

# PRUEBAS DIAGNOSTICAS DE LABORATORIO EN ZOONOSIS

Oliva Franco Betancurth \*

A pesar de los múltiples adelantos en materia de salud y específicamente en la implementación de nuevas técnicas de diagnóstico, pocas veces se utiliza el laboratorio para un aspecto tan importante como es la vigilancia epidemiológica, de la cual debe constituir un pilar fundamental.

En nuestro medio el diagnóstico de salud tiene serias deficiencias por que es eminentemente clínico, ya sea por deficiencia en la información o por la no utilización de los diferentes medios de apoyo ( en nuestro caso el laboratorio) para la confirmación de determinada patología.

De ahí que el conocimiento de la situación de salud de una población determinada, debe contar con el apoyo del laboratorio para considerarse como valedero y así tener la posibilidad de hacer una buena planeación para la obtención de unos mejores recursos en bien de la salud.

En este curso se pretende dar una visión del papel del laboratorio en las Zoonosis y presentar los procedimientos diagnósticos que los diferentes programas han estandarizado y difundido a través de La Red de Laboratorios.

---

\*Bacterióloga -Red Laboratorios DSSC

# RABIA

A causa del peligro potencial de una infección letal y la importancia obvia para la Salud Pública que acompaña esta enfermedad, se recomienda que todo el trabajo de diagnóstico de la Rabia que implique a animales y a seres humanos sea realizado en laboratorios de Salud Pública con dispositivos especiales de aislamiento y por personal inmunizado y diestro.

El diagnóstico de la Rabia Humana, se puede confirmar mediante cultivo en líneas celulares, método inmunofluorescentes, histológicos, serológicos y biológicos .

Los cultivos de suspensiones al 20 % de biopsias cerebrales o de tejidos cerebrales postmortem se realizan mediante inoculación intracerebral en ratones de 1 a 2 años de edad y observando los signos neurológicos o la muerte durante 28 días.

Los virus se han aislado también de las secreciones salivales, miocardio, músculo esquelético, pulmón, hígado, riñón, en los casos humanos con desarrollo letal.

La inmunofluorescencia directa para demostrar el antígeno también constituye un buen diagnóstico y se puede utilizar con frotis de cerebro y raspado craneano; también se ha comunicado que el Antígeno puede detectarse por el material procedente de biopsia cutánea tomada de la mucosa. En las secreciones fijadas de cerebro y en las frotis por impresión se puede demostrar la presencia de inclusiones intracelulares en las neuronas (cuerpos de Negri) mediante la tinción de eosina y azul de metileno, de Giemsa o de Seller.

El diagnóstico serológico se puede realizar mediante los métodos de neutralización en el ratón, anticuerpos fluorescentes indirectos, inhibición del foco fluorescente o fijación del complemento.

Estas pruebas son importantes para establecer el diagnóstico de Rabia y determinar la adecuación de las respuestas de anticuerpos en el curso de la inmunización o después de la exposición.

La pobre preservación de algunos especímenes o su envío en soluciones inadecuadas son la causa determinante de una falta de positividad absoluta en las pruebas de inmunofluorescencia y de inoculación al ratón.

La gran resolución y alta especificidad hacen que la inmunofluorescencia directa sea un método muy confiable para el diagnóstico de la Rabia. Requiere experiencia y entrenamiento adecuado.

## TOMA Y ENVIO DE MUESTRAS PARA EL DIAGNOSTICO DE LA RABIA

Todo animal sospechoso de haber contraído rabia NO DEBE SER sacrificado, sin someterlo a observación por 10 días contados a partir del momento de la

mordedura, al cabo de los cuales se debe informar al organismo de salud que haya atendido a las personas mordidas para que proceda de acuerdo con las normas establecidas.

Si durante los 10 días aparecen síntomas de Rabia el animal se debe dejar hasta su fallecimiento y las muestras adecuadas deben remitirse sin demora a la institución que tenga disponibilidad para el diagnóstico de Rabia.

## ENVIO DE MUESTRAS

El envío de cualquier material debe acompañarse con los siguientes datos:

- Fecha de muerte del animal.
- Procedencia Geográfica del animal.
- Especie.
- Signos que presento.
- Nombre y dirección del remitente.
- Nombre y dirección del médico o de la institución de salud que conoce el caso.

Con todas las precauciones se enviarán cualquiera de las siguientes muestras:

1. Si existe la posibilidad de disponer de diagnóstico a menos de cuatro horas del sitio del envío, se puede remitir el cadáver completo para que el laboratorio se encargue de la toma de la muestra.
2. Para el envío de la cabeza, esta pieza se depositará en una bolsa plástica impermeable introducida dentro de un contenedor adecuado al tamaño y en un sobre aparte la información.
3. Si se va a enviar cerebro, cerebelo; debe ser en un frasco que contenga suficiente cantidad de "glicerina comercial", diluida en un volumen igual de agua corriente.

Es muy importante también enviar muestras de médula espinal.

Si se trata de una persona que ha fallecido se enviarán refrigerados "sin formol" cerebro, cerebelo, médula espinal.

Además se tomarán por aparte fragmentos de los mismos órganos y de los demás obtenidos en la autopsia que se pondrán "en formol" para estudio histopatológico.

# CISTICERCOSIS

La cisticercosis, enfermedad producida por la larva de taenia solium, constituye un importante problema de salud pública en aquellos países sin un nivel adecuado de higiene y saneamiento ambiental.

Con el propósito de facilitar el diagnóstico de la cisticercosis humana se han diseñado numerosas pruebas de laboratorio en el suero y en el L.C.R. de humanos. Dentro de estas pruebas inmunológicas tenemos:

- Fijación de complemento
- Hemaglutinación Indirecta
- Inmunolectroforesis
- Radioinmunoensayo RIA
- ELISA- Análisis inmunoenzimático

Uno de los problemas para el diagnóstico de la Neurocisticercosis es la baja sensibilidad de las pruebas hasta ahora usadas.

El reciente empleo de ELISA ha logrado aumentar considerablemente la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico en muestras de suero y LCR.

El diagnóstico serológico de la NC presenta varios problemas; la relación huésped-parásito es un cuento inmunológico complejo, no muy bien comprendido hasta ahora; la respuesta inmune de los pacientes ante la presencia del parásito no es uniforme. Además existe una proporción significativa de pacientes con NC que son inmunológicamente tolerantes ante el parásito, es decir, no tienen anticuerpo en suero o LCR y no presentan alteraciones en su inmunidad celular; en algunos pacientes la respuesta a PPD está disminuida en relación con controles normales. Tampoco parece existir variabilidad en la composición antigénica entre cisticercos recolectados de diferentes cerdos y también entre cisticercos de cerdos provenientes de diversas regiones geográficas de un mismo país.

Esta heterogeneidad tanto en la composición antigénica del parásito como en la respuesta inmunológica del huésped, podrían al menos en parte explicar la baja sensibilidad de las pruebas serológicas anteriormente utilizadas; con la introducción de ELISA se han logrado aumentar tanto la sensibilidad como la especificidad a niveles aceptables.

El ELISA, es una prueba de aparición relativamente reciente. Sin embargo su desarrollo ha sido vertiginoso, considerándose hoy en día como una técnica serológica que presenta ventaja sobre otras, tales como alta sensibilidad, facilidad en su ejecución, bajo costo y menores riesgos para quien la realiza.

Otro adelanto sería el desarrollo de pruebas inmunoenzimáticas y bioquímicas que permitan detectar posibles ANTIGENOS circulantes en suero y LCR de pacientes con NC. Estas pruebas por ser más específicas y demostrar la presencia de

Antígeno serían las IDEALES, pero aún hay que recorrer algún trecho antes de que se puedan diseñar y elaborar rutinariamente.

## TOMA DE MUESTRA

Tomar 5 ml. de sangre venosa sin anticoagulantes, enviar el suero o LCR en viales de plástico rotuladas con cinta de enmascarar, con nombre del paciente completo, y fecha.

Asegurar la tapa del vial con cinta y anexar un resumen del paciente con todos los datos clínicos.

## DENGUE

La fiebre hemorrágica por Dengue es una enfermedad febril grave, a menudo fatal, transmitida principalmente por el mosquito *Aedes Aegypti*, y que puede ser causada por cualquiera de los cuatro tipos conocidos del virus del Dengue.

Los agentes etiológicos del Dengue se clasifican en la familia TOGAVIRIDAE género *Favivirus*; son virus RNA que poseen envoltura rica en lípidos por lo cual son sensibles a los solventes orgánicos.

Se conocen cuatro tipos diferentes de virus, distinguibles mediante la prueba de neutralización, mediante la técnica de Huellas Digitales y con Inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos monoclonales.

Dentro de las técnicas utilizadas con mayor frecuencia tenemos la Inhibición de la Hemaglutinación y el Análisis Inmunoenzimático.

Se han establecido dos procedimientos para el diagnóstico del Dengue Hemorrágico.

### 1o. Diagnóstico Microbiológico

Aislamiento e identificación del virus en la fase aguda de la enfermedad (1-5 días) a partir del suero virémico, así:

a) En cultivo celular: Se coloca en contacto el suero del paciente con una monocapa de células, identificándolas por medio de inmunofluorescencia indirecta. Desde 1979 el aislamiento de los virus del dengue se han cultivado en una línea continua de células de *Aedes Albopictus*. La técnica consiste en infectar monocapas de esta línea celular, con diluciones de 1:5 y 1:10 del suero que se investiga. Después de incubar el cultivo de células por espacio de 7-10 días, se verifica el crecimiento del virus mediante una prueba de fijación de complemento y por inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos monoclonales de ratón.

b) En mosquitos, inoculación torácica del virus, con formación de complejos inmunes, liberación del virus e identificación en células de mosco del virus amplificado.

## 2o. Diagnóstico Serológico.

a) Detectando anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación. Los eritrocitos de ganso no se aglutinan en presencia del suero del paciente ya que la aglutinación normal en presencia del virus se encuentra bloqueada por la reacción antígeno anticuerpo.

b) El desarrollo de las técnicas inmunoenzimáticas ha facilitado y simplificado las técnicas para detectar IgM. Si a una fase sólida como es el fondo de un pozo de microplata, se adhiere un anticuerpo anti IgM humano y después se agrega un suero humano que contenga IgM, se producirá una reacción Ag-AC específica. Si esa IgM humana ha sido estimulada por una infección por Dengue-4 y agregamos a nuestra prueba antígeno de D-4, se producirá una segunda reacción Ag-AC específica entre la IgM que habíamos adherido en el primer paso (IgM anti-D-4) y el Antígeno. Luego verificamos esta reacción agregando una IgG anti D-4 conjugada con una enzima que reaccionará con un sustrato específico que adicionamos en un último paso. La reacción enzima-sustrato produce un color visible que se puede ver con facilidad en un espectrofotómetro.

## REMISION DE MUESTRAS

De cada persona deben tomarse al menos dos muestras de suero, correspondientes a las fases de la enfermedad.

- a) Lo más pronto posible después del ingreso en el hospital o de la presentación en la consulta. Muestra No. 1.
- b) Poco antes de la salida del hospital. Muestra No. 2,
- c) Si es posible 14-21 días después del comienzo de la enfermedad. Muestra No. 3.

El no dejar un intervalo de 10-14 días entre la Muestra No. 1 y la Muestra No. 2 puede impedir el diagnóstico serológico de infecciones primarias de Dengue.

En una infección primaria por Dengue el título de anticuerpos se eleva lentamente hasta un nivel moderado y es relativamente monoespecífico. En las infecciones secundarias, el título de Acs se eleva rápidamente hasta niveles muy altos y hay reacciones con una amplia variedad de antígenos de flavivirus, solo se encuentran títulos extraordinariamente elevados en sueros obtenidos de pacientes que sufren infección secundaria aguda.

En el 90% de los pacientes no se dispone de información sobre los resultados de la segunda muestra, generalmente porque esta segunda muestra no existe; lo que implica que un 10% solo tiene un estudio serológico para intentar el diagnóstico. Además carece de información sobre el lapso entre la primera y segunda muestra serológica. (Ver cuadro).

### INTERPRETACION DE LA RESPUESTAS DE ACS I H

#### RESPUESTA DE INTERVALO TITULO INTERPRETACION

ACS	M1-M2	Cualquier Ag.
Aumento $\geq 4$	$\geq 7$ Días $\leq 1:1.280$	Infec definida primaria
Aumento $\geq 4$	cualquier $\geq 1:2.560$ muestra	Infec. definida secundaria
Aumento $\geq 4$	$< 7$ Días $\leq 1:1.280$	Infec. definida, posible primaria o secundaria
Sin cambio	Cualquier $\geq 1:2.560$ muestra	Supuesta infección secundaria.
Sin cambio	$\geq 7$ Días $\leq 1:1280$	No es dengue
Sin cambio	$< 7$ Días $\leq 1:1280$	Ininterpretable
	Una sola $\leq 1:1280$ muestra	Ininterpretable

## RECOGIDA Y EMPAQUE DE MUESTRAS

Enviar el suero en frascos o tubos herméticos debidamente rotulados, con el nombre y fecha de procedencia legibles. Se debe fijar el tapón del frasco o tubo con cinta de enmascarar para evitar que se salga el contenido en el transporte. Se deben refrigerar y enviar refrigeradas a la Red de Laboratorios. Se debe identificar cual es la Muestra No. 1 y la muestra No. 2 de cada paciente. Anexar un resumen de la historia clínica en la cual se consignen los resultados de los estudios paraclínicos. (Hematocrito y plaquetas)

## DATOS PARA CASOS SOSPECHOSOS DE DENGUE HEMORRAGICO

Nombre  
Edad  
Lugar de Procedencia  
Lugar de Residencia Habitual  
Fecha de inicio de la enfermedad  
Fecha de toma de muestra  
Recuento plaquetas  
Hematocrito  
Hemoglobina  
Prueba de torniquete  
Diagnóstico  
Información sobre hemorragias y shock

### Diagnóstico Histopatológico

En caso de fallecimiento del paciente se hará necropsia completa, dentro de las 24 horas, enviando las piezas de tejido, en formol tamponado, en formol corriente o en alcohol etílico o metílico. Se consideran de especial importancia en su orden, las muestras de: Hígado, ganglios linfáticos, estómago, duodeno, intestino delgado, riñón, pulmón y cerebro.

A nivel de las instituciones de atención médica se carece de los recursos para un diagnóstico histopatológico y los estudios serológicos se hacen con el sistema de los llamados antígenos febriles cuyos resultados no son bajo ninguna circunstancia nada confiables.

## BRUCELOSIS

El diagnóstico más eficaz en la fase inicial es el aislamiento del agente etiológico en las tres primeras semanas que es cuando el micro-organismo está en la sangre.

Hemocultivos. Con la debida antisepsia se deben tomar 3 muestras en el medio de Ruiz Castañeda.

Mielocultivos. Se tomarán del esternón o cresta iliaca y sembrar en el medio de Castañeda.

Serología. Las pruebas serológicas se usan extensamente en el diagnóstico de la brucelosis humana y animal. La determinación de anticuerpos circulantes contra *Brucella abortus* constituye un gran recurso en el laboratorio ya que el aislamiento de la bacteria no es fácil y solo es posible en la fase bacterémica de la enfermedad.

Los anticuerpos circulantes producidos por el huésped pueden demostrarse por varios procedimientos:

Aglutinación rápida en placa.

Prueba lenta en tubo.

Fijación del COMPLEMENTO.

Inmunofluorescencia (IF).

ELISA.

Anti inmunoglobulina de Coombs

Hemaglutinación indirecta.

Card Test

Para los programas del Instituto Nacional de Salud se estandarizaron 2 técnicas serológicas de diagnóstico que son la aglutinación en placa y la aglutinación en tubo y una prueba complementaria, aglutinación con 2ME.

Para la estandarización se requieren antígenos específicos y una técnica especial.

Un título de aglutinación 1:160 en un caso presuntivo, prácticamente es diagnóstico. Los anticuerpos aglutinantes pueden diferenciarse en IgG y IgM por medio de las técnicas de aglutinación lenta en tubo con 2 Mercaptoetanol.

En las formas crónicas los títulos elevados de IgG prácticamente son diagnósticos. Tanto en el hombre como en los animales la infección natural estimula la aparición simultánea o ligeramente diferida de IgM y las IgG; pero mientras las IgM declinan y tienden a desaparecer, la IgG se estabilizan y persisten por largo tiempo.

En casos crónicos la principal inmunoglobulina presente y muchas veces la única es la IgG.

Las IgG están estrechamente ligadas a un estímulo antigénico fuerte; su presencia permanente está relacionada con un estado infeccioso progresivo o con una enfermedad crónica.

La repetición de estímulo antigénico determina una síntesis mayor, más rápida y persistente de IgG; en cambio en la respuesta secundaria la IgM se comporta como un simple estímulo primario. La desaparición de la IgG significa generalmente la eliminación de la infección.

## PRUEBA DE AGLUTINACION RAPIDA EN PLACA.

Se usa en gran escala como método de rutina en todo América, las diluciones de rutina son 1:25, 1:50, 1:100, 1:200.

El método ofrece la ventaja de ser rápido y sencillo, lo que permite aplicarlo en escala masiva en las campañas de control y en muestreos para establecer la prevalencia de la enfermedad.

## PRUEBA DE AGLUTINACION EN TUBO

Se puede usar como prueba diagnóstica básica como método para corroborar los resultados obtenidos con otras pruebas serológicas. La prueba está menos sujeta a errores de manipulación y presenta menos reacciones inespecíficas que la de placa. Los sueros hemolizados no son adecuados para la aglutinación lenta en tubo, por las interferencias del fenol que se utiliza en la técnica con la hemoglobina libre.

En esta prueba se emplean diluciones de 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200, un antígeno estandarizado y suspendido en solución salina fenolada. Las muestras se incuban a 37° por 48 horas.

## PRUEBA COMPLEMENTARIA DEL 2 MERCAPTOETANOL

Es una prueba selectiva que detecta solamente la presencia de IgG. Se basa en la reducción de los enlaces disulfuros debido a la acción del 2 Mercaptoetanol.

La prueba del 2 Mercaptoetanol se debe efectuar simultáneamente con la prueba en tubo y se interpreta por la diferencia entre el suero sin tratamiento y el suero tratado con 2 ME, por ejemplo: un suero sin tratamiento con título 1:100 (Prueba

en tubo) y que resulta negativo a la dilución de 1:25 con Mercaptoetanol, revela que los anticuerpos presentes son solo de la clase IgM. En este caso se aconseja repetir la prueba transcurridos 30 días.

En cambio si un suero muestra el mismo título luego del tratamiento con 2 ME. el hecho indica la presencia de IgG.

La prueba de 2 ME es útil para detectar infectados crónicos en los que la prueba de aglutinación puede ser de título bajo ya que el suero tendrá predominantemente Acs IgG.

Los resultados positivos en la prueba standard de aglutinación en tubo y negativos al 2 ME, se pueden interpretar como reacciones heteroespecíficas o como infección reciente en periodo de incubación.

En este caso se repetirán las reacciones a un intervalo prudente

## HEMAGLUTINACION INDIRECTA

Ha sido aplicada extensamente en la detección de Acs de Brucella en el suero de hombres y animales; es un procedimiento muy sensible para revelar la presencia de Acs brucelósicos y generalmente da títulos mayores que los otros procedimientos diagnósticos aunque muestra buena correlación con la seroaglutinación, F de C y prueba de la tarjeta.

## PRUEBA DE ANTIGLOBULINA DE COOMBS

Es de valor como prueba complementaria en el diagnóstico de la Brucelosis humana y se aconseja utilizar para la detección de casos crónicos.

Ha sido recomendada especialmente para encuestas epidemiológicas porque permite descubrir infecciones crónicas en áreas endémicas y en casos sospechosos de Brucelosis evolutiva con serología negativa.

## PRUEBA DE ANTIGENO TAMPONADO O DE TARJETA CARD TEST

Es un procedimiento cualitativo, rápido de aglutinación macroscópica que se efectúa con una sola dilución y detecta principalmente IgG, también se ha encontrado que reaccionan las IgM. Esta prueba, puede dar positiva antes que las pruebas estandares.

## **BIBLIOGRAFIA**

López, C Murillo. Estandarización y evaluación de ELISA para diagnóstico de la Cisticercosis en suero y L.C.R.

C. Gonzalez y col. ELISA en el diagnóstico de Cisticercosis. II Congreso Nacional de Colbasaniges.

Brucelosis Humana-instituto Nacional de Salud. Monografía N° 1 1.987.

Plan de vigilancia y control para fiebre amarilla y dengue boletín epidemiológico Nacional. Ministerio de Salud. Bogotá.

Dengue Hemorrágico, tratamiento y lucha. Organización Mundial de la Salud.

Vigilancia y control de Dengue Clásico y dengue Hemorrágico en Colombia. Instituto Nacional de Salud.

Dengue Hemorrágico en Cuba. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana, Noviembre 1.982.

I, Carmona. Fiebre Hemorrágica dengue en Colombia 1989-1990. Temas microbiológicos.

M. Akerman. dengue y su forma Hemorrágica, Noviembre 1990. Revista médica estudiantil.

M. Guzmán. Brucelosis Manual de Laboratorio. Instituto Nacional de Salud 1990.

Alton G. Jones. Las Técnicas de laboratorio en Brucelosis. OMS. Arg. Ed. 1976.

Casa-Olaseaga R. Diagnóstico Serológico de la Brucelosis. C. Espanzo OPS/ OMS. Buenos Aires.

## **CONTENIDO**

ASPECTOS CLINICOS Y EPIDEMIOLOGICOS DEL DENGUE HEMORRAGICO ✓	8
ASPECTOS ENTOMOLOGICOS DEL DENGUE ✓	17
FACTORES DE RIESGO EN CISTICERCOSIS ✓	30
ASPECTOS CLINICOS DE LA NEUROCISTICERCOSIS	36
LEISHMANIASIS COMPORTAMIENTO EN CALDAS 1992	57
DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LAS LEISHMANIAS EN COLOMBIA	70
EPIDEMIOLOGIA DE LA RABIA. PROGRAMA DE LA RABIA	72
PRUEBAS DIAGNOSTICAS DE LABORATORIO EN ZONOSIS	78