfermedad inflamatoria crónica
3. Talasémica
4. Sideroblástica



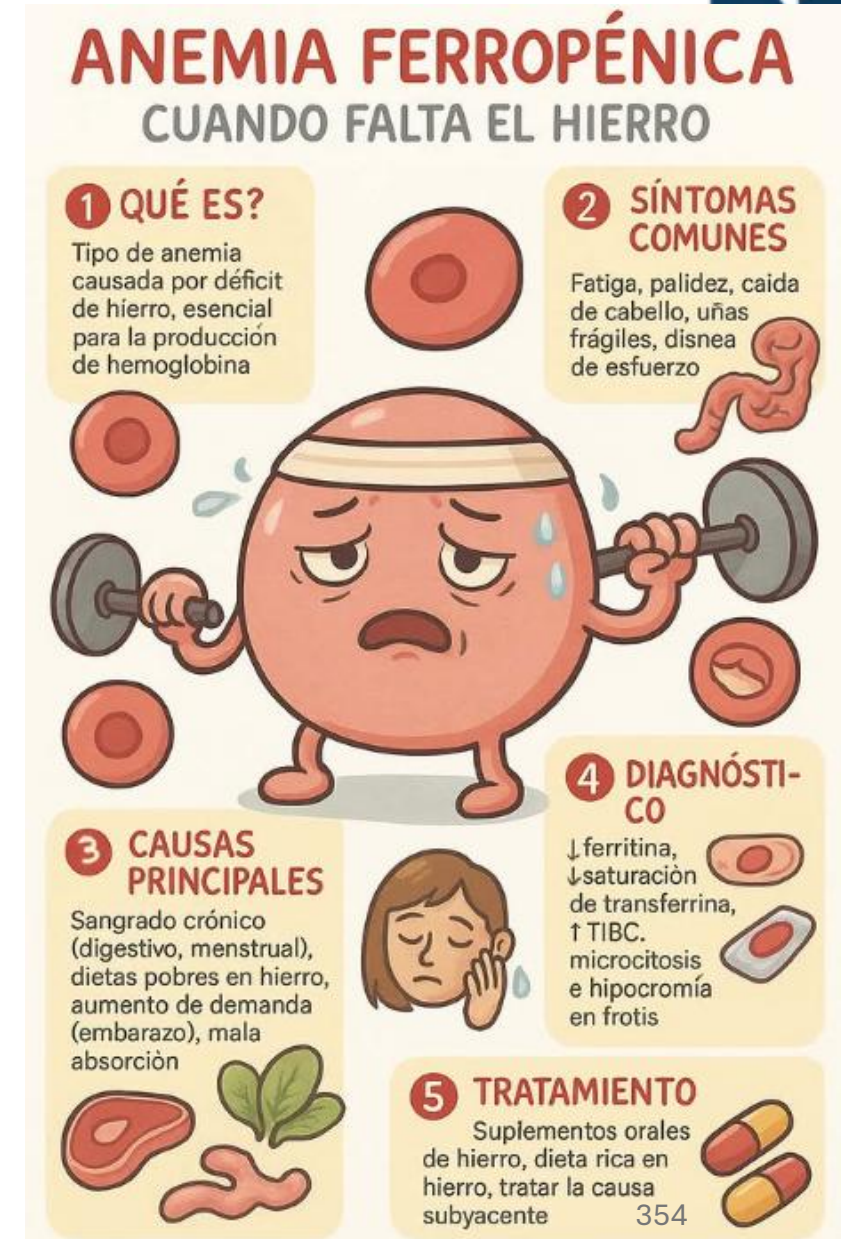
MICROCITICAS

- Anemia ferropénica
- Anemia de enfermedad crónica
- Talasemias
- Sideroblastia

Anemias microcíticas

1. Ferropénica

- La **anemia ferropénica** es la anemia microcítica más frecuente
- El 67% del hierro corporal está en las hemoglobinas
- El déficit de hierro afecta a la producción del grupo hemo y por tanto a la producción de eritrocitos
- La ferritina < 15 ug/fL es el mejor parámetro para diagnosticar la anemia ferropénica
- Las principales causas de este déficit de hierro son:
 - Déficit nutricional
 - Malabsorción
 - Sangrados por:
 - AINEs
 - Neoplasias colónicas
 - Enfermedad inflamatoria intestinal
 - Úlceras pépticas



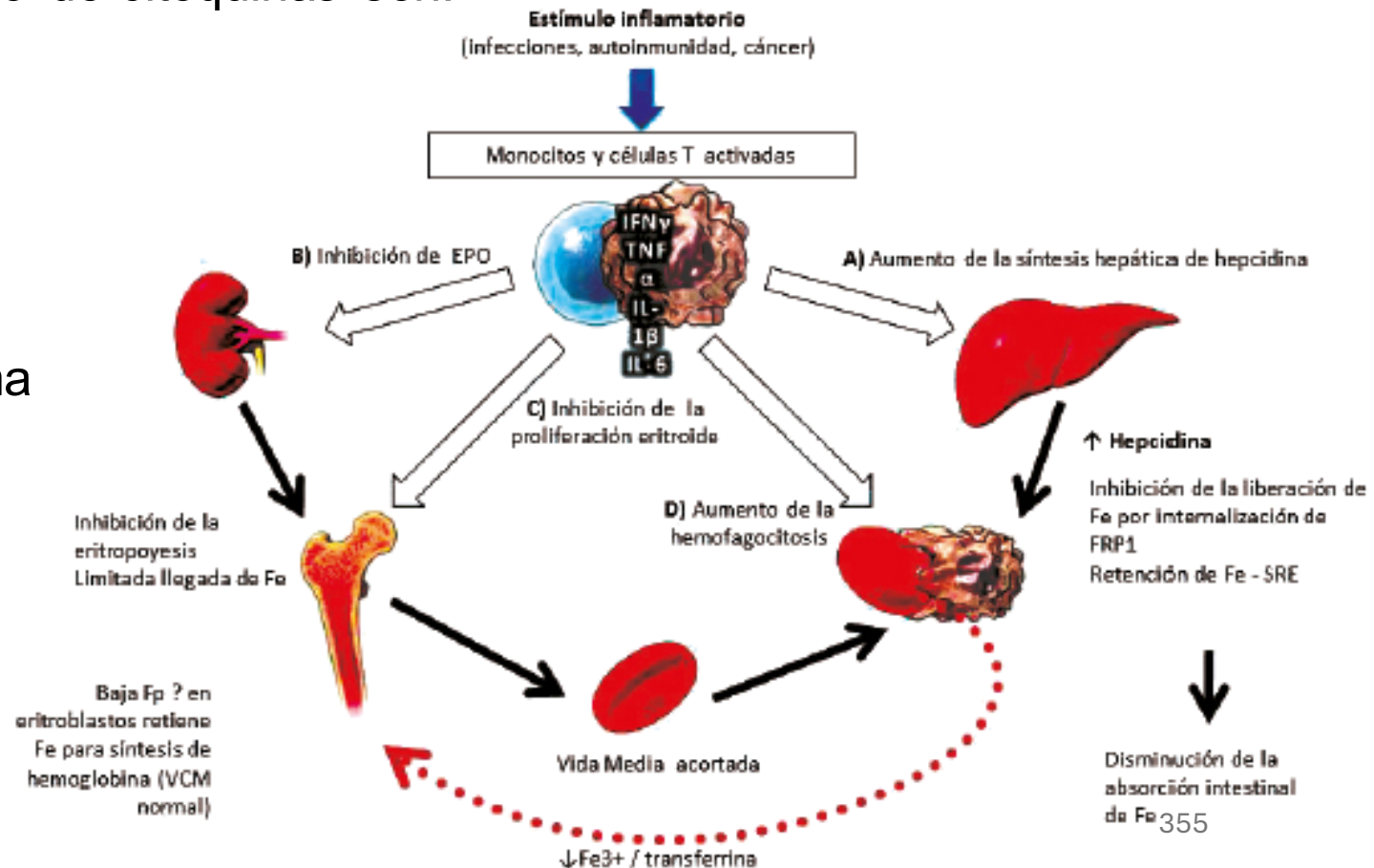
Anemias microcíticas



2. Enfermedad inflamatoria crónica

- La liberación de ciertas citoquinas inflamatorias (**IL6**) produce la inhibición de la eritropoyesis
- Las principales causas de este aumento de citoquinas son:

- Trastornos autoinmunes
 - Enfermedad de Crohn
 - Lupus eritematoso
 - Artritis reumatoides
 - Colitis ulcerosa
- Cánceres hematológicos → linfoma
- Infecciones prolongadas
 - Endocarditis bacteriana
 - Osteomielitis
 - VIH
 - VHB
 - VHC

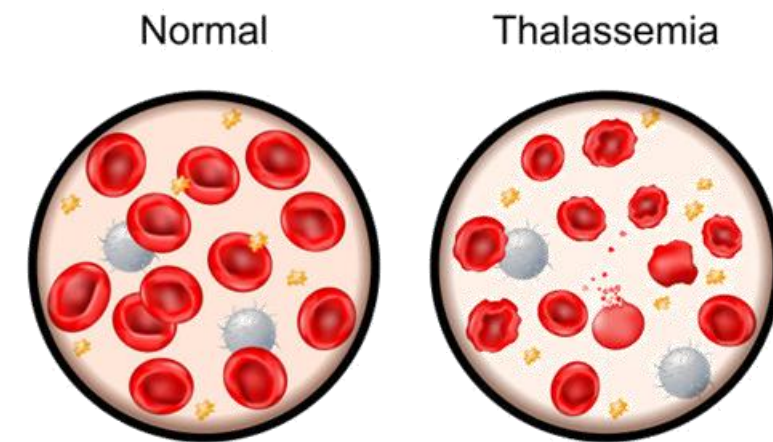


Anemias microcíticas



3. Talasémica

- Enfermedad hereditaria que destruye los glóbulos rojos en sangre (hemólisis)
- Se produce por un **defecto en la síntesis de una de las globinas**
 - Alfa talasemia: defecto en síntesis de cadenas alfa. Compensa hiperproduciendo cadenas beta
 - Beta talasemia: defecto en síntesis de cadenas beta. Compensa hiperproduciendo cadenas alfa
- El acúmulo de una de las globinas produce la lisis del eritrocito, liberando hierro.
- Consecuencias:
 - Hipertrofia hepática: acumulación de hierro en el hígado produce daño hepático que desemboca en fibrosis y crecimiento hepático
 - Hipertrofia esplénica: los macrófagos fagocitan eritrocitos lisados produciendo esta congestión y aumento de tamaño del bazo
 - Hipertrofia medular: para compensar los bajos niveles de eritrocitos en sangre se fuerza la eritropoyesis

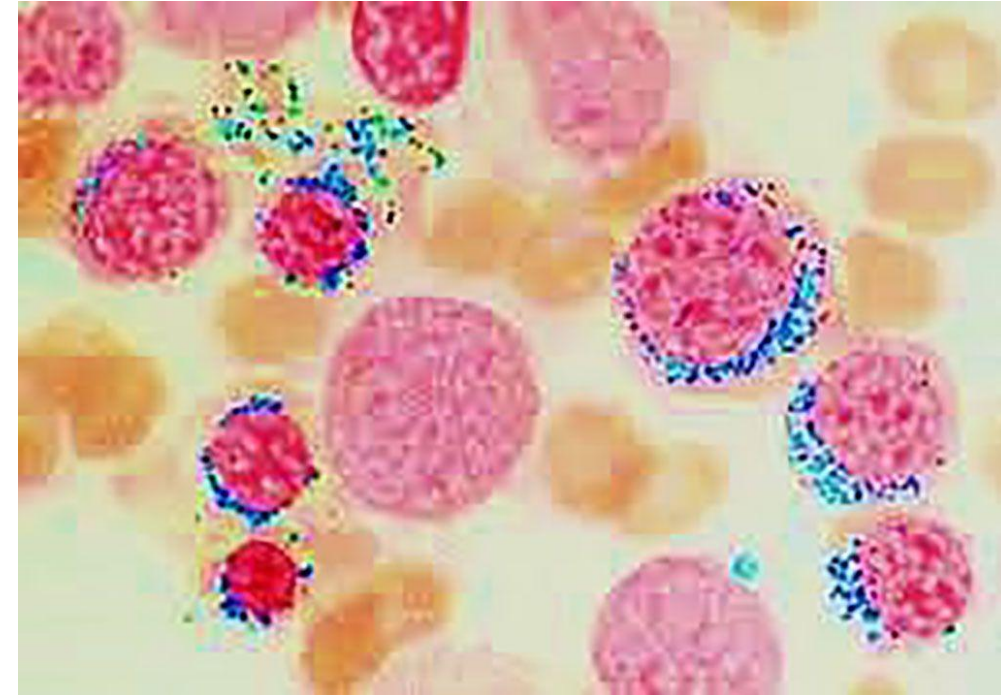


Anemias microcíticas



4. Sideroblástica

- **Alteración de la síntesis del grupo hemo** en los precursores eritroides de la médula ósea
- Esto produce depósitos de hierro en las mitocondrias de los precursores eritroides formando **sideroblastos en anillo**
- Causas:
 - Alteración de la eritropoyesis → síndrome mielodisplásico
 - Hereditarias: mayor incidencia en varones
 - Asociadas al consumo de alcohol y fármacos → reversibles



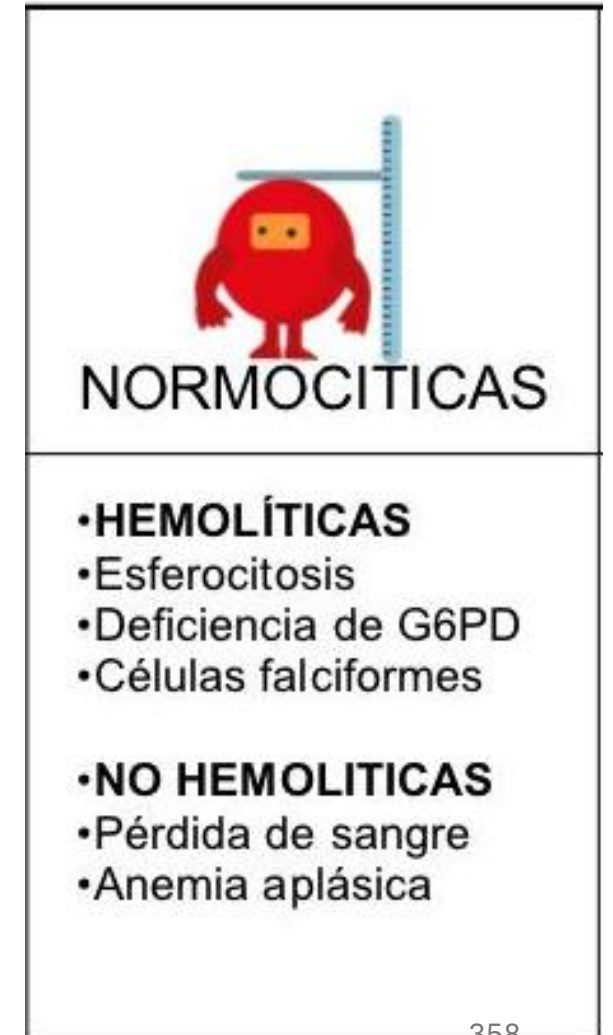
Anemias normocíticas



Se caracterizan por una **menor producción** de glóbulos rojos con un **tamaño normal** ($80 \text{ fL} < \text{VCM} < 100 \text{ fL}$)

Clasificación

1. Hemolíticas
2. Enfermedad inflamatoria aguda
3. Aplásicas
4. Hemorrágicas



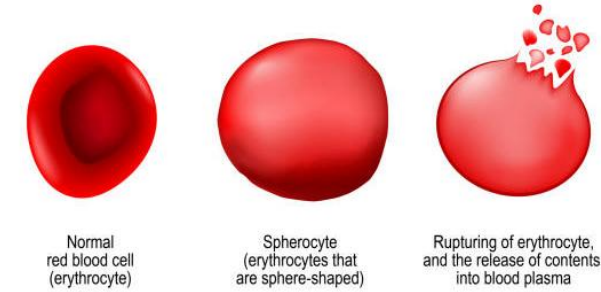
Anemias normocíticas



1. Hemolítica

- Los glóbulos rojos se destruyen y son expulsados de forma prematura al torrente sanguíneo
- Pueden ser:
 - Hereditarias
 - Esferocitosis: glóbulos rojos con forma esférica
 - Eliptocitosis: glóbulos rojos con forma de elipse
 - Falciforme: glóbulos rojos con forma de hoz
 - Deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
 - Deficiencia de piruvato quinasa
 - Adquiridas:
 - Autoinmunidad
 - Hemólisis mecánica: estructuras circulatorias producen la hemólisis (válvulas)
 - Hemoglobinuria paroxística nocturna: sensibilidad al sistema del complemento

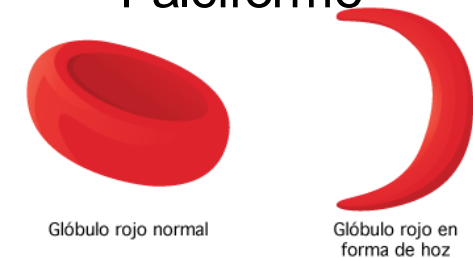
Esferocitosis



Eliptocitosis



Falciforme



KidsHealth® All rights reserved.

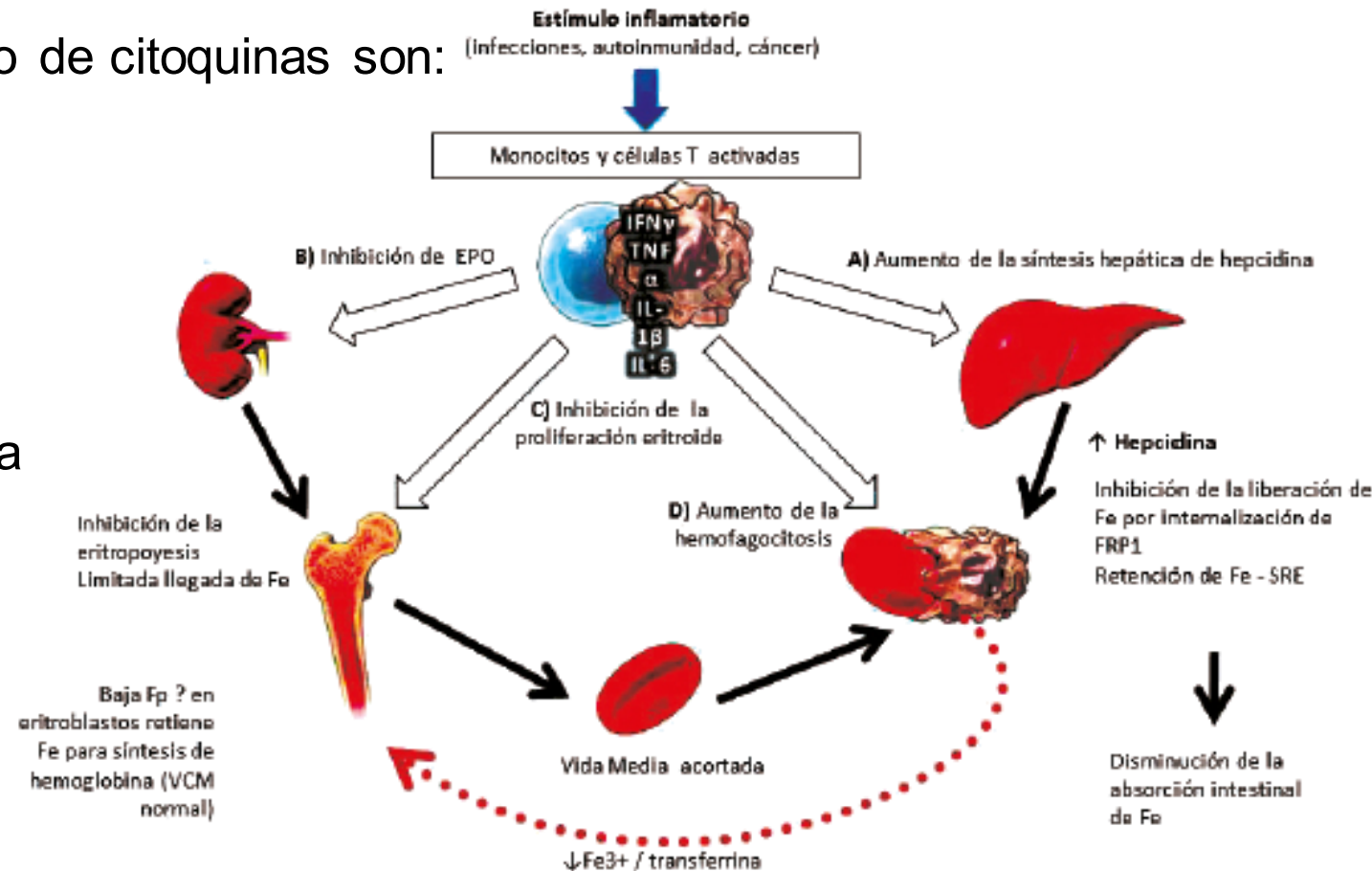
Anemias normocíticas



2. Enfermedad inflamatoria aguda

- La liberación de ciertas citoquinas inflamatorias (**IL6**) produce la inhibición de la eritropoyesis
- Las principales causas de este aumento de citoquinas son:

- Trastornos autoinmunes
 - Enfermedad de Crohn
 - Lupus eritematoso
 - Artritis reumatoides
 - Colitis ulcerosa
- Cánceres hematológicos → linfoma
- Infecciones prolongadas
 - Endocarditis bacteriana
 - Osteomielitis
 - VIH
 - VHB
 - VHC



- Cuando se cronifican evolucionan a anemias microcíticas

Anemias normocíticas



3. Aplásica

- Se produce por una reacción autoinmune de los linfocitos T contra células precursoras de eritrocitos y leucocitos
- Causas:
 - Consumo de fármacos
 - Antiepilépticos (Carbamazepina)
 - Citostáticos (Metotrexato)
 - Antibióticos (cloranfenicol)
 - Infecciones víricas → Parvovirus B19
 - Anemia hereditaria de Fanconi → defectos en la reparación del DNA eritrocitario



Anemia Fanconi

Es un trastorno hematológico hereditario raro y grave que causa insuficiencia de la médula ósea, impidiendo la producción suficiente de células sanguíneas.

Signos y síntomas

- Fatiga extrema
- Falta de aliento
- Piel pálida
- Sensación de mareo
- Dolores de cabeza
- Dolor en el pecho
- Infecciones frecuentes
- Moretones de fácil aparición
- Sangrados nasales

En Estados Unidos, 1 de cada 130,000 nacimientos presenta anemia de Fanconi.

CDT. DR. CÉSAR A. COLLAZO
"Juntos por la Salud de Juncos"

Fuente: stjude.org

Anemias normocíticas



4. Hemorrágica

➤ Se produce por la pérdida de grandes cantidades de sangre

➤ Causas:

- Traumas
- Úlceras pépticas
- Aneurismas rotos
- Parásitos



➤ Dependiendo de la velocidad de pérdida de sangre y de los depósitos de hierro en el organismo dará lugar a **anemia normocítica** o **microcítica ferropénica**

Anemias macrocíticas



Se caracterizan por presentar glóbulos rojos de un tamaño superior al normal $VCM > 100 \text{ fL}$

Su principal causa es la alteración de la síntesis de DNA (**megaloblastia**):

Las células se **dividen muy lentamente** pero el **desarrollo del citoplasma es normal**, adquiriendo mayor tamaño y produciendo menos células

Clasificación:

Megaloblásticas:

1. Déficit de vitamina B12
2. Déficit de ácido fólico

No megaloblásticas:

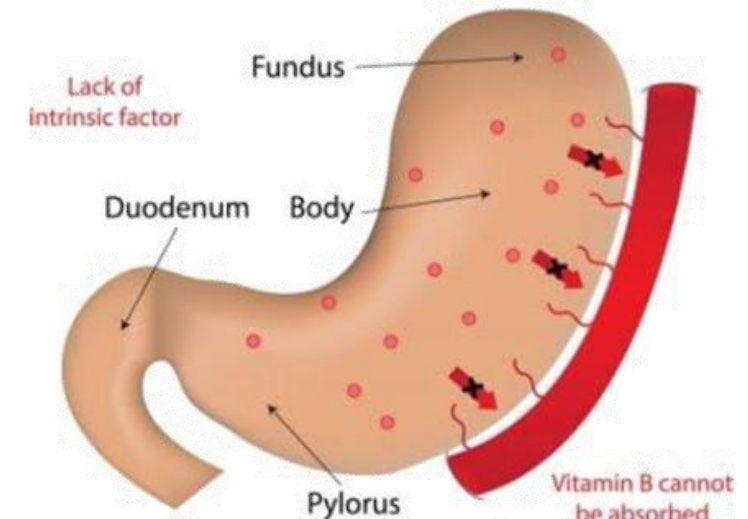
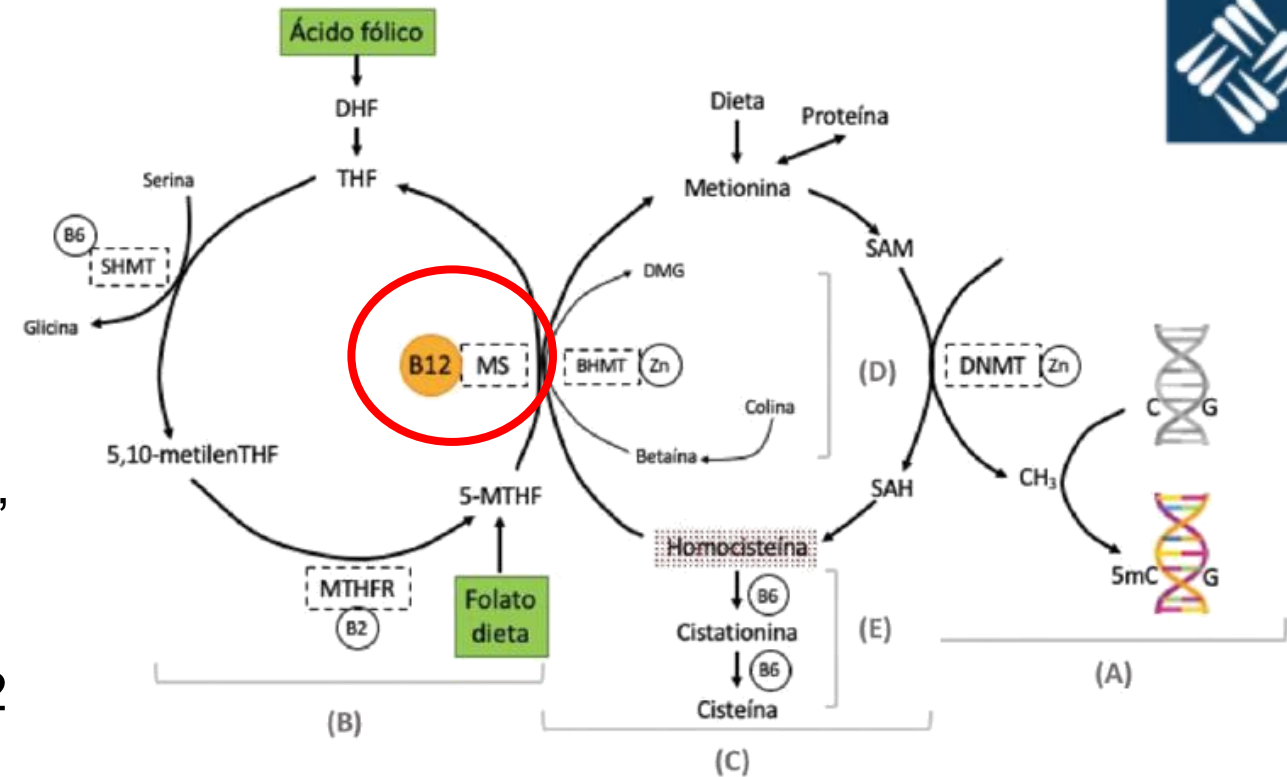
3. Hipotiroidismo
4. Enfermedad hepática



Anemias macrocíticas

1. Déficit de vitamina B12

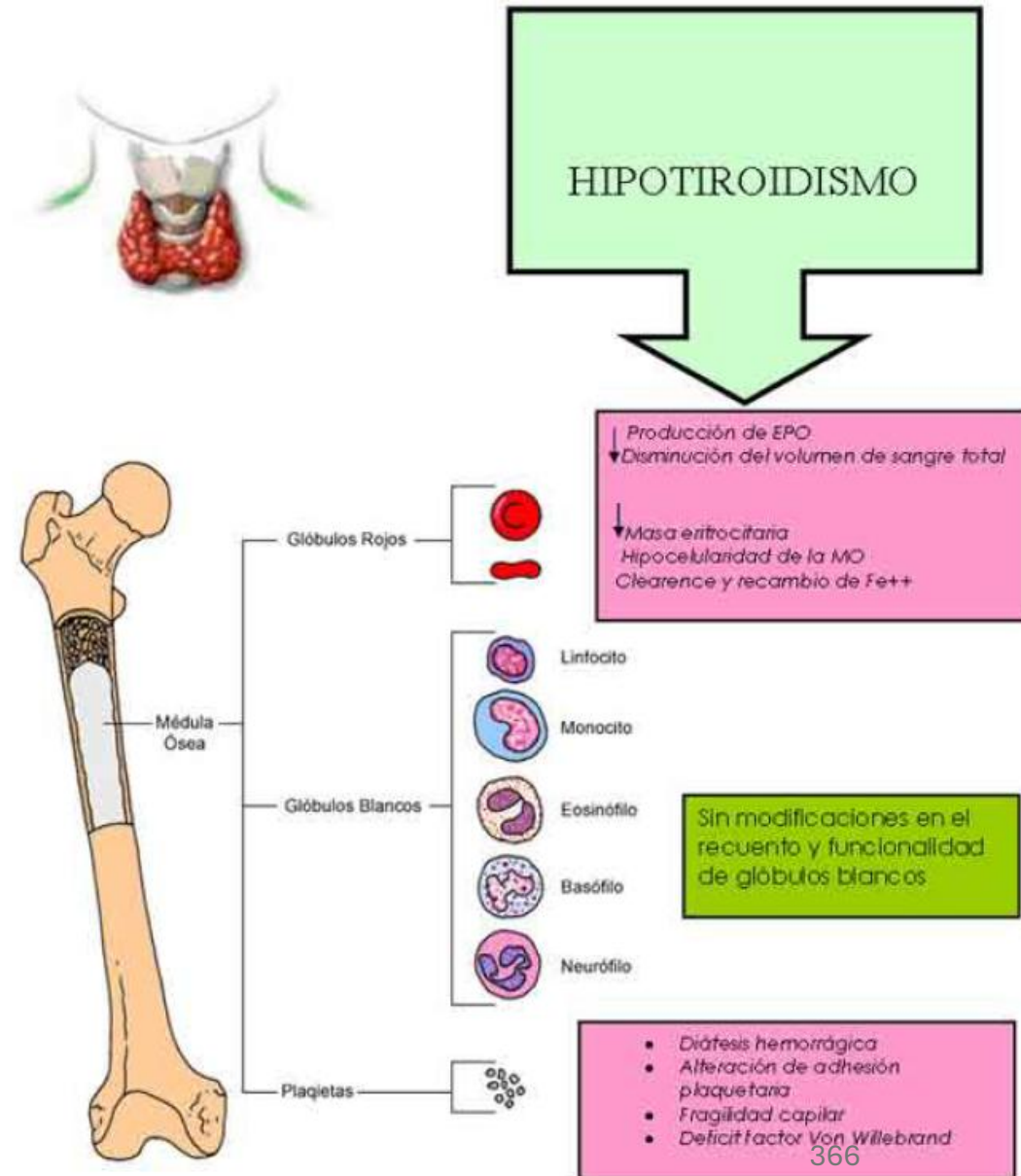
- Es la denominada **anemia perniciosa**
- La vitamina B12 es esencial para la síntesis, reparación y metilación del ADN
- Debido a una malabsorción de vitamina B12 por el intestino se produce un déficit en la síntesis de ADN (**megaloblástica**)
- La principal causa es la **falta del factor intrínseco**



Anemias macrocíticas

3. Hipotiroidismo

- No tiene que ver con la síntesis de ADN, por lo que no es megaloblástica
- La T3 es necesaria para disminuir el volumen de los precursores eritrocitarios
- Su deficiencia produce macrocitosis



Anemias macrocíticas



4. Enfermedad hepática

- No tiene que ver con la síntesis de ADN, por lo que no es megaloblástica
- Enfermedades hepáticas crónicas dan lugar a:
 - Menor metabolismo de fosfolípidos y colesterol
 - Glóbulos rojos absorben lípidos aumentando sus membranas
 - Eritrocitos redondeados
- Causas
 - Alcoholismo crónico
 - Hepatitis crónica
 - Cirrosis
 - Colestasis

AFECTACIÓN HEMATOLÓGICA EN LA HEPATOPATÍA CRÓNICA



Trombocitopenia

Plaquetas bajas por hipersplenismo y ↓ trombopoyetina.



Anemia

Sangrado gastrointestinal, deficiencias nutricionales



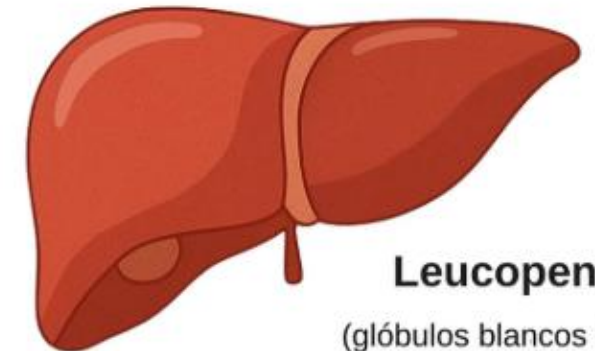
Trastornos Fibrinolíticos

Riesgo de sangrado y trombosis.



Coagulopatía

Déficit de factores de coagulación, TP/TPa prolongados



Leucopenia

(glóbulos blancos bajos) riesgo de infección

Sintomatología de la anemia



Los síntomas de la anemia dependen de la rapidez de su instauración

➤ Instauración progresiva

1. Disminución de resistencia física, taquicardia y dificultad respiratoria
2. Acentuación de síntomas incluso con mínimos esfuerzos, cansancio extremo
3. Palidez, baja coloración de piel y mucosas, dolor de cabeza
4. Adaptación y control de síntomas si se alarga en el tiempo, siempre que no se haga esfuerzo

➤ Instauración brusca: depende del volumen de sangre perdido

- Colapso vascular
- Palidez
- Sudoración
- Taquicardia
- Hipotensión arterial

Complicaciones de la anemia



Si la anemia se hace más grave pueden surgir complicaciones como

- Infarto de órganos por falta de oxígeno
- Partos prematuros en embarazadas



Sección IV: Laboratorio de Bioquímica

TEMA 14

Alteraciones del metabolismo del hierro

Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio

Nacho Escrig, PhD

El hierro



Es el metal más abundante en el cuerpo humano → 40 mg de hierro por Kg de masa

Localizado en

- Hemoglobina
- Proteínas de transporte → transferrina
- Proteínas de almacenamiento → ferritina y hemosiderina
- Enzimas
- Mioglobina muscular

Es indispensable para la vida

- Escasez → síntesis de hemoglobina defectuosa
- Exceso → patologías hepáticas, pancreáticas o cardíacas

Su determinación se hace en la **sangre**



Equilibrio del hierro

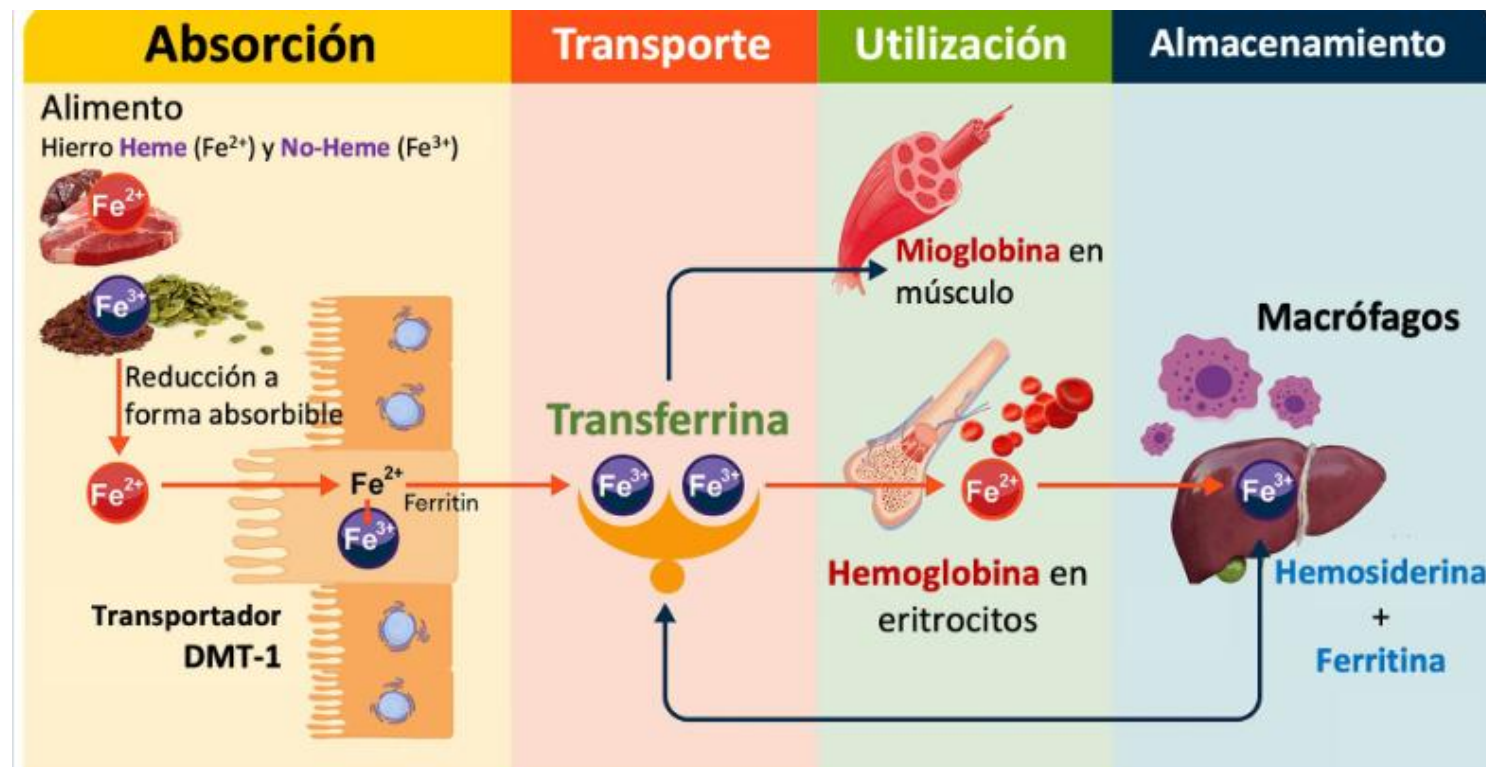


ABSORCIÓN

El hierro en la dieta se encuentra en dos formas

- Hemo (ferroso +2)
 - Carne
 - Mariscos
 - Pollo
- No hemo (férrico +3)
 - Lentejas
 - Espinaca
 - Garbanzos

La acidez gástrica reduce el hierro férrico (+3) a ferroso (+2), que se absorbe en el duodeno y la parte superior del yeyuno



TRANSPORTE y USO

En el enterocito se oxida de nuevo a férrico (+3) y se transporta por la **transferrina** allí donde se necesite (sobre todo médula ósea)

Equilibrio del hierro



ALMACENAMIENTO

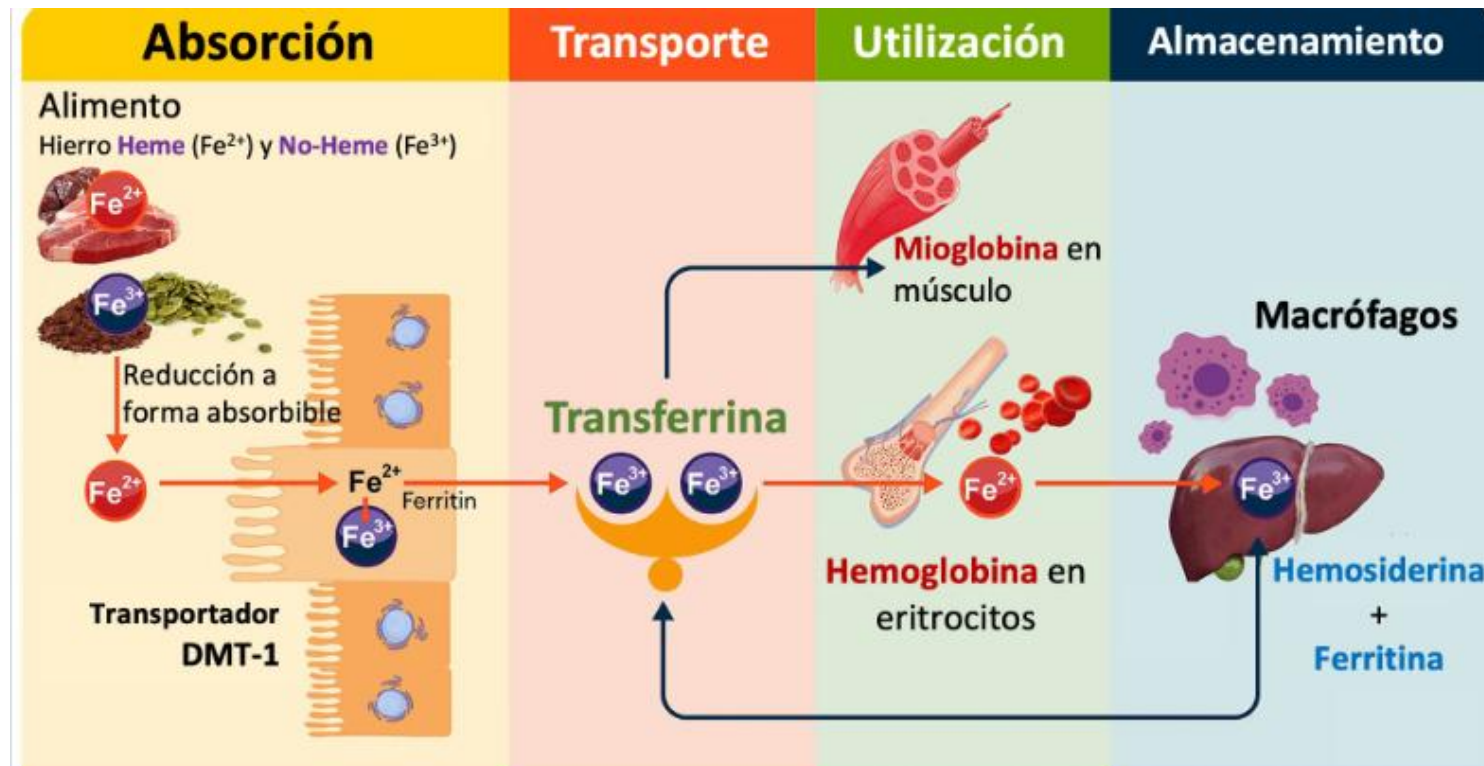
Si hay exceso se almacena en la **ferritina** o la **hemosiderina**

Vida media:

- Hierro → 75 minutos
- Ferritina → semanas - meses
- Hemosiderina → meses – años

REUTILIZACIÓN

Cuando los eritrocitos envejecen son fagocitados por macrófagos en bazo, hígado y médula ósea



Se degrada la hemoglobina y el hierro es transportado por la transferrina para reutilizarlo

Equilibrio del hierro



El hierro se está **reciclando** continuamente

El aporte de hierro por la dieta es necesario para compensar pérdidas de hierro:

- Descamación de piel y epitelios
- Menstruación y pérdidas sanguíneas
- Embarazo
- Parásitos

Las bajadas de hierro se compensan liberando hierro de los depósitos (ferritina o hemosiderina)

Estos depósitos se rellenan cuando hay hierro disponible

El grado de absorción de hierro es:

- Inversamente proporcional a la cantidad de hierro en los depósitos
- Directamente proporcional a la actividad eritropoyética

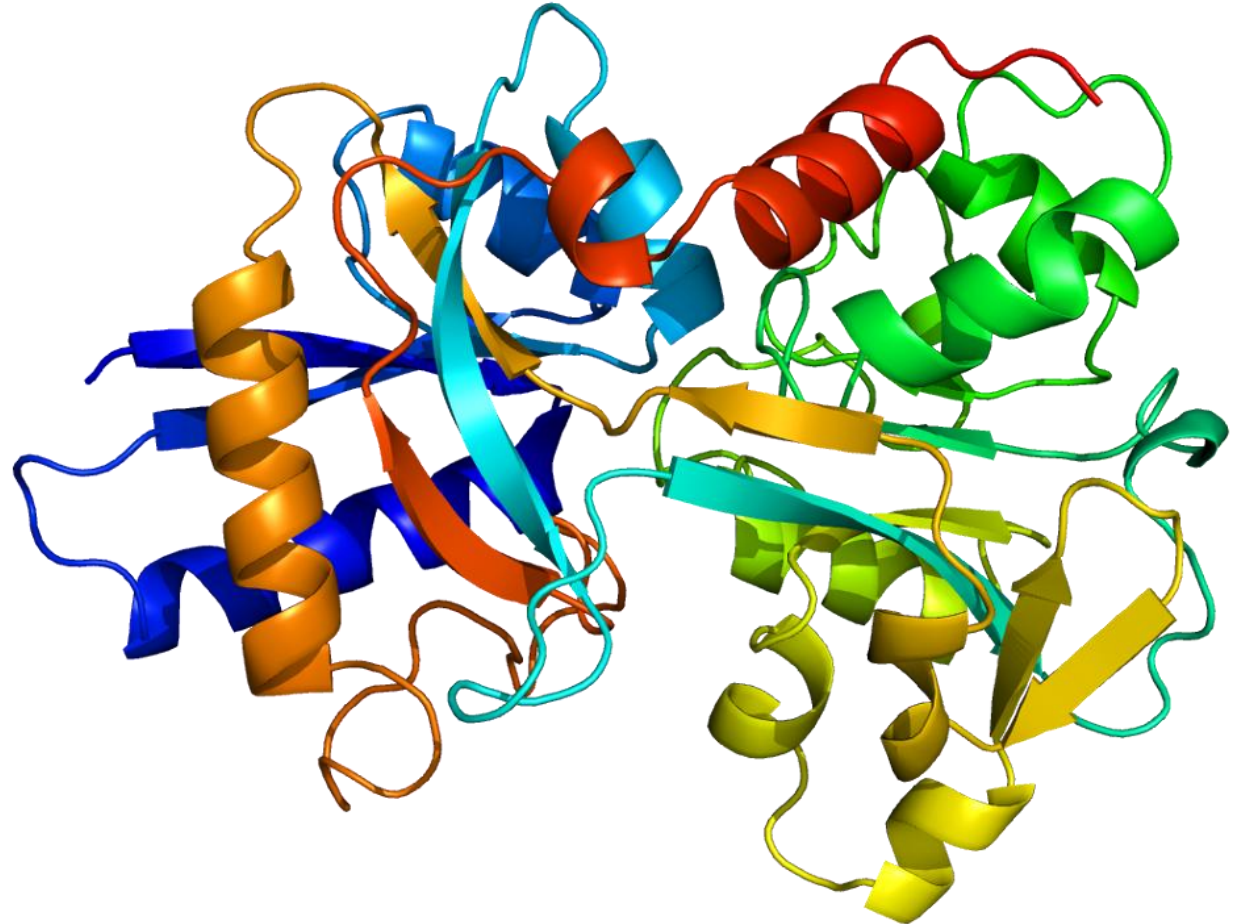
Este proceso está regulado por las **IRP (Iron Regulatory Proteins)**



Proteínas asociadas con el equilibrio del hierro



1. Transferrina
2. Receptor de transferrina
3. Ferritina
4. Hemosiderina
5. IRP



1. Transferrina



Es la encargada de transportar el hierro por el plasma y el líquido extracelular

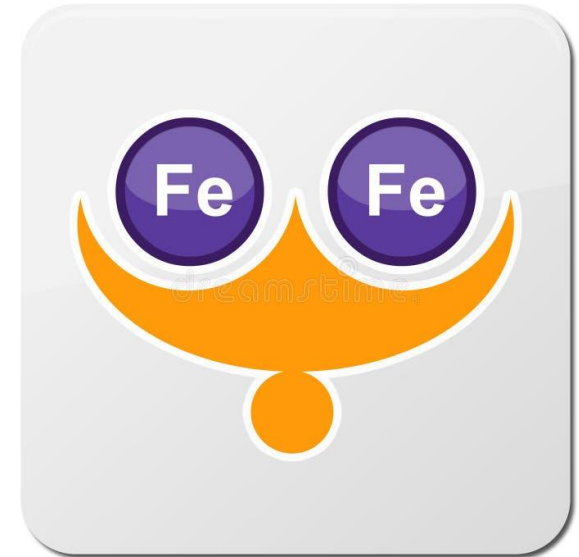
Altamente específica para el hierro

Puede unir hasta dos átomos de hierro → **HOLOTRANSFERRINA**

Si no tiene ningún átomo de hierro unido se llama **APOTRANSFERRINA**

Se sintetiza en el hígado

Su síntesis aumenta cuando hay baja cantidad de hierro



1. Transferrina – cuantificación



Se cuantifica con inmunoensayos

Miden la concentración de transferrina mediante la generación de complejos que enturbian la solución

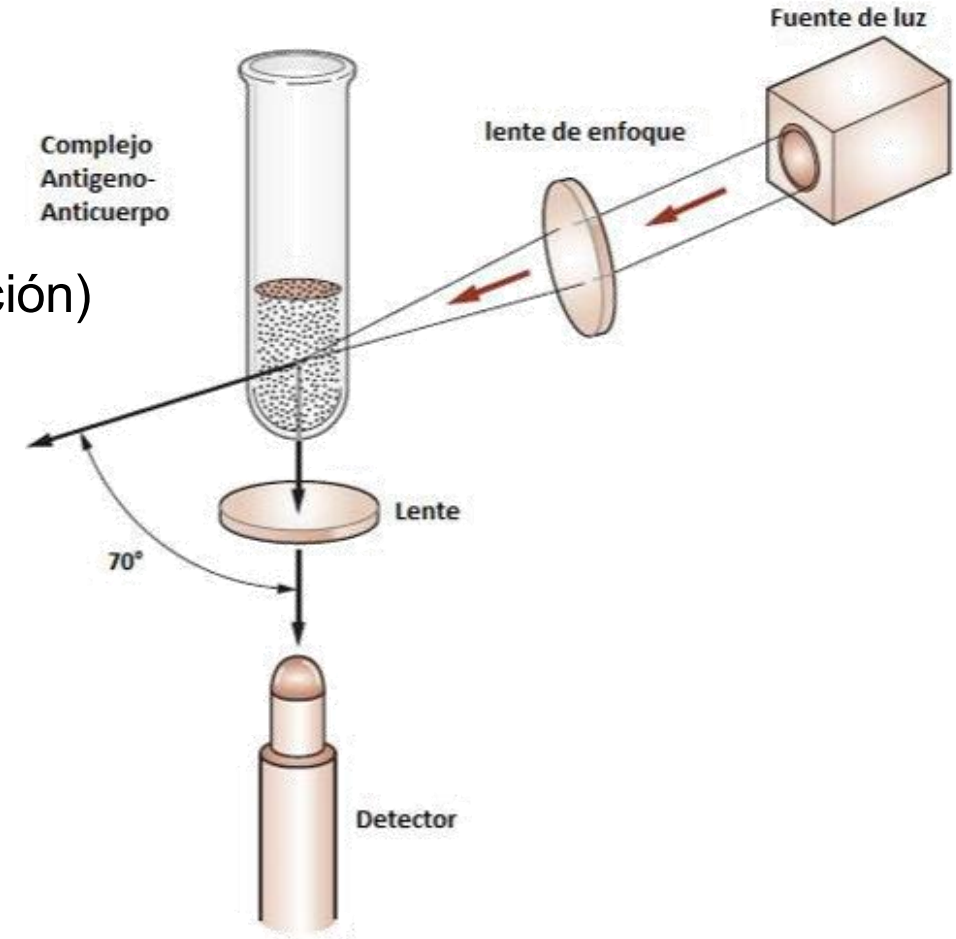
➤ Inmunoturbidometría

Cuantifica la disminución de luz transmitida (absorción)

➤ Immunonefelometría

Cuantifica la luz dispersada lateralmente

Más sensible que la inmunoturbidometría



1. Transferrina – parámetros asociados



Capacidad total de fijar hierro (CTFH/TIBC):

- Cantidad total de hierro que puede unirse a la transferrina disponible en el plasma
- Determinación bioquímica:
 1. Extracción de sangre
 2. Incubación con hierro
 3. Eliminación del hierro no unido a transferrina
 4. Cuantificación del hierro unido a transferrina
- Determinación matemática



$$\text{CTFH (mmol/L)} = 25 \times \text{Transferrina (g/L)}$$

$$\text{CTFH (mg/dL)} = 1,64 \times \text{Transferrina (mg/dL)}$$

Índice de saturación de la transferrina (IST):

- Proporción de sitio ocupados con hierro con respecto a los totales
- Se calcula midiendo el hierro sérico y dividiéndolo por la CTFH
- Se mide en porcentaje

$$\text{IST} = \frac{\text{Fe sérico} \times 100}{\text{CTFH}}$$

Cuantificación del hierro sérico

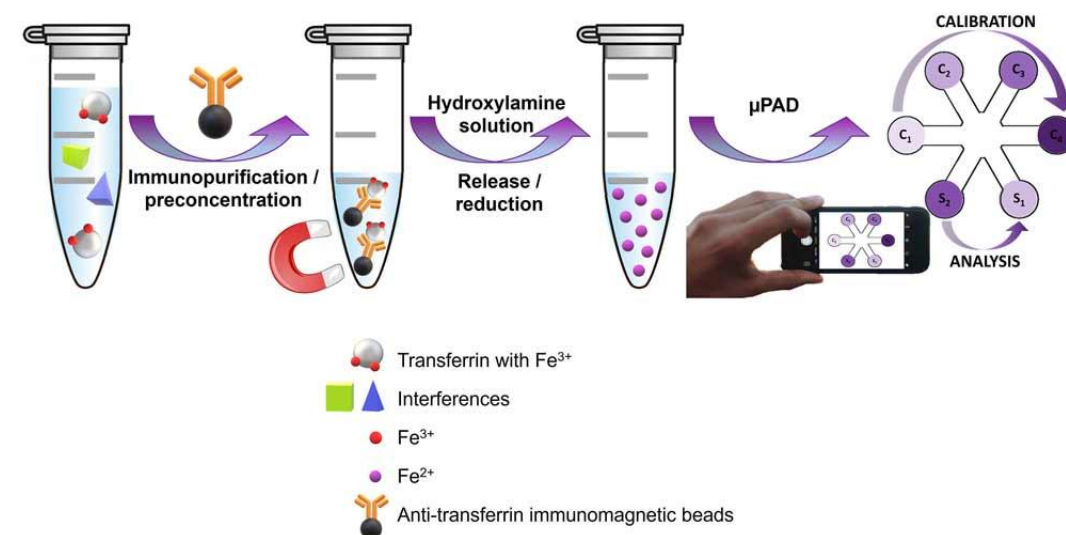


No es el parámetro que más se usa para determinar el estado del paciente

Se mide con sistemas automatizados basados en colorimetría

Para su medición hay que:

- Separar el hierro de la transferrina con un medio ácido
- Reducir el hierro férrico (3+) a hierro ferroso (2+)
- Formar complejos cromógeno-hierro



La interpretación de los resultados es delicada por su variabilidad biológica

Nunca se interpreta solo, siempre junto a:

- Ferritina
- Transferrina
- Capacidad total de fijar hierro
- Índice de saturación de transferrina

2. Receptor de la transferrina

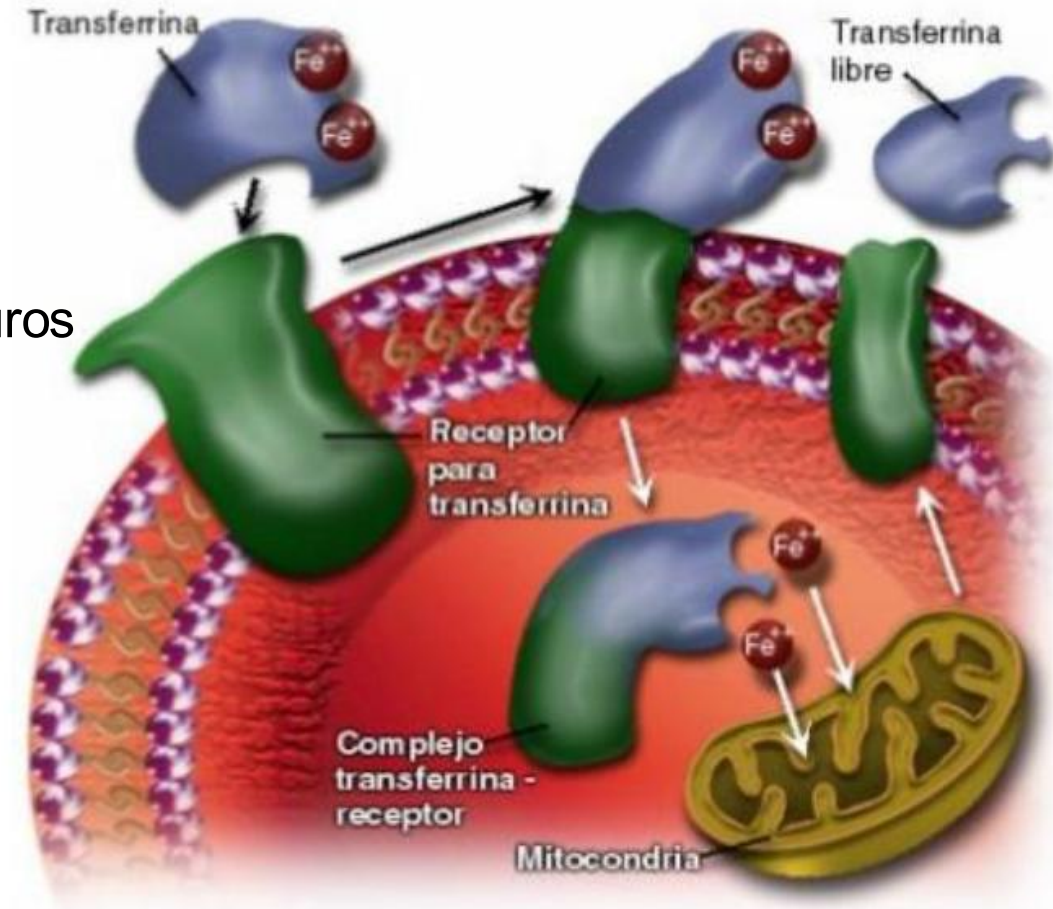
Permite la entrada de los átomos de hierro a las células

Reconoce la transferrina cargada de hierro

Algunos receptores se escinden formando la fracción soluble, sobre todo en los eritroblastos

Lo expresan todas las células menos los hematíes maduros

1. Cuando la transferrina se une al receptor de transferrina el complejo transferrina-hierro-receptor se internaliza sin ser transformado
2. Tras liberar los átomos de hierro, el complejo transferrina-receptor es devuelto a la superficie de la membrana
3. Finalmente, la transferrina es liberada para reiniciar el ciclo de transporte



2. Receptor de la transferrina – cuantificación

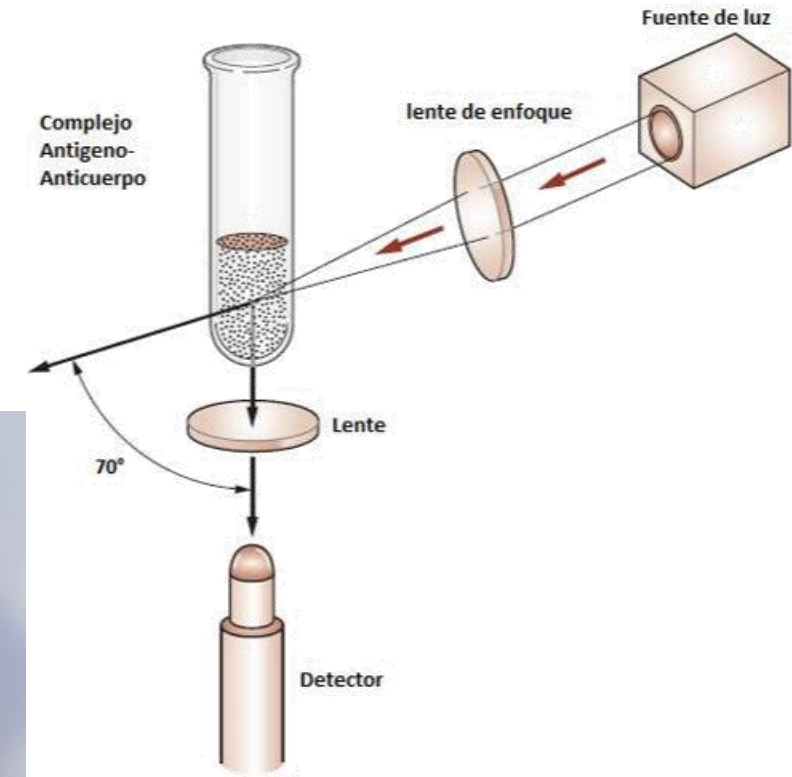
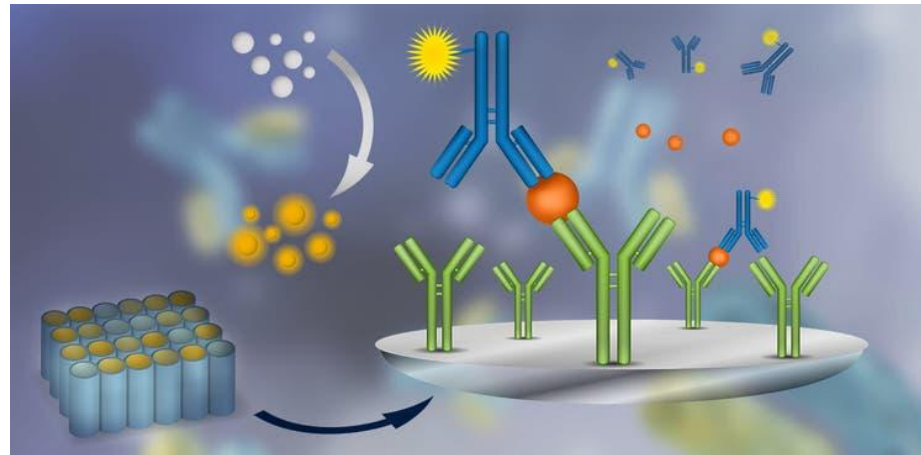


Se cuantifican los receptores solubles de la transferrina, que son equivalentes a los receptores en la membrana (insolubles)

Indica la funcionalidad de la eritropoyesis

Se cuantifican por:

- Elisa
- Inmunonefelometría



3. Ferritina



Almacena los átomos de hierro en gran cantidad

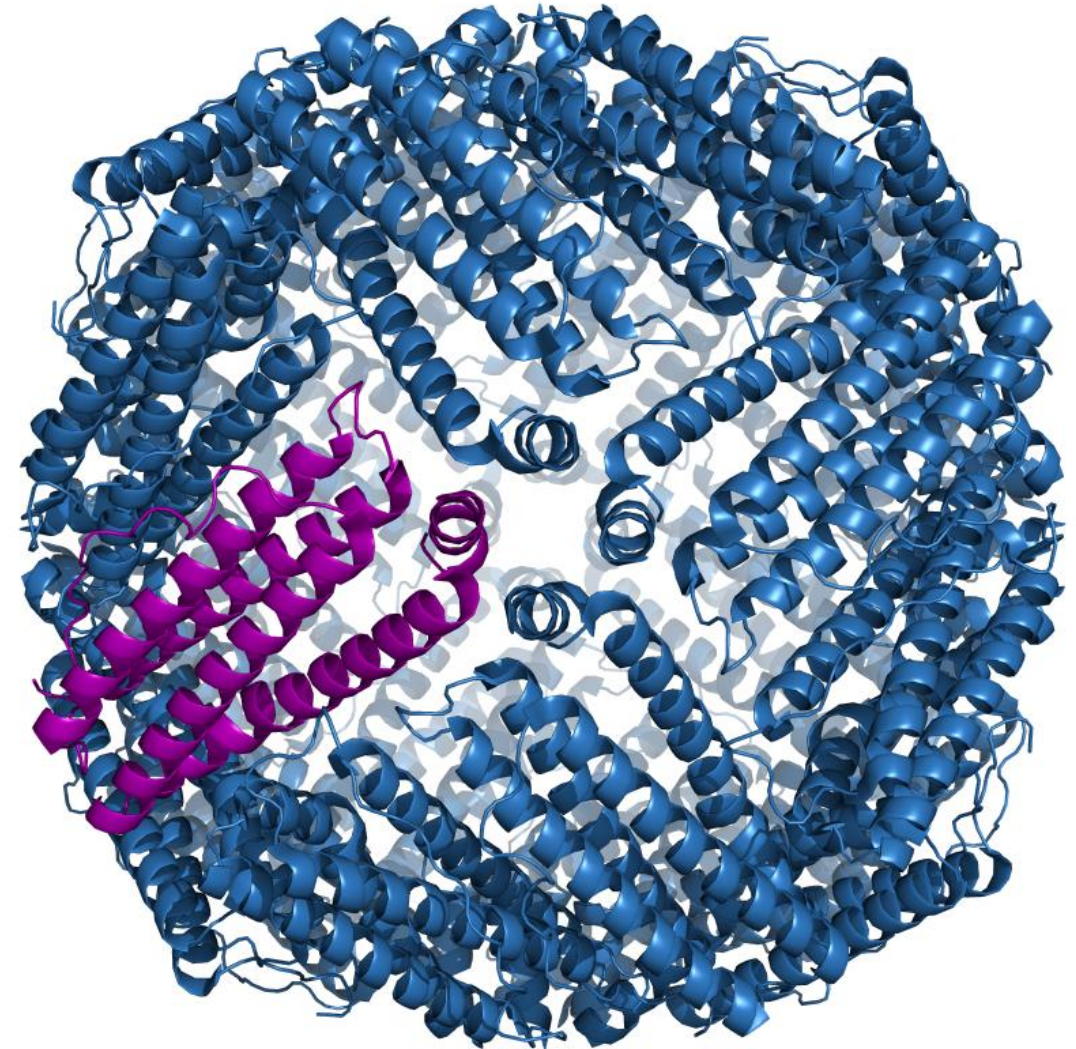
Formada por 24 subunidades en forma de esfera

Puede contener hasta 4.500 átomos de hierro

Su vida media es de semanas a meses

El hierro que contiene esta biodisponible para funciones celular

Para almacenarlo tiene que oxidarlo a Fe^{3+} mediante ferroxidasas presentes en la ferritina

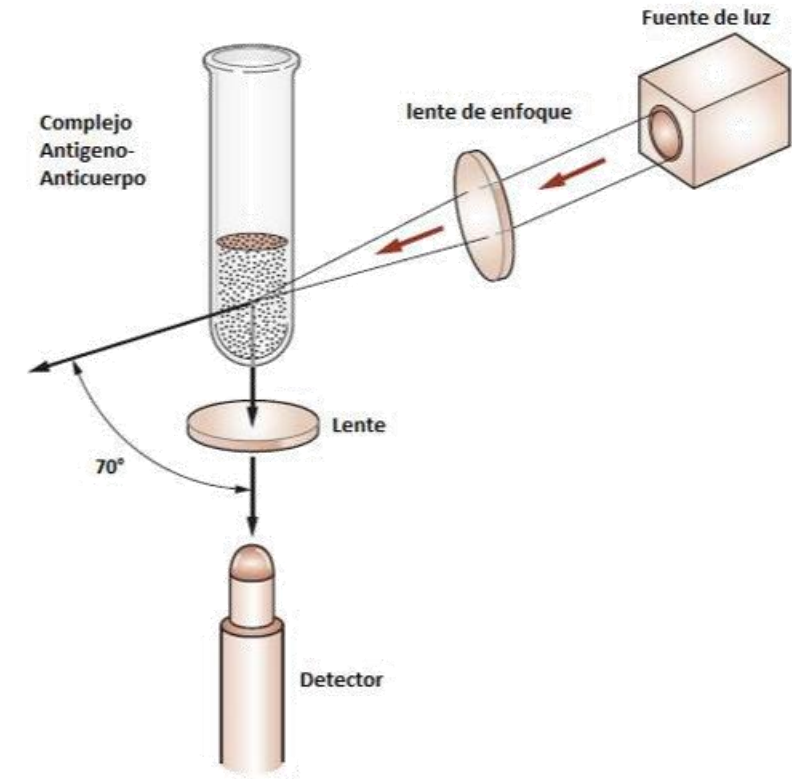
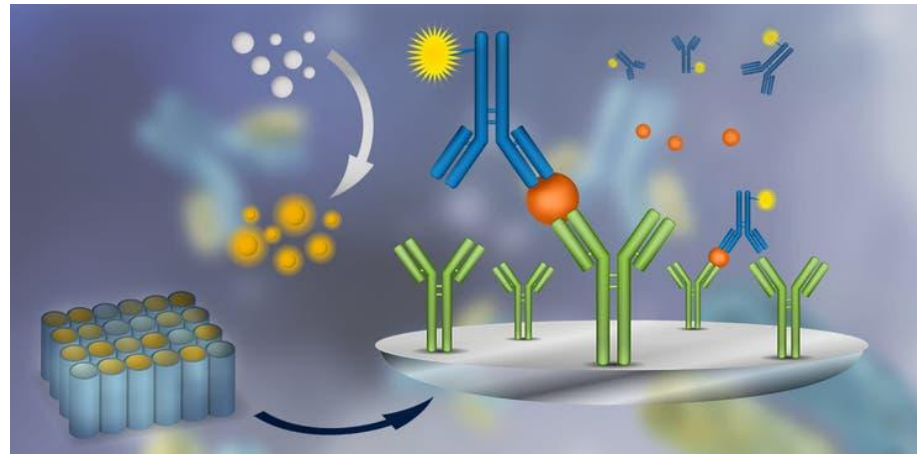


3. Ferritina – cuantificación



Es la proteína que mas se cuantifica para el diagnóstico del estado del hierro

- Elisa
- Inmunoturbidometría
- Immunonefelometría



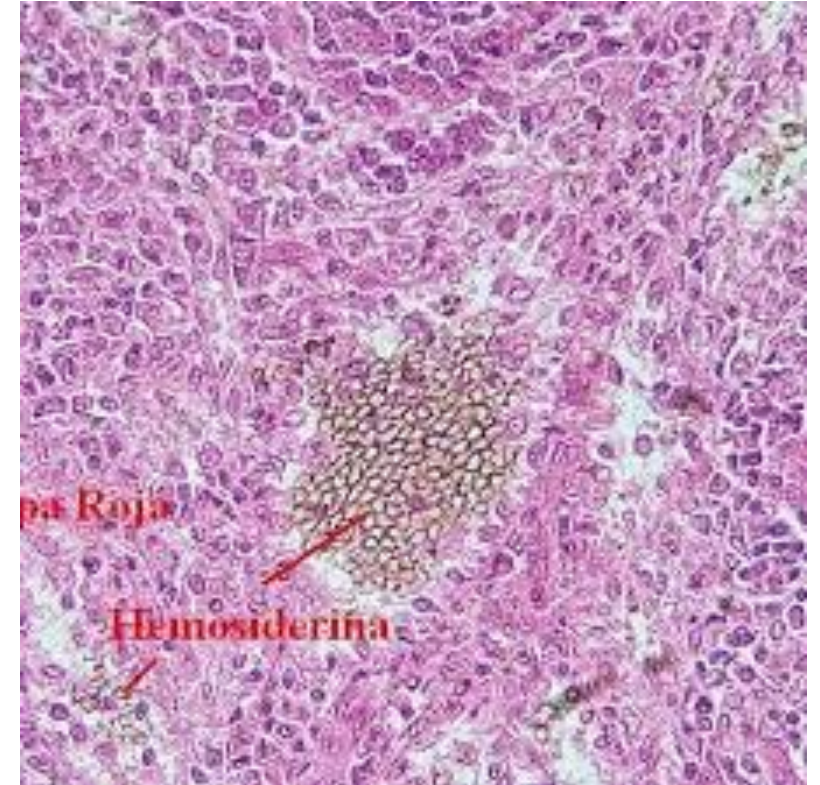
4. Hemosiderina



Almacena los átomos de hierro en gran cantidad

Diferencias con la ferritina:

- Más insoluble
- Mayor capacidad de almacenamiento
- Deposito de largo plazo → vida media de meses-años
- El hierro contenido es menos biodisponible, se incorpora de forma más lenta y errática



4. Hemosiderina – cuantificación



La hemosiderina se cuantifica en tejidos para evaluar los depósitos de hierro

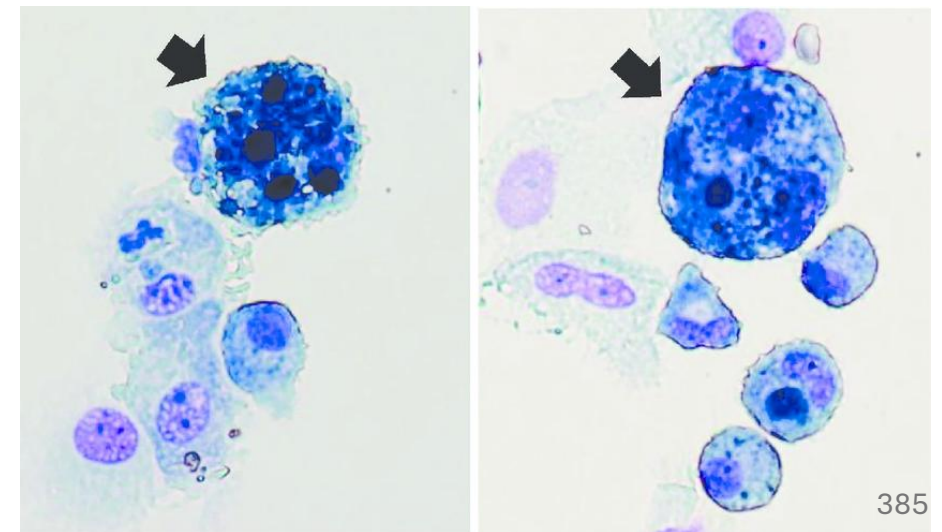
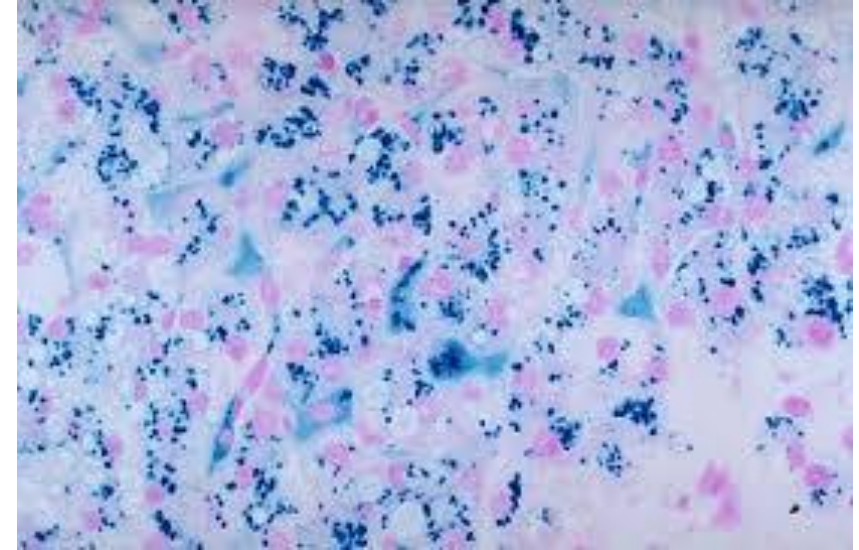
Se usa mucho menos que la ferritina

Histología → Tinción con Azul de Prusia

- Estima el hierro en los tejidos

Índice de Golde → cuantificación en macrófagos

- Se hace en lavado broncoalveolar
- Indica hemorragias alveolares



4. Proteínas reguladoras del hierro (IRP)



Regulan la síntesis de las proteínas involucradas en el metabolismo del hierro

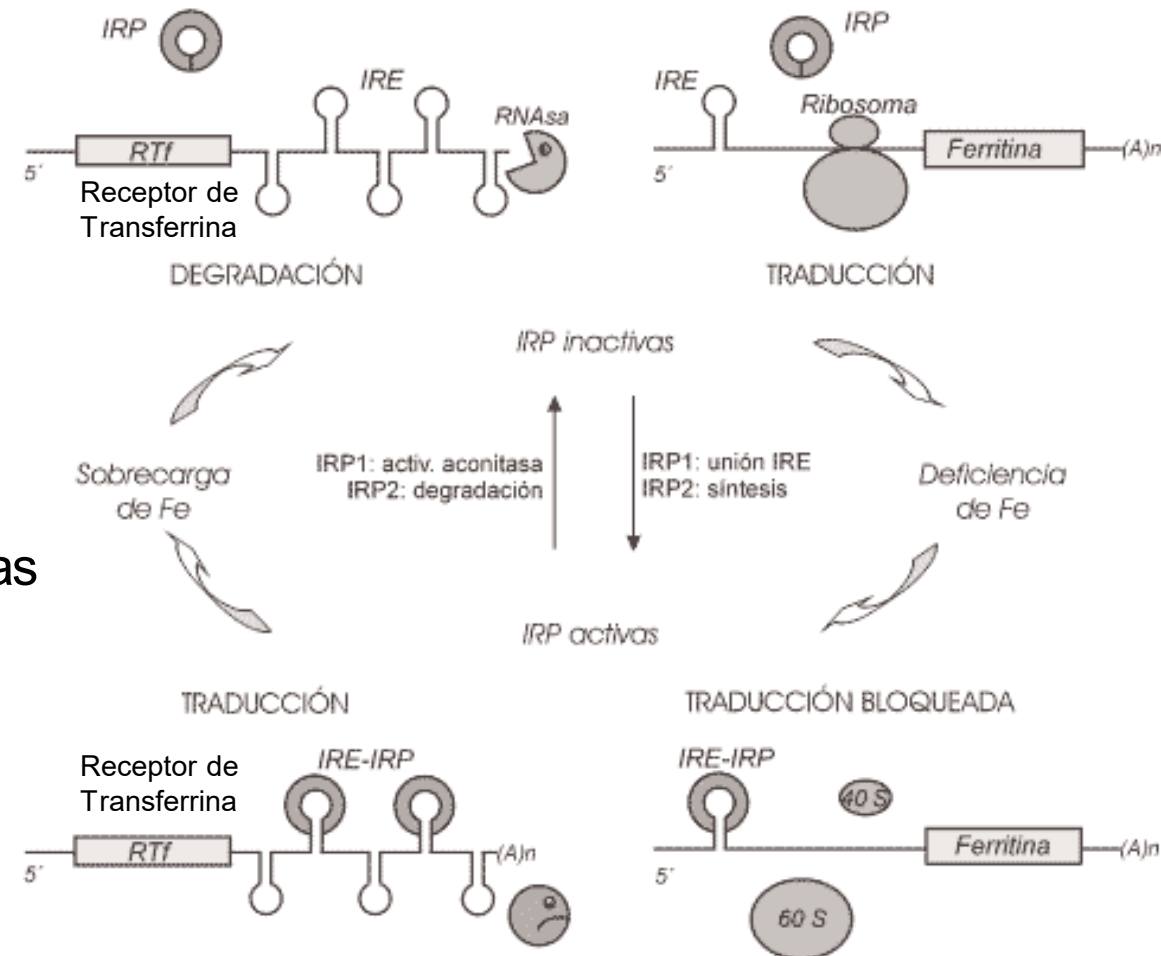
Se encuentran en todos los tejidos

Controlan la estabilidad del mRNA en ausencia de hierro

Cuando hay poco hierro:

- Estabilizan el mRNA de la transferrina y del receptor de transferrina
 - Más transporte e incorporación del hierro en las células
- Bloquean el mRNA de la ferritina impidiendo su traducción
 - Más hierro disponible

No se cuantifican de forma rutinaria



Deficiencia de hierro – causas



Las pérdidas de hierro son mínimas y se suelen recuperar por medio de la dieta

La ingesta de hierro puede ser insuficiente debido a

➤ Situaciones fisiológicas:

- Menstruación (causa más común en mujeres)
- Embarazo
- Lactancia
- Crecimiento

➤ Situaciones patológicas:

- Problemas de absorción
- Hemorragias
- Cánceres
- Hipotransferrinemia
- Proteinurias: presencia de proteínas en la orina
- Hematurias: presencia de sangre en la orina
- Hemorragia gastrointestinal (causa más común en hombres)



Deficiencia de hierro – estadísticas

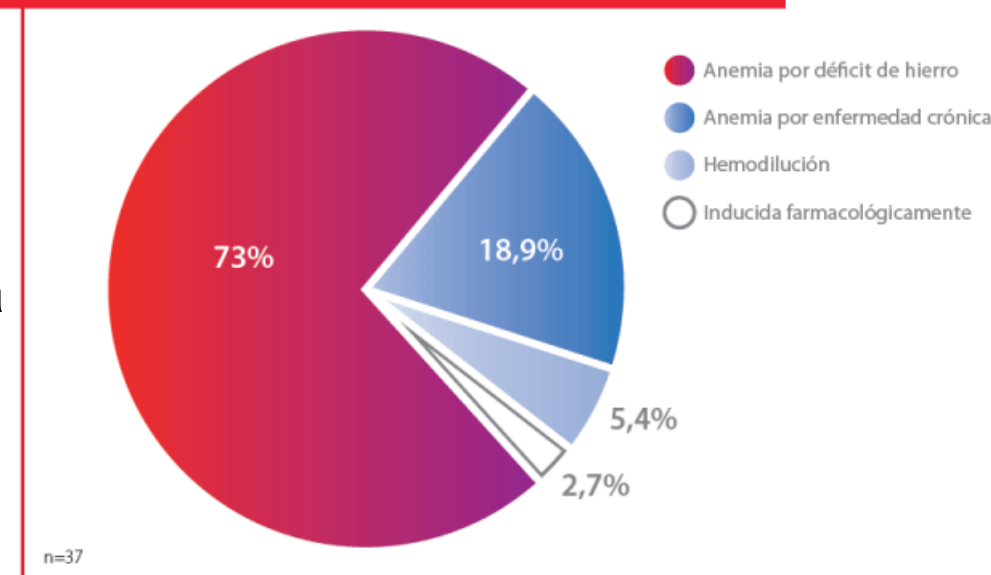


Es la principal causa de anemia sobre todo en mujeres, niños y ancianos

El déficit de hierro:

- No produce síntomas hasta que se instaura la anemia
- Afecta al 30% de la población mundial
- Produce 500 millones de casos de anemia ferropénica
- Tiene más incidencia en países no desarrollados
- En España afecta a:
 - 10% de los menores de 3 años
 - 4% de mujeres en edad fértil
 - 3% de ancianos
- La mitad de los casos en España desarrollan anemia ferropénica

Figura 2: El déficit de hierro fue la causa más frecuente de anemia en los pacientes con ICC avanzada (NYHA IV)¹²



Adaptado de Nanas y cols. 2006.

Deficiencia de hierro – síntomas anemia ferropénica



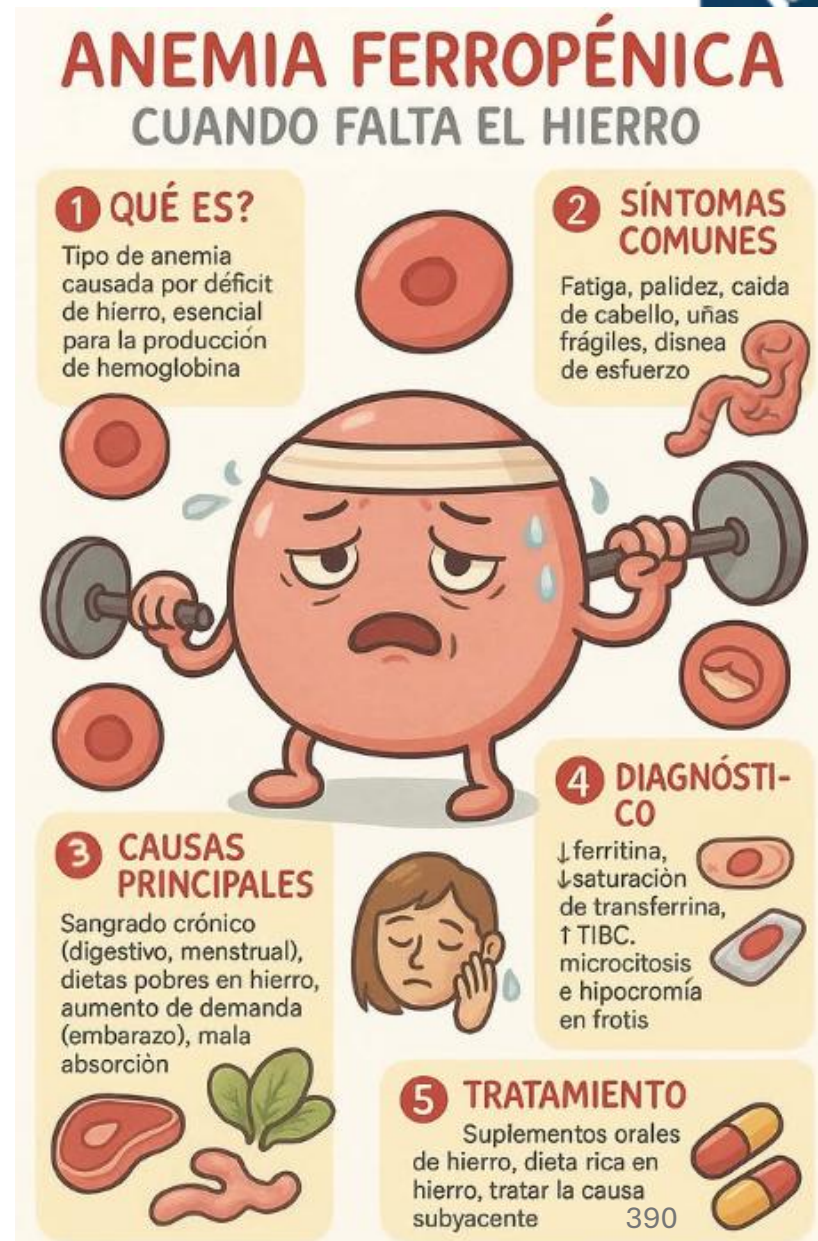
Deficiencia de hierro – diagnóstico

La mejor forma es medir la concentración plasmática de **ferritina**

La ferritina es un reactante de fase **aguda**, por lo que puede verse aumentada en procesos inflamatorios, falseando el resultado

Por ello no se usa como único marcador, sino que se utilizan otros parámetros asociados con anemia ferropénica

- Volumen corpuscular medio disminuido
- Hemoglobina corpuscular media disminuida
- Eritrocitos hipocrómicos y microcíticos
- Anisocitosis → gran amplitud de ancho de distribución de eritrocitos

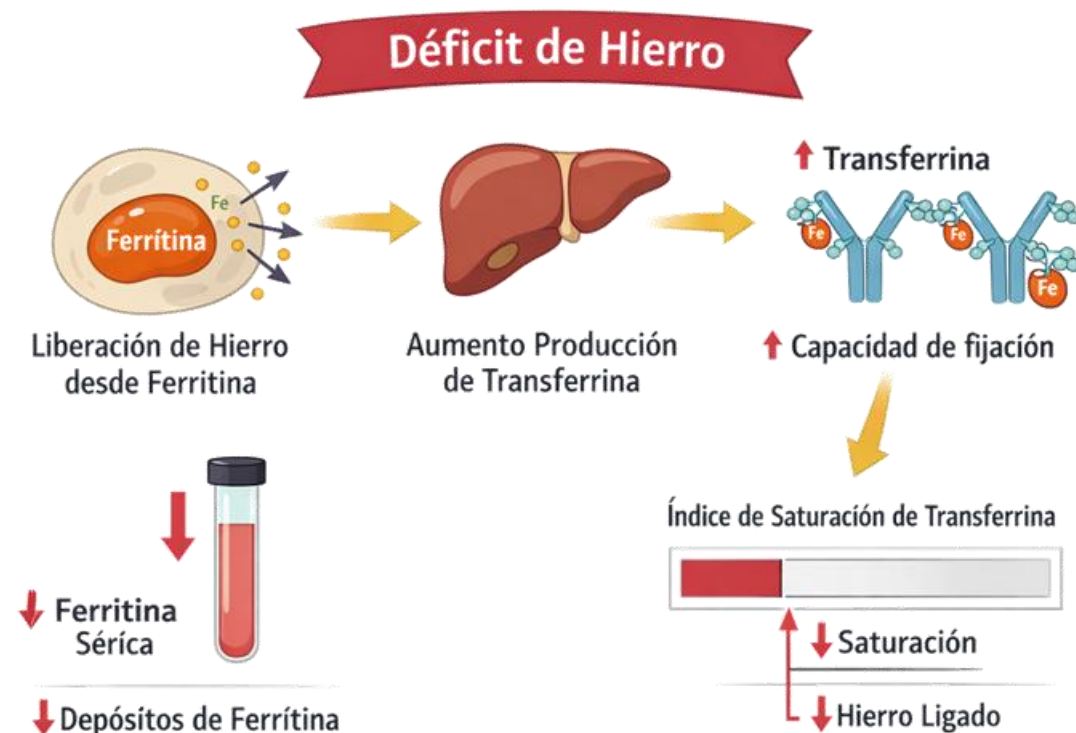


Deficiencia de hierro – Proceso fisiológico



Cuando el organismo tiene una carencia de hierro:

1. El organismo moviliza las reservas de hierro de la ferritina
2. Disminuye la concentración plasmática de ferritina
3. El hígado aumenta la producción de transferrina para aprovechar el poco hierro disponible
4. Aumenta la capacidad de fijar hierro
5. Disminuye el índice de saturación de transferrina



Deficiencia de hierro – tratamiento



Soluciones de la falta de hierro

➤ Dieta rica en hierro

Las dietas ricas en cereales que contienen fitatos precipitan el hierro impidiendo su absorción

➤ Suplementos de hierro

Se usan sales ferrosas que se absorben con más facilidad

La administración parenteral se lleva a cabo solo en casos de intolerancia intestinal o dificultades de absorción

El tratamiento se mantiene más allá de la recuperación de los niveles normales para tratar de rellenar las reservas



Exceso de hierro – causas

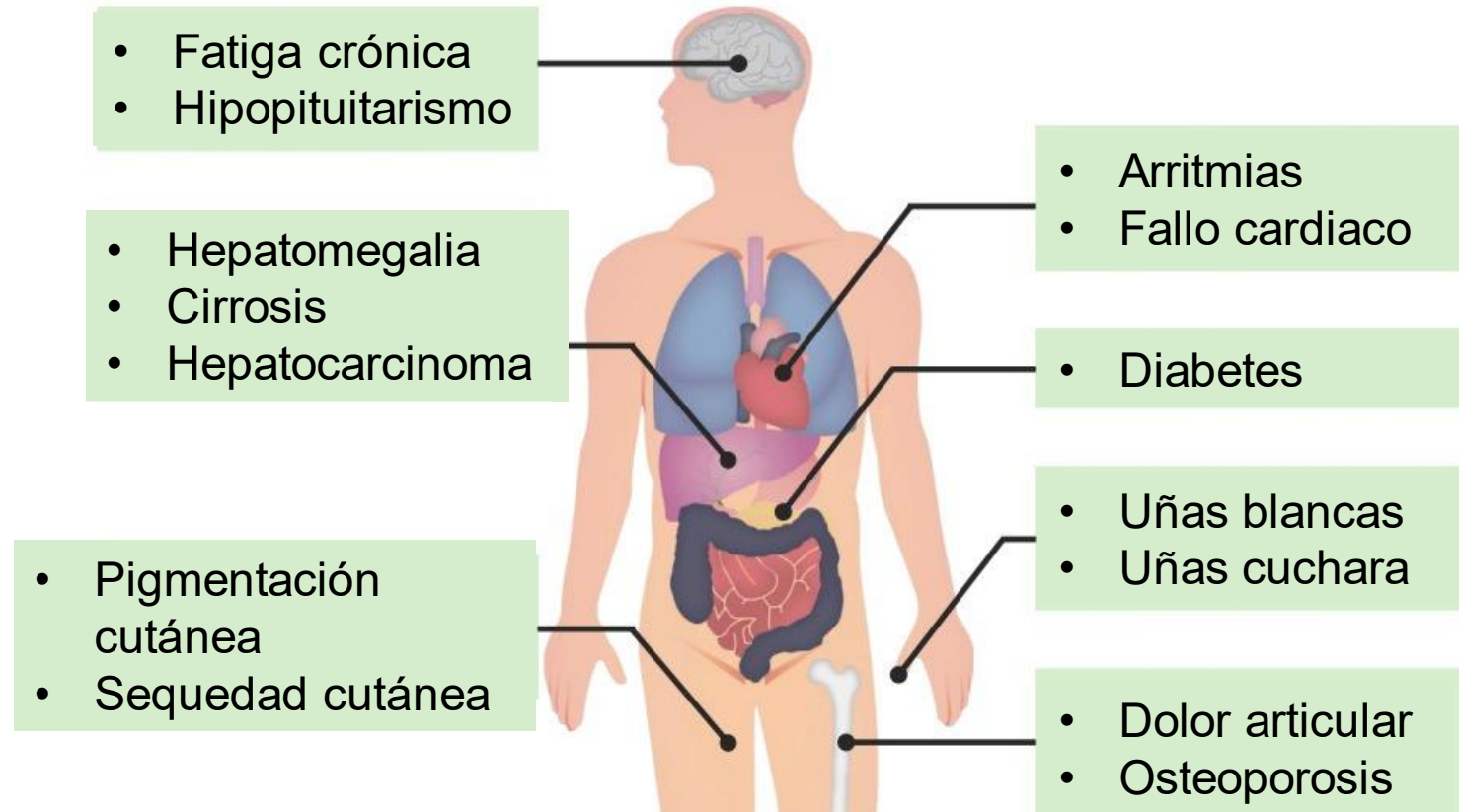


No es tan común como la deficiencia de hierro

Se puede producir por:

- Trastornos genéticos
 - Hemosiderosis hereditaria
- Transfusiones frecuentes por:
 - Talasemias
 - Anemias aplásicas
 - Síndromes mielodisplásicos
- Sobresuplementación

HEMOSIDEROSIS HEREDITARIA



Exceso de hierro – consecuencias



La principal consecuencia es la acumulación de depósitos de hemosiderina en los tejidos, denominada **HEMOSIDEROSIS**.

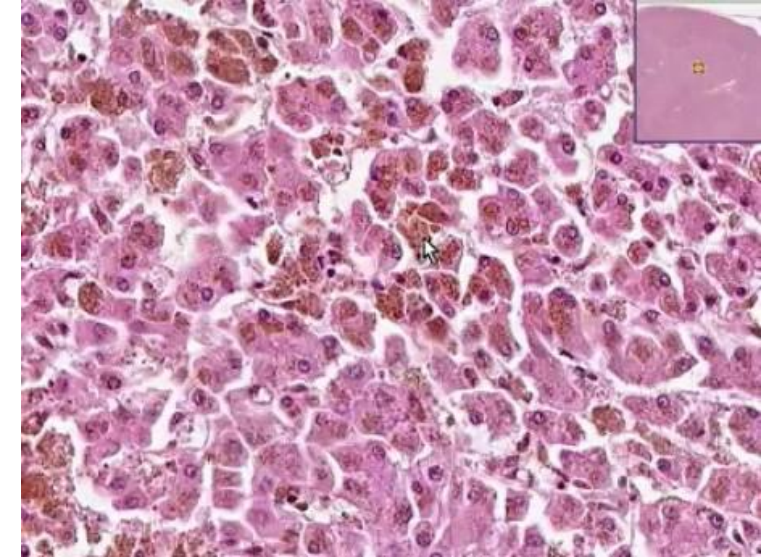
La hemosiderosis tiene un efecto prooxidante en los tejidos

Este efecto produce un daño denominado **HEMOCROMATOSIS** en tejidos como:

- Hígado → cirrosis
- Corazón → cardiomiopatía
- Páncreas → diabetes

La cirrosis hepática es la alteración más grave, pues desemboca en carcinoma hepatocelular

Puede producir hiperpigmentación en la piel

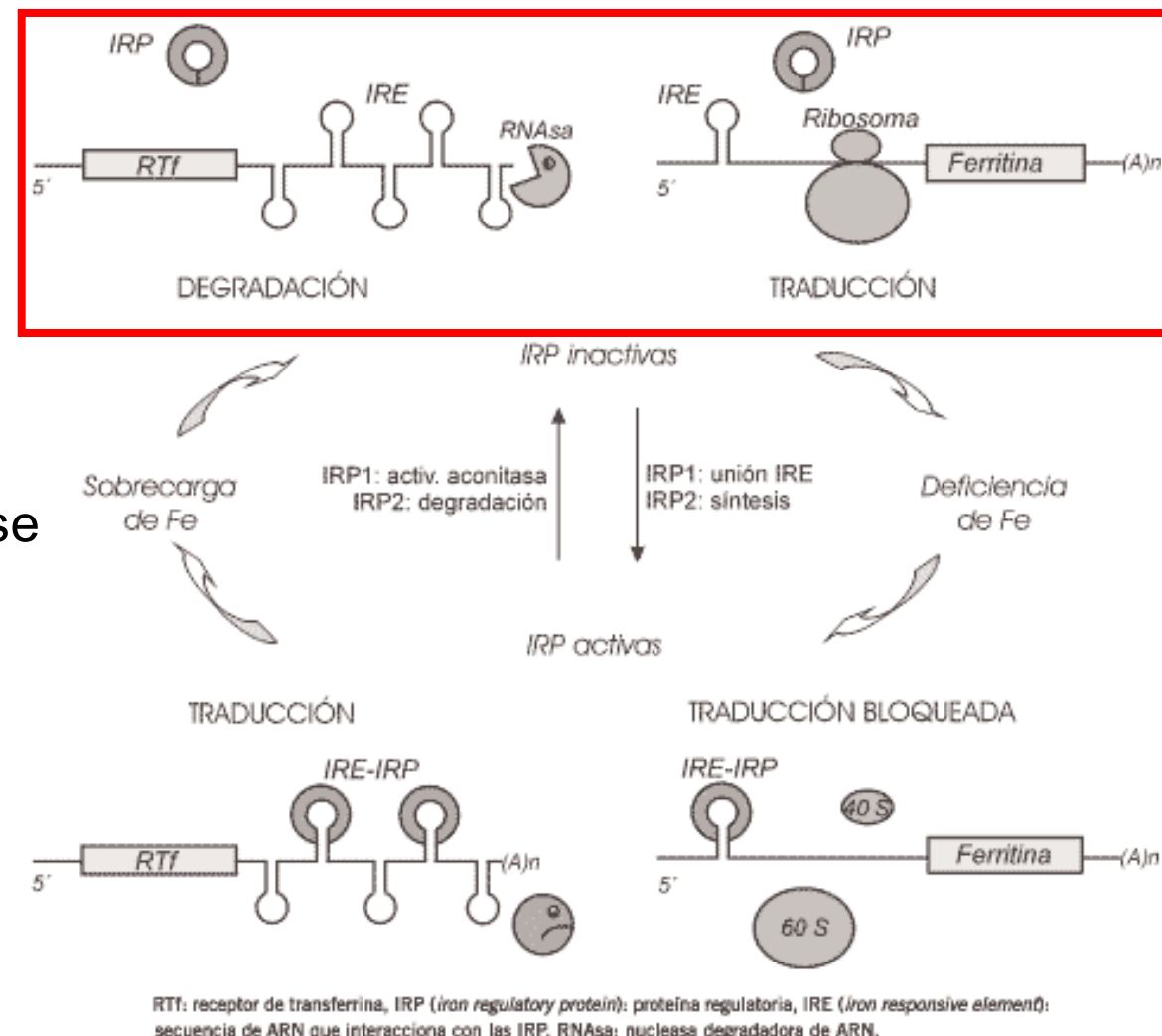


Exceso de hierro – proceso fisiológico



La hemosiderosis produce:

1. El organismo aumenta la producción de ferritina para almacenar el exceso de hierro (IRPs)
2. El hierro sérico aumenta
3. Se eleva la saturación de transferrina al ocuparse todos los espacios de la transferrina
4. Las células reducen la síntesis del receptor de transferrina (IRPs)



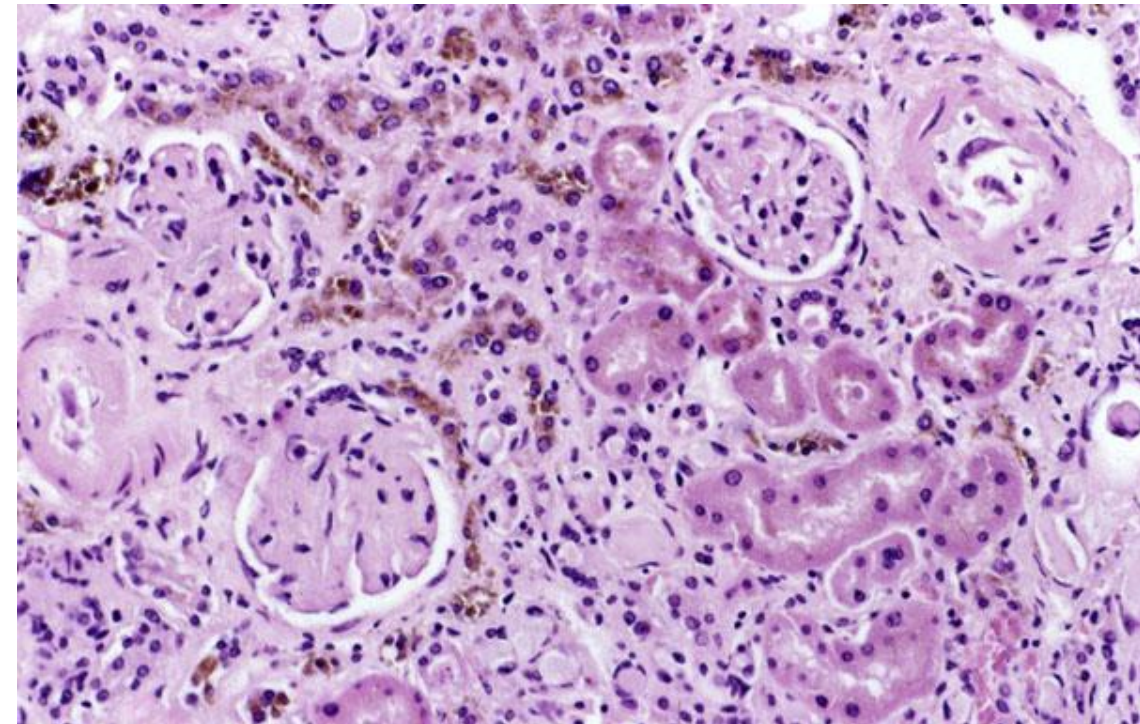
Exceso de hierro – diagnóstico



El diagnóstico se hace por determinación de los parámetros relacionados con el metabolismo del hierro

- Aumento de ferritina
- Aumento de hierro sérico
- Aumento de saturación de ferritina

Se puede cuantificar el hierro no contenido en grupos hemo en muestras de tejidos hepáticos



Exceso de hierro – tratamiento



Los tratamientos del exceso de hierro son:

- Quelantes de hierro → Deferroxamina
- Flebotomías → Hemosiderosis hereditaria

Extracciones periódicas de sangre para que el cuerpo use el hierro almacenado en tejidos para la producción de glóbulos rojos



Sección IV: Laboratorio de Bioquímica

TEMA 15

Marcadores bioquímicos de sepsis

Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio

Nacho Escrig, PhD

Bacteremia



Presencia de bacterias en sangre

El foco de infección puede ser:

Extravascular:

a través de los capilares o vasos linfáticos

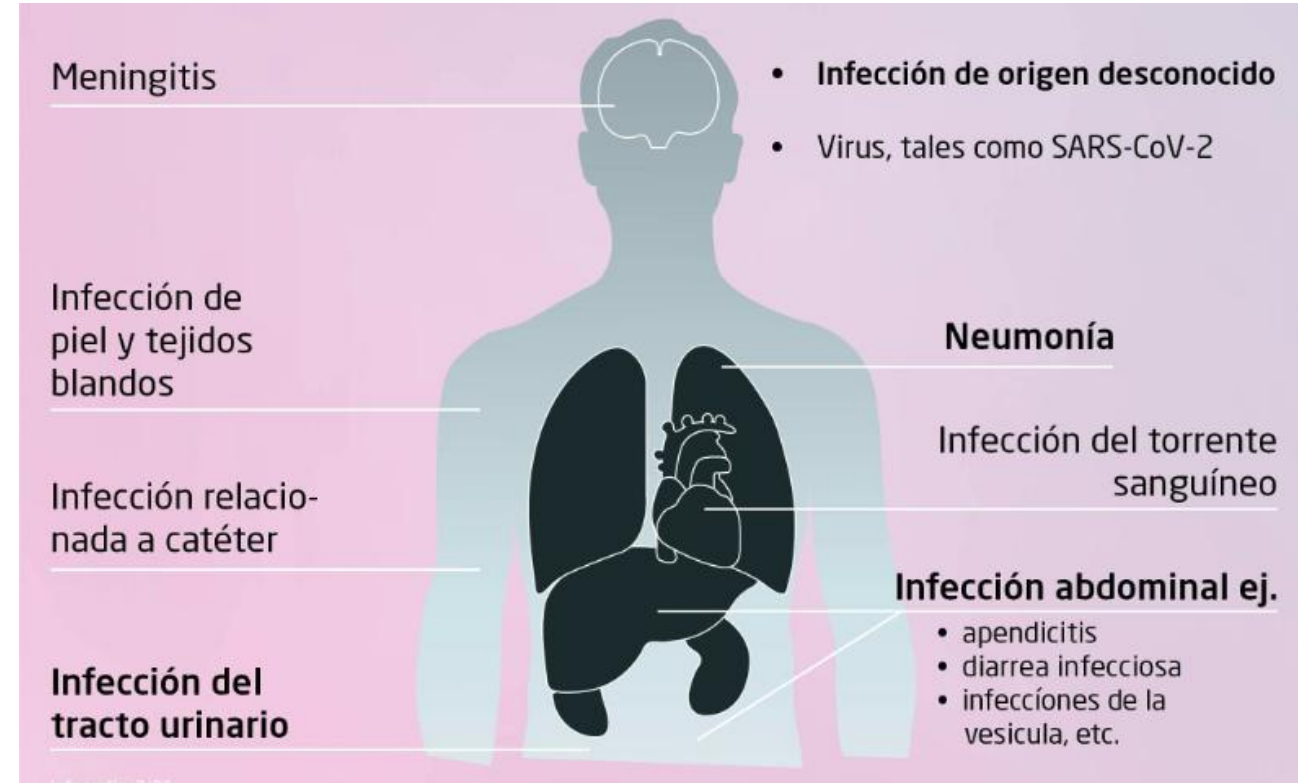
- Heridas quirúrgicas
- Infecciones gastrointestinales
- Infecciones genitourinarias

Intravascular:

a través de los propios vasos sanguíneos

- Endocarditis (infección en el corazón)
- Catéteres contaminados (fungemia)

El 25% de los casos tienen un origen desconocido



Grampositivas

Enterococcus
Staphylococcus
Streptococcus

Gramnegativas

Enterobacterias
(e.g. *escheriquia*
***o salmonella*)**

Sepsis



Es una enfermedad muy “**tiempo-dependiente**”

Tras la infección y si el microorganismo llega a sangre se produce:

Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS)

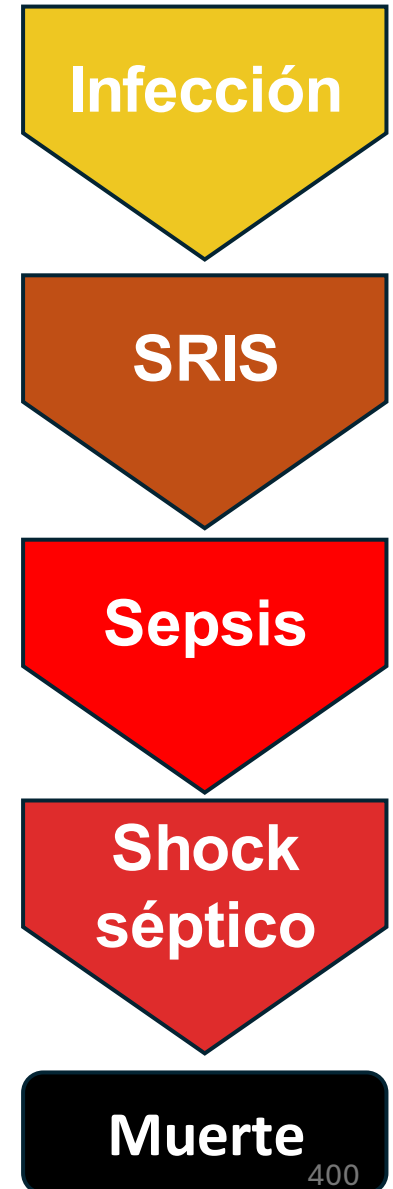
- Activación general del sistema inmune
- Subida de temperatura, frecuencia cardíaca y respiratoria
- Aumento de recuento leucocitario (células inmunes en sangre)

Sepsis

- Disfunción orgánica que amenaza la vida del paciente
- Se monitoriza por una escala de sepsis

Shock séptico

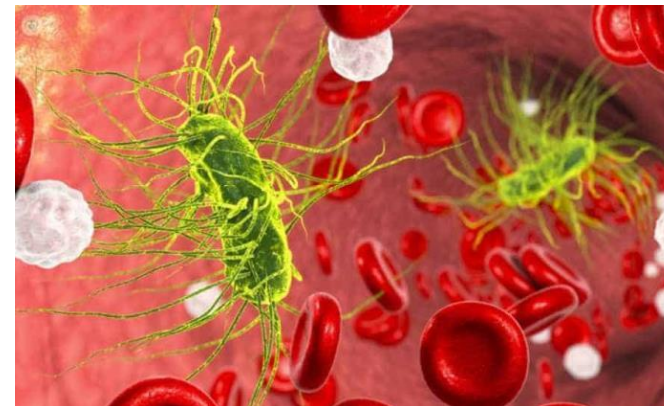
- Alteraciones metabólicas, circulatorias y celulares
- Altas probabilidades de muerte



Diagnóstico de sepsis

El diagnóstico puede darse por tres vías **complementarias**

- Microbiológica → Hemocultivo (Tema 7)
- Sintomática → fiebre, taquipnea, taquicardia o leucocitosis
- Biomarcadores → TNF, PCR, PCT...



Diagnóstico sintomático



Se considera que hay una sepsis cuando el paciente desarrolla síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS)

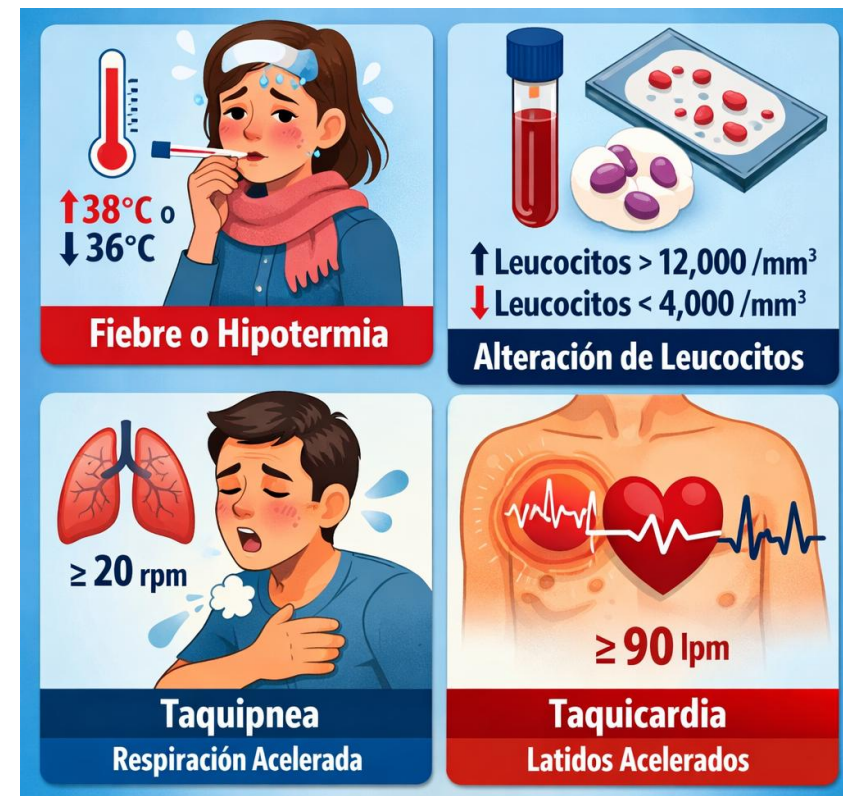
El SRIS asociado a sepsis cumple **dos de los siguientes parámetros**

- Taquipnea
 - Frecuencia respiratoria elevada
 - > 20 respiraciones por minuto
- Taquicardia
 - Frecuencia cardiaca elevada
 - > 90 latidos por minuto
- Leucocitosis
 - < 4.000 células/mm³
 - > 12.000 células/mm³
- Fiebre o hipotermia
 - < 36 °C
 - > 38 °C

Estos parámetros son **muy sensibles**, pero **poco específicos**

Aparecen en otras patologías, lo que dificulta el diagnóstico de pacientes con sepsis → antibióticos innecesarios

Esto hace que los biomarcadores sean mucho más útiles para el diagnóstico de sepsis



Diagnóstico por biomarcadores



Los biomarcadores son molecular medibles en una muestra biológica de forma **objetiva**, **sistemática** y **precisa**

Sus niveles correlacionan con la presencia de un proceso patológico

Se utilizan para:

- **Diagnóstico precoz** que se adelante a síntomas y signos permitiendo un tratamiento precoz
- **Cuantificar la gravedad**
- **Estratificar el riesgo**
- **Monitorizar la evolución**



Biomarcadores de respuesta inflamatoria e infección



Estos biomarcadores sirven para

- Distinción entre infección bacteriana y viral
- Distinción entre infección bacteriana localizada y sistémica
- Detección precoz del paciente con infección grave
- Predicción de bacteremia para proceder con pruebas microbiológicas (hemocultivos)
- Orientación en la decisión de alta o ingreso
- Orientación diagnóstica en distintas infecciones (neumonía, meningitis, sepsis urológicas)
- Indicación de administración inmediata de antibióticos
- Monitorización de tratamiento antibiótico, mantenimiento o cese de la pauta
- Monitorización de la evolución del paciente y grado de SRIS
- La combinación de los marcadores permite confirmar un diagnóstico dudoso



Biomarcadores de respuesta inflamatoria e infección



Existen más de 200 biomarcadores de respuesta inflamatoria e infección

Su naturaleza es muy variable: citoquinas, factores de coagulación, vasodilatación, receptores...

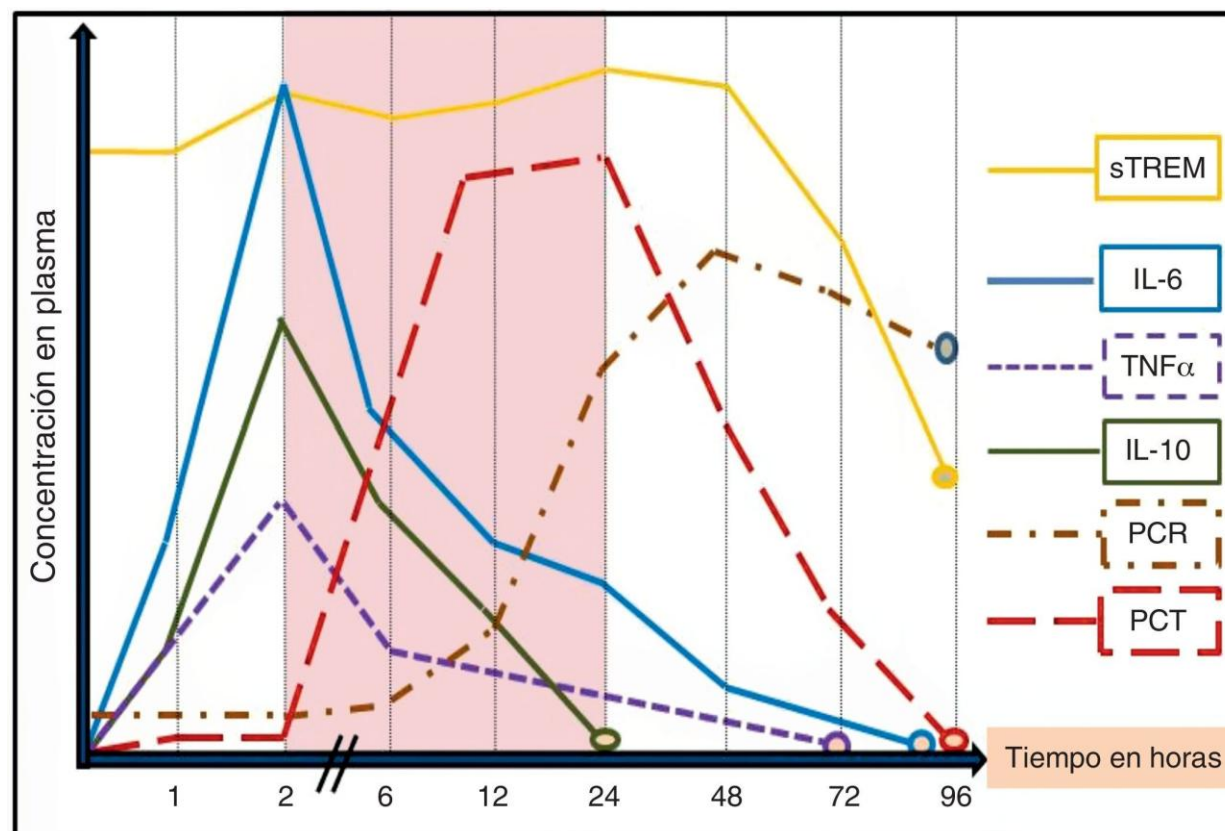
No todos están validados: evidencia científica de que mide de forma fiable lo que pretende

Validados:

1. Procalcitonina (PCT)
2. Lactato
3. Proteína C reactiva (PCR)

No validados pero muy utilizados:

4. TNF, IL-6, IL-8
5. sTrem1
6. Neopterin



Biomarcadores de respuesta inflamatoria e infección



Tabla 2
Clasificación de BMRIel y utilidades relevantes reconocidas en urgencias

BMRIel	Capacidad diagnóstica ^a	Capacidad pronóstica ^b	Otras ^c	Comentarios
Citoquinas				
TNF α	–	++	–	Primer mediador que estimula a su vez la aparición de IL-1, IL-6, IL-8
IL-6	+++	+++	+	Se ha relacionado con gravedad (SG-SS), mala evolución (FMO), mortalidad a los 28-30 días, sepsis neonatal y en pacientes pediátricos. Utilidad demostrada en neutropénicos
IL-8	++	+++	+	Se ha relacionado con gravedad (SG-SS), mala evolución (FMO, CID), mortalidad a los 28-30 días. Utilidad en neutropénicos. Sensibilidad y especificidad > 90%
IL-10	+	+	–	Se ha relacionado con gravedad (SG-SS) y mortalidad a 28 días
IL-12	+++	++	–	Se ha relacionado con infección bacteriana y sepsis, más en pacientes pediátricos. Sensibilidad y especificidad > 90%
Proteínas de fase aguda				
PCR	+++	++	+	Se ha relacionado con infección bacteriana, sepsis, gravedad (SG-SS), bacteriemia, mala evolución, mortalidad, como guía de tratamiento AB. Menor sensibilidad y especificidad que la PCT
PCT	+++++	++++	+++	Se ha relacionado con infección bacteriana, sepsis, gravedad (SG-SS), mortalidad, bacteriemia, mala evolución (FMO, necesidad de UCI), guía de tratamiento AB (sepsis, NAC, EPOC), evolución según aclaramiento porcentual. Sensibilidad y especificidad > 90% según puntos de corte. Utilidad en: neutropénicos, pacientes oncohematológicos, reumatológicos, con insuficiencia renal o hepática. Utilidad en pacientes ancianos con similar sensibilidad y especificidad. Asociación con escalas pronósticas de gravedad. Orientación de etiología microbiana específica (NAC, meningitis). Estimación de puntos de corte, intervalos semicuantitativos y VRC. Utilidad de seriación y medición del aclaramiento. Es el BM con mayor poder diagnóstico ⁹
ETI y Pro-ETI	–	++	–	Mortalidad a los 28 días y correlación con SOFA

Receptores solubles				
sTREM1	++	+++	+	Se ha relacionado con gravedad (SG-SS) y mortalidad a los 28 días. Estudios recientes le otorgan menor poder predictivo que PCT y otros BM. Más útil en UCI que en SUH. Receptores de superficie celular
CD14	–	+	–	Mortalidad a los 28 días
CD64	+++	++	–	En sepsis frente a SRIS con sensibilidad y especificidad > 90%. Correlación con APACHE II y SOFA
CD11b	+++	+	–	En sepsis frente a SRIS con sensibilidad y especificidad > 90%. Utilidad en neonatos
Factores de la coagulación				
Trombopenia	–	++	+	Predice FMO y mortalidad a los 28-30 días
Dímero D	–	+++	–	Se ha relacionado con la gravedad (SG-SS), mala evolución (FMO, CID), APACHE II y mortalidad a los 28 días
TTPa	+	++	–	Correlación con FMO, CID y mortalidad
AT-III	–	++	–	Predicen FMO y mortalidad
Proteínas C y S	–	++	–	Descenso de proteínas C y S predicen mala evolución y mortalidad
Daño vascular endotelial y/o vasodilatación				
Endocan	++	++	–	Se ha relacionado con gravedad (SG-SS) y mortalidad a los 28 días. Diagnóstico de sepsis frente a SRIS no infeccioso
Neopterina	+	++	++	Se relaciona con infección vírica y mortalidad a los 28 días. Orientación etiológica en NAC
Pro-ADM	+	+++++	+	Se ha relacionado con gravedad (SG-SS) y mortalidad a las 3, 28, 90, 180 días. Asociación con escalas pronósticas de gravedad en NAC. Es el BM con mayor poder pronóstico ⁹ de mortalidad
MR-proADM	–	++	–	Se relaciona con mortalidad a los 28 días en pacientes con SS con depresión miocárdica y distensión auricular. Disfunción orgánica
Pro-ANP	–	++	–	Mortalidad a los 28 días y correlación con APACHE II
Copeptina	–	++	–	Se ha relacionado con gravedad (SG-SS)
Óxido nítrico	+	++	–	
Otros BM				
FosfolipasaA2 tipo II	+++	+++	–	Se ha relacionado con S y bacteriemia con sensibilidad y especificidad > 90%. Mortalidad a los 28 días.
Lactato	–	+++++	+	Mejor marcador de hipoperfusión e hipoxia tisular. Predictor de mala evolución, gravedad (SG-SS) y mortalidad. Utilidad de seriación y medición del aclaramiento. Respuesta al tratamiento
Complemento (C3, C4, C5a)	+	++	–	Mortalidad a los 28 días. Distingue entre S y SRIS. No adecuado para el SUH

1. Procalcitonina (PCT)

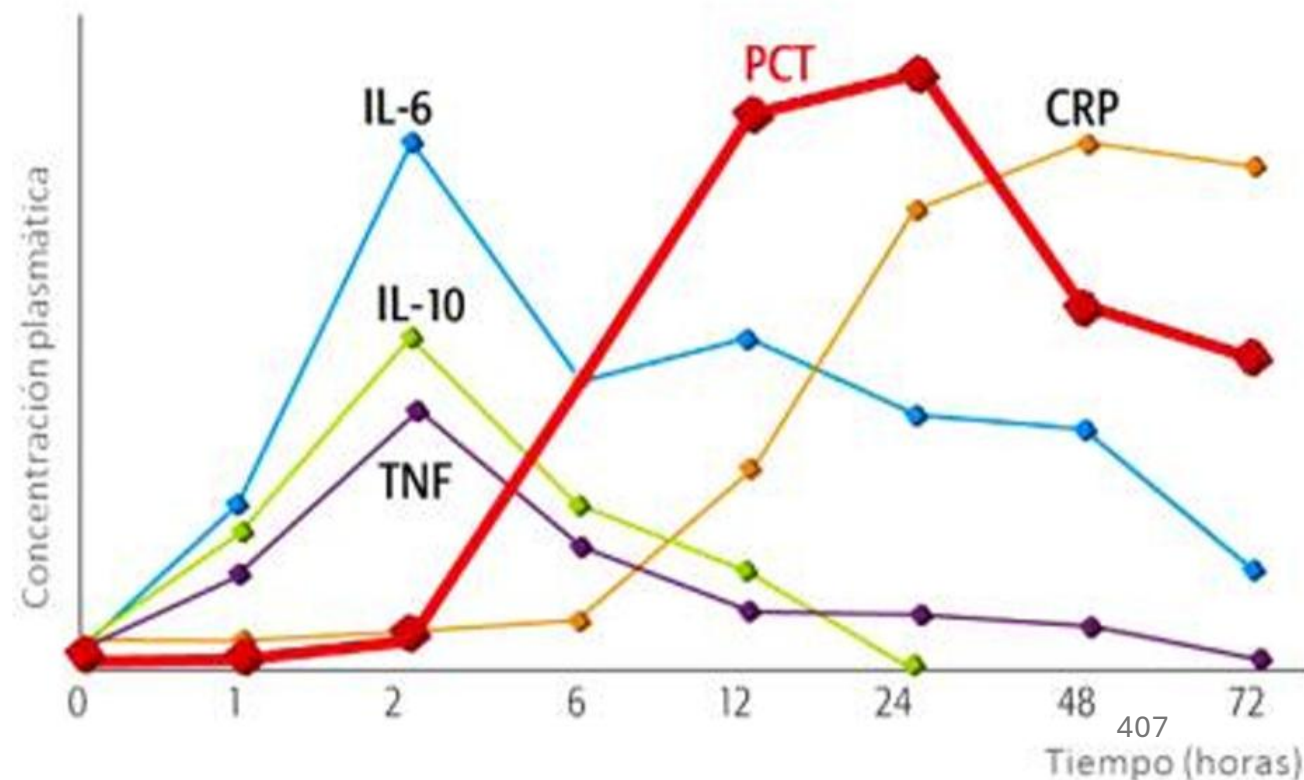


Producción:

- Se sintetiza en la tiroides y en las células neuroendocrinas del pulmón
- En condiciones normales toda su producción se procesa, siendo indetectable su concentración en individuos sanos ($>0,05$ ng/mL)
- Se produce por otros tejidos en infecciones bacterianas y sepsis

Cinética:

- Se eleva de forma precoz a las 4-6 horas de la infección
- Tiene su pico entre las 12 y 24 h
- Tiene una vida media de 20 y 36 h





1. Procalcitonina (PCT)

Utilidad diagnóstica:

- Sus niveles se relacionan con la **CARGA BACTERIANA**
- Se mide el porcentaje de variación entre dos mediciones, pues una reducción del 30-50% en los niveles de PCT significa que el estímulo inflamatorio ha cesado o está en resolución
- Su utilidad diagnóstica se mantiene en enfermos con patologías que pueden producir falsos positivos como:
 - Insuficiencia renal
 - Cirrosis
 - Ancianos
 - Pacientes oncohematológicos
 - Pacientes neutropénicos
 - Autoinmunidad

1. Procalcitonina (PCT)



Utilidad diagnóstica:

- Los distintos puntos de corte sirven para diagnosticar distintas situaciones
- Puede dar lugar a falsos positivos y falsos negativos en determinados contextos

Tabla 4
PCT: puntos de corte, valores normales, falsos positivos y negativos

<i>Puntos de corte de PCT (ng/ml):</i> Sanos < 0,05 Posible infección bacteriana > 0,1 Probable infección bacteriana > 0,25 Posible sepsis (gravedad clínica) > 0,5 Probable bacteriemia > 1-2 Posible SG-SS > 5-10 ng/ml Pacientes con infección viral < 0,5 Pacientes con infección bacteriana localizada < 0,5 Inflamación crónica y enfermedades autoinmunes < 0,5 <i>FN o situaciones donde la PCT puede estar en rangos normales existiendo una infección:</i> Fases precoces de la infección (6 primeras horas). Repetir determinación a las 6-12 o 24 h Infección localizada (empiema, absceso) Endocarditis subaguda-crónica Infecciones por bacterias intracelulares	<i>FP o situaciones donde la PCT puede estar elevada:</i> Neonatos (a partir de 48-72 h regresan a valores normales) Trauma grave o cirugía mayor reciente (considerar IB si PCT > 1,5-2 ng/ml o si existe un aumento entre 2 mediciones de VRC (0,45 ng/ml) o del 50% del valor inicial) Invasión fúngica masiva (puede mostrar niveles > 2-5 ng/ml) Shock cardiogénico grave (considerar IB si PCT > 2-5 ng/ml o si existe un aumento entre 2 mediciones de VRC o del 30-50% del valor inicial) Infección por <i>Plasmodium falciparum</i> (puede mostrar niveles > 2-5 ng/ml) Anomalías importantes de perfusión (considerar IB si PCT > 2-5 ng/ml o si existe un aumento de VRC o entre 2 mediciones del 30-50% del valor inicial) Carcinoma medular de tiroides (puede mostrar niveles muy altos) Carcinoma microcítico de pulmón (puede mostrar niveles muy altos) Síndrome carcinoide (puede mostrar niveles altos) Isquemia mesentérica y pancreatitis (considerar IB si PCT > 2-5 ng/ml o si existe un aumento entre 2 mediciones de VRC del 30-50% del valor inicial)
--	--

FN: falsos negativos; FP: falsos positivos; IB: infección bacteriana; PCT: procalcitonina; SG: sepsis grave; SS: shock séptico; VRC: valor de referencia de cambio clínico.
Adaptada de las referencias 45,46,51,56.



1. Procalcitonina (PCT)

Utilidad diagnóstica:

ENTORNO DE ATENCIÓN PRIMARIA (BAJA GRAVEDAD)				
DETERMINACIÓN DE PCT EN LA ADMISIÓN				
PCT (ng/mL)	<0,1	0,1-0,25	0,25-0,5	>0,5
Prescripción de Antibióticos	Fuertemente desaconsejada	Desaconsejada	Recomendada	Fuertemente recomendada
• Valorar la prescripción de antibióticos con independencia del valor de PCT en pacientes de alto riesgo. • Realizar otra determinación en caso de que no se resuelvan los síntomas tras 1-2 días.				

Tabla 2: Algoritmo de recomendación antibiótica en base al valor de PCT en pacientes atendidos en atención primaria. Adaptado de Schuetz y cols. (17).



1. Procalcitonina (PCT)

Utilidad diagnóstica:

ENTORNO DE SERVICIOS DE URGENCIAS Y SERVICIOS DE HOSPITALIZACIÓN NO CRÍTICOS (GRAVEDAD MODERADA)				
DETERMINACIÓN DE PCT EN LA ADMISIÓN				
PCT (ng/mL)	<0,1	0,1-0,25	0,25-0,5	>0,5
Prescripción antibiótica	Fuertemente desaconsejada	Desaconsejada	Recomendada	Fuertemente recomendada
• Reevaluar a los pacientes y volver a determinar la PCT después de 24 horas si no hay mejoría clínica. • En pacientes estables determinar los valores de PCT cada 2-3 días para considerar la interrupción temprana de la terapia antibiótica.				
DETERMINACIÓN DE PCT PARA CONTROL EVOLUTIVO (cada 2-3 días)				
PCT (ng/mL)	<0,1	0,1-0,25	0,25-0,5	>0,5
Interrupción de antibióticos	Fuertemente recomendada	Recomendada	Desaconsejada	Fuertemente desaconsejada
• Considerar la continuación de terapia antibiótica en pacientes clínicamente inestables. • Considerar el fracaso del tratamiento si la PCT no disminuye de manera progresiva.				

Tabla 3: Algoritmo de recomendación antibiótica en base al valor de PCT en pacientes atendidos en servicios de urgencias o pacientes hospitalizados no críticos.

Adaptado de Schuetz y cols. (17).

2. Lactato



Producción:

- Principal metabolito resultante de la glucólisis anaerobia (ausencia de oxígeno)
- Aparece en condiciones de hipoxia e hipoperfusión

Utilidad clínica:

- Indica hipoxia o hipoperfusión, por lo que se relaciona con disfunción orgánica
- No sirve para diagnóstico precoz
- Es muy útil como marcador de evolución clínica y mortalidad
 - Niveles superiores a 2-5 mmol/L indica mala evolución y mortalidad
 - La disminución de los niveles con el tratamiento indica buen pronóstico
 - Una reducción de los niveles en un 10% reduce la probabilidad de muerte en un 11%
- No diferencia sepsis de SRIS
- Su determinación es rápida y barata

3. Proteína C reactiva (PCR)

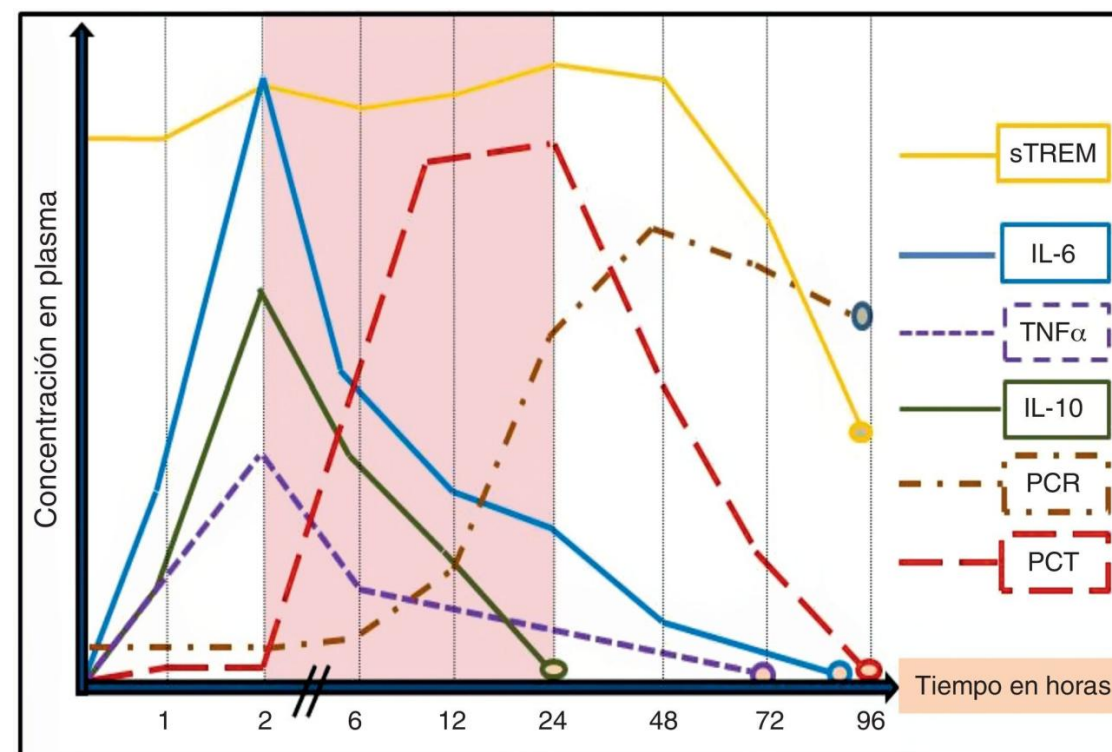


Producción:

- Es liberada por los hepatocitos ante reacciones inflamatorias mediadas por IL-6 e IL-8
- El hígado continúa produciéndola tras la infección

Utilidad clínica:

- Es una proteína de fase aguda liberada en respuesta a infecciones víricas y bacterianas
- Se emplea en la monitorización y apoyo al diagnóstico
- Se usa siempre en combinación con otros biomarcadores por:
 - Elevación en procesos infecciosos y no infecciosos
 - Cinética lenta (12h tras la infección)
 - Sus niveles se mantienen tras la resolución de la infección



4. TNF, IL-6, IL-8



Producción:

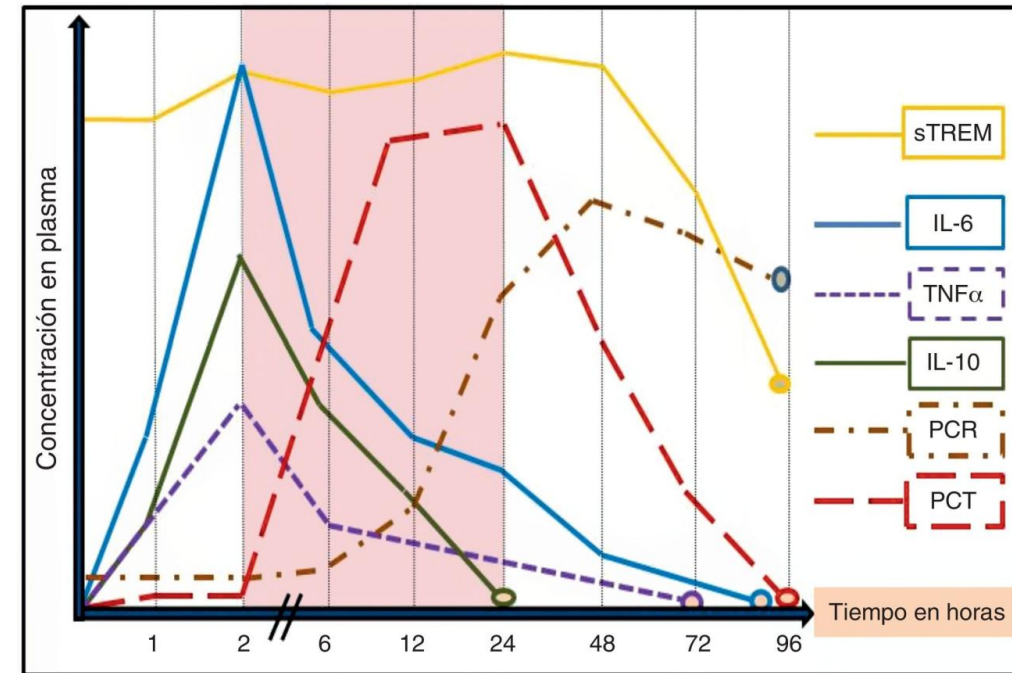
- Se producen por el sistema inmune innato y adaptativo durante la infección

Cinética:

- Se elevan en las primeras 2h
- Tienen una vida media corta por su baja estabilidad

Utilidad clínica **IL-6 e IL-8**:

- Alta sensibilidad para diferenciar SRIS infecciosa de no infecciosa
- IL6 se emplea en urgencia de pediatría y neonatos, que presentan la PCT elevada fisiológicamente
- IL6 tiene mayor capacidad diagnóstica que IL-8



5. sTREM1



Producción:

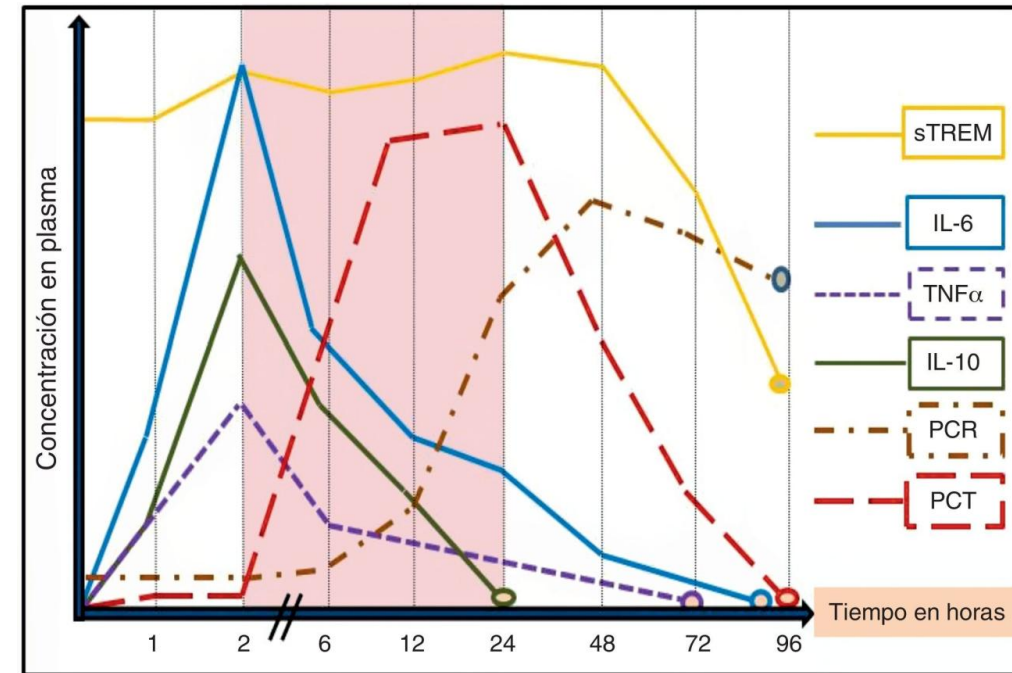
- Es un receptor de superficie de células mieloides (neutrófilos y monocitos)

Cinética:

- Se eleva en las primeras 2h
- Tiene un pico a las 12-24h

Utilidad clínica:

- Sus niveles correlacionan con el mantenimiento y empeoramiento de la sepsis
- Se emplea como marcador de seguimiento
- Se usa mucho en pacientes inmunodeprimidos y ancianos



6. Neopterin



Producción:

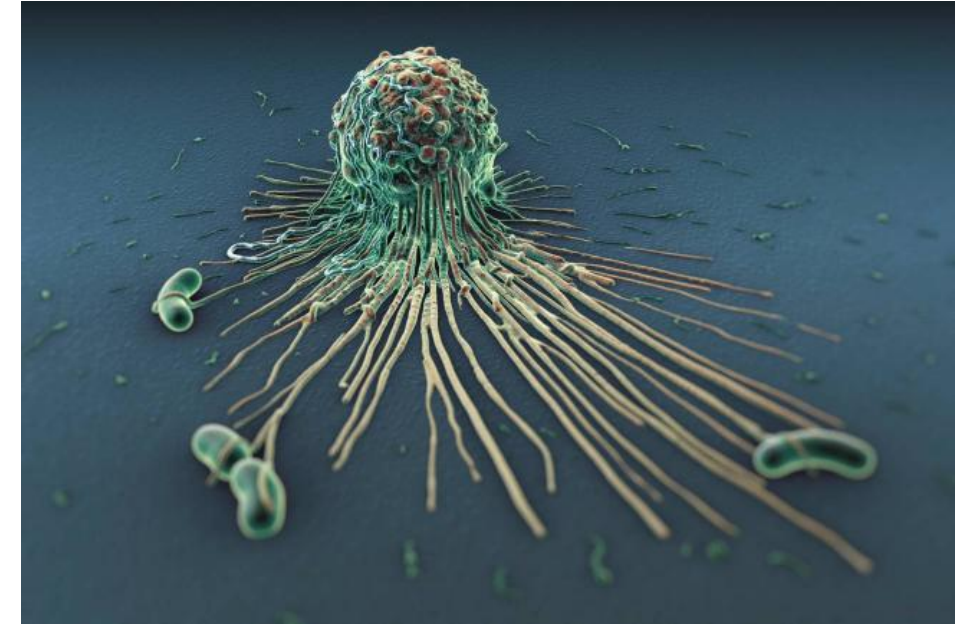
- Es liberada por macrófagos estimulados por $\text{INF}\gamma$

Cinética:

- Alcanza su pico días después de la infección

Utilidad clínica:

- Marcador de infecciones víricas
- Marcador de infecciones bacterianas intracelulares (respiratorias)
- No diferencia entre víricas y bacterianas intracelulares
- No es precoz
- Se usa en combinación con la PCT



Consideraciones de los biomarcadores de sepsis



El mejor diagnóstico reside en la combinación de los biomarcadores

NO sustituyen la valoración clínica ni el estudio microbiológico

Son de utilidad en:

- Pacientes leves:
 - Se busca un valor predictivo positivo elevado
 - Evitar falsos negativos
- Pacientes graves:
 - Se busca un valor predictivo negativo elevado
 - Descartar las sospechas

Las más utilizadas en combinación son:

- PCT: para inicio y seguimiento de la infección
- Lactato: predicción de mortalidad
- PCR: Monitorización

Los valores predictivos no dependen de la técnica (especificidad y sensibilidad) sino de que el parámetro analizado permita la correcta interpretación de la realidad

Diagnostico de los biomarcadores de sepsis



Los biomarcadores de sepsis se determinan en **sangre**, aunque algunos pueden medirse en otras muestras

Todos ellos se miden mediante inmunoensayos tipo **ELISA**

La única excepción es el lactato, que se mide por:

- Gasometría
- Tiras reactivas



VALORES NORMALES	
Gasometría arterial	
Gases en sangre	
pH	7.35 - 7.45
PaCO ₂	35 - 45 mmHg
PaO ₂	80 - 100 mmHg
Equilibrio ácido-base	
HCO ₃ ⁻	22 - 26 mEq/L
E.B.	-2 a +3 mEq/L
CO ₂	23 - 28 mmol/L
Oximetría	
ctHb	12 - 17 g/dL
sO ₂	95 - 100%
F02Hb	94 - 98%
Electrolitos	
Na ⁺	135 - 145 mEq/L
K ⁺	3.5 - 4.5 mEq/L
Ca ²⁺	1.15 - 2.35 mEq/L
Cl ⁻	95 - 105 mEq/L
Metabolitos	
Glucosa	70 - 100 mg/dL
Lactato	0.5 - 2.0 mmol/L

• Los valores cambian en la gasometría venosa.

Sección IV: Laboratorio de Bioquímica

TEMA 16

Seminograma

Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio

Nacho Escrig, PhD

Infertilidad en datos



Los problemas reproductivos afectan a 80 millones de parejas en todo el mundo

Se asocian con:

- Modificación del estilo de vida
- Exposición a tóxicos ambientales
- Consumo de tóxicos (alcohol, tabaco, drogas...)

Desde 2002 la esterilidad es considerada por la OMS como una enfermedad

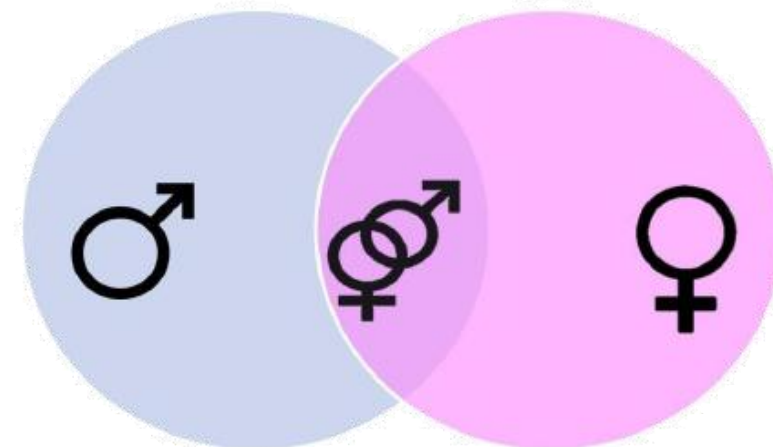
Es complicado aunar datos fiables de prevalencia de esterilidad pues no todas las parejas no gestantes son estériles, y no todas las parejas estériles acuden al médico

De los casos de infertilidad que se conocen, el 40% tiene un origen masculino

Los hombres tienen menos problemas hormonales que las mujeres

Sus problemas suelen estar más relacionados con una producción de espermatozoides anómala

Causas de infertilidad



40% - Causa de origen masculino
40% - Causa de origen femenino
20% - Mixta

Infertilidad vs Esterilidad



Hay que diferenciar entre estos dos conceptos

➤ Infertilidad: se logra la gestación, pero no llega a término

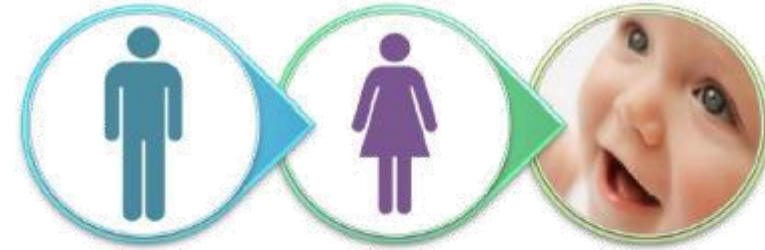
- Problemas en la implantación
- Problemas anatómicos del útero
- Alteraciones genéticas

➤ Esterilidad: no se logra la gestación

- Problemas ovulatorios
- Obstrucción en trompas de Falopio
- Endometriosis
- Edad
- Alteraciones en la calidad del semen

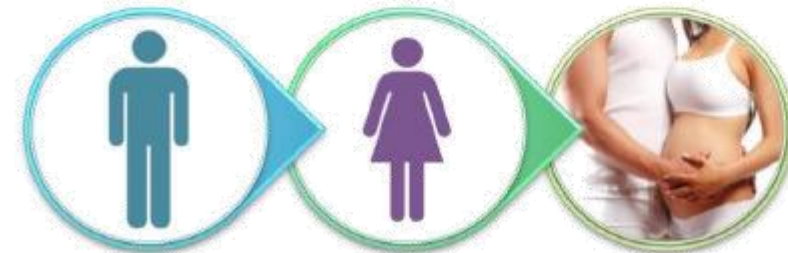
Infertilidad

“Consigue la gestación pero no alcanza el parto”



Esterilidad

“No consigue la gestación”



Causas de la esterilidad



En las mujeres lo más común son problemas **hormonales o fisiológicos**

En los hombres lo más común son **anomalías en la producción de espermatozoides**



Diagnóstico

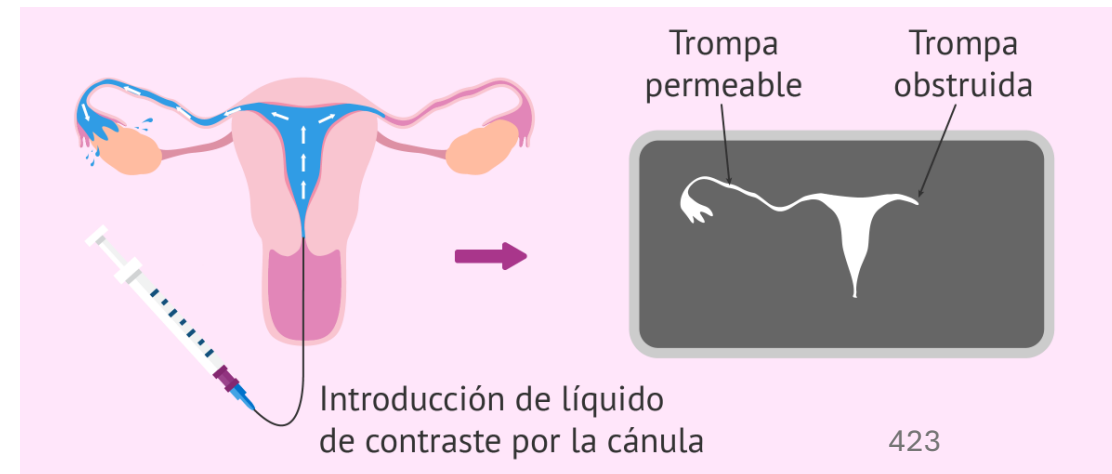
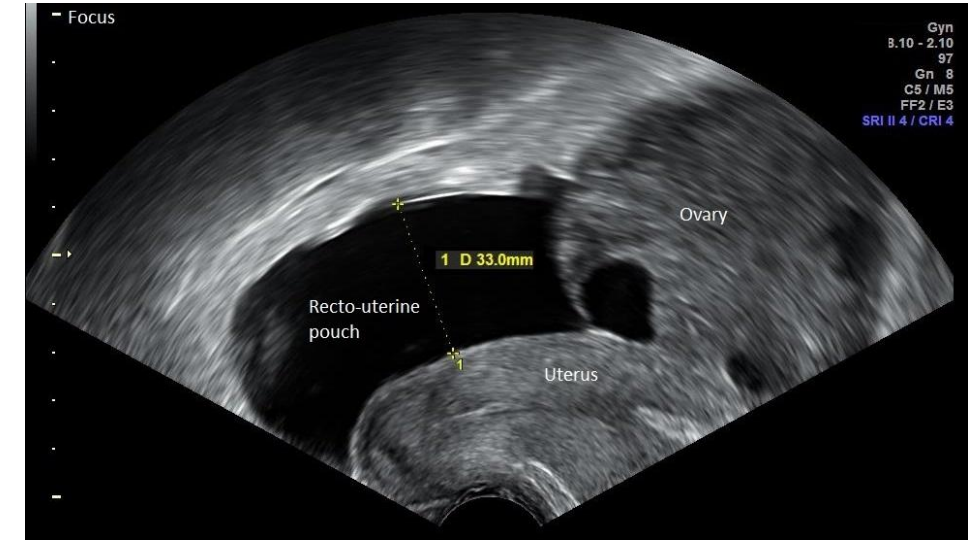


Lo primero que se hace es un estudio de **antecedentes familiares y personales (anámnesis)**

Luego se lleva a cabo un estudio de la fertilidad:

Mujer:

- Estudio hormonal: para descartar problemas hormonales
- Ecografía transvaginal: para descartar problemas morfológicos del útero y las trompas
- Histerosalpingografía: estudio radiológico con contraste para ver el estado del útero y las trompas



Diagnóstico

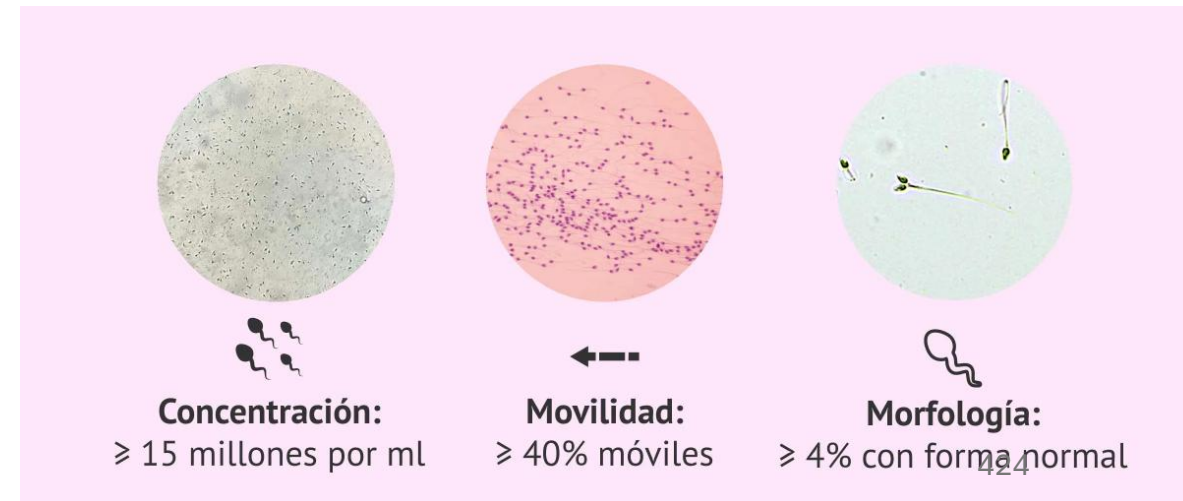
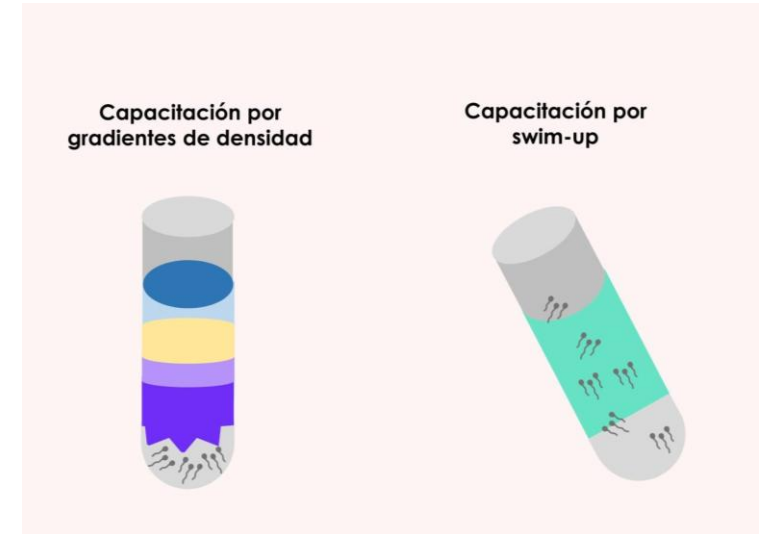


Lo primero que se hace es un estudio de **antecedentes familiares y personales (anámnesis)**

Luego se lleva a cabo un estudio de la fertilidad:

Hombre:

- Estudio hormonal: para descartar problemas hormonales
- Test de capacitación: indica el porcentaje de espermatozoides aptos para fecundar
- Estudio bacteriológico y bioquímico: las infecciones pueden alterar la calidad del semen
- Seminograma



El semen



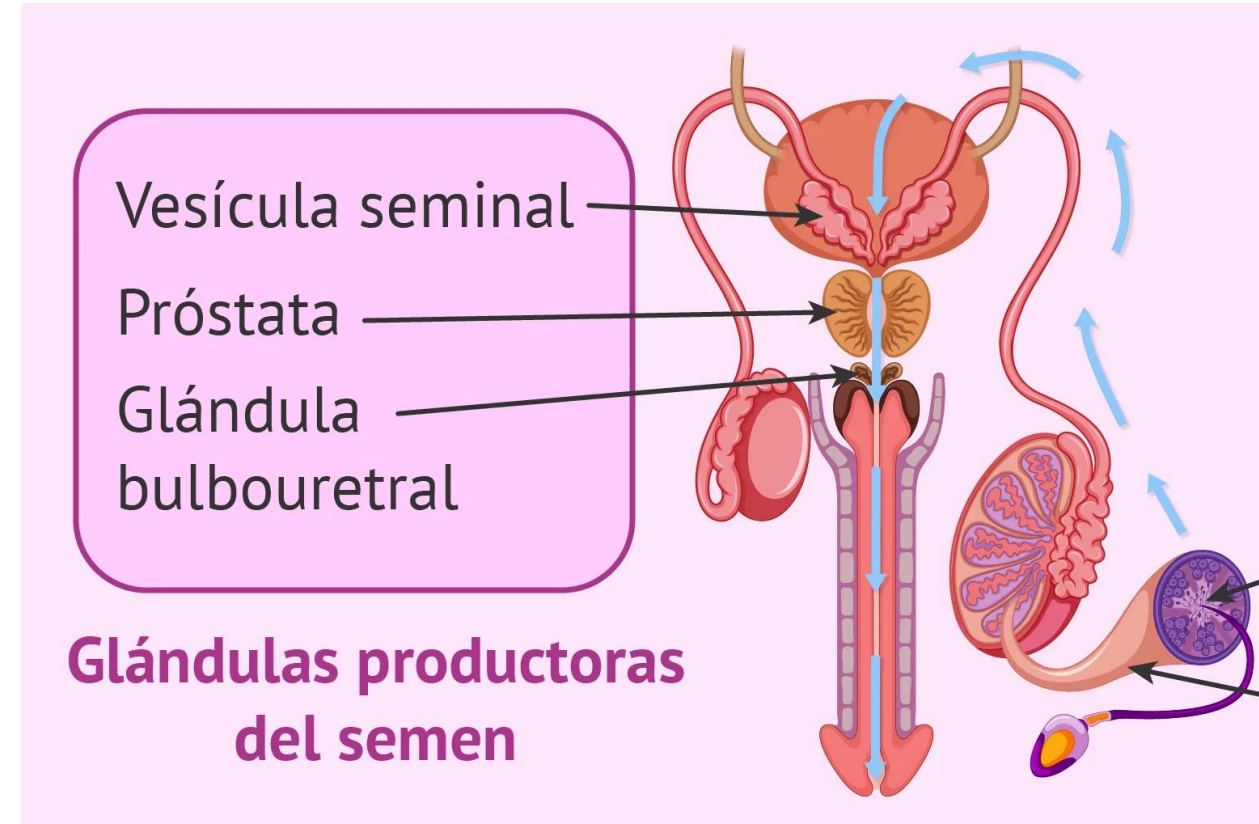
El semen es el único fluido corporal diseñado para llevar a cabo su función fuera del organismo que lo produce

Composición del semen:

❑ Plasma seminal (90%):

- Secreciones seminales (60-65%)
 - Lo producen las vesículas seminales
 - Es rico en fructosa
 - Nutre, da energía y favorece movilidad
- Secreción prostática (30-35%)
 - Lo produce la próstata
 - Licúa el semen tras la eyaculación
 - Protege a los espermatozoides en el tracto femenino
- Secreciones bulbouretrales (5%)
 - Lo producen las glándulas bulbouretrales (de Cowper)
 - Aportan lubricación natural
 - Neutralizan los residuos de la acidez urinaria

❑ Espermatozoides (10%)





El seminograma

El seminograma permite valorar ciertas características del paciente

NO sirve para pronosticar la capacidad fecundante a no ser que haya

AZOOSPERMIA: ausencia de espermatozoides

ASTENOZOOSPERMIA: ausencia de movilidad espermática

Existen unos valores de referencia en los parámetros del seminograma, pero no significan valores de normalidad

Pacientes con niveles fuera de los valores de referencia pueden conseguir la fecundación

Dada la variabilidad de los valores del líquido seminal, la OMS recomienda un seminograma longitudinal, con al menos dos muestras tomadas con una diferencia de unas semanas, y un tercero si hubiera discrepancia entre los dos primeros

El seminograma tiene una variación interindividual pero también intraindividual

Características del seminograma



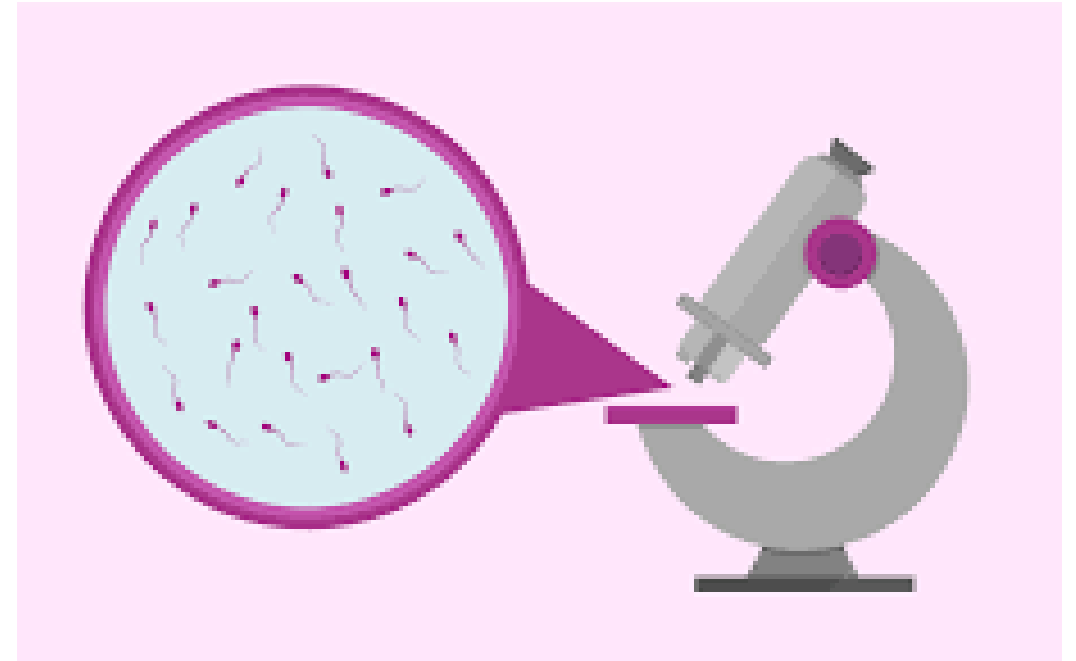
El seminograma incluye

1. Características macroscópicas:

- Volumen
- Licuefacción
- Viscosidad
- Color
- pH
- Concentración de fructosa

2. Características microscópicas:

- Concentración de espermatozoides
- Movilidad
- Vitalidad
- Morfología

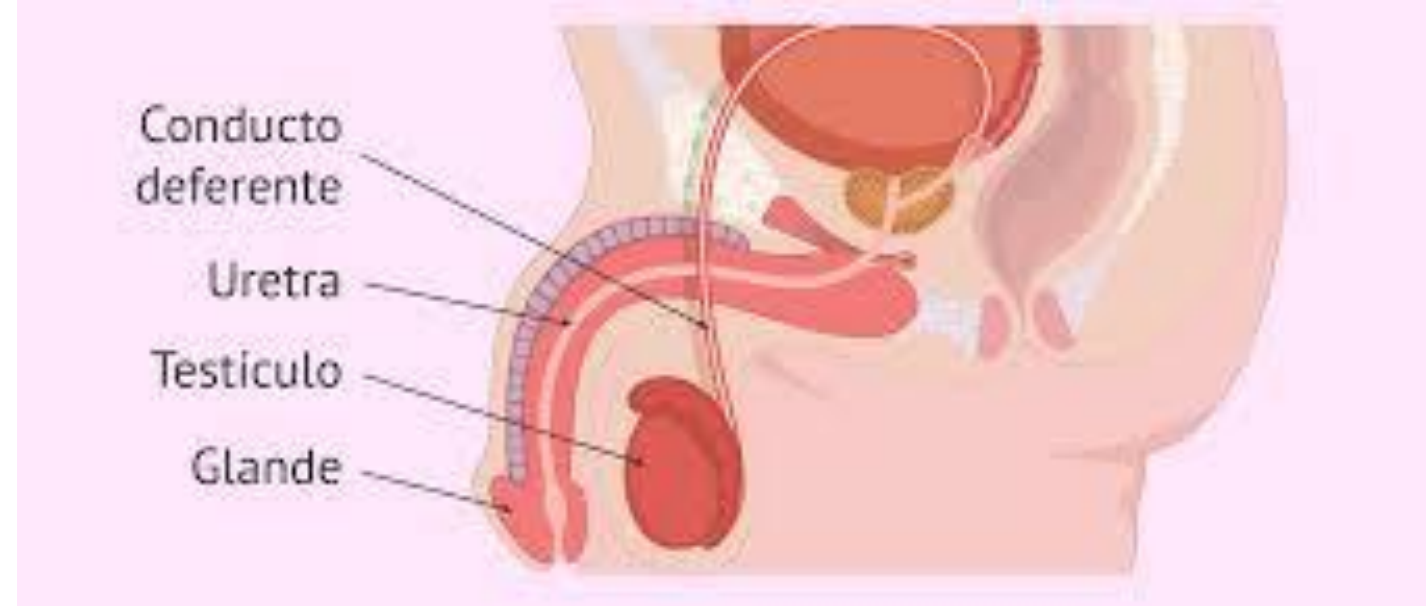


1. Características macroscópicas



➤ Volumen

- Se encuentra entre 1.5 y 6 ml
- Si es inferior hay **HIPOSPERMIA**
- La hipospermia puede deberse a:
 - Infección
 - Obstrucción de vasos deferentes
 - Eyaculación retrógrada



➤ Licuefacción

- El semen se licúa a temperatura ambiente 20 minutos después de la eyaculación
- A esta licuefacción contribuyen las secreciones prostáticas
- Si no se da dentro de esos 20 minutos puede haber **disfunción prostática**



1. Características macroscópicas

➤ Viscosidad

- El semen licuado ha de ser ligeramente más viscoso que el agua
- Para comprobarlo se observa la formación de hilos en la muestra
- Si la muestra es muy viscosa puede deberse a **disfunción prostática**
- Esto no es causa directa de infertilidad, pero se ha de considerar con el resto de parámetros

➤ Color

- El semen debe ser blanco ligeramente amarillento
- Otros colores indican contaminación:
 - Rojo: presencia de sangre
 - Amarillo intenso: presencia de bilirrubina, vitaminas
 - Amarillento: alto contenido en leucocitos
 - Transparente: baja concentración de espermatozoides

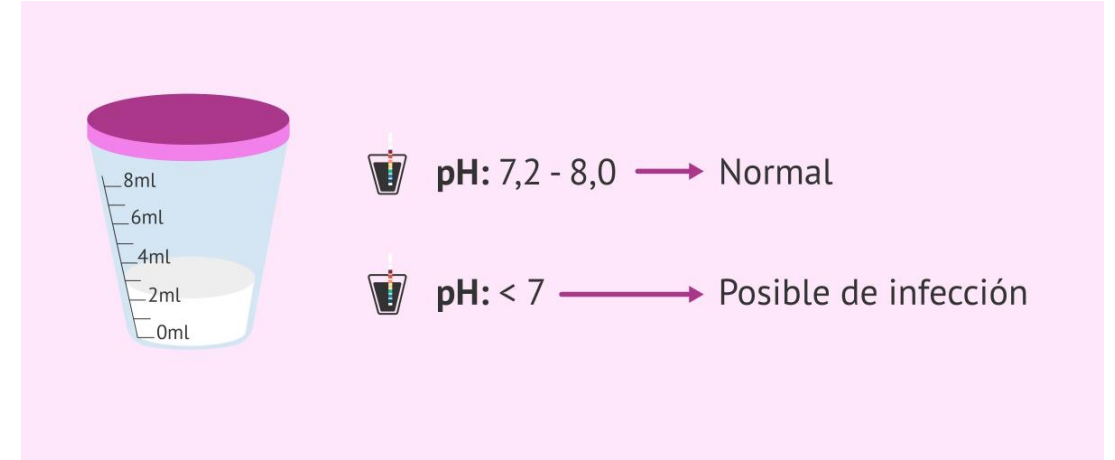




1. Características macroscópicas

➤ pH

- Normalmente entre 7,2 y 8,2
- Debe medirse antes de 1 h tras la eyaculación
- Indica el balance de las distintas secreciones
 - **Ácido:** secreción prostática
 - **Alcalino:** secreción seminal



➤ Concentración de fructosa

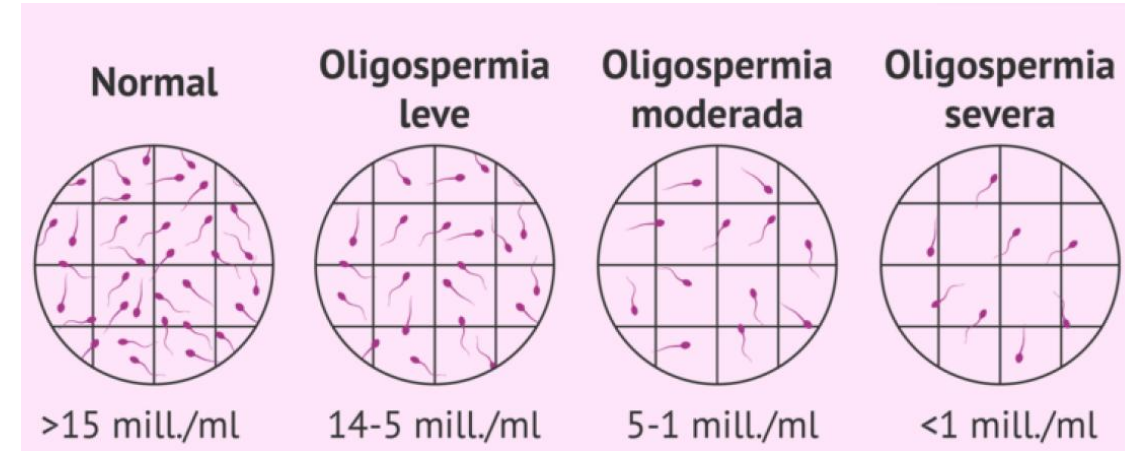
- Es el sustento nutritivo de los espermatozoides
- Valores bajos indican problemas en las **vesículas seminales**

2. Características microscópicas



➤ Concentración de espermatozoides

- El valor de normalidad inferior es de 15 M/ml
- Se mide contando en una cámara de Neubauer
- Se puede automatizar
- Si hay una cantidad baja se denomina **OLIGOZOOSPERMIA**



➤ Movilidad

- Es muy importante para que los espermatozoides lleguen a las trompas de Falopio y fertilicen el óvulo
- Su defecto se denomina **ASTENOZOOSPERMIA**



2. Características microscópicas

➤ Vitalidad

- Es el cálculo del porcentaje de espermatozoides vivos
- Se hace con una tinción de eosina-nigrosina
- Un alto porcentaje de muerte se denomina **NECROZOOSPERMIA**

➤ Morfología

- El espermatozoide ha de tener una cabeza oval, sin defectos en el cuello, pieza media ni cola
- Alteraciones de esta morfología dan lugar a problemas de fertilidad
- En un seminograma normal ha de haber más de un 4% de espermatozoides normales
- Se estudia con una tinción de Papanicolaou
- Defectos en >96% de los espermatozoides se denomina **TERATOZOOSPERMIA**



Fig. 1. Specimen stained using eosin-nigrosin (A – unstained sperm cells, viable, B – dead sperm cells with a damaged cell membrane)



2. Características microscópicas



A. DEFECTOS DE CABEZA



B. DEFECTOS DE CUELLO



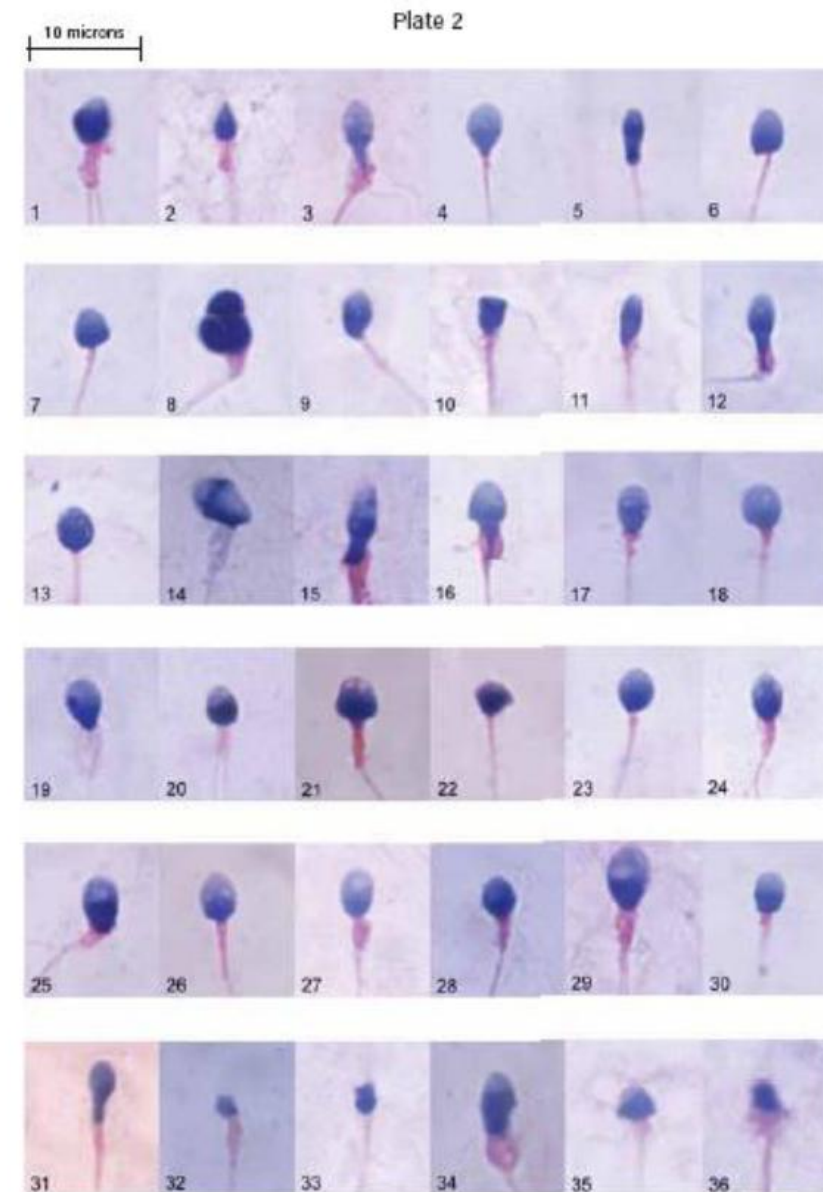
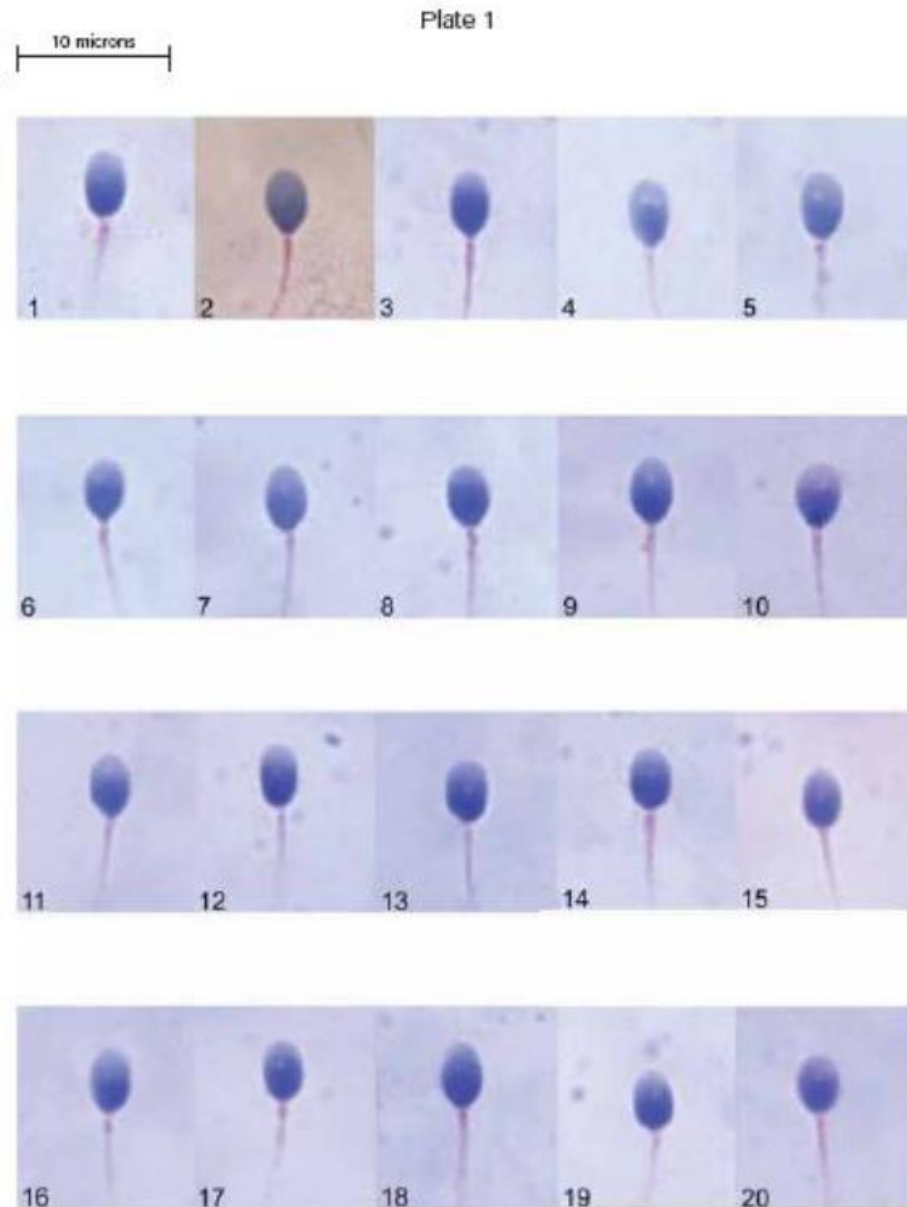
C. DEFECTOS DEL TALLO



D. EXCESO RESIDUAL CITOPLASMÁTICO



2. Características microscópicas



Micrographs courtesy of C Brazil

2. Características microscópicas



PARÁMETRO	ANOMALÍA
Volumen	Aspermia: Ausencia de eyaculado (o eyaculación retrógrada) <u>Hipospermia</u> : < 1.5 ml
Concentración espermática	<u>OLIGOZOOSPERMIA</u> : < 15 millones/ml POLIZOOSPERMIA: > 150 millones/ml <u>AZOOSPERMIA</u> : ausencia de espermatozoides en el fresco y tras centrifugación CRIPTOZOOSPERMIA: Ausencia de espermatozoides en el fresco pero presencia de espermatozoides en el sedimento tras la centrifugación
Movilidad total	<u>ASTENOZOOSPERMIA</u> : movilidad progresiva <32%
Vitalidad	<u>NECROZOOSPERMIA</u> : < 58 % espermatozoides vivos
Morfología espermática	<u>TERATOZOOSPERMIA</u> : < 4% espermatozoides normales
Otras células	LEUCOSPERMIA: > 1 millón leucocitos/ ml
Alteraciones mixtas	ASTENOTERATOZOOSPERMIA, OLIGOASTENOTERATOZOOSPERMIA CRIPTOTERATOZOOSPERMIA, etc

Pruebas adicionales



A veces las pruebas básicas del seminograma no son suficientes para un diagnóstico concluyente

Para apoyar el diagnóstico se pueden llevar a cabo:

1. Métodos avanzados:

- Índice de anomalías espermáticas
- Interacción espermatozoide-moco cervical
- Bioquímica del plasma seminal
- Análisis espermático mediante software

3. Estudio genético

4. Estudio hormonal

5. Estudio microbiológico

2. Métodos menos utilizados

- Estudio de las ROS
- Interacción espermatozoide-ovocito



1. Métodos avanzados



Índice de anomalías espermáticas

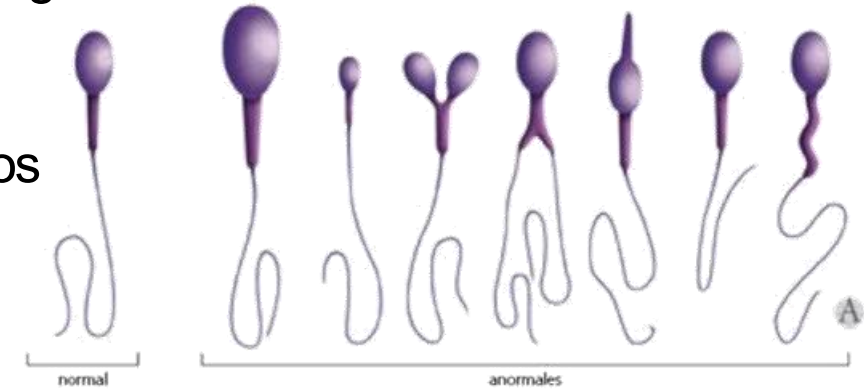
Un espermatozoide puede presentar múltiples alteraciones morfológicas

La evaluación de la incidencia de anomalías morfológicas puede ser más útil que el porcentaje de espermatozoides anómalos

Indican **cuánto de dañados están** los espermatozoides del paciente

Para ello se puede calcular:

- **Índice de anomalías múltiples:** es la media de las anomalías por espermatozoide anormal
- **Índice de teratozoospermia:** es la media de las anomalías por espermatozoide anormal teniendo en cuenta un máximo de 4 anomalías por espermatozoide
- **Índice de deformidad del esperma:** número promedio de defectos entre el total de espermatozoides de la muestra



$$\text{IAM} = \frac{\text{Total de defectos observados}}{\text{nº espermatozoides anormales}}$$

$$\text{ITZ} = \frac{\text{Total de defectos observados}}{\text{nº espermatozoides anormales (max. 4 por espermatozoide)}}$$

$$\text{IDE} = \frac{\text{Total de defectos observados}}{\text{Total de espermatozoides analizados}}$$

1. Métodos avanzados



Interacción espermatozoide-moco cervical

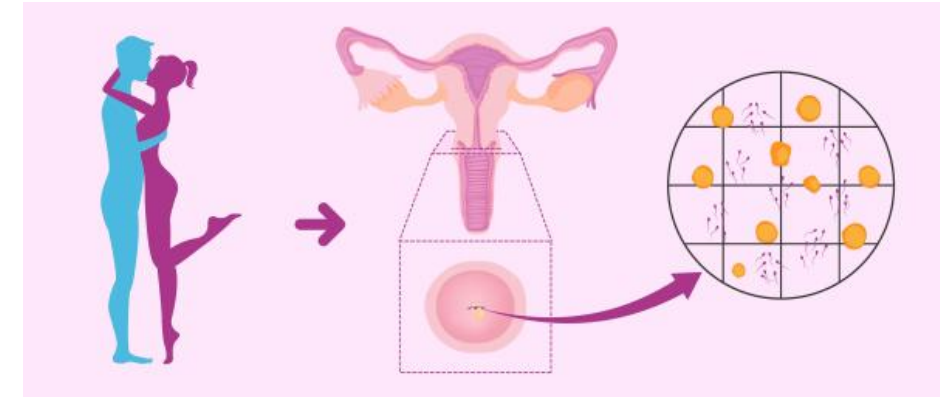
Permite ver el número de espermatozoides activos en el moco cervical, su supervivencia y comportamiento

➤ **Prueba de Huhner o postcoital**

Indica la cantidad de espermatozoides que han penetrado en distintos mocos cervicales

Se utiliza una muestra de moco cervical tras una relación sexual

Se considera positiva si hay 10 espermatozoides móviles en un campo de 40x



➤ **Penetración cruzada in vitro**

Evalúa la cantidad de espermatozoides que han penetrado en distintos mocos cervicales

Se mezclan los espermatozoides con el moco de la pareja y con mocos controles

1. Métodos avanzados



Bioquímica del plasma seminal

Se estudian parámetros bioquímicos para ver el estado funcional de las glándulas secretoras

Se estudia:

- Citrato
- Fructosa
- Alfa glucosidasa

	Volumen	pH	Citrato	Fructosa	α -glucosidasa
Obstrucción distal	Muy bajo	Ácido	Bajo	Muy baja	Baja
Inflamación	Bajo	Normal /Alcalino	Normal	Baja	Normal
Obstrucción proximal	Normal	Normal	Normal	Normal	Baja
Azoospermia secretora	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Hipospermia funcional	Bajo	Normal	Normal	Normal	Normal

Tabla 8. Alteraciones de marcadores bioquímicos

1. Métodos avanzados



Análisis espermático mediante software

Se emplea un sistema automatizado que evalúa la motilidad de los espermatozoides

Estudia:

- Velocidad
- Número de espermatozoides que se mueven

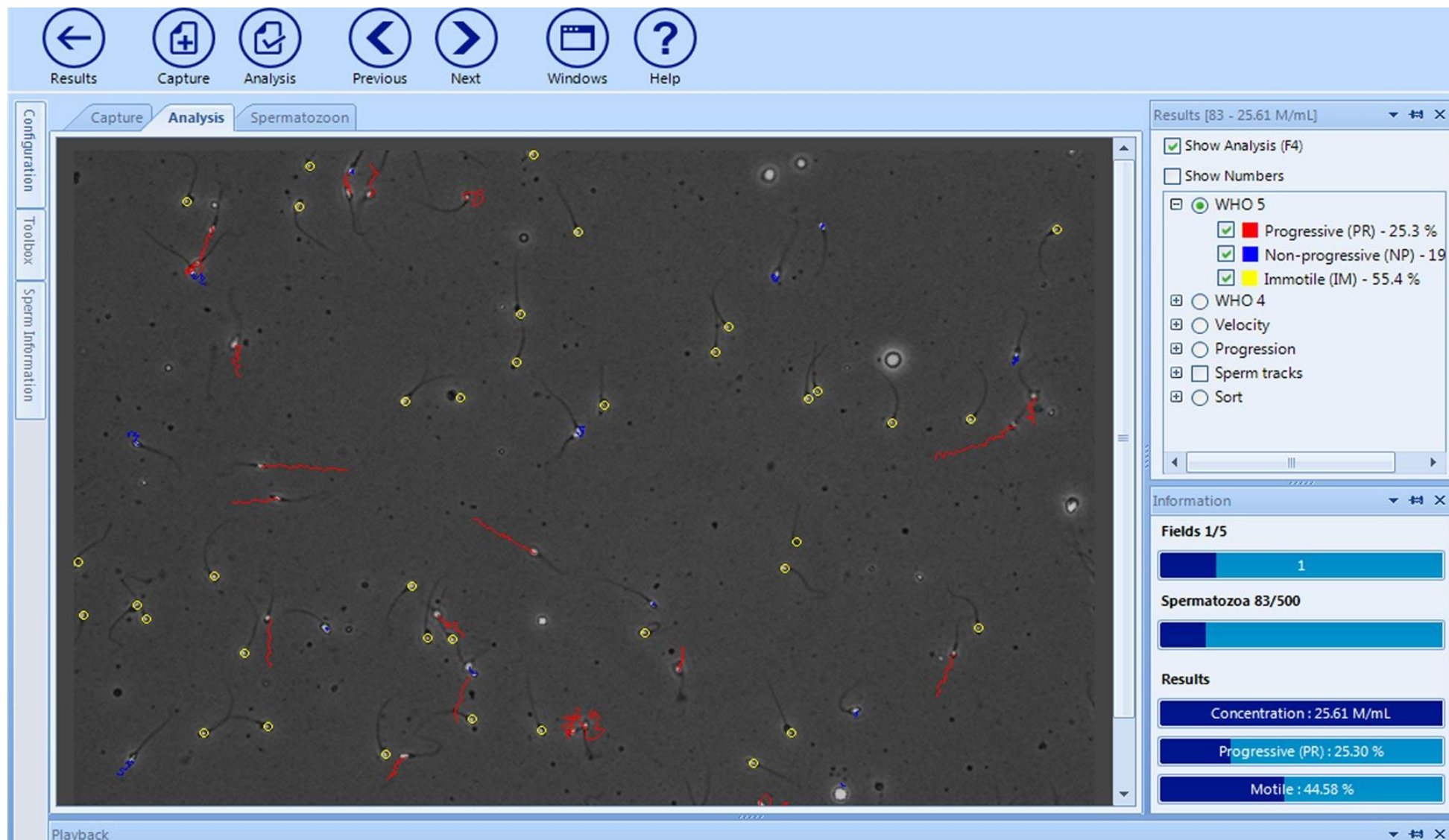
Está formado por:

- Microscopio con cámara
- Ordenador
- Software



1. Métodos avanzados

Análisis espermático mediante software



2. Métodos menos utilizados

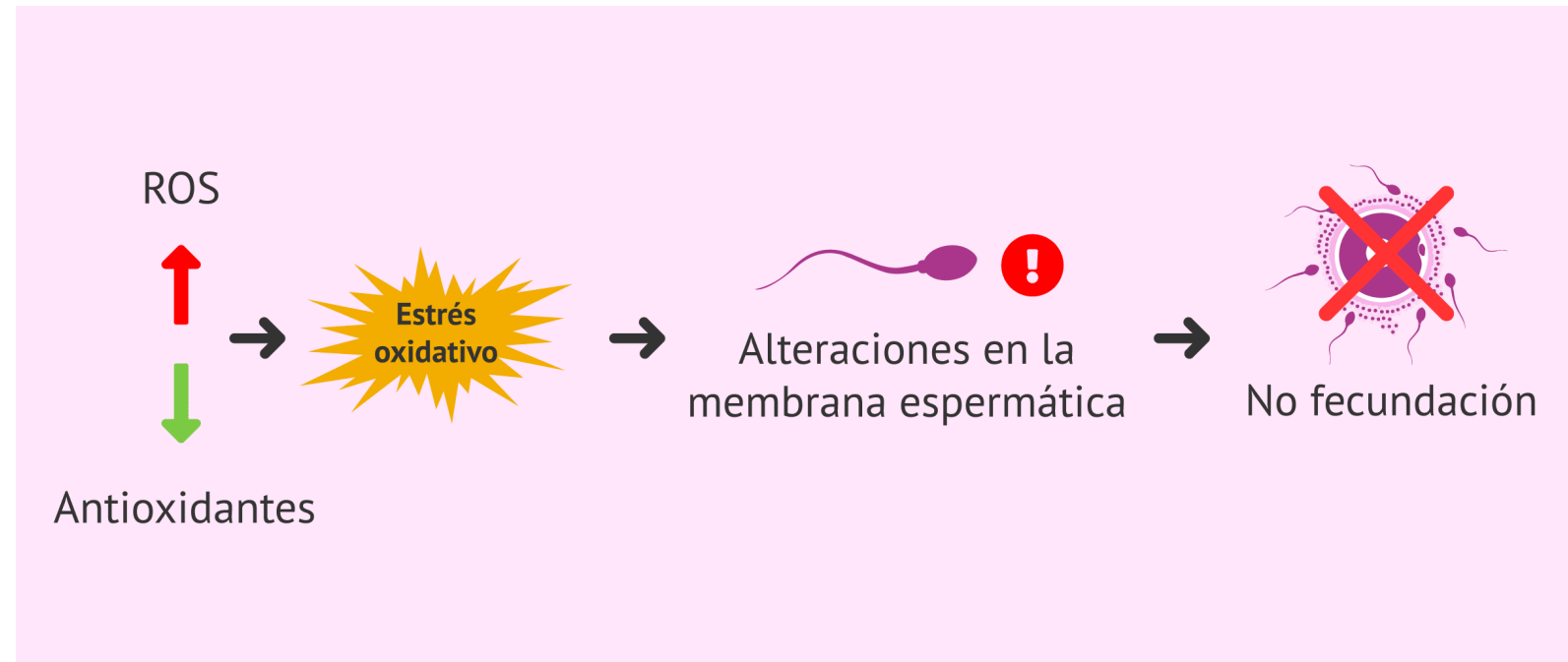


Estudio de las ROS

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son generadas por espermatozoides y neutrófilos

Su acumulación puede producir peroxidación de los lípidos de la membrana del espermatozoide afectando a:

- Movilidad
- Capacidad de fecundar
- Reconocimiento del óvulo
- Integridad del ADN



2. Métodos menos utilizados

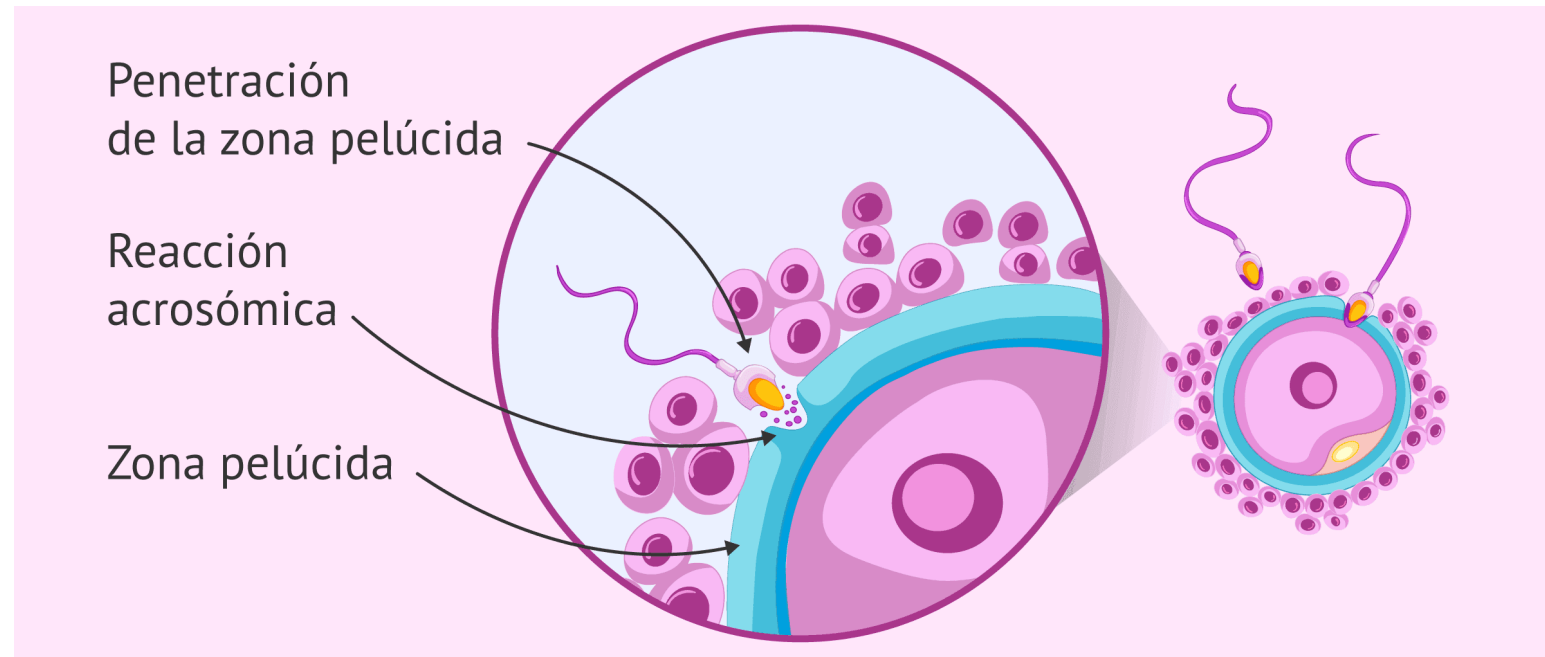


Interacción espermatozoide-ovocito

Se estudia la unión del espermatozoide a la zona pelúcida del ovocito

Se puede medir

- Reconocimiento del óvulo
- Unión a la zona pelúcida
- Reacción acrosómica



3. Estudio genético



Las alteraciones genéticas pueden producir **azoospermia** u **oligozoospermia**

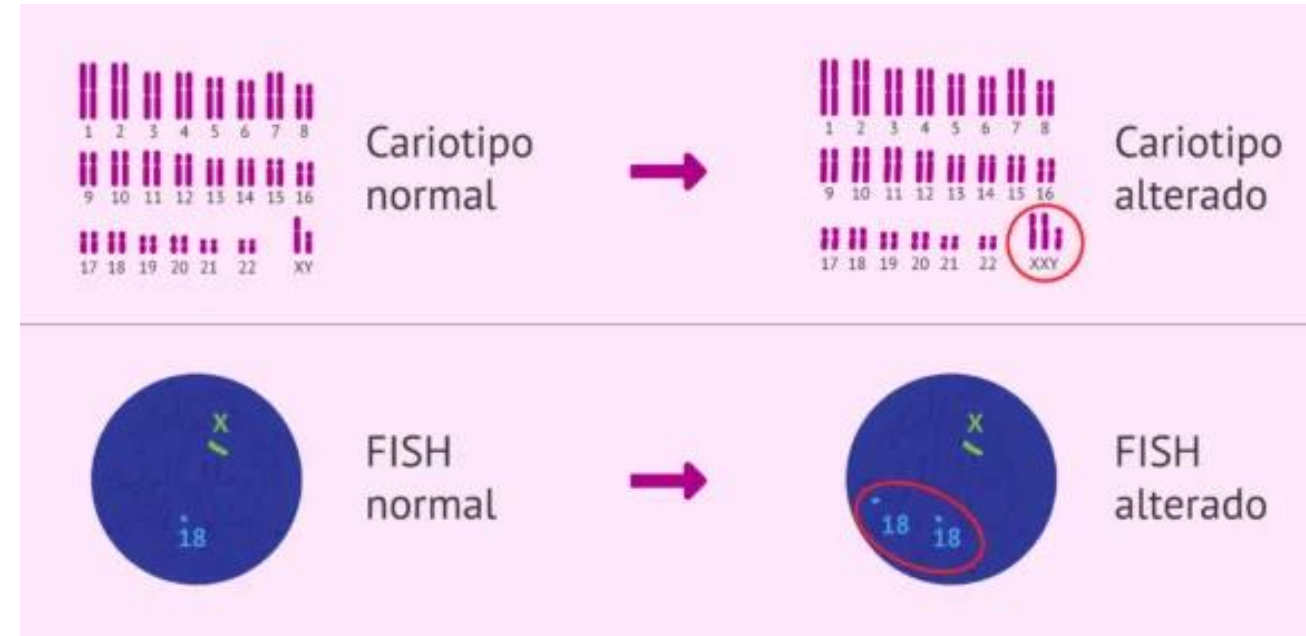
Se puede estudiar

➤ Cariotipo

- Detecta anomalías estructurales y/o numéricas en los **cromosomas del paciente**
- Síndrome de Klinefelter (XXY)

➤ FISH

- Evalúa aneuploidías o mosaicos en los propios **espermatozoides**

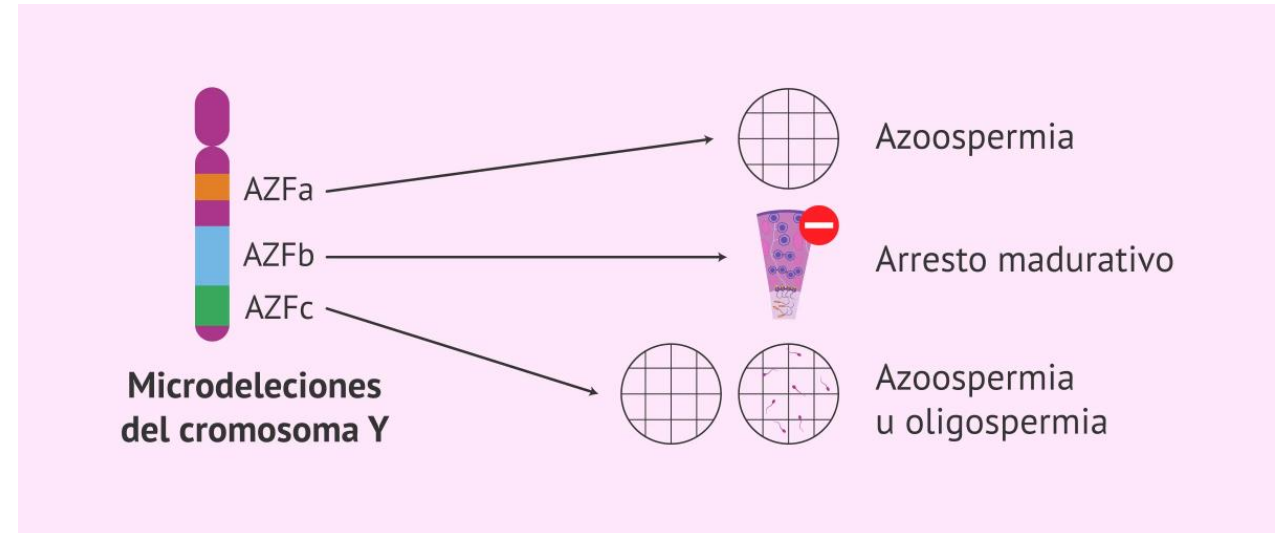
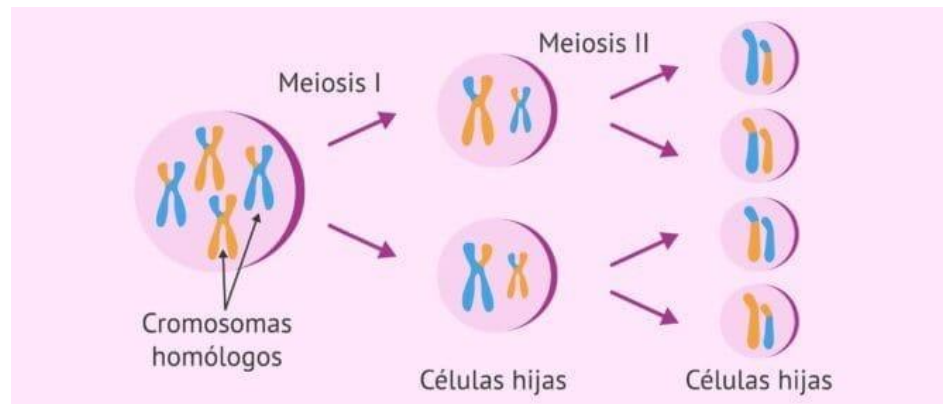


3. Estudio genético

Las alteraciones genéticas pueden producir **azoospermia** u **oligospermia**

Se puede estudiar

- Microdeleción del Y
 - Se estudia en el ADN del paciente
 - Puede producir oligozoospermia o azoospermia
- Estudios de meiosis
 - Se hace sobre espermatozoides obtenidos de biopsias testiculares



4. Estudio hormonal



Se estudian:

- FSH
- LH
- Testosterona
- Prolactina

Hormona Folículo estimulante (FSH)	Hormona Luteinizante (LH)	Testosterona (T)	Prolactina (PRL)	Escenario Clínico
Baja	Baja	Baja	Normal o Alta	Hipogonadismo Hipogonadotrópico
Alta o Normal	Normal	Normal	Normal	Espermatogénesis anormal
Alta	Alta	Baja	Normal	Fracaso Testicular o Hipogonadismo Hipergonadotrópico
Normal o Baja	Normal o Baja	Baja	Alta	Prolactinoma

5. Estudio microbiológico



Se puede hacer un estudio serológico de ambos miembros de la pareja para prevenir enfermedades de transmisión hematológica (VHB, VIH...) o ETS (sífilis)

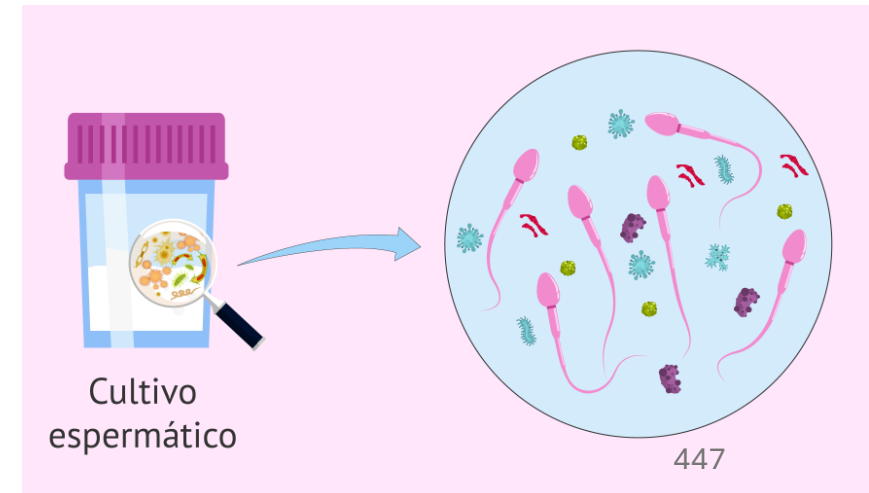
Las infecciones que influyen en la fertilidad pueden afectar a:

➤ Vías urinarias:

- Para determinarlo se lleva a cabo un **urocultivo** (cultivo de orina)

➤ Vía seminal

- Para determinarlo se lleva a cabo un **espermocultivo**



Sección IV: Laboratorio de Bioquímica

TEMA 17

Hipersensibilidad alimenticia

Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio

Nacho Escrig, PhD

Reacciones adversas a alimentos



Cualquier respuesta clínicamente anormal, atribuible a la ingestión, contacto o inhalación de un alimento, de sus derivados o de un aditivo contenido en el mismo.

Las reacciones adversas a alimentos se conocen desde la antigüedad

Hoy en día suponen un importante problema clínico en los países occidentales, con una incidencia creciente

La hipersensibilidad comienza en los **2 primeros años de vida** y disminuye progresivamente en la infancia hasta la edad adulta

Incluye:



- Reacciones **tóxicas**: producidas por toxinas propias del alimento o contaminantes
 - Setas tóxicas
 - Marea roja del mejillón
- Reacciones **no tóxicas**: generadas por sustancias no tóxicas en personas susceptibles

Hipersensibilidad a alimentos

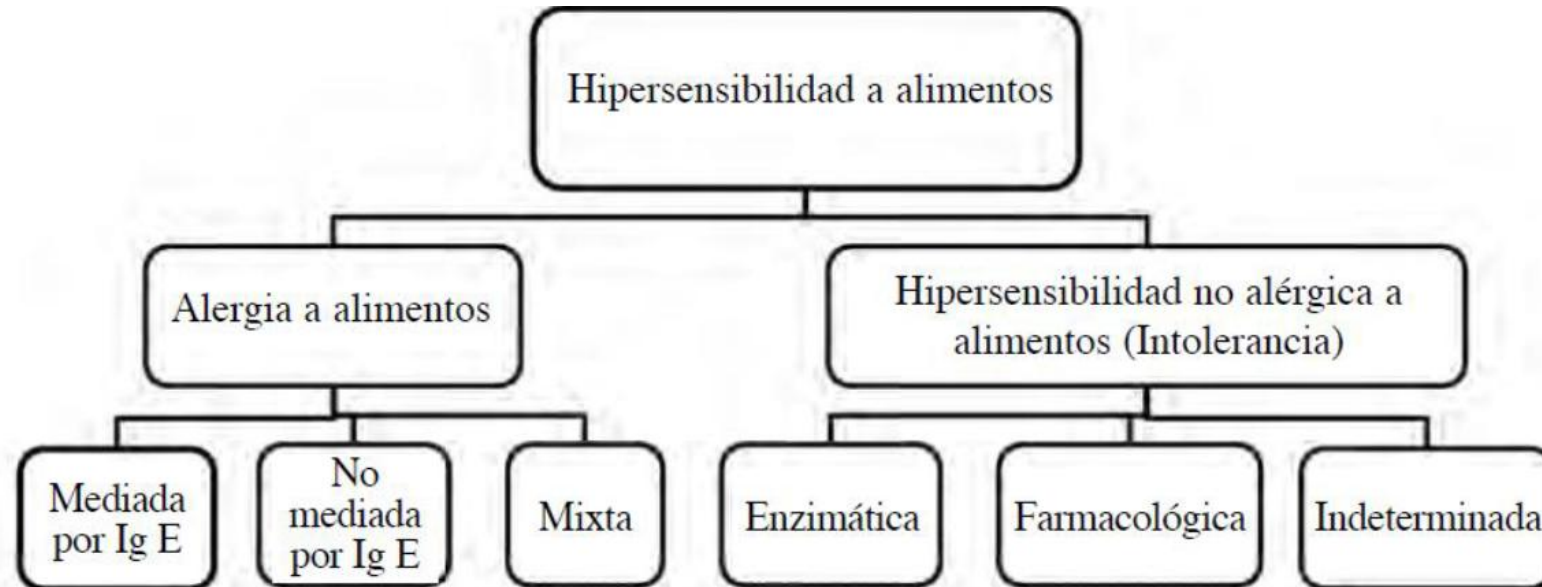


Únicamente incluye las reacciones adversas no tóxicas a alimentos

Se clasifica en:

Hipersensibilidad alérgica: mediada por mecanismos inmunológicos

Hipersensibilidad no alérgica (intolerancia): mediada por otros mecanismos



Hipersensibilidad alérgica a alimentos



Es el conjunto de reacciones adversas a alimentos debido a su ingesta, contacto o inhalación por una causa inmunológica comprobada

Se distinguen:

1. **Mediada por IgE**
2. **No mediada por IgE**
3. **Mixta**

Son reacciones **no dependientes de dosis**

La prevalencia se estima en torno al 4-8% en menores de 3 años

Esta prevalencia se reduce conforme se llega a la edad adulta



1. Hipersensibilidad mediada por IgE

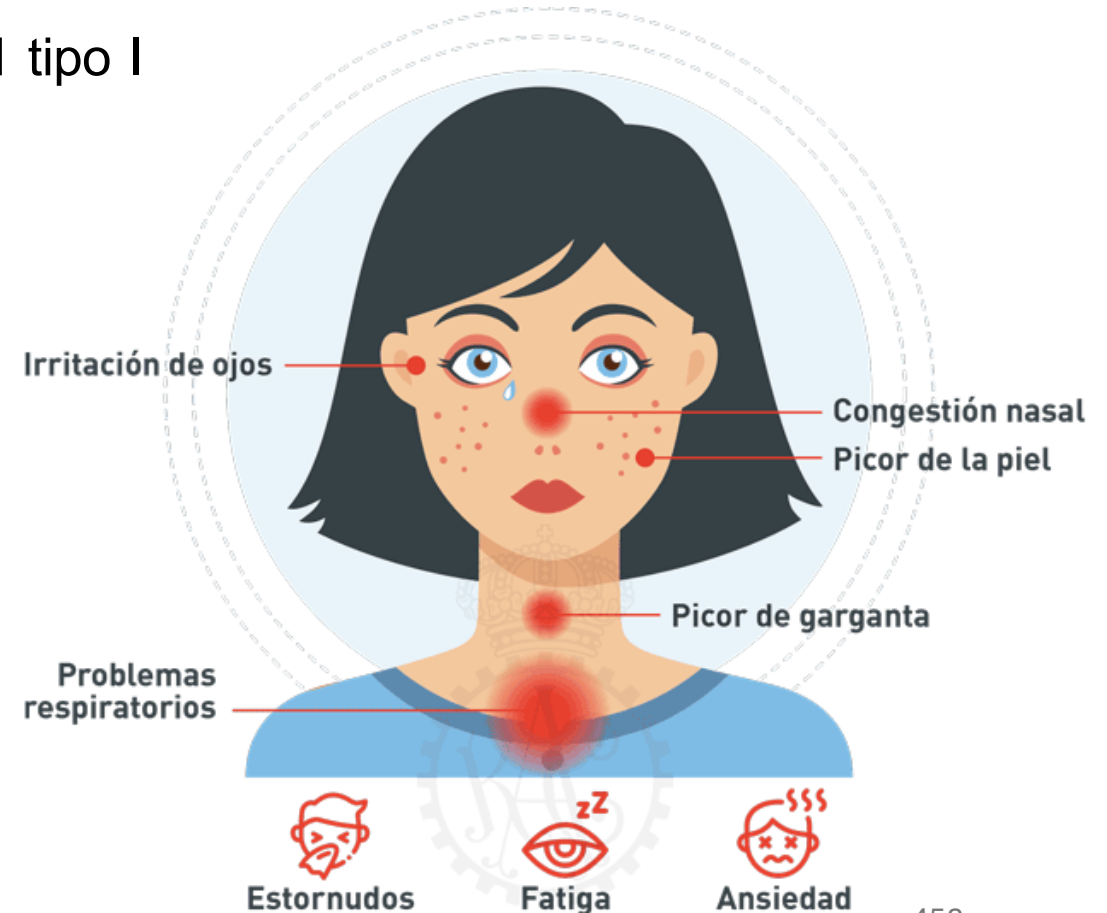


Etiología

Se produce por la acción de anticuerpos IgE específicos frente a un antígeno alimentario

Dan lugar a reacciones inmediatas de hipersensibilidad tipo I

- Urticaria
- Angioedema
- Broncoespasmo
- Diarrea
- Vómitos
- Hipotensión

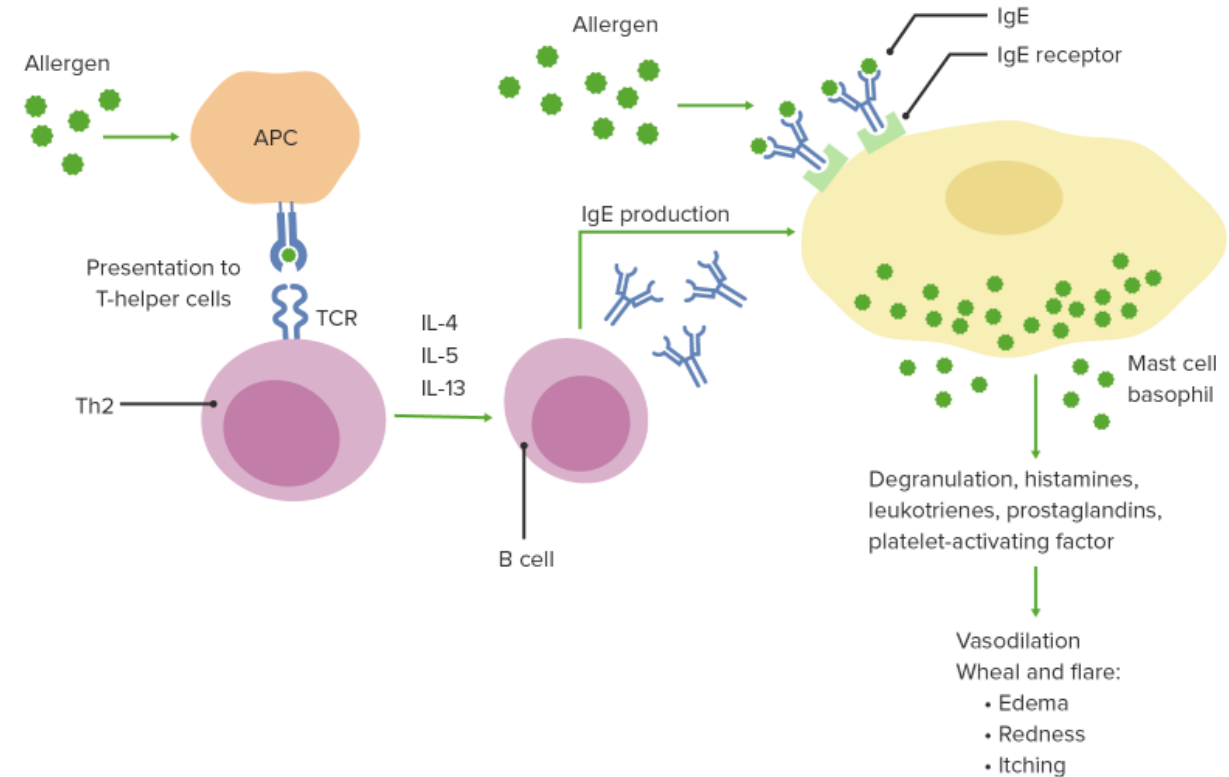


1. Hipersensibilidad mediada por IgE



FISIOPATOLOGÍA

- Primer contacto con el antígeno
 - Se genera IgE específica al alérgeno
- Segunda exposición al alérgeno
 - El alérgeno interacciona con la IgE
 - Liberación de mediadores inflamatorios
 - Histamina
 - Leucotrienos
 - Prostaglandinas
 - Citocinas



1. Hipersensibilidad mediada por IgE



FISIOPATOLOGÍA

Los mediadores inflamatorios producen:

- Vasodilatación
- Contracción del músculo liso
- Aumento de secreción de moco
- Estímulo de los nervios sensitivos

Puede afectar a:

- Piel: eritema, prurito, habones
- Bronquios: secreción de mocos
- Nariz y ojos: rinoconjuntivitis
- Tracto digestivo: diarrea y vómitos

Cuando estos efectos afectan a más de dos órganos se denomina **anafilaxia**

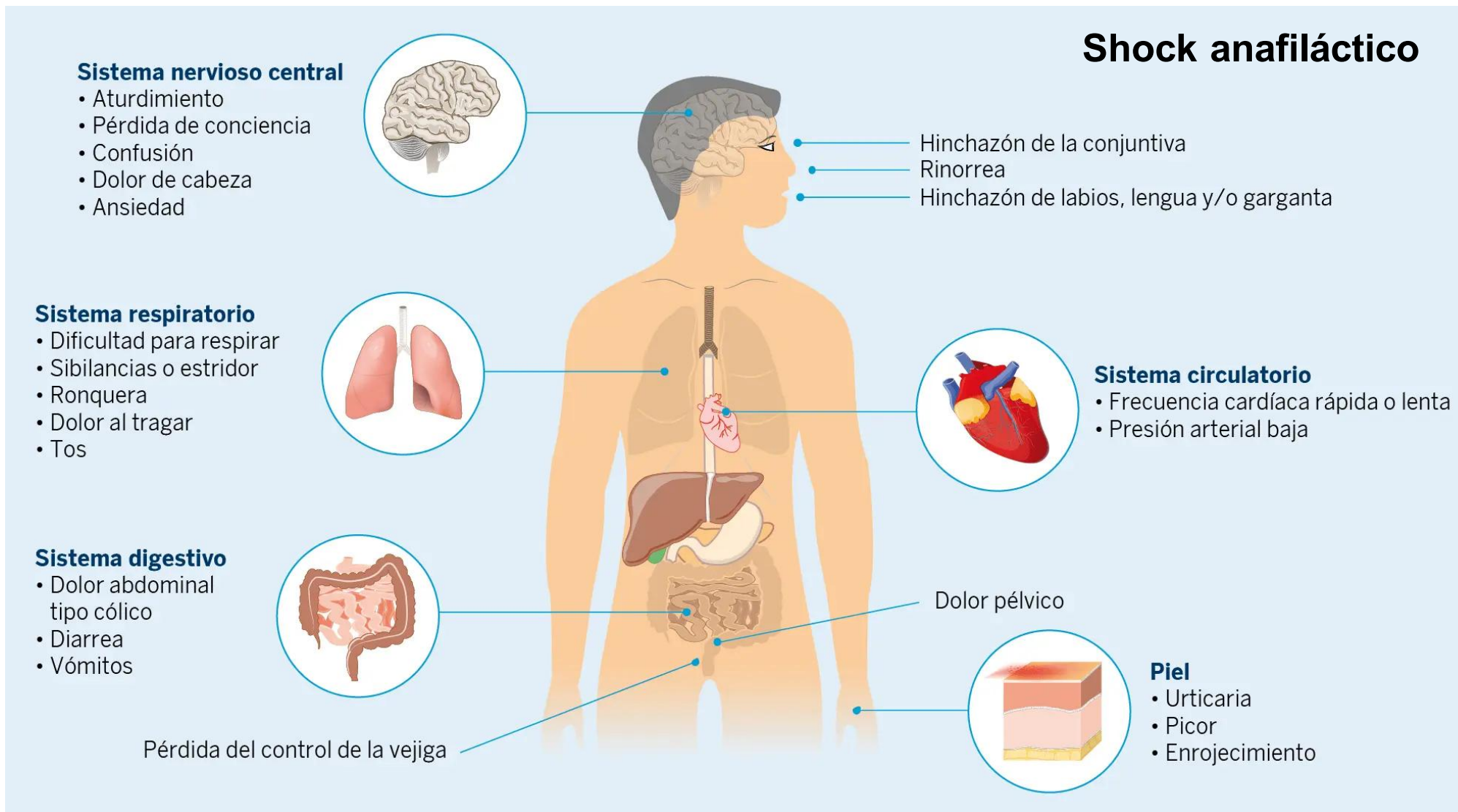
El grado más severo es el **shock anafiláctico** que incluye hipotensión y puede llevar a la muerte



1. Hipersensibilidad mediada por IgE



FISIOPATOLOGÍA



1. Hipersensibilidad mediada por IgE



ALÉRGENOS

Son proteínas o glicoproteínas hidrosolubles

Son resistentes a calor, ácidos y proteasas

Conservan su poder alergénico tras la cocción y digestión

Se han sintetizado **alérgenos recombinantes** con técnicas de ingeniería genética para:

- Diagnóstico
- Tratamiento con inmunoterapia



1. Hipersensibilidad mediada por IgE



ALÉRGENOS

Todos los alimentos pueden contener alérgenos (potencialmente sensibilizantes)

Factores que determinan que se produzca sensibilización

- Predisposición genética
- Hábitos alimenticios
- Microbiota
- Edad
- Exposición a los alérgenos
- Grado de maduración inmunológica



El huevo, la leche de vaca y el pescado son los más prevalentes en niños

Los vegetales, mariscos, frutos secos, frutas, leguminosas y hortalizas son más prevalentes en adultos

1. Hipersensibilidad mediada por IgE



ALÉRGENOS

Las costumbres alimenticias favorecen patrones de alergia a alimentos

- Pescado → España, Japón o Islandia
- Cacahuete → USA y UK

Huevo

El principal componente responsable de la alergia al huevo es la clara

La clara del huevo contiene al menos 24 proteínas que inducen alergia

Las más alergénicas son la **ovoalbúmina** y el **ovomucoide**



Leche de vaca

Contiene al menos 25 proteínas distintas

Las caseínas son los mayores alérgenos

La mayoría de los niños adquieren tolerancia a la leche de vaca en los primeros años



1. Hipersensibilidad mediada por IgE



ALÉRGENOS

Pescados y mariscos

Producen el 12-14% de los casos de alergia en adultos

Los principales alérgenos de los mariscos son proteínas termostables del grupo de las tropomiosinas

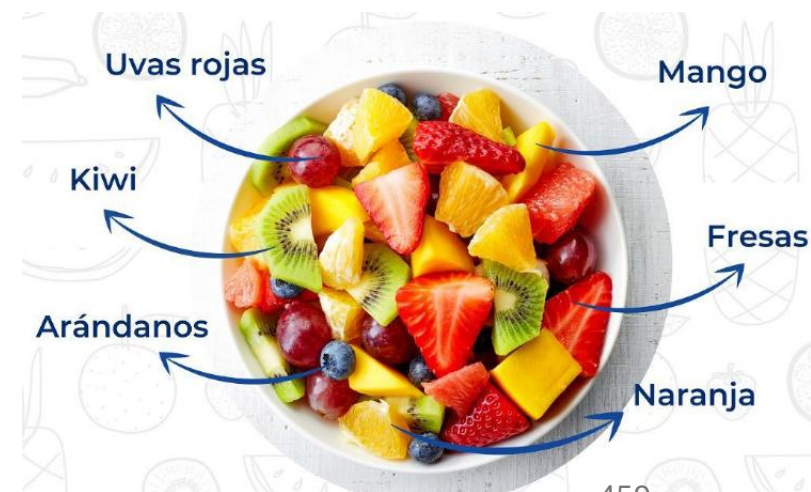
Es más frecuente la alergia a crustáceos que a moluscos



Frutas y verduras

Producen más alergias en niños mayores de 5 años y adultos

Las más alergénicas en España son: melocotón, fresa, manzana, pera, cereza, ciruela, piña, kiwi, mango, aguacate



1. Hipersensibilidad mediada por IgE



ALÉRGENOS

Anisakis simplex

Es un caso de alergia especial tras el consumo de pescado

Se produce al ingerir pescados parasitados con las larvas de este parásito

Es más común en merluza, anchoa y bacalao donde hasta el 80% puede estar parasitado

Produce dos cuadros clínicos

- Anisakidosis: infestación del tracto digestivo humano
- Reacciones alérgicas mediadas por IgE

Se previene con medidas que maten al parásito (obligatorias en la UE) como:

- Congelación durante más de 24h
- Alcanzar al menos 60°C durante 10 minutos



1. Hipersensibilidad mediada por IgE



ALÉRGENOS

Frutos secos

Es una de las alergias más frecuente y con más riesgo de reacciones graves

Afecta al 0,5 – 2 % de la población europea

Es más frecuente en niños y tiende a persistir en adultos

Las proteínas alergénicas resisten el calor



Legumbres

Las más prevalentes son a las lentejas, garbanzos y soja

Es menos frecuente que otras alergias

El calor puede aumentar la alergenicidad de algunas legumbres como las lentejas



1. Hipersensibilidad mediada por IgE



ALÉRGENOS OCULTOS

Los alimentos elaborados pueden tener alérgenos no siempre fáciles de identificar

- Ingredientes con nombres técnicos: caseína, lecitina, albúmina
- Derivados o procesados: proteína vegetal hidrolizada
- Contaminación cruzada: trazas

Tienen que estar obligatoriamente en las etiquetas

Ejemplos:

- Frutos secos, huevo, leche en galletas, pasteles...
- Antibióticos en leche de vaca
- Caseína (de leche de vaca) en embutidos
- Soja en hamburguesas



1. Hipersensibilidad mediada por IgE



PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Su objetivo es establecer una asociación causal entre el alimento y las manifestaciones clínicas

Se pueden llevar a cabo:

- A. Anámnesis
- B. Pruebas cutáneas
- C. Pruebas de laboratorio
- D. Pruebas de provocación



1. Hipersensibilidad mediada por IgE



PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

A. Anámnesis

Se lleva a cabo un estudio del paciente en cuanto a:

- Motivo de consulta
- Relación temporal
- Exposición a posibles alérgenos
- Antecedentes personales y familiares
- Medicación



Estos datos condicionarán las pruebas posteriores a realizar

1. Hipersensibilidad mediada por IgE



PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

B. Pruebas cutáneas

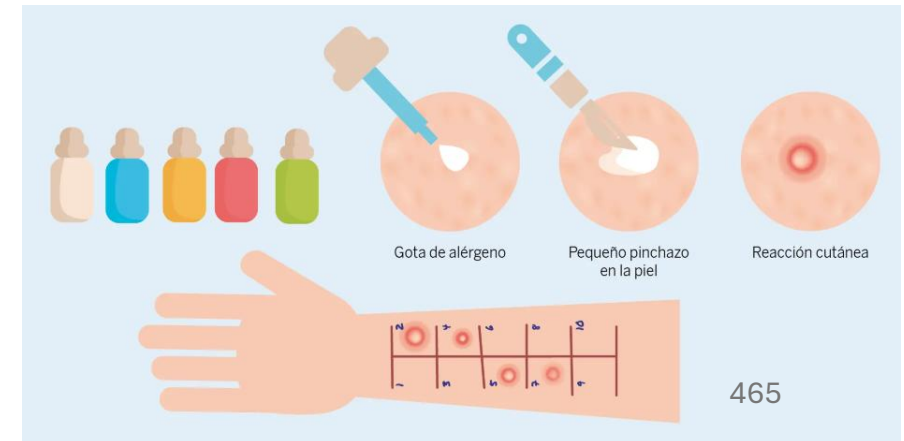
Usan extractos alérgenos

Prick-Test: prueba intraepidérmica en la que se deposita una gota del extracto alérgico en la piel puncionando a través de ella con una lanceta

Valor predictivo negativo superior al 95% → si da negativo probablemente sea negativo

Valor predictivo positivo menor del 50% → si da positivo puede ser un falso positivo

- Indica sensibilización
- Puede no ser acompañada de clínica



1. Hipersensibilidad mediada por IgE

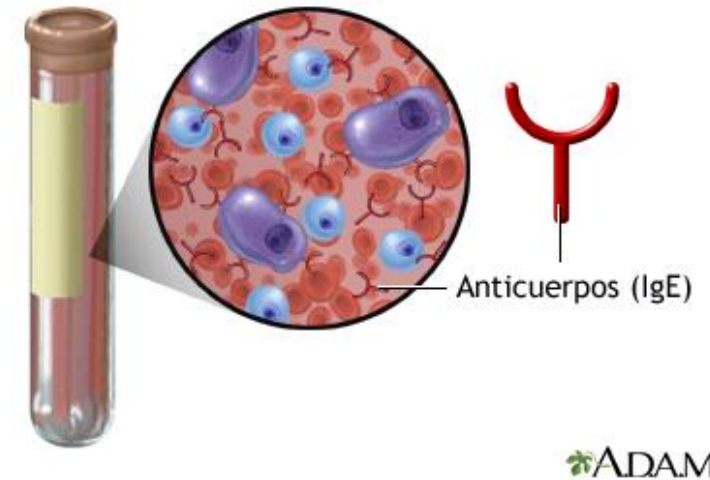


PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

B. Pruebas de laboratorio

Estudia distintos parámetros inmunes asociados con hipersensibilidad mediada por IgE

- Anticuerpos IgE
 - Niveles totales
 - IgE específica frente a alérgeno
- Niveles de IgG
 - Específica frente a alérgenos
 - Exposiciones repetidas al alérgeno
 - IgG4: elevada como respuesta a vacunas frente alérgenos



1. Hipersensibilidad mediada por IgE

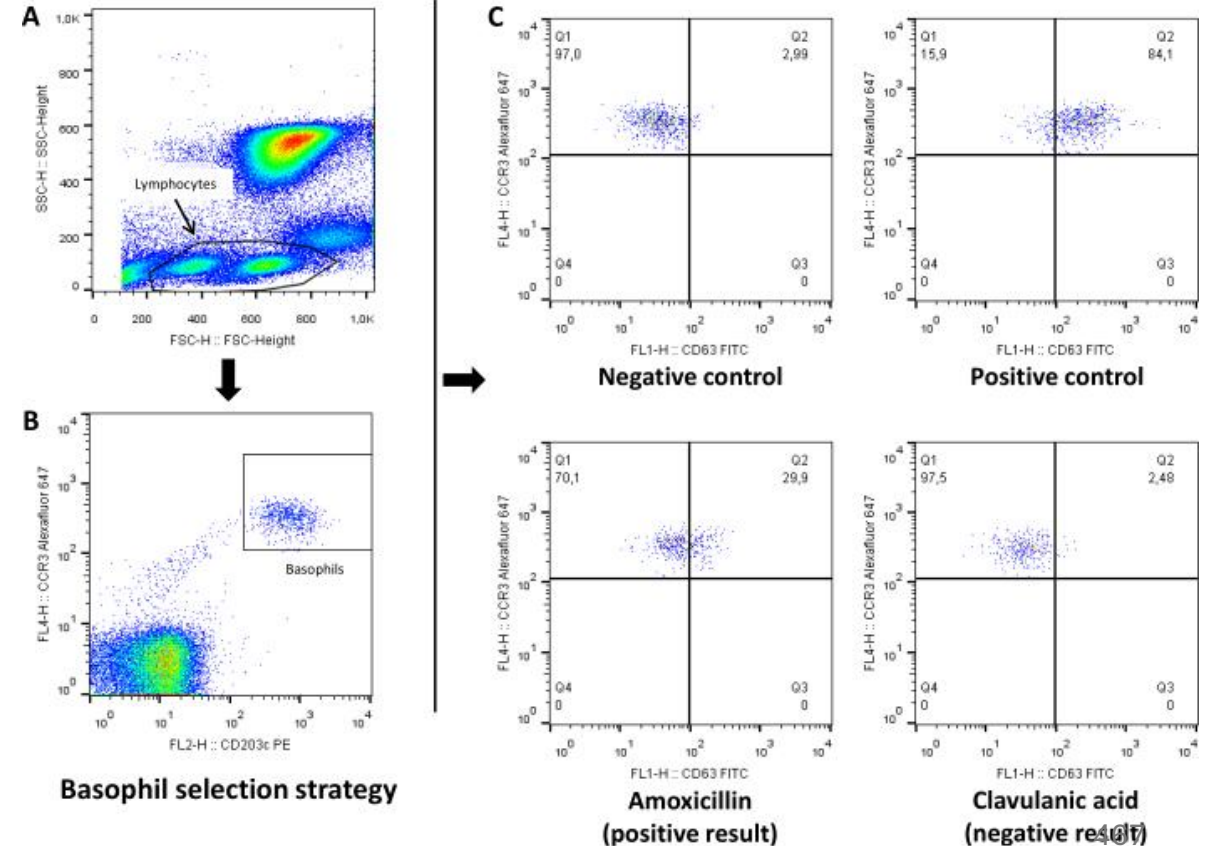


PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

B. Pruebas de laboratorio

Estudia distintos parámetros inmunes asociados con hipersensibilidad mediada por IgE

- Test de activación de basófilos
 - La proteína CD63 aumenta en su membrana cuando se activan
 - Se detecta por citometría de flujo



1. Hipersensibilidad mediada por IgE

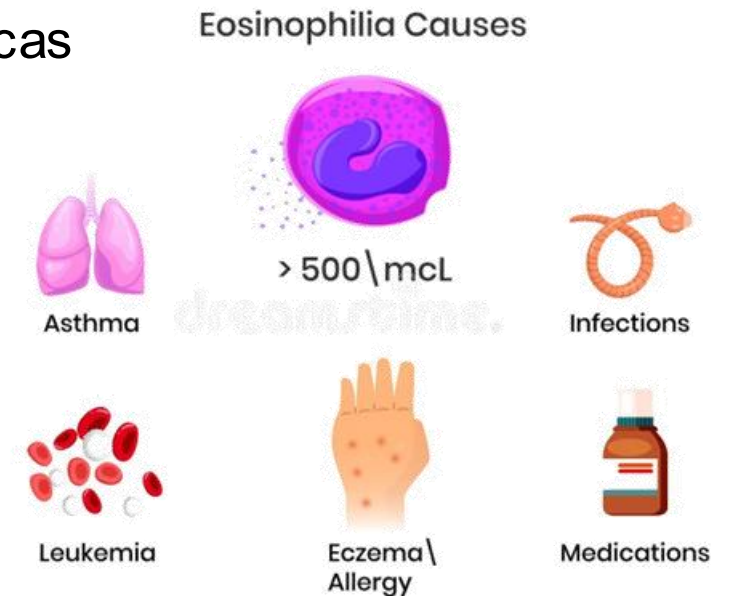


PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

B. Pruebas de laboratorio

Estudia distintos parámetros inmunes asociados con hipersensibilidad mediada por IgE

- Determinación de nivel de eosinófilos en sangre
 - Aumentan en sangre como respuesta a reacciones alérgicas
- Determinación de mediadores alérgicos:
 - Triptasa
 - Histamina
 - Factores y enzimas del sistema del complemento



1. Hipersensibilidad mediada por IgE



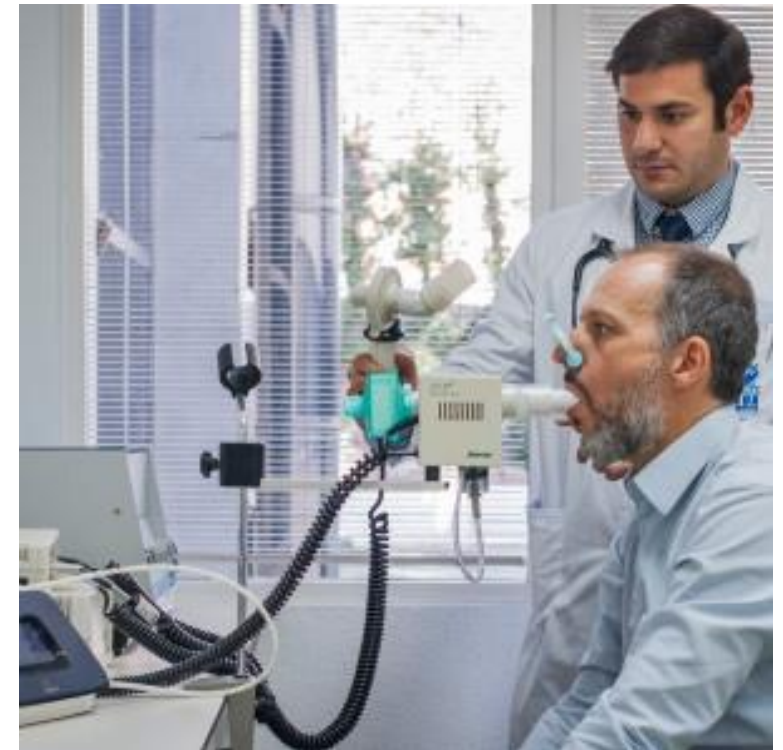
PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

C. Pruebas de provocación

Exponen al paciente al alérgeno sospechoso bajo circunstancias controladas para:

- Reproducir los síntomas
- Demostrar tolerancia

Se debe realizar siempre bajo vigilancia pues existe el riesgo de reacciones graves



1. Hipersensibilidad mediada por IgE



ALGORITMO DIAGNÓSTICO

Las pruebas más indicadas ante sospecha de una hipersensibilidad mediada por IgE son:

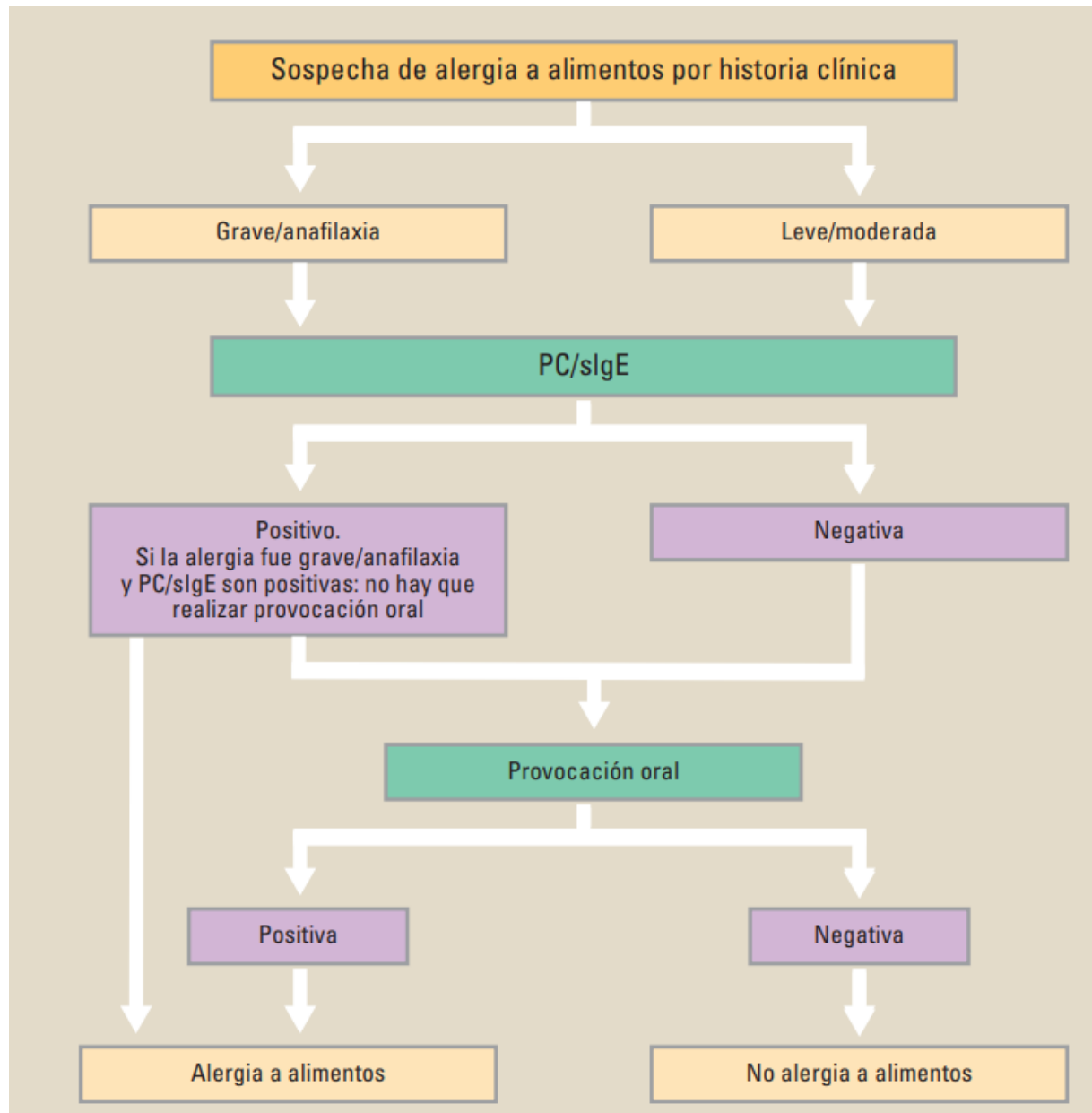
- Prick-test
- Determinación de IgE sérica específica

La prueba de provocación es el Gold Standard

Sin embargo, se reserva para cuando las anteriores no son concluyentes debido a su peligrosidad



1. Hipersensibilidad mediada por IgE



PC: prueba cutánea
sIgE: determinación de
IgE en suero

2. Hipersensibilidad NO mediada por IgE



Etiología

Se produce por una reacción de tipo IV o retardada

No intervienen anticuerpos

Se produce por la activación de linfocitos T sensibilizados

Presenta un curso subagudo o crónico

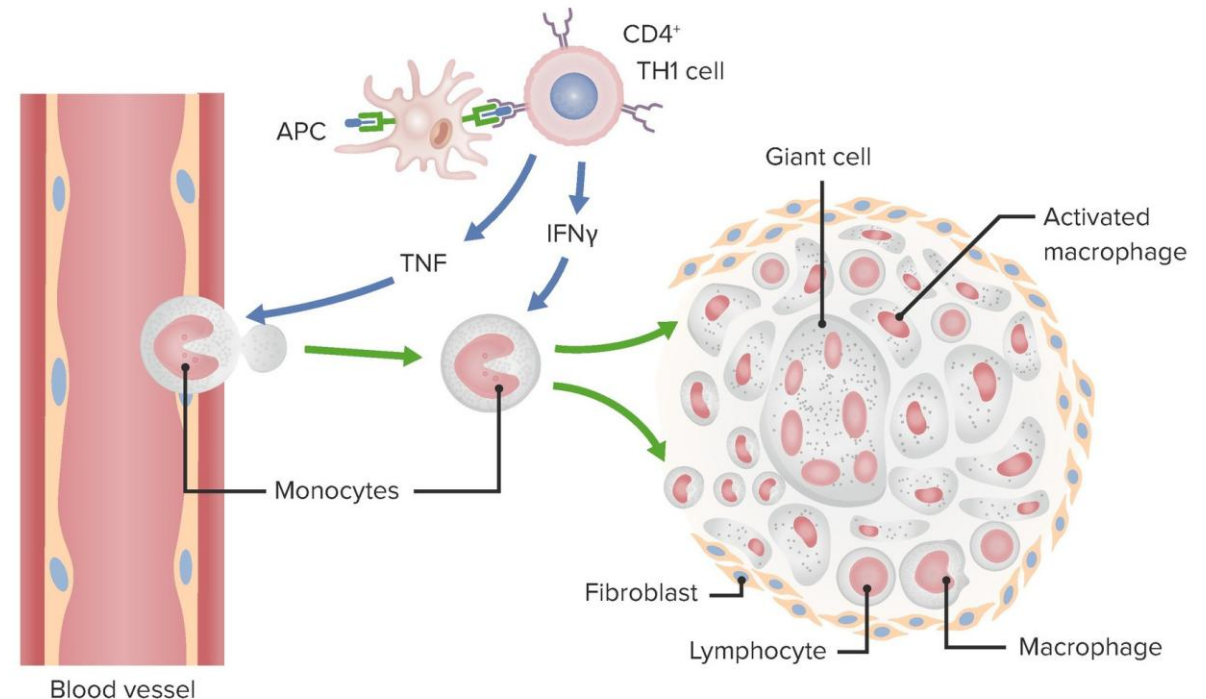
El tiempo desde la ingesta hasta la aparición de los síntomas es largo (horas – días)

Síntomas más inespecíficos y variables

- Negatividad de test cutáneos
- Negatividad de IgE en suero

Tienen su inicio en los primeros meses de vida

Las manifestaciones suelen ser locales



2. Hipersensibilidad NO mediada por IgE



Causas

Son producidas por alimentos como:

- Leche
- Soja
- Huevo
- Pescado
- Arroz
- Trigo



2. Hipersensibilidad NO mediada por IgE



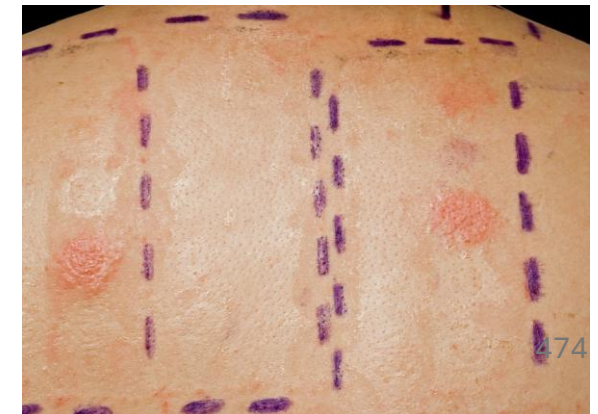
Diagnóstico

Test de supresión-provocación

- Se elimina el alimento de la dieta durante 2-4 semanas
- Se introduce el alimento de forma controlada
- Se observa la aparición de síntomas

Patch-test

- Similar al prick-test pero con el alérgeno de forma epicutánea
- Se mantiene el alérgeno durante más tiempo



2. Hipersensibilidad NO mediada por IgE



Clasificación

Se clasifican por el órgano afectado

- Formas gastrointestinales
 - Afectan al colon distal y/o intestino delgado
 - Producen malabsorción, vómitos, moco en las heces
 - Muy comunes en lactantes
 - Desaparecen con el tiempo
- Forma intestinal autoinmune
 - Además de por linfocitos T hay autoanticuerpos
 - Suelen ser crónicas
 - Enfermedad celíaca
- Forma cutánea
 - Son más raras
 - Se producen por el contacto con el alimento





3. Hipersensibilidad alérgica mixta

Etiología

Se produce por una combinación de las anteriores

- Producción de anticuerpos IgE
- Activación de linfocitos T sensibilizados

Su prevalencia va en aumento con los años en los países desarrollados

Incluye

- Dermatitis atópica
- Asma

3. Hipersensibilidad alérgica mixta

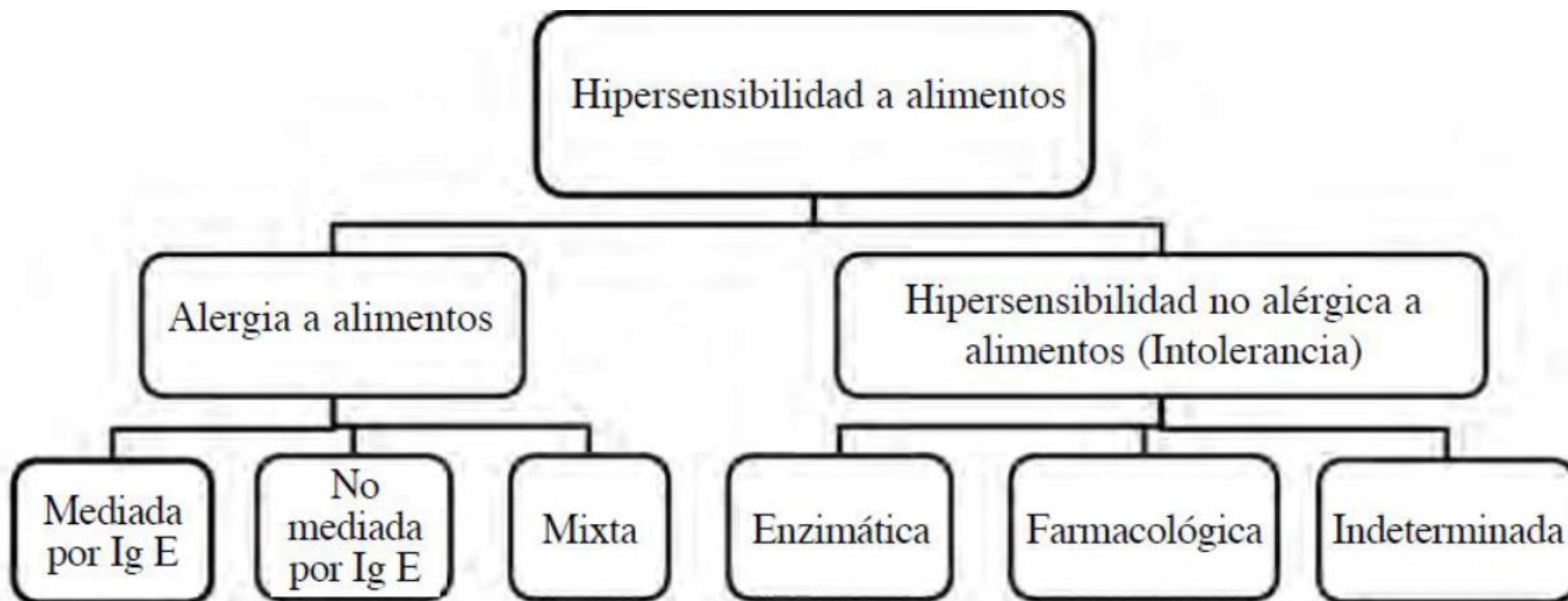


Diagnóstico

Combina pruebas diagnósticas de alergias mediadas por IgE y no mediadas por IgE

- Historia clínica
- Prick-test
- Detección de IgE específica en suero
- Prueba de eliminación y provocación
- Patch-test
- Sintomatología intestinal
- Infiltración de eosinófilos en el tracto intestinal sin haber otras causas de eosinofilia tisular

Hipersensibilidad a alimentos



Hipersensibilidad no alérgica a los alimentos



Son reacciones de hipersensibilidad no mediadas por mecanismos inmunológicos (**INTOLERANCIA**)

Pueden ser:

1. **Enzimáticas:** debidas a la ausencia de enzimas metabolizadoras
2. **Farmacológicas:** debidas a sustancias con potencial farmacológico
3. **Idiopáticas:** de mecanismo desconocido



1. Enzimáticas



Originadas por la imposibilidad de metabolizar sustancias presentes en los alimentos por déficits enzimáticos

Son las intolerancias más frecuentes

1.1 Intolerancia a la fructosa:

Se produce por déficit de aldolasa B

La **fructosemia** es un trastorno genético de herencia autosómica recesiva

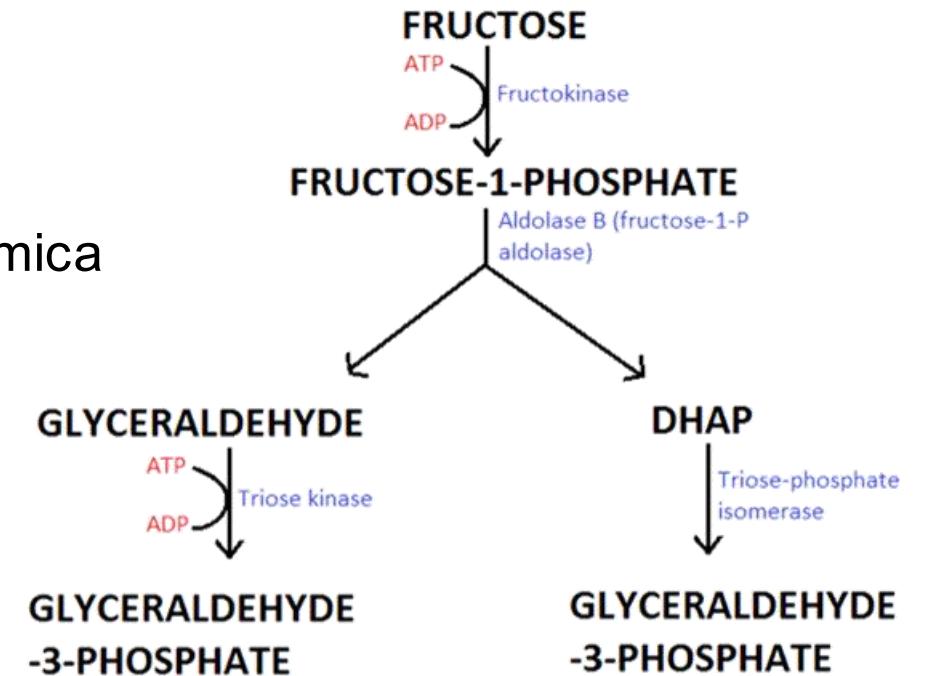
La fructosa está en frutas, vegetales y algunos fármacos

También en edulcorantes como la sacarosa

Se diagnostica mediante

- Estudio de la actividad enzimática
- Estudios genéticos de mutaciones

FRUCTOSE METABOLISM



1. Enzimáticas



1.2 Intolerancia a la lactosa:

Se produce por un déficit en la lactasa que hidroliza la lactosa en glucosa y galactosa

Para procesar correctamente la lactosa solo se necesita una actividad del 50% de la lactasa

Hay dos tipos:

Primaria → genéticas

- **Alactasia congénita:** pérdida completa de la lactasa (muy rara)
- **Hipolactasia del tipo adulto:** reducción de la actividad enzimática de la lactasa durante la infancia o adolescencia (más común)

Secundaria → adquirida

- **Hipolactasia secundaria:**
 - Temporal y reversible.
 - Se produce por enfermedades que afectan a la reserva enzimática intestinal como enfermedades gastrointestinales, fármacos que afecten a la mucosa intestinal o la inflamación crónica del intestino delgado

1. Enzimáticas



1.2 Intolerancia a la lactosa:

El diagnóstico habitual se basa en la mejora clínica tras la eliminación de la lactosa de la dieta

En el laboratorio clínico se puede llevar a cabo:

- Test de hidrógeno espirado

La lactosa no metabolizada es fermentada por las bacterias intestinales aumentando el hidrógeno espirado tras la administración de lactosa

- Test de tolerancia a la lactosa

Si hay deficiencia de lactasa la glucemia no se elevará tras la administración de una sobrecarga de lactosa

- Lactasa en biopsia de intestino delgado

- Polimorfismo 13910 C/T en el gen de la lactasa

Sirve para diferenciar la hipolactasia primaria de la secundaria



2. Farmacológicas



Se deben a reacciones anómalas a sustancias presentes de forma natural en alimentos que pueden desencadenar reacciones adversas gastrointestinales y neurológicas

➤ Vasoactivas

Histamina – quesos curados

Tiramina – productos fermentados

Noradrenalina – vegetales frescos

Feniletilamina – chocolate negro

Triptamina – vino tinto

Serotonina – plátano

Dopamina – aguacate

➤ Metilxantinas

Cafeína – café

Teofilina – té

Teobromina – chocolate

➤ Capsaicina – alimentos picantes

➤ Alcohol



3. Idiopáticas



Muchas de ellas se deben a intolerancias a los aditivos

Un aditivo es toda sustancia que se añade a los alimentos y/o bebidas sin modificar su valor nutricional

Entre los más asociados a intolerancias se incluyen

- Colorantes:
 - Tartracina: relacionada con asma y urticaria crónica
- Conservantes:
 - Sulfitos: relacionados con asma y urticaria crónica
 - Benzoatos: asociados a urticaria y angioedema
- Antioxidantes:
 - Ácido láctico y cítrico: relacionados con asma, rinitis y urticaria
- Potenciadores del sabor:
 - Glutamato: puede provocar eritema, cefalea, sudoración

SÍNDROME DEL Restaurante Chino

Hace referencia a un **grupo de síntomas** que algunas personas experimentan **después de ingerir comida china**. Es un término en desuso, que fue creado en los años 60s para describir por primera vez reacciones serias a la **comida china**.

Hoy en día, se lo conoce como **síndrome de glutamato monosódico (GMS)** y estos síntomas incluyen

- Dolor de cabeza, torácico o muscular
- Enrojecimiento de la piel
- Sudoración
- Sensación de presión facial y
- Entumecimiento o ardor en la boca

También se la ha llamado Dolor de cabeza por el consumo de hotdogs, asma inducida por glutamato, síndrome del glutamato monosódico y síndrome de Kwok.

La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) clasifica al **GMS como "generalmente reconocido como seguro"** (mismo grupo donde se encuentra la sal y el azúcar) porque la gran mayoría de las personas pueden consumir alimentos que contienen glutamato monosódico sin experimentar ningún problema.

Sección IV: Laboratorio de Bioquímica

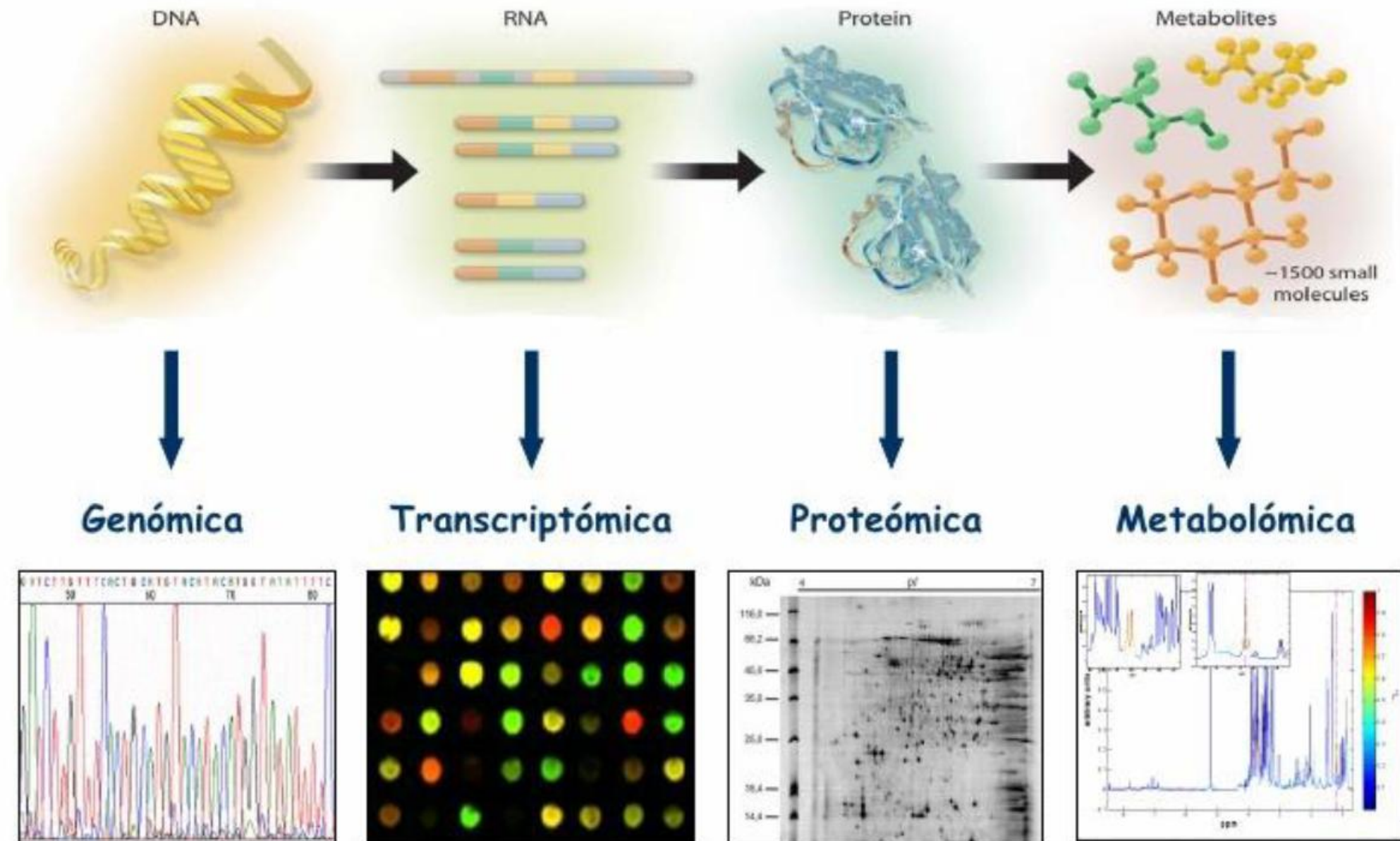
TEMA 18

Metabolómica clínica

Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio

Nacho Escrig, PhD

Técnicas ómicas



Técnicas ómicas



Las ómicas permiten el conocimiento integral de un compartimento molecular

Requieren de herramientas:

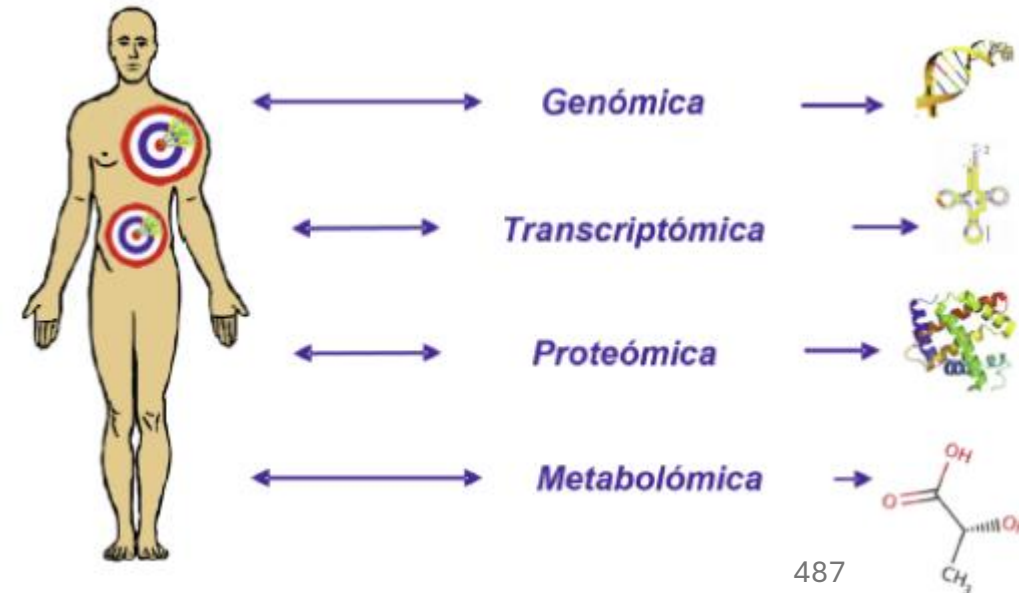
- Análisis de datos masivos
- Bases de datos estandarizadas

La cantidad de información obtenida es a la vez ventaja y desventaja de las técnicas

- Ventaja → mayor información
- Desventaja → dificultad de integrar la información

Información obtenida

- Genómica → 25.000 genes
- Transcriptómica → 100.000 transcritos
- Proteómica → 1.000.000 proteínas
- Metabolómica → 6.500 – 10.000 metabolitos



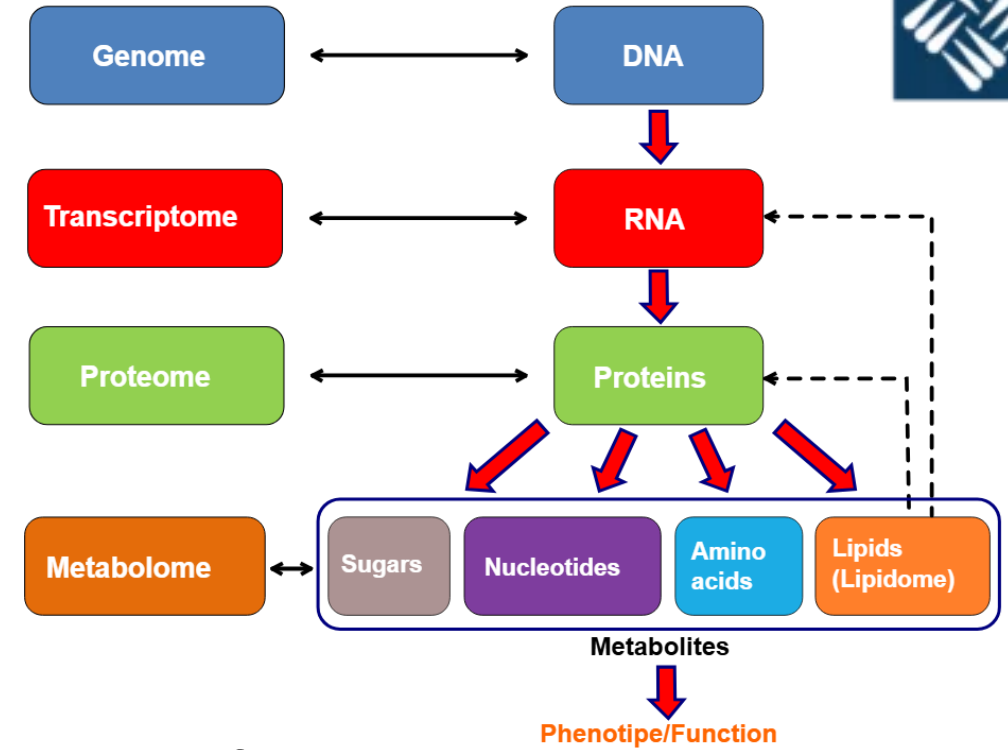
Metabolómica

Es el estudio masivo de todos los metabolitos presentes en una muestra biológica (metaboloma)

Representa el futuro de un diagnóstico precoz, un pronóstico certero y un tratamiento clínico ajustado

Permite:

- El conocimiento profundo de una patología
- El descubrimiento de nuevas rutas fisiológicas ligadas a la enfermedad



El metaboloma representa el punto final de los procesos regulatorios, fisiológicos y patológicos

Refleja una perspectiva integrada de los fenotipos biológicos

Metabolómica

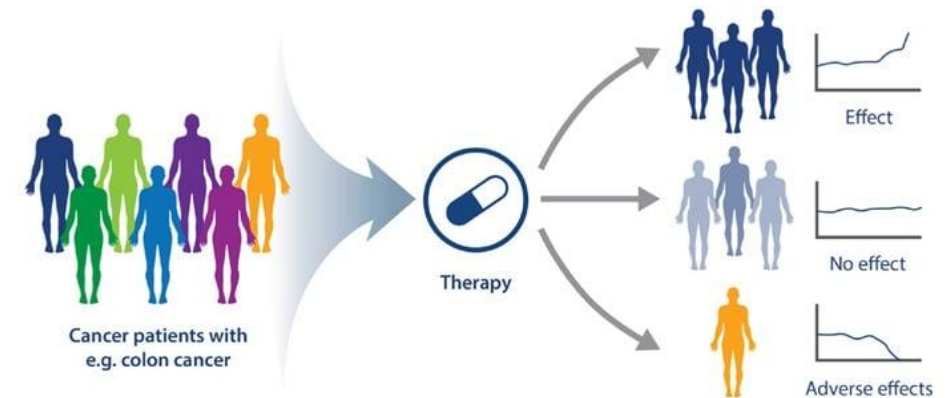


El desarrollo de la metabolómica podrá revelar marcadores y condiciones fisiopatológicas para:

- Prevenir el desarrollo de enfermedades crónicas
- Detección de enfermedades de forma precoz
- Identificar biomarcadores de situaciones fisiopatológicas
- Implementación de tratamientos clínicos adecuados
- Generar “metabotipos” de respuesta a tratamientos para fomentar tratamientos individualizados

Current Medicine

One Treatment Fits All



Future Medicine

More Personalized Diagnostics



Aplicación de la metabolómica

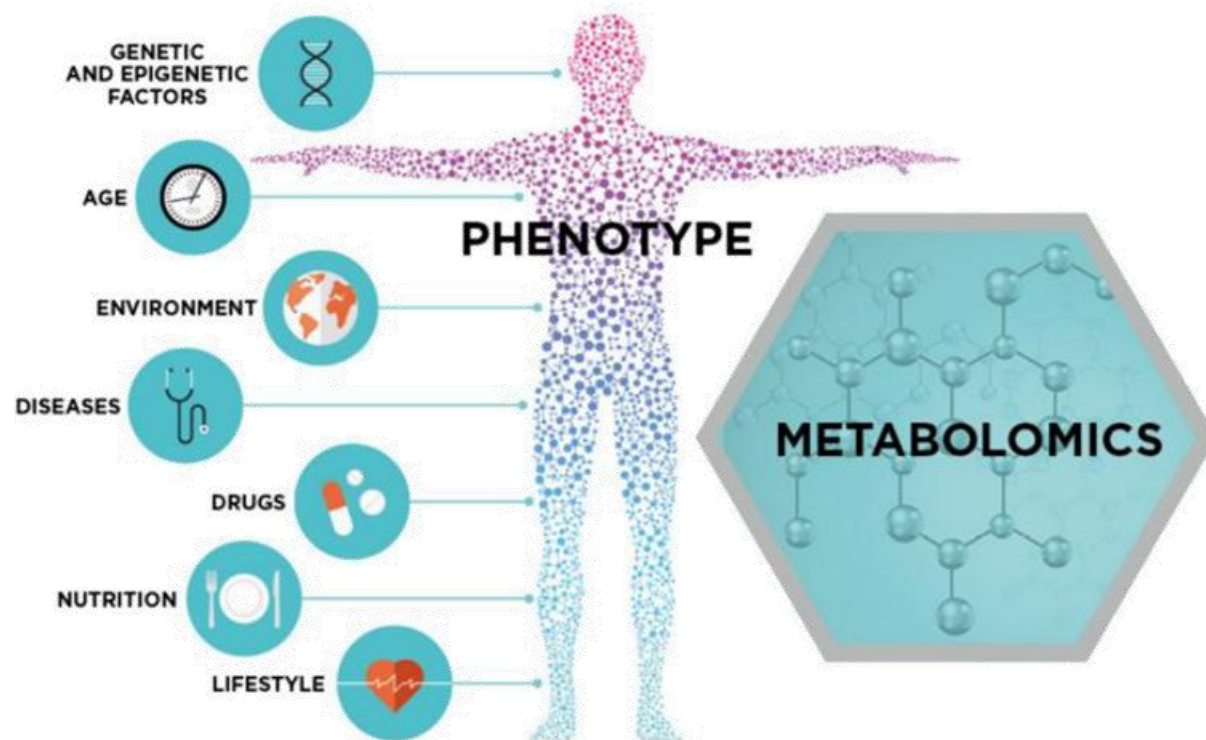


La metabolómica clínica se basa en la comparación de patrones biológicos estandarizados asociados a las patologías con el metaboloma del paciente

Existen una gran cantidad de variables que pueden afectar a los resultados

- Sexo
- Edad
- Tratamiento
- Dieta
- Hábitos
- Condiciones de estrés
- Tecnología analítica

Es muy importante fijar estas variables para poder llevar a cabo un diagnóstico más preciso

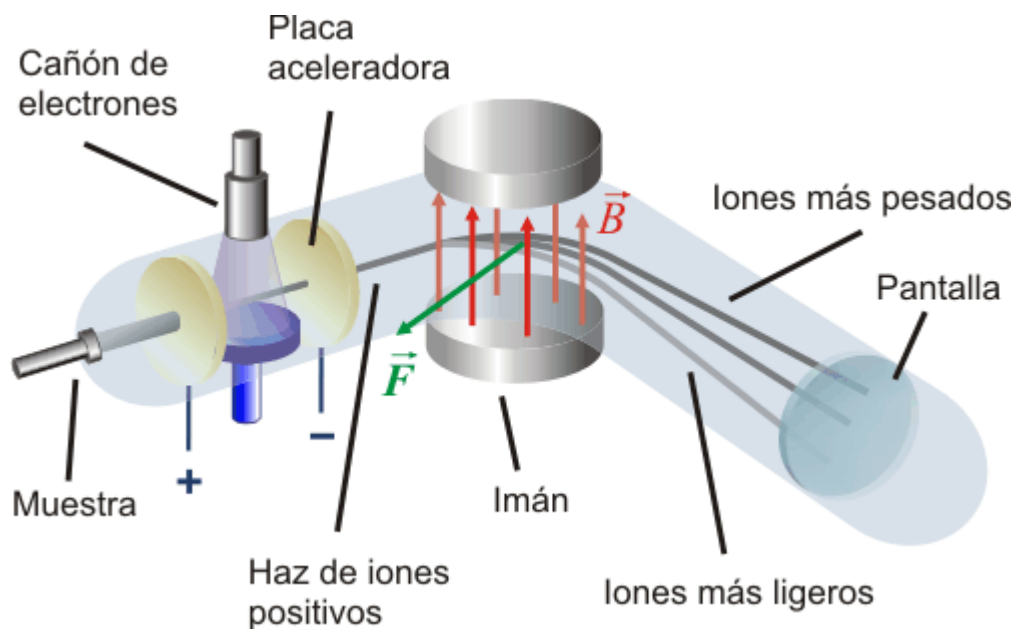


Técnicas de la metabolómica clínica

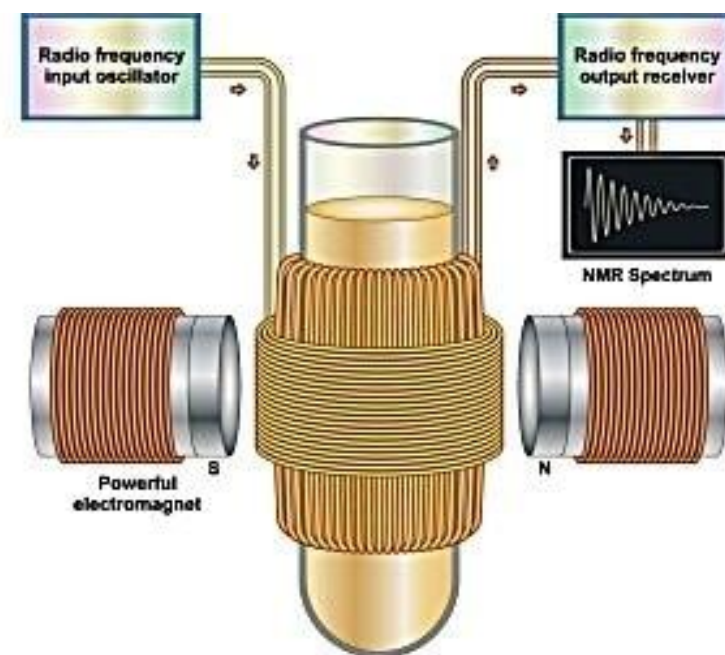


Las principales técnicas que se utilizan para el estudio de la metabolómica son

Espectrometría de masas



Resonancia magnética nuclear



Técnicas de la metabolómica clínica



Espectrometría de masas

- Se basa en la conversión de los compuestos orgánicos de una muestra en iones para ser identificados en base de su relación masa/carga
- Partes
 - Fuente de ionización:** da carga iónica a los fragmentos peptídicos resultantes de la digestión
 - Analizador:** separa los iones por masa/carga
 - Detector:** produce la huella peptídica
- Se suele acoplar a la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)
 - Separar los compuestos de una mezcla compleja
 - Asegura la llegada individualizada al espectrómetro de masas
- Destruye la muestra

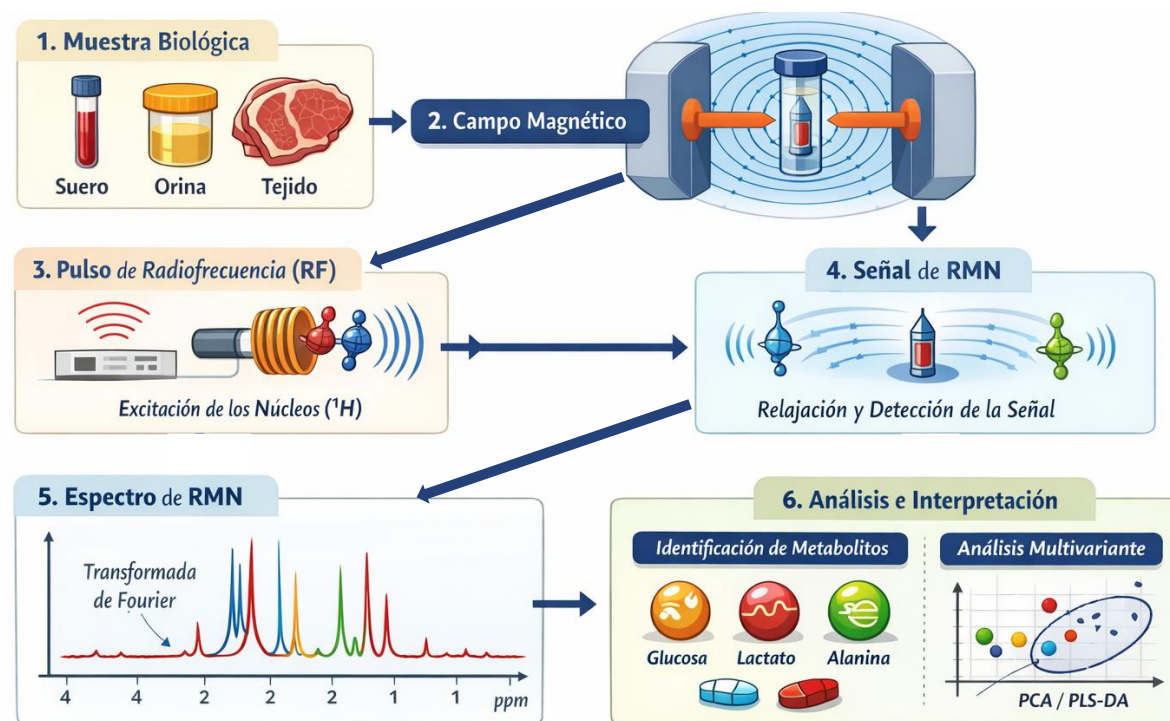


Técnicas de la metabolómica clínica



Resonancia magnética nuclear

- Se basa en la aplicación de un campo magnético que hace entrar a los compuestos en resonancia en función de su estructura
- No necesita HPLC
- No destruye la muestra
- Los equipos están optimizados para un procesamiento mínimo de la muestra
- Favorece el análisis de toda la muestra y no solo de lo que se logra extraer



Muestras para metabolómica clínica



Muestras de orina

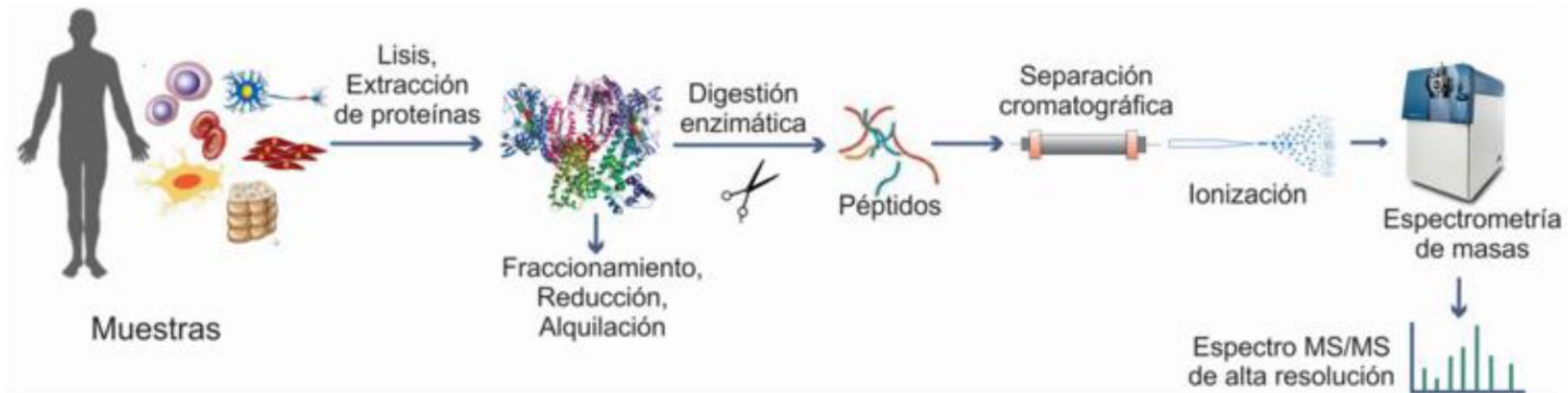
- Centrifugación
- Filtrado

Muestras de plasma o suero

- Precipitación de proteínas
- Centrifugación
- Filtrado

Biopsias

- Resonancia magnética nuclear
 - Se puede analizar directamente muestras congeladas
- Espectrometría de masas
 - Disgregar
 - Precipitar proteínas
 - Centrifugar
 - Filtrar



Metabolómica en el cáncer



Los perfiles metabólicos de muchos tumores correlacionan con el tipo de tumor, proliferación y actividad tumoral

Ciertos metabolitos pueden ser empleados como biomarcadores en el diagnóstico y pronóstico de una gran variedad de cánceres

1. Cáncer de mama

- Es el segundo tipo de cáncer más común en el mundo
- La esperanza de vida está muy relacionada con el diagnóstico precoz
- Metabolitos relacionados:
 - Nucleósidos metilados en orina
 - Ácido nonanedióico en plasma
 - Lactato → efecto Warburg
 - Colina y derivados → membranas celulares
 - Glutamina → fuente de energía

[Review](#) > [Metabolites](#). 2025 Jun 23;15(7):428. doi: 10.3390/metabo15070428.

Metabolomics in Breast Cancer: From Biomarker Discovery to Personalized Medicine

[Rosa Perestrelo](#)¹, [Catarina Luís](#)^{1 2}

Affiliations + expand

PMID: 40710528 PMCID: [PMC12298204](#) DOI: [10.3390/metabo15070428](#) [495](#)

Metabolómica en el cáncer



2. Cáncer de pulmón

- Se diagnostica normalmente en un estado avanzado, teniendo mal pronóstico
- Lo ideal sería usar aire expirado como muestra pero se puede emplear plasma
- Metabolitos relacionados:
 - Lípidos peroxidados
 - Alcanos derivados de ácidos grasos
 - Lactato → efecto Warburg
 - Aminoácidos de cadena ramificada
 - Ornitina
 - Ácidos grasos
 - Ácido palmítico
 - Ácido heptadecanoico
 - Ácido tridecanoico
 - Ácido esteárico

[nature](#) > [scientific reports](#) > [articles](#) > article

Article | [Open access](#) | Published: 03 June 2021

High-resolution metabolomic biomarkers for lung cancer diagnosis and prognosis

[Shi-ang Qi](#), [Qian Wu](#), [Zhenpu Chen](#), [Wei Zhang](#), [Yongchun Zhou](#), [Kaining Mao](#), [Jia Li](#), [Yuanyuan Li](#), [Jie Chen](#)
[✉](#), [Youguang Huang](#) [✉](#) & [Yunchao Huang](#) [✉](#)

[Scientific Reports](#) **11**, Article number: 11805 (2021) | [Cite this article](#)

12k Accesses | **83** Citations | **4** Altmetric | [Metrics](#)

Metabolómica en el cáncer



2. Cáncer de colon

- Es el que presenta más muertes en países desarrollados
- Los programas de cribado se basan en la detección de sangre en heces
- El reto de la metabolómica radica en la detección antes de la aparición de anomalías físicas en el colon o en el recto
- Metabolitos relacionados:
 - Bajas concentraciones de ácidos grasos de cadena corta (butirato)
 - Prolina y cisteína → destrucción de glicoproteínas epiteliales del colon
 - Fosfocolina
 - Esfinganina
 - Fosfoetanolamina

[nature](#) > [scientific reports](#) > [articles](#) > [article](#)

Article | [Open access](#) | Published: 27 December 2019

Untargeted LC-HRMS-based metabolomics to identify novel biomarkers of metastatic colorectal cancer

[Ariadna Martín-Blázquez](#), [Caridad Díaz](#), [Encarnación González-Flores](#), [Daniel Franco-Rivas](#), [Cristina Jiménez-Luna](#), [Consolación Melguizo](#), [José Prados](#) , [Olga Genilloud](#), [Francisca Vicente](#), [Octavio Caba](#) & [José Pérez del Palacio](#)

Metabolómica en enfermedades cardiovasculares



- La complejidad y variedad etiológica de las enfermedades cardiovasculares son puntos clave para la metabolómica
- El daño cardiovascular es silencioso y los síntomas aparecen de forma brusca cuando la enfermedad ya está avanzada
- La metabolómica puede aportar al diagnóstico precoz
- Existen múltiples variables confusoras en estos pacientes: tratamientos, intervenciones...
- Se siguen estudiando metabolitos que permitan estratificar estos pacientes:
 - N-óxido de trimetilamina
 - Ácido úrico
 - Homocisteína
 - Ceramidas
 - Lactato → hipoxia tisular

Review | [Open access](#) | Published: 23 September 2024

Recent advances in cardiovascular disease research driven by metabolomics technologies in the context of systems biology

[Boyao Zhang](#) & [Thierry Schmidlin](#) 

Metabolómica en enfermedades neurodegenerativas



- La identificación de biomarcadores neurológicos es clave para el desarrollo de nuevos tratamientos para estas patologías

1. Alzheimer

- Las alteraciones patológicas se relacionan con el metabolismo de la proteína amiloide, el estrés oxidativo, inflamación y desregulación lipídica
- Los ácidos biliares y lípidos podrían tener un papel importante a través de mecanismos de señalización celular, homeostasis del colesterol y metabolismo β -amiloide
- Metabolitos relacionados:
 - Lisofosfatidilcolinas (LPCs) → reducidos
 - Esfingolípidos
 - Triptófano → reducido
 - Ceramidas

JOURNAL ARTICLE

Comprehensive metabolomics profiling reveals novel biomarkers and pathways for early detection of Alzheimer's disease

Prabhakar Tiwari , Anu Gupta, Meenakshi Kaushik, Anjali Yadav, Anjali Anjali, Rekha Dwivedi, Pallavi Mudgal, Yashwant Kumar, Manjari Tripathi, Rima Dada

Brain Communications, Volume 7, Issue 6, 2025, fcaf410,

<https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaf410>

Published: 18 October 2025 **Article history** ▼



2. Parkinson

- Afecta a 6 millones de personas en el mundo
- Su incidencia está aumentando
- Metabolitos relacionados:
 - Nucleósidos metilados
 - Glutathione
 - Ácido úrico
 - Metabolitos de daño oxidativo

[nature](#) > [npj parkinson's disease](#) > [articles](#) > [article](#)

Article | [Open access](#) | Published: 19 March 2024

Comprehensive blood metabolomics profiling of Parkinson's disease reveals coordinated alterations in xanthine metabolism

[Elisa Gómez de Lope](#), [Rebecca Ting Jiin Loo](#), [Armin Rauschenberger](#), [Muhammad Ali](#), [Lukas Pavelka](#), [Tainá M. Marques](#), [Clarissa P. C. Gomes](#), [Rejko Krüger](#) & [Enrico Glaab](#)  [On behalf of the NCER-PD Consortium](#)

[npj Parkinson's Disease](#) **10**, Article number: 68 (2024) | [Cite this article](#)

ARTICLE | February 8, 2017



Metabolomic biomarkers as strong correlates of Parkinson disease progression

Peter A. LeWitt, MD, Jia Li, PhD, Mei Lu, PhD, Lining Guo, PhD, and Peggy Auinger, MS On behalf of the Parkinson Study Group-DATATOP

Investigators | [AUTHORS INFO & AFFILIATIONS](#)

Metabolómica en la celiacía



- Es una enfermedad con factores genéticos y medioambientales determinantes
- Da lugar a una enteropatía mediada por el sistema immune ante la ingestion de gluten
- Puede ser asintomática
- Se suele diagnosticar cuando ya se ha producido cierta atrofia de las vellosidades intestinales
- La metabolómica ha permitido diferenciar a pacientes susceptibles mediante
 - Indoxil sulfato
 - Ácido-meta-hidroxilfenilpropionico
 - Fenilacetilglicina
- Estos metabolitos se detectan en orina de los pacientes susceptibles

[Home](#) > [Clinical and Experimental Medicine](#) > [Article](#)

Metabolomics and lipidomics signature in celiac disease: a narrative review

Review | [Open access](#) | Published: 10 February 2024

Volume 24, article number 34, (2024) [Cite this article](#)

Metabolómica en la diabetes



- Es una patología caracterizada por el metabolismo anormal de los carbohidratos, lípidos y proteínas
- La metabolómica estratifica a los pacientes en
 - ❑ Normoglicémicos con riesgo: niveles elevados de
 - Isoleucina
 - Leucina
 - Valina
 - Tirosina
 - Fenilalanina
 - ❑ Prediabéticos: rutas alteradas
 - Metabolismo lipídico
 - Metabolismo de ácidos biliares
 - Ruta de esteroides
 - ❑ Diabéticos: niveles bajos de
 - Leucina
 - Dihidroesfingosina
 - Fitoesfingosina

Article | [Open access](#) | Published: 29 July 2016

Identification of metabolic biomarkers in patients with type 2 diabetic coronary heart diseases based on metabolomic approach

[Xinfeng Liu](#), [Jian Gao](#), [Jianxin Chen](#), [Zhiyong Wang](#), [Qi Shi](#), [Hongxue Man](#), [Shuzhen Guo](#), [Yingfeng Wang](#), [Zhongfeng Li](#) & [Wei Wang](#)

[Scientific Reports](#) **6**, Article number: 30785 (2016) | [Cite this article](#)

Consideraciones de la metabolómica

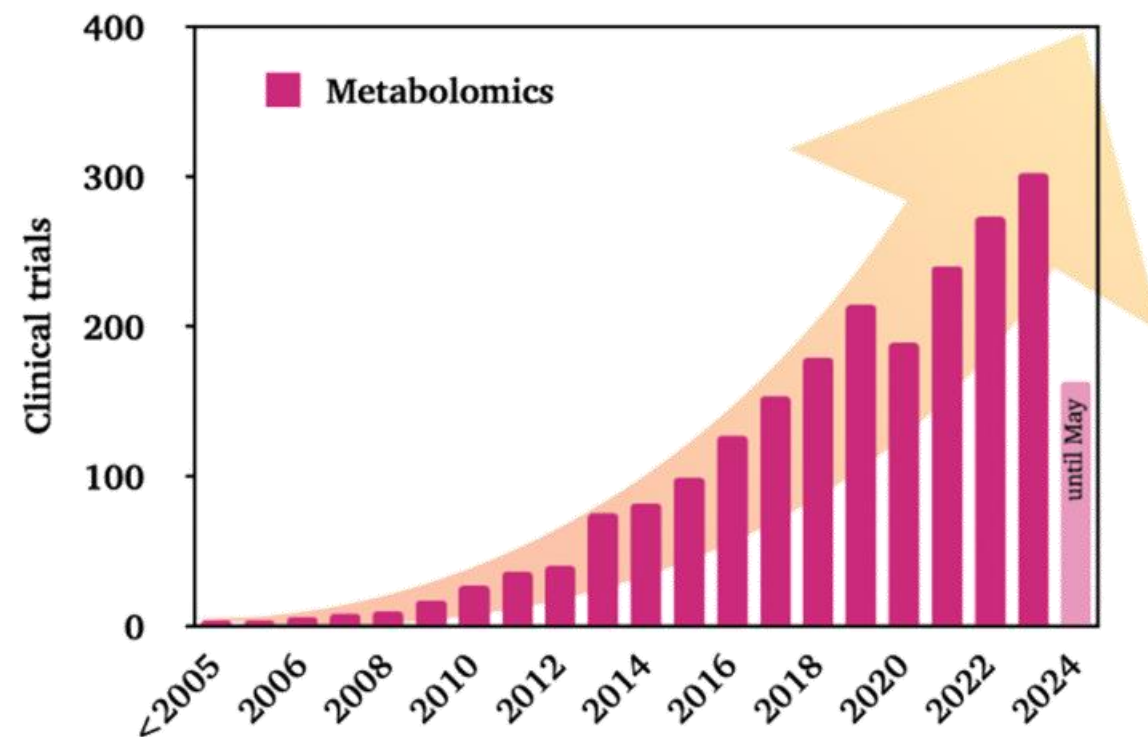


Los avances en la metabolómica han permitido la caracterización de rutas desreguladas en distintas patologías y la identificación de biomarcadores

Es un herramienta rápida y poco invasiva que puede mejorar nuestra capacidad diagnóstica y el tratamiento de las enfermedades

Aunque los resultados son prometedores, aún no hay una aplicación rutinaria de la metabolómica en el diagnóstico precoz de enfermedades

Se aplica a nivel quirúrgico para asistir a cirujanos en la resección de tumores, de forma que aporta datos útiles durante la operación para mejorar la extirpación del tumor





Análisis Biológico y Diagnóstico de Laboratorio

91 351 03 03
INFO@UFV.ES
UFV.ES

CTRA. POZUELO-MAJADAHONDA
KM 1.800, 28223 POZUELO DE ALARCÓN
MADRID. ES