

Libros de **Cátedra**

Diagnóstico etiológico de las enfermedades infecciosas

Fundamentos e interpretación clínica
de las técnicas inmunológicas y moleculares

Nora Beatriz Molina - Judith Celina Bernstein
Martín Enrique Rabassa

n
naturales

FACULTAD DE CIENCIAS
MÉDICAS


EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS

FUNDAMENTOS E INTERPRETACIÓN CLÍNICA DE LAS TÉCNICAS
INMUNOLÓGICAS Y MOLECULARES

Nora Beatriz Molina
Judith Celina Bernstein
Martín Enrique Rabassa

Facultad de Ciencias Médicas



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



Agradecimientos

A mi querida hermana Marcela por su corazón valiente y generoso.

A mis amores, Víctor y Nacho, por su inmenso apoyo, aliento y compañía en cada desafío.

Nora Beatriz Molina

A mis hijos Axel y Alan Knauer, soportes fundamentales de mi vida, que me han apoyado desde siempre en todas mis iniciativas.

A Kanzo, Moros y San, por la alegría y el amor incondicional.

Judith Celina Bernstein

A Ana y Manuel.

Martín Enrique Rabassa

Debes amar el tiempo de los intentos.

Debes amar la hora que nunca brilla.

-José Martí

Índice

Introducción	7
Capítulo 1	
Generalidades del sistema inmune	8
<i>Martín Enrique Rabassa</i>	
Capítulo 2	
Respuesta inmune a las infecciones	19
<i>Nora Beatriz Molina</i>	
Capítulo 3	
Mecanismos de respuesta inmune frente a patógenos	35
<i>Judith Celina Bernstein y Martín Enrique Rabassa</i>	
Capítulo 4	
Diagnóstico etiológico de las enfermedades infecciosas	49
<i>Nora Beatriz Molina</i>	
Capítulo 5	
Propiedades generales de las pruebas de diagnóstico microbiológico	59
<i>Nora Beatriz Molina</i>	
Capítulo 6	
Técnicas inmunológicas aplicadas al diagnóstico de las enfermedades infecciosas	70
<i>Nora Beatriz Molina</i>	
Capítulo 7	
Técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico de las enfermedades infecciosas	82
<i>Nora Beatriz Molina</i>	
Capítulo 8	
Interpretación clínica de las pruebas diagnósticas en las enfermedades infecciosas	94
<i>Nora Beatriz Molina y Judith Celina Bernstein</i>	
Lista de tablas	103

Lista de figuras	104
-------------------------	------------

Los autores	106
--------------------	------------

Introducción

La interpretación de las técnicas inmunológicas y moleculares representa un pilar fundamental en el diagnóstico etiológico de las enfermedades infecciosas. En un mundo marcado por la globalización y el constante movimiento de personas y productos, la aparición y propagación de patógenos emergentes se ha vuelto una realidad. Por lo tanto, es crucial que los profesionales de la salud comprendan y apliquen correctamente estas técnicas para realizar diagnósticos precisos y oportunos.

El problema de las enfermedades endémicas en nuestra región, como el dengue, la enfermedad de Chagas, la fiebre hemorrágica argentina; emergentes, como la CoViD-19 por SARS-CoV-2, la viruela simiana, la fiebre Chikungunya, Zika, la encefalitis equina y reemergentes como la fiebre amarilla, hantaviriosis, el sarampión, la sífilis y la rabia humana, se destacan por la posibilidad de su rápida expansión. Este hecho cobra una importancia fundamental, ya que hoy prácticamente todos los países las padecen o enfrentan el inminente peligro de su aparición. El resurgimiento de estos microorganismos y la pandemia de la CoViD-19 constituyen una clara demostración de la vulnerabilidad de la humanidad y una advertencia de que los avances alcanzados hasta ahora en materia de seguridad sanitaria, bioseguridad y prosperidad mundial pueden perderse a menos que se formulen políticas de desarrollo efectivas y compromisos para implementarlas a nivel nacional e internacional.

El avance científico en el campo de la inmunología y la biología molecular ha permitido el desarrollo de métodos innovadores que no solo mejoran la sensibilidad y especificidad de los diagnósticos, sino que también facilitan la detección temprana de agentes infecciosos. En este contexto, es esencial que los estudiantes adquieran una sólida base teórica y práctica sobre estas técnicas, lo que les permitirá abordar con éxito los desafíos que plantea el diagnóstico de las enfermedades infecciosas.

Por consiguiente, este libro busca ser una herramienta valiosa que combine el aprendizaje de fundamentos teóricos, el análisis crítico de datos y la comprensión de los últimos avances científicos en este campo. Al proporcionar un marco integral para el estudio de estas técnicas, se espera capacitar a los futuros profesionales para que puedan contribuir de manera significativa a la salud pública y a la respuesta epidemiológica ante brotes infecciosos. En última instancia, la educación en este ámbito no solo beneficia a los individuos, sino que también fortalece la salud de la comunidad.

CAPÍTULO 1

Generalidades del sistema inmune

Martín Enrique Rabassa

El sistema inmunitario es un conjunto de células, tejidos y órganos cuya función principal es la defensa del organismo frente a microorganismos patógenos. Para llevar a cabo esta función, el sistema inmunitario posee una serie de receptores que le permiten detectar señales constituidas por elementos de los microorganismos o por señales generadas debido al daño producido por éstos a las propias células. En este sentido, el sistema inmunitario posee la característica de diferenciar lo propio de lo extraño o lo propio modificado.

Luego de la detección de estas señales, el sistema inmunitario integra la información recolectada y genera una respuesta inmune específica para cada una de las distintas clases de microorganismos. Desde una perspectiva evolutiva se desarrollaron dos tipos de respuestas inmunes: la respuesta inmune innata y la adaptativa. Una respuesta inmune innata se puede rastrear hasta los organismos multicelulares más rudimentarios y arcaicos; ocurre de forma inmediata, luego de la detección de los patógenos y se encuentra orientada al reconocimiento de moléculas que no presentan variaciones en el tiempo en su composición, es decir, hace millones de años que son parte constitutiva invariante de una clase de microorganismo particular. Por otro lado, la respuesta inmune adaptativa, que se originó hace unos 500 millones de años con la aparición de los peces óseos, necesita de una respuesta innata previa, por lo que no es inmediata, se encuentra enfocada en la detección de moléculas que sufren continuas variaciones en su composición (particularmente las proteínas) y tiene la capacidad de generar memoria inmunológica. Las moléculas reconocidas en las respuestas inmunes innatas se denominan patrones asociados a patógenos o a daño, mientras que las moléculas reconocidas en el contexto de una respuesta inmune adaptativa se denominan antígenos.

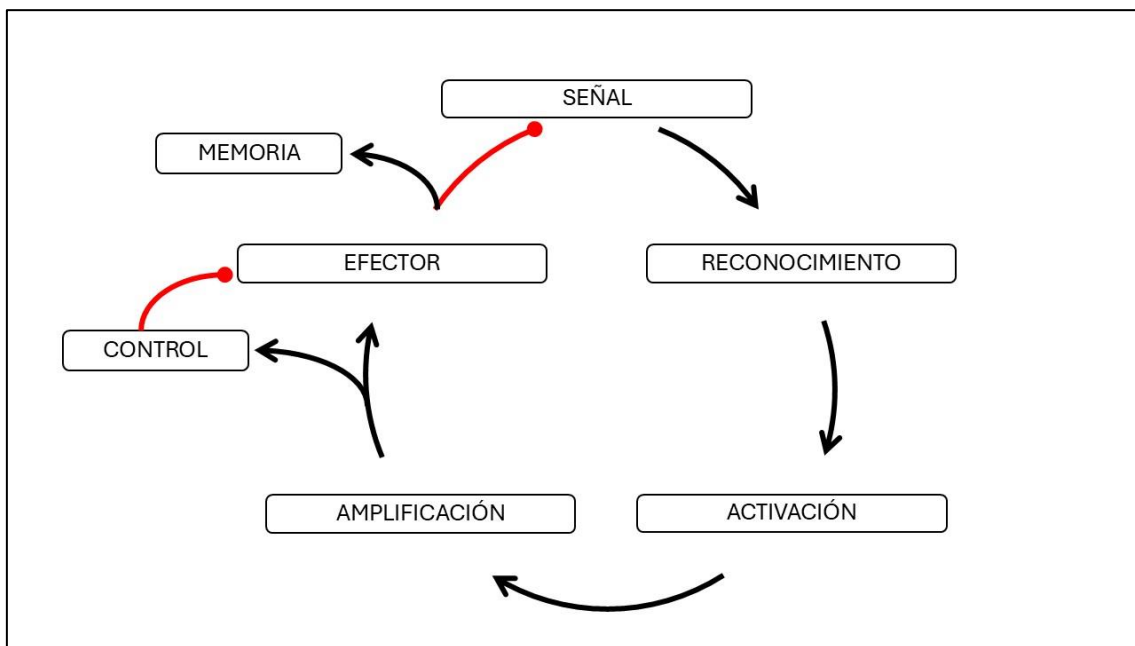
Fases de la respuesta inmune

Las respuestas inmunitarias se desarrollan en fases. Se inician mediante el reconocimiento de una señal generada por productos de microorganismos. Luego, el sistema integra el reconocimiento de esas señales y pasa a una fase de activación en la que se pueden observar cambios intracelulares que llevan a la producción de citocinas u otros mediadores moleculares. A continuación, tiene lugar una fase de amplificación en la que aumenta la producción de

citocinas y de otros mediadores químicos. En las respuestas adaptativas se produce la división celular y amplificación clonal de linfocitos. El resultado final es la generación de uno o más mecanismos efectores que tienen como objetivo eliminar la fuente de la señal. Al mismo tiempo, se generan mecanismos de control que, junto a la eliminación de la señal, llevan a la contención de los mecanismos efectores. Además, tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa se generan cambios en el sistema (memoria) que le permiten responder de forma más eficiente a la reexposición a la misma señal (Figura 1.1)

Figura 1.1

Etapas de la respuesta inmune



Células y tejidos del sistema inmunitario

Las células del sistema inmune poseen la característica de encontrarse en diversos compartimentos del organismo, no estando limitadas a los tejidos linfoides. Sin embargo, la mayor cantidad de células inmunológicas se encuentran en la médula ósea, los ganglios linfáticos, el bazo, el timo y las amígdalas. Es posible observar tejido linfoide en cantidades significativas asociado a mucosas como las del tracto gastrointestinal, respiratorio y la piel. Además, las células del sistema inmune pueden migrar y circular por la sangre y la linfa. A pesar de poseer la sangre y la linfa una masa importante, la densidad y cantidad de células inmunes en circulación es mucho menor comparado con la presente en los órganos linfoides.

Las células de la inmunidad innata están constituidas por componentes mieloides y linfoides. Las células de origen mieloide son principalmente fagocitos, es decir los monocitos, macrófagos y los granulocitos neutrófilos. El resto de los granulocitos los conforman los eosinófilos y los

basófilos. Otras células mieloides son las células dendríticas, relevantes por su capacidad de presentar antígenos a los linfocitos de la inmunidad adaptativa y, finalmente, los mastocitos. Las células de origen linfoide son los linfocitos NK, los linfocitos invariantes y las células linfoides invariantes. Las células de la inmunidad adaptativa son los linfocitos T y B.

Los granulocitos neutrófilos son las células más abundantes en la sangre y tienen una gran capacidad para combatir infecciones; se producen en la médula ósea y tienen una vida media corta (12-24 horas). Su función principal es la fagocitosis y la liberación de enzimas y radicales libres para destruir microorganismos; también pueden formar trampas extracelulares de ADN (NETs) para atrapar y matar patógenos. Los mastocitos se encuentran en los tejidos y liberan histamina en respuesta a alérgenos o parásitos. Los basófilos son similares a los mastocitos, pero se encuentran en la sangre. Los eosinófilos participan en la inflamación asociada a parásitos y en la remodelación tisular.

Los monocitos son células sanguíneas que se originan en la médula ósea y dan lugar a los macrófagos tisulares. Existen dos tipos de monocitos: los clásicos (CD16-) que se convierten en macrófagos tisulares y los no clásicos (CD16++) que patrullan los vasos sanguíneos. Los macrófagos son células fagocíticas que se encuentran en todos los tejidos del cuerpo. Algunos de ellos se originan en precursores fetales durante la hematopoyesis en el saco vitelino y se alojan en varios órganos con morfología y funciones específicas tales como la glía, las células de Kupffer o las de Langerhans; en su conjunto, se denominan macrófagos residentes y se considera que poseen capacidad de autorrenovarse. Los macrófagos derivados de monocitos pueden tener diferentes fenotipos (M1 y M2) según el contexto y participan en la inflamación y la reparación de tejidos.

Las células dendríticas se encuentran en las mucosas y tejidos linfoides. Su función principal es capturar y presentar antígenos a los linfocitos T y así activar una respuesta inmune. Existen diferentes tipos de células dendríticas, incluyendo las clásicas (cDC1 y cDC2), las derivadas de macrófagos (MoDC) y las plasmacitoides (pDC).

Las células linfoides invariantes comparten algunas características con los linfocitos, pero no tienen un receptor de antígeno específico. Incluyen las células NK (natural killer) que matan células infectadas o tumorales, y las células ILCs (linfoides invariantes) que producen citoquinas y participan en la inmunidad innata.

Las células de la inmunidad adaptativa son los linfocitos. Se dividen en dos grupos principales: linfocitos T y B. Por un lado, los linfocitos T son responsables de la inmunidad celular. Pueden ser CD4+ (helper) que ayudan a otras células inmunes mediante la secreción de citocinas y los CD8+ (citotóxicos) que matan células infectadas o tumorales. Por otro lado, encontramos a los linfocitos B, quienes se encargan de la inmunidad humoral y producen anticuerpos que neutralizan patógenos o marcan células para su destrucción. Los linfocitos T y B pueden ser *naïve* (vírgenes) si no han encontrado su antígeno, o efectores o de memoria si ya lo han encontrado, pudiendo en este último caso responder más rápidamente en un segundo encuentro.

Finalmente, los linfocitos B1 y de la zona marginal, los linfocitos $T\gamma\delta$, las células NKT y las células MAIT, son células que tienen receptores de antígeno menos diversos y participan en la inmunidad innata o en respuestas inmunes específicas en tejidos periféricos.

Podemos dividir a los órganos del sistema inmune en primarios, donde se generan las células inmunes, y secundarios, donde se inician las respuestas inmunes adaptativas.

Los órganos primarios son la médula ósea roja y el timo. La médula ósea produce la mayoría de las células inmunes (linfoides y mieloides); se encuentra en huesos del eje central como las costillas, esternón, vértebras y pelvis. Almacena células T de memoria y células plasmáticas que producen anticuerpos. El timo se encuentra ubicado en el mediastino y permite la maduración de los linfocitos T a través de un fenómeno denominado "educación tímica". Se divide en una corteza (abundancia de linfocitos T) y una médula (linfocitos T, células epiteliales tímicas, macrófagos y células dendríticas). Aunque la proporción de médula ósea roja disminuye con el tiempo y es reemplazada por la amarilla junto con el crecimiento de los huesos, su masa permanece relativamente constante e incluso puede aumentar en situaciones de estrés. En cambio, el timo involuciona en la edad adulta.

Los órganos secundarios son los ganglios linfáticos, que capturan antígenos de la linfa. Están distribuidos en grupos y constituidos por linfocitos que ingresan a través de las vénulas de endotelio alto y recirculan de un grupo ganglionar a otro. En un ganglio se pueden reconocer las siguientes estructuras anatómicas: seno marginal ocupado por macrófagos; paracorteza, donde hay células T y células dendríticas; folículos y centros germinales con células B y finalmente cordones medulares que alojan células plasmáticas.

Otro órgano secundario es el bazo. A diferencia de los ganglios es único; en él, los linfocitos reconocen antígenos de la sangre. Se divide en una pulpa roja rica en macrófagos que eliminan células sanguíneas dañadas, y una pulpa blanca con abundantes linfocitos que responden a antígenos sanguíneos.

Los acúmulos linfoides en las mucosas, por ejemplo, las placas de Peyer en el intestino, también poseen características de órganos secundarios pero no poseen una estructura anatómica (cápsula) que permita separarlos de los tejidos en los que se encuentran.

Finalmente es posible considerar la existencia de órganos linfoides terciarios, acúmulos linfoides que aparecen en el contexto de inflamaciones crónicas.

Migración de células linfoides

La migración de las células del sistema inmune es un proceso fundamental para las respuestas inmunitarias, distinguiéndose de otros tipos celulares que, en las personas adultas, sólo migran durante procesos de reparación o regeneración. Este proceso resulta de interacciones complejas entre moléculas de señalización que controlan la quimiotaxis, motilidad y adhesión celular, requiriendo una elevada demanda energética y adaptación a diversos microambientes. Las células inmunes deben superar obstáculos como la navegación por

entornos tridimensionales complejos y la resistencia a tensiones de cizallamiento en vasos sanguíneos.

Las quimiocinas, citocinas quimioatrayentes, actúan como guías moleculares dirigiendo células hacia compartimentos específicos mediante receptores únicos que detectan gradientes químicos. Las células inmunes utilizan un movimiento ameboide, caracterizado por cambios morfológicos rápidos y flexibles, impulsado por el citoesqueleto de actina que controla forma, polaridad y motilidad celular.

La migración ocurre tanto por sangre como por la linfa. La transmigración a través de barreras endoteliales implica una secuencia regulada que incluye selectinas (que permiten el "rodamiento" celular mediante interacciones débiles con carbohidratos) e integrinas (que proporcionan adhesión firme mediante interacciones proteína-proteína). Cada tejido presenta una combinación específica de estas moléculas que regula el acceso de las células inmunes.

El sistema linfático funciona como una vía de vigilancia inmunológica, permitiendo que células dendríticas y antígenos alcancen los ganglios linfáticos. Ejes de señalización específicos de receptores de quimiocinas y sus ligandos, como CCR7-CCL19/CCL21 y CCR5-CCL3/CCL4/CCL5, coordinan la migración de células T y B durante la formación de centros germinales, facilitando la producción de anticuerpos específicos.

La migración de linfocitos a los tejidos periféricos es un proceso complejo regulado por la impronta inmunológica, un fenómeno en el cual el microambiente induce la expresión de moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas que dirigen a los linfocitos a tejidos específicos. Por ejemplo, en el intestino, el ácido retinoico (derivado de vitamina A) induce la expresión de $\alpha 4\beta 7$ y CCR9, que guían a los linfocitos hacia el intestino delgado. En la piel, los derivados de la vitamina D inducen la expresión de CLA, CCR4 y CCR10, que dirigen a los linfocitos hacia la piel. La inflamación puede modular este proceso, como se observa con la expresión de CCR8 en la piel inflamada, que reconoce CCL1 y amplifica el reclutamiento de células inmunitarias. La microbiota presente en las mucosas también puede modular la migración direccionada mediante la producción de metabolitos como butirato y propionato.

Antígenos y Anticuerpos

Definimos un antígeno como aquella molécula capaz de ser reconocida por alguno de los receptores de la inmunidad adaptativa. Por lo tanto, son antígenos los péptidos derivados de una proteína que son presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y, en ese contexto, son reconocidos por el receptor de las células T (TCR). Las proteínas de las cuales se obtienen estos péptidos también se consideran antígenos. Usualmente se llama "determinante antigénico" a la secuencia de aminoácidos de una proteína que es reconocida por los linfocitos T. También es un antígeno una molécula que es reconocida por los receptores de los linfocitos B (BCR). Los linfocitos B emplean una inmunoglobulina específica de membrana como receptor antigénico que, a diferencia de los linfocitos T, es capaz de reconocer el antígeno en forma

soluble. Además, las inmunoglobulinas del BCR pueden reconocer moléculas de composición no proteica. La porción del antígeno que entra en contacto con la inmunoglobulina se denomina epítipo y un antígeno puede tener uno o más de un epítipo en su estructura. De esta manera, un antígeno puede ser reconocido por diversos linfocitos o, si el antígeno repite el mismo epítipo varias veces en su estructura (por ejemplo, un multímero), puede unirse a varias inmunoglobulinas al mismo tiempo. En general los linfocitos B reconocen epítopos conformacionales, es decir, superficies intrincadas en vez de determinantes antigénicos lineales, como lo hacen los linfocitos T.

Ya que un organismo como el nuestro puede generar una gran cantidad de variaciones de receptores de linfocitos T y B (del orden de un trillón de variaciones posibles, eso es un 1 seguido de 18 ceros), el universo posible de antígenos es muy grande. Sin embargo, no todos los antígenos tienen la capacidad de generar una respuesta inmune. Los antígenos que inducen una respuesta inmune se denominan inmunógenos, mientras que los antígenos que generan tolerancia (es decir evitan una respuesta inmune a pesar del reconocimiento antigénico) se denominan tolerógenos.

Para clasificar los antígenos podemos emplear criterios como su composición (proteicos, glucoproteicos, glucolípidos, etc.), su origen (antígenos propios o autoantígenos, microbianos, alimentarios, ambientales), su obtención (naturales, sintéticos o recombinantes) y muchas otras formas más, siguiendo varios criterios según sea pertinente. Una forma importante de clasificación es en antígenos T dependientes y antígenos T independientes. Cuando un linfocito B reconoce un antígeno proteico con su BCR puede procesarlo, presentarlo en el MHC a los TCR de los linfocitos T y recibir su cooperación. Estos son los antígenos T dependientes y son, por definición, proteínas. Cuando los linfocitos B reconocen antígenos que no pueden procesar y presentar, esos antígenos son T independientes. La gran diferencia entre estos tipos de antígenos, además de su naturaleza proteica, radica en la capacidad de generar memoria inmunológica. Los antígenos T dependientes son los que pueden inducir linfocitos T y B de memoria y respuestas inmunes secundarias intensas y altamente específicas.

Además del reconocimiento antigénico mediante BCR y TCR los linfocitos, una vez activados de forma adecuada, poseen mecanismos efectores específicos. Los linfocitos T CD8+ poseen gránulos citotóxicos para inducir la muerte por apoptosis de células infectadas. Cuando un LT CD8+ reconoce un antígeno como extraño se divide intensamente y su progenie buscará células que expresen ese mismo antígeno para eliminarlas.

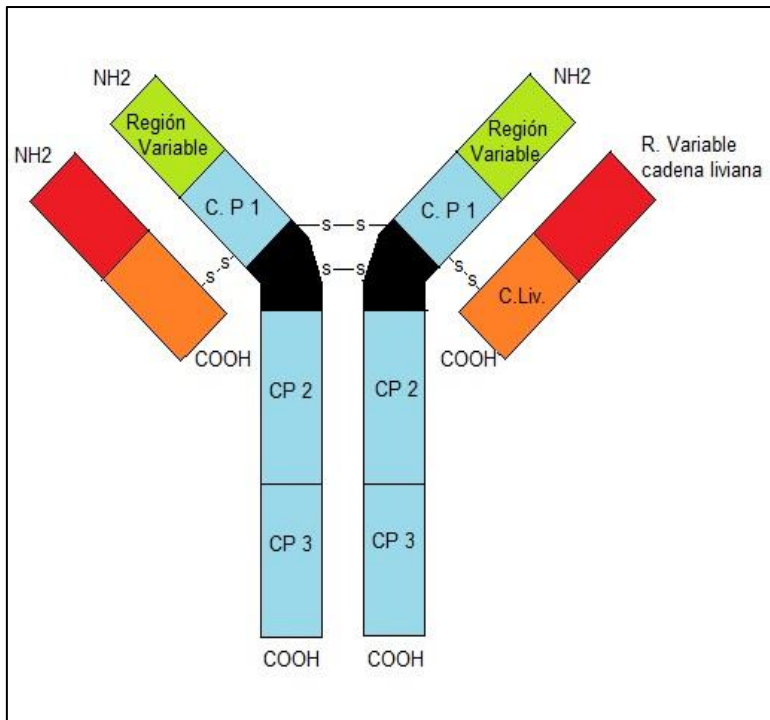
Cuando los linfocitos CD4+ reconocen antígenos extraños, también se dividen intensamente, pero se diferencian en diversos grupos de células según existan otras señales en el microambiente. Estas señales aportadas por la inmunidad innata le indican a los LT CD4+ que tipo de citocinas deben secretar y, por lo tanto, qué tipo de cooperación deben llevar a cabo. Así, los CD4+ se diferencian a células cooperadoras de tipo 1 (Th1) que secretan interferón gamma y activan macrófagos, o Th17 que liberan IL-17 e inducen inflamación con granulocitos, o Th2 que producen IL-4 e IL-5 e inducen inflamación con eosinófilos. Estos “perfiles de diferenciación”

también se observan en los LT CD4+ que cooperan con los LB cuando hay antígenos T dependientes de por medio (los Th foliculares), e inducen distintos tipos de inmunoglobulinas.

Tanto los CD4+ como los CD8+ pueden generar una progenie que se diferencian a células de memoria (Tm) y así producir respuestas secundarias intensas en una reinfección. También pueden originar células reguladoras (Treg), que permiten el control de las respuestas inmunes o generar tolerancia.

Tipos y funciones de inmunoglobulinas

Una inmunoglobulina es un complejo molecular simétrico de cuatro cadenas, dos denominadas pesadas (H) y dos denominadas livianas (L). Cada cadena pesada y liviana posee a su vez una región constante (C) y una región variable (V). Pertenecen a las superfamilias de las inmunoglobulinas porque las cadenas están constituidas por repeticiones de dominios de dos hojas betas plegadas unidas por puentes disulfuro, llamados dominios Ig. La configuración más frecuente son cuatro dominios Ig en cada cadena pesada y dos en la liviana. De éstos, la cadena pesada tiene un dominio Ig para la región V y tres dominios Ig para la región C. En la cadena liviana son uno y uno, respectivamente. El complejo se mantiene unido entre sí mediante puentes disulfuros presentes en las regiones constantes adyacentes a las variables, región que recibe el nombre de bisagra. Las inmunoglobulinas son glicoproteínas, dado que presentan sitios de O-glicosilación en la región bisagra que son ocupados por glicanos de distinta longitud y complejidad (Figura 1.2).

Figura 1.2*Estructura básica de una Inmunoglobulina monomérica*

El par conformado por las regiones variables de cadenas pesadas y livianas es el sitio en el que se produce el reconocimiento y la unión al epítipo del antígeno. Cada inmunoglobulina tiene un par de sitios de reconocimiento idénticos. Eventualmente, las inmunoglobulinas pueden ser secretadas en forma de dímeros o pentámeros, lo que aumenta el número idéntico de sitios de reconocimiento a cuatro o diez, aumentando la capacidad de unión a antígenos con antígenos repetidos, próximos entre sí. Este fenómeno se conoce como avididad de un anticuerpo y depende de la cantidad de sitios de reconocimiento disponibles. Finalmente, cada dominio Ig de las regiones variables posee tres sitios de mayor variabilidad, o regiones hipervariables. Esta parte de la molécula es la que entra en contacto físico con el epítipo del antígeno. La gran variabilidad se obtiene por un proceso distinto de la recombinación somática, durante las divisiones celulares de los linfocitos B, posteriormente al reconocimiento de antígeno y asociado a la cooperación de los Th foliculares. En ese momento el linfocito B genera mutaciones al azar en estas regiones hipervariables con la intención de modificar la afinidad de su inmunoglobulina receptor. Sólo los linfocitos B que aumentan su afinidad por el antígeno sobreviven y se transforman en células plasmáticas productoras de anticuerpos, en un fenómeno que se conoce como “reacción de centro germinal”. En general, las respuestas inmunes secundarias a la reexposición del antígeno generan aumentos dramáticos en la afinidad de los anticuerpos por su antígeno, haciendo más eficientes las respuestas inmunes humorales. Las regiones constantes de las cadenas livianas pueden ser de dos tipos diferentes, κ y λ . Ambos tipos de región constante son funcionalmente equivalentes y su elección dependerá de la selección negativa de linfocitos B en la médula ósea.

Las regiones constantes de las cadenas pesadas definen la función de la inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden estar asociadas a la membrana plasmática, donde cumplen la función de receptor, o pueden ser secretadas para cumplir su función efectora. En humanos existen nueve formas diferentes de inmunoglobulinas (clases o isotipos) que se reconocen por variaciones en las cadenas pesadas y se denominan: IgD, IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 e IgE. Las inmunoglobulinas D y M son las que pueden presentar un dominio de transmembrana en la región constante de las cadenas pesadas y, por lo tanto, actuar como BCR. La secreción de la inmunoglobulina D es muy escasa, mientras que la IgM es secretada como un pentámero. Las otras inmunoglobulinas son secretadas. La IgG se encuentra principalmente en el plasma y posee cuatro variantes, la IgA posee dos isoformas y es secretada como un dímero en las mucosas y la IgE es capturada por mastocitos y eosinófilos.

Cada linfocito B que no ha reconocido aún a su antígeno, expresa IgM e IgD de membrana. Luego del reconocimiento y en coincidencia con las mutaciones en las regiones hipervariables, los linfocitos B pueden hacer un “cambio de clase” modificando la expresión de las cadenas pesadas, permitiendo la producción y secreción de IgM, IgG, IgA o IgE.

Los mecanismos efectores que se asocian a las inmunoglobulinas son diversos. La simple unión de una inmunoglobulina a su antígeno en la superficie de un microorganismo puede impedir el libre tránsito e ingreso de estos en el organismo. De especial importancia son las inmunoglobulinas que se unen a las proteínas que los microorganismos emplean para el ingreso al interior de células en el huésped. Estos mecanismos se conocen como neutralización y la generación de inmunoglobulinas con estas características es una enorme ventaja en la lucha contra un patógeno, evitando su diseminación en el organismo o directamente su entrada. Las IgA son un tipo de inmunoglobulinas en las que la neutralización es relevante, teniendo en cuenta la capacidad de transferirlas hacia el exterior del organismo junto con las secreciones bronquiales, intestinales, las lágrimas o la leche materna. De esta manera la IgA se encuentra localizada de forma estratégica para evitar el ingreso de patógenos. Por las mismas razones, la generación de respuestas inmunes con anticuerpos neutralizantes es también un objetivo deseable al momento de planificar el desarrollo de una vacuna. Finalmente, las toxinas producidas por microorganismos pueden ser inmunogénicas y generar la producción de anticuerpos neutralizantes que impidan el daño sobre las células.

La capacidad de unirse a un antígeno y “marcar” un microorganismo puede también desencadenar otros efectores del sistema inmune para la eliminación de aquellos. La IgM pentamérica y las subclases IgG1 e IgG3 tienen la capacidad de activar el complemento y formar el complejo de ataque de membrana sobre la superficie de bacterias para destruirlas. Esta marcación u “opsonización” permite el reconocimiento del complejo antígeno-anticuerpo y la fagocitosis de este por parte de los neutrófilos y macrófagos. Para ello, las células del sistema inmune poseen receptores de las porciones constantes de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas (también llamada porción Fc). El reconocimiento mediante estos receptores puede inducir también la migración, activación o degranulación de células como neutrófilos y

mastocitos, pero en este último caso las IgE se encuentran previamente unidas a los receptores celulares.

Los anticuerpos también pueden inducir citotoxicidad sobre células infectadas, es decir, pueden marcar células para su destrucción por células NK, macrófagos o linfocitos. La expresión de los receptores Fc como CD16a (FcγRIIIa) favorecen su activación y desencadenan la degranulación y producción de citocinas. Este tipo de respuesta es especialmente importante en el caso de infecciones virales como las de influenza o virus Herpes simple (VHS), donde se reconocen antígenos virales en la membrana de las células infectadas.

En resumen, cada tipo de inmunoglobulina tiene un papel específico y esencial en la defensa del organismo contra infecciones. La IgG es fundamental para la respuesta inmune adaptativa a largo plazo y la inmunidad pasiva en los recién nacidos. La IgA protege las superficies mucosas cruciales para la defensa inmediata. La IgM proporciona una respuesta rápida y eficaz durante las fases iniciales de la infección. La IgE es clave en la defensa contra parásitos y en las respuestas alérgicas, mientras que la IgD contribuye a la activación y maduración de los linfocitos B (Figura 1.3)

Figura 1.3

Funciones y distribución de los principales isotipos de inmunoglobulinas en el humano

Actividad funcional	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE
Neutralización	+	-	++	++	++	++	++	-
Opsonización	-	-	+++	+	++	+	+	-
Sensibilización a células NK	-	-	++	-	++	-	-	-
Sensibilización a mastocitos	-	-	+	-	+	-	-	+++
Activación del complemento	+++	-	++	+	+++	-	+	-
Distribución	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE
Transporte a través del epitelio	+	-	-	-	-	-	+++	-
Transporte a través de placenta	-	-	+++	+	++	+	-	-
Difusión a sitios extravasculares	-	-	+++	+++	+++	+++	++	+

Preguntas Guía

1. ¿En qué se diferencian los órganos linfoides primarios y secundarios?
2. ¿Qué fenómenos ocurren en los órganos linfoides primarios durante la maduración de células mieloides y linfoides?

3. ¿Qué eventos suceden en los órganos linfoides secundarios?
4. Explique qué es un antígeno
5. Describa qué tipos de antígenos existen
6. Explique qué es un anticuerpo
7. ¿Qué tipos de anticuerpos hay y qué funciones cumplen?

Referencias

- Aegerter, H., Lambrecht, B. y Jakubzick, C.V. (2022). Biology of Lung Macrophages in Health and Disease. *Immunity*, 55 (9): 1564–1580.
- Burn, G., Foti A., Marsman G., Patel, D. y Zychlinsky A. (2021). The Neutrophil. *Immunity* 54 (7): 1377–1391.
- Chastney, M., Kaivola J., Leppänen V. y Ivaska J.(2024). The Role and Regulation of Integrins in Cell Migration and Invasion. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*, September, 1–21.
- Cruz de Casas, P., Knöpper K., Sarkar R. y Kastenmüller W. (2023). Same yet Different - How Lymph Node Heterogeneity Affects Immune Responses. *Nature Reviews Immunology*, December, 1–17.
- Elsner, R. y Shlomchik M. (2020). Germinal Center and Extrafollicular B Cell Responses in Vaccination, Immunity, and Autoimmunity. *Immunity* 53 (6): 1136–1150.
- Hoeffel, G. y Ginhoux, F. (2018). Fetal Monocytes and the Origins of Tissue-Resident Macrophages. *Cellular Immunology* 330 (August): 5–15.
- Morrison, SJ. y Scadden D. (2014). The Bone Marrow Niche for Haematopoietic Stem Cells. *Nature* 505 (7483): 327–334.
- Sender, R., Weiss, Y., Navon Y., Milo, I., Azulay, N., Keren, L., Fuchs, S., Ben-Zvi, D., Noor, E. y Milo, R. (2023). The Total Mass, Number, and Distribution of Immune Cells in the Human Body. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 120 (44): e2308511120.
- Soderholm, A.T. y Pedicord, V.A. (2019). Intestinal Epithelial Cells: At the Interface of the Microbiota and Mucosal Immunity. *Immunology* 158 (4): 267–280.
- Sun, L., Su, Y., Jiao A., Wang X. y Zhang, B. (2023). T Cells in Health and Disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8 (1): 235.
- Victora, G.D. y Nussenzweig M. (2022). Germinal Centers. *Annual Review of Immunology*, 40(1): 413–442.

CAPÍTULO 2

Respuesta inmune a las infecciones

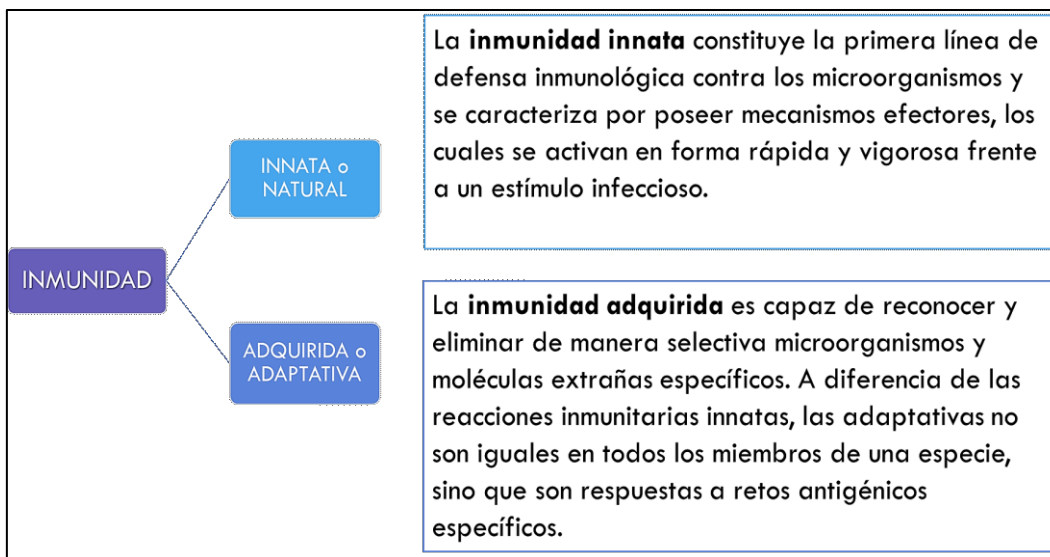
Nora Beatriz Molina

El sistema inmune es una compleja red de células, tejidos y órganos que se encargan de la defensa del cuerpo ante las infecciones. Mediante una serie de etapas que se denominan respuesta inmune, el sistema inmunológico reconoce y distingue a los microorganismos patógenos y reacciona contra ellos.

La respuesta inmune se clasifica en dos grandes categorías: la respuesta inmune innata o natural y la respuesta inmune adquirida o adaptativa. (Figura 2.1)

Figura 2.1

Respuesta inmune innata y adquirida



Respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata incluye las barreras físicas y químicas, así como diferentes tipos de células y proteínas. Las barreras naturales del sistema inmune son el primer nivel de defensa del organismo contra los microorganismos y los agentes patógenos (Tabla 2.1)

Tabla 2.1*Componentes de las barreras naturales*

Componentes	Características y funciones
Superficies cutáneas	Las células de la epidermis (queratinocitos) producen queratina, una sustancia difícil de degradar para la mayoría de los microorganismos. La superficie cutánea contiene células muertas y queratina; estas células se desprenden y favorecen la eliminación mecánica de las bacterias adheridas a la piel. El pH ácido y la baja humedad de la piel inhiben el crecimiento de la mayoría de las bacterias patógenas. Los folículos pilosos, sebáceos y glándulas sudoríparas producen ácidos grasos con efecto tóxico sobre las bacterias.
Mucosas	El moco es una mezcla de glicoproteínas de acción antimicrobiana, producida por células especializadas. Actúa como lubricante y atrapa a las bacterias dentro de su matriz, evitando que se adhieran al epitelio y facilitando su expulsión. La lisozima y lactoferrina son proteínas con función bactericida; la lisozima induce la lisis bacteriana, principalmente de bacterias gram positivas y la lactoferrina inhibe el crecimiento bacteriano, porque secuestra al hierro que es un factor de crecimiento microbiano. Las defensinas son polipéptidos catiónicos con efectos microbicidas sobre bacterias, hongos y virus envueltos; en las criptas de la mucosa intestinal, las defensinas regulan el crecimiento de la flora normal entérica y defienden la mucosa de los microorganismos patógenos. La IgA secretoria es una inmunoglobulina presente en el moco que se une específicamente a los microorganismos y favorece la opsonización y destrucción microbiana.
Tracto respiratorio	Las bacterias pueden adherirse a la mucosa de la tráquea y ser eliminadas por el movimiento de los cilios de la superficie de las células epiteliales. La tos y el estornudo son mecanismos adicionales que promueven la eliminación de posibles patógenos.
Tracto digestivo	El pH ácido del estómago y las enzimas hidrolíticas destruyen a la mayoría de los microorganismos. El movimiento peristáltico colabora en la eliminación de microorganismos.
Tracto urinario	La orina arrastra a los microorganismos capaces de adherirse a las mucosas del tracto urinario, mientras que su pH ácido tiende a mantener a la vejiga y la uretra libres de microorganismos.
Tracto genital	En el epitelio vaginal, la microbiota habitual produce metabolitos ácidos (ácido láctico). En las trompas de Falopio se produce moco y los cilios celulares se mueven constantemente expulsándolo del área.
Conjuntiva	El parpadeo y las lágrimas, que poseen una elevada concentración de lisozima, inhiben la colonización bacteriana.

La piel y las mucosas de los tractos digestivo, respiratorio y genitourinario constituyen las barreras físicas, cada una con una serie de características propias. La piel posee una superficie menor en comparación con la respiratoria y digestiva, así como la presencia de un epitelio estratificado con secreciones sebáceas y de sudor, combinada con la capa córnea externa de células epiteliales muertas. Además de las células epiteliales podemos destacar la presencia de abundantes linfocitos de memoria, células dendríticas y células de Langerhans (macrófagos residentes) interdigitadas entre los queratinocitos.

El tracto digestivo, y en particular el intestino, posee una superficie extraordinaria pero una sola capa de células epiteliales. Está recubierto por una extensa capa de moco secretada por abundantes glándulas submucosas y células caliciformes. Las criptas de las glándulas intestinales poseen células que, además de intervenir en fenómenos endocrinos, son capaces de producir sustancias que modulan a la microbiota. La presencia de células del sistema inmune es abundante, formando acúmulos linfoides llamados placas de Peyer. Se pueden observar células dendríticas, linfocitos de memoria, linfocitos T reguladores, linfocitos B en centros germinales, eosinófilos y células plasmáticas. La masa y densidad de microorganismos es máxima, principalmente en el intestino grueso.

El tracto respiratorio posee áreas de epitelio plano estratificado (nasal), simple pseudoestratificado ciliado (bronquial) y plano simple (alveolar). La delgadez del epitelio alveolar, que permite la hematosis, supone un riesgo ante la presencia de microorganismos. El epitelio nasal y el bronquial con sus secreciones de moco y cilios retienen y eliminan la mayoría de las partículas y microorganismos aspirados. A su vez, el epitelio alveolar es patrullado por macrófagos alveolares (otra forma de macrófagos residentes) que, junto a sustancias secretadas en el surfactante, eliminan aquellos microorganismos que hubieran llegado hasta los alvéolos. Al igual que en otras mucosas pueden observarse células dendríticas, linfocitos de memoria, linfocitos T reguladores, linfocitos B en centros germinales, eosinófilos y células plasmáticas, aunque en menor cantidad que en la piel o el intestino.

Finalmente, el tracto genitourinario está revestido en su mayor parte por un epitelio plano estratificado, adaptado para resistir la fricción, el paso de la orina y secreciones. A lo largo de las vías urinarias, este epitelio y el flujo de orina facilitan la eliminación de microorganismos, aunque hoy se reconoce la presencia de una microbiota urinaria escasa pero diversa, con un papel en la salud y la enfermedad aún en estudio. En contraste, el epitelio vaginal alberga una microbiota compleja y dinámica, dominada por especies de *Lactobacillus*. Estas bacterias producen ácido láctico, creando un ambiente que inhibe el crecimiento de patógenos. Además, la microbiota vaginal produce sustancias antimicrobianas y compite con los patógenos por los recursos, contribuyendo de manera crucial a la defensa contra infecciones.

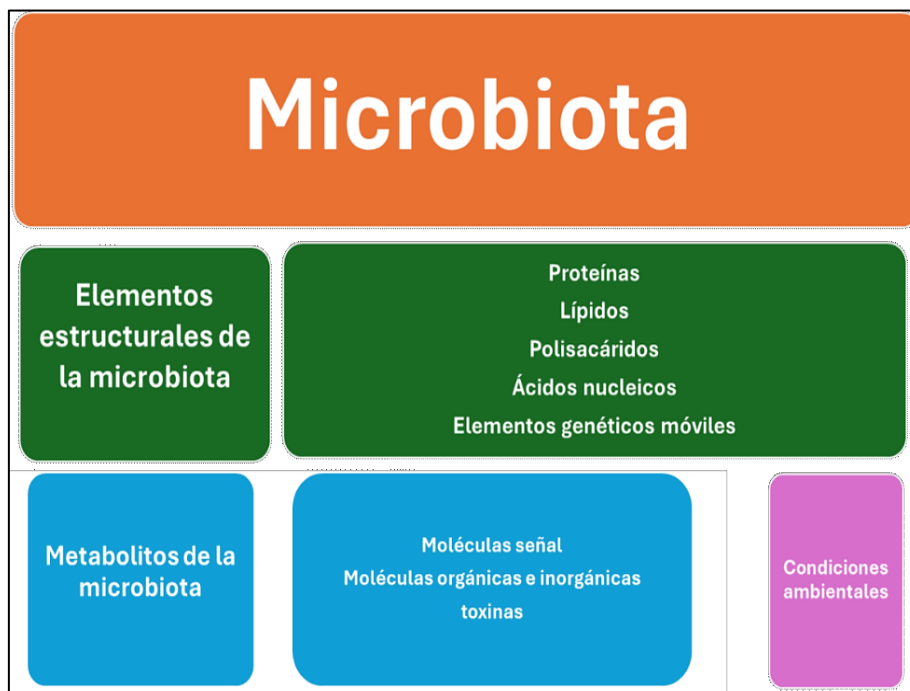
Microbiota habitual

La microbiota habitual es el conjunto de microorganismos comensales, mutualistas o patógenos que se encuentra sobre la superficie corporal o dentro de cavidades abiertas del cuerpo humano, como por ejemplo, la piel, la orofaringe, el tracto gastrointestinal, las conjuntivas, o el tracto genitourinario. Estas comunidades tienen relaciones simbióticas y mutualistas con las células humanas; son imprescindibles para el correcto funcionamiento del organismo, mantienen comunicación con el sistema inmunitario y tienen funciones homeostáticas que condicionan la salud.

El término microbioma incluye a los microorganismos, los metabolitos, los elementos genéticos móviles (transposones, plásmidos) y el hábitat donde se encuentran asentados los microorganismos (figura 2.2). El conocimiento de los microbiomas se ha ampliado tras la utilización de las técnicas moleculares de secuenciación masiva. Para determinar la composición de la microbiota se han empleado comúnmente cultivos microbiológicos, pero en la actualidad se sabe que la mayor parte de estos microorganismos no pueden ser cultivados con medios tradicionales, por lo que su detección es posible únicamente mediante secuenciación de ADN. Las técnicas moleculares han permitido identificar y asignar taxonómicamente a la mayoría de los microorganismos, sin necesidad de cultivarlos. Con la secuenciación masiva y el desarrollo de la metagenómica se ha avanzado en la identificación de especies y la ampliación del conocimiento en cuanto a función, simbiosis y metabolismo de la microbiota, así como sus repercusiones en la salud humana.

Figura 2.2

Composición del microbioma humano



Respuesta Inmune Innata

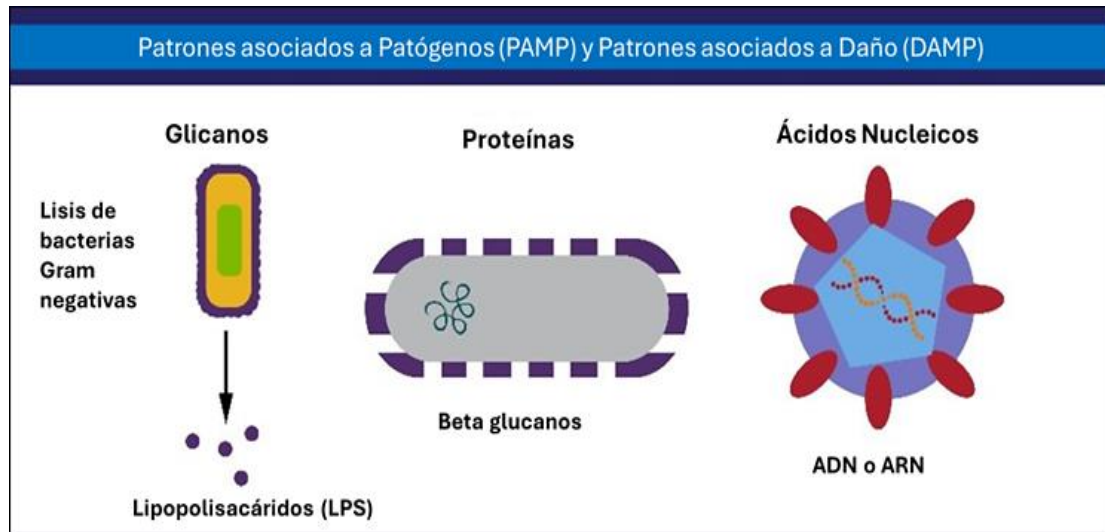
Entre las células del sistema inmune innato se encuentran los macrófagos y los neutrófilos, que fagocitan y destruyen patógenos. Las células NK (natural killers) juegan un papel crucial al destruir células infectadas por virus y células tumorales. Además, las proteínas del complemento pueden opsonizar patógenos, facilitando su fagocitosis, y activar la cascada del complemento que culmina en la lisis del patógeno (tabla 2.2).

Tabla 2.2

Componentes de la inmunidad innata

Inmunidad innata	
Células	Leucocitos polimorfonucleares Células fagocíticas Células natural killer
Componentes moleculares solubles	Sistema de complemento Proteínas de fase aguda Citoquinas

Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés, de *Pattern Recognition Receptor*) son receptores presentes en las células del sistema inmune innato que identifican moléculas asociadas con patógenos microbianos. Estos receptores son los principales sensores de la respuesta inmune innata y su función es reconocer moléculas indispensables para la sobrevivencia de los patógenos, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (o PAMP, por sus siglas en inglés). Dichas moléculas incluyen hidratos de carbono bacterianos, (lipopolisacáridos o manosa), ácidos nucleicos, peptidoglicano, ácidos lipoteicoicos; formilmetionina y lipoproteínas (figura 2.3).

Figura 2.3*Patrones Moleculares asociados a patógenos (PAMP) y asociados a daño (DAMP)*

Las células contienen PRR, las cuales pueden reconocer directamente las estructuras moleculares específicas en la superficie de patógenos, células huésped apoptóticas y células senescentes dañadas; identifican infecciones inducidas por patógenos a partir de ciertos componentes, como proteínas y motivos moleculares de patógenos (PAMP y DAMP). Los PRR incluyen *Toll-Like receptors* (TLR), *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors* (*Nod-like receptors*, NLRs, y *C-type lectin receptors* (CLR). La activación de los PRR desencadena una cascada de señalización que resulta en la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y otros mediadores inflamatorios. Esta respuesta inflamatoria inicial es crucial para contener la infección y reclutar células inmunes adicionales al sitio de infección. La activación de los PRR colabora con la activación de las células presentadoras de antígenos para que estas puedan activar eficazmente a los linfocitos T, en lo que será la respuesta de inmunidad específica contra ese antígeno. En los últimos años, el aumento de las investigaciones sobre el reconocimiento y la unión de los PRR y sus ligandos ha impulsado considerablemente la comprensión de las diferentes vías de señalización de los PRR y ha aportado ideas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario, las infecciones e incluso tumores.

Respuesta Inmune Adquirida

La respuesta inmune adquirida o adaptativa es mediada por linfocitos T y B. Estas células se caracterizan por su capacidad de reconocer antígenos específicos mediante receptores altamente específicos. Como se ha explicado en el capítulo anterior, los linfocitos T se dividen en dos principales subtipos: células T citotóxicas (CD8+) y células T helper (CD4+). Las células T citotóxicas son responsables de destruir células infectadas por patógenos intracelulares,

mientras que las células T helper coordinan la respuesta inmune mediante la secreción de citocinas que activan otras células inmunes.

Los linfocitos B activados se diferencian en células plasmáticas; estas células serán las encargadas de producir anticuerpos específicos contra el antígeno. La función de los anticuerpos será la de neutralizar microorganismos patógenos y toxinas, opsonizar patógenos para facilitar su fagocitosis y activar la cascada del complemento.

El mecanismo de acción de la respuesta inmune adaptativa se inicia con la presentación de antígenos. Las células presentadoras de antígenos (CPA), como los macrófagos y las células dendríticas, fagocitan a los patógenos, procesan sus proteínas y presentan los péptidos derivados en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en su superficie. Los linfocitos T reconocen estos péptidos presentados por el MHC mediante sus receptores de células T (TCR). Una vez que las células T helper reconocen a un antígeno, se produce su activación y comienzan a secretar citocinas que estimulan la activación y proliferación de los linfocitos T citotóxicos y de los linfocitos B.

La expansión clonal de linfocitos específicos para el antígeno que es generada, permite una respuesta eficaz contra el patógeno (Tabla 2.3).

Tabla 2.3

Componentes de la inmunidad adquirida

Inmunidad adquirida	
Células	Linfocitos T (CD4 y CD8)
	Linfocitos B
	Células plasmáticas
	Células presentadoras de antígenos
Componentes moleculares solubles	Anticuerpos (inmunoglobulinas)
	Citoquinas

En resumen, ambas respuestas inmunes poseen características diferenciales pero participan en forma coordinada para la eliminación de los microorganismos patógenos. En la tabla 2.4 se presentan las principales características de la inmunidad innata y adquirida.

Tabla 2.4*Principales características de la inmunidad innata y adaptativa*

Característica	Inmunidad Innata	Inmunidad Adaptativa
Tiempo de respuesta	Rápida (minutos a horas)	Lenta (días a semanas)
Diversidad de receptores	Limitada	Alta
Memoria inmunológica	Memoria por entrenamiento (cambios epigenéticos)	Memoria clásica (selección de clones)
Células involucradas	Neutrófilos, macrófagos, células NK	Linfocitos T y B
Receptores	Receptores de patrón (PRR)	Receptores específicos (TCR y BCR)
Función principal	Primera línea de defensa	Defensa específica y memoria
Activación	Activada por patrones moleculares comunes	Activada por antígenos específicos
Duración de la respuesta	Corto plazo	Largo plazo
Mecanismos efectores	Fagocitosis, citotoxicidad, inflamación, respuesta antiviral	Producción de anticuerpos, citotoxicidad mediada por células T, cooperación de células T
Mecanismos de control	Regulación por citoquinas, apoptosis	Regulación por citoquinas, células T reguladoras

Antígenos

Como se mencionó en el capítulo anterior, un antígeno es cualquier molécula o estructura que es reconocida por el sistema inmunológico y es capaz de inducir una respuesta inmune. Los antígenos pueden ser de origen externo (exógeno) como bacterias, virus, hongos, parásitos y toxinas, o de origen interno (endógeno) como células infectadas por virus o células tumorales.

Los antígenos juegan un papel crucial en la activación y regulación de la respuesta inmune, ya que su reconocimiento es el primer paso para la defensa del organismo contra infecciones. Los antígenos presentan dos propiedades: inmunogenicidad y antigenicidad. La antigenicidad se define como la capacidad de inducir una respuesta inmune. No todos los antígenos son igualmente inmunogénicos; las proteínas suelen ser más inmunogénicas que los polisacáridos y los lípidos. La antigenicidad es la capacidad de ser específicamente reconocido por los receptores de antígenos en las células B y T. Esta especificidad está determinada por la estructura molecular del antígeno.

Composición de los antígenos

Los antígenos pueden ser proteínas, polisacáridos, lípidos o ácidos nucleicos. Las proteínas son los antígenos más comunes y potentes debido a su compleja estructura tridimensional y diversidad de epítomos (partes específicas del antígeno que son reconocidas por los receptores de las células inmunes). Los polisacáridos también pueden ser inmunogénicos, especialmente en las bacterias, donde forman parte de la cápsula o la pared celular. Los lípidos y ácidos nucleicos son menos inmunogénicos por sí mismos, pero pueden convertirse en antígenos cuando se asocian con proteínas o polisacáridos.

Epítomos de un antígeno

Las porciones o fragmentos reales de un antígeno que reaccionan con receptores en linfocitos B y linfocitos T, y con moléculas de anticuerpos, se denominan epítomos o determinantes antigénicos; el tamaño de un epítomo es equivalente a 5-15 aminoácidos o 3-4 residuos de azúcar. Algunos antígenos, como los polisacáridos, suelen tener muchos epítomos, pero todos de la misma especificidad y antigenicidad; esto se debe a que los polisacáridos pueden estar compuestos por cientos de azúcares con cadenas laterales de azúcar ramificadas, pero generalmente contienen solo uno o dos azúcares diferentes.

Otros antígenos como las proteínas, suelen tener muchos epítomos con diferente especificidad y antigenicidad. Esto se debe a que las proteínas suelen tener cientos de aminoácidos de longitud y están compuestas por 20 aminoácidos diferentes. Ciertos aminoácidos son capaces de interactuar con otros aminoácidos en la cadena proteica, lo que favorece que la proteína se pliegue sobre sí misma y asuma una forma tridimensional compleja. Por ende, las proteínas son más inmunogénicas que los polisacáridos.

Un microorganismo tiene muchas proteínas y polisacáridos diferentes en su superficie, y cada proteína puede tener muchos epítomos diferentes. Por lo tanto, las respuestas inmunitarias se dirigen contra diversos epítomos de muchos antígenos distintos del mismo patógeno.

Antígenos Timo dependientes y Timo independientes

La inmunidad adaptativa es una parte esencial del sistema inmune que proporciona una defensa específica y duradera contra los patógenos. A diferencia de la inmunidad innata, que es rápida pero inespecífica, la inmunidad adaptativa tarda más en activarse pero es altamente específica y puede recordar patógenos anteriores, lo que le permite responder de una manera más eficaz en las futuras infecciones. La existencia de dos tipos de antígenos en la respuesta adquirida—antígenos timo-dependientes y timo-independientes—es crucial para la diversidad y efectividad del sistema inmunológico adaptativo. Esta diferenciación permite al sistema

inmunológico adaptarse y responder de manera adecuada a diferentes tipos de patógenos y situaciones inmunológicas.

Antígenos Timo-Dependientes

Como ya se explicó, los antígenos timo-dependientes (AG-TD) son aquellos que necesitan la colaboración de células T helper (CD4+) para inducir una respuesta inmunológica efectiva. Esta colaboración es esencial porque en primer lugar, la interacción entre células T helper y linfocitos B amplifica la respuesta inmune; en segundo lugar, las células T helper promueven la formación de células B de memoria, que son cruciales para una respuesta rápida y eficaz en caso de reexposición al mismo antígeno; y por último, las células T helper ayudan a los linfocitos B a someterse a hipermutación somática y maduración por afinidad en los centros germinales, resultando en anticuerpos de alta afinidad que pueden neutralizar eficazmente los patógenos. Los antígenos timo-dependientes suelen ser proteínas. Estas moléculas tienen una estructura compleja que facilita su procesamiento y presentación por las CPA a las células T. Además, estos antígenos son procesados por las CPA y presentados en el contexto de moléculas MHC clase II, lo que permite su reconocimiento por células T helper. (Tabla 2.5)

Antígenos Timo-Independientes

Los antígenos timo-independientes (AG-TI) pueden activar directamente a los linfocitos B sin la necesidad de ayuda de las células T helper. Este tipo de activación es esencial para proporcionar una respuesta inmune rápida en situaciones donde la ayuda de las células T no está disponible o es limitada. La activación directa de los linfocitos B permite una respuesta rápida contra patógenos que expresan antígenos timo-independientes, especialmente en etapas tempranas de la infección. Además, la capacidad de responder a antígenos no proteicos (como polisacáridos) amplía el repertorio de respuesta del sistema inmunológico, proporcionando una defensa adicional contra diferentes tipos de patógenos. Los antígenos timo-independientes son a menudo polisacáridos, lipopolisacáridos y otros componentes repetitivos de la superficie bacteriana. Estas moléculas pueden unirse a múltiples receptores de linfocitos B (BCR) simultáneamente, induciendo una activación policlonal. Además, las respuestas a antígenos timo-independientes suelen ser menos duraderas y no generan una memoria inmunológica robusta, lo que significa que la inmunidad proporcionada es menos efectiva en la protección a largo plazo. (Tabla 2.5)

Cuando un patógeno invade el organismo, sus antígenos son reconocidos por el sistema inmunológico innato y adaptativo. En la fase innata, los macrófagos y las células dendríticas fagocitan el patógeno y procesan sus antígenos. Estos fragmentos antigénicos son presentados en la superficie de las CPA junto con moléculas del MHC. Las células T helper (CD4+) reconocen los antígenos presentados por MHC clase II en las CPA mientras que las células T citotóxicas (CD8+) reconocen antígenos presentados por MHC clase I en las células infectadas.

Tabla 2.5*Características de las respuestas timo independiente y timodependiente*

Tipo de antígeno (Ag)	Timo independiente (AG-TI)	Timo dependiente (AG-TD)
Especificidad frente al Ag	Si	Si
Colaboración celular de linfocitos T-B	No	Si
Células que procesan y presentan Ag	Linfocito B (CD5+)	Células presentadoras de Ag (CPA)
Memoria inmunológica	No	Si
Maduración de la respuesta inmune	No	Si
Aumento de la Afinidad de los Ac	No	Si
Cambio de isotipo de inmunoglobulina durante la respuesta inmune	No	Si

Esta interacción desencadena la activación y proliferación de las células T específicas para el antígeno, así como la activación de los linfocitos B, que se diferencian en células plasmáticas y producen anticuerpos específicos contra el antígeno. Estos anticuerpos pueden neutralizar directamente los patógenos, opsonizarlos para facilitar su fagocitosis por los macrófagos, o activar el sistema del complemento para destruir las células infectadas. La especificidad de los anticuerpos y células T garantiza que la respuesta inmune es altamente dirigida y eficaz, proporcionando una defensa robusta contra infecciones presentes y futuras gracias a la memoria inmunológica.

Desde una perspectiva evolutiva, la existencia de dos tipos de antígenos permite al sistema inmunológico adaptarse a una amplia gama de desafíos infecciosos. Los antígenos timo-dependientes proporcionan una respuesta inmune robusta y duradera contra patógenos proteicos, mientras que los antígenos timo-independientes permiten una respuesta rápida y eficaz contra patógenos con estructuras repetitivas como bacterias encapsuladas.

Respuesta Inmune Primaria y Secundaria

Los antígenos Timo dependiente (AG-TD) generan memoria inmunológica en el organismo, por lo tanto, los encuentros sucesivos con el antígeno serán diferentes. La respuesta inmune primaria ocurre cuando el organismo se expone por primera vez a un patógeno. El reconocimiento inicial del patógeno por el sistema inmune innato activa la inflamación y recluta células presentadoras de antígenos al sitio de infección. Estas células presentan antígenos a los linfocitos T, que se activan y proliferan. Durante la respuesta primaria, los linfocitos B también se activan y se diferencian en células plasmáticas, produciendo anticuerpos específicos contra el patógeno. Sin embargo, la producción de anticuerpos y la proliferación de linfocitos es lenta,

resultando en un periodo de varios días antes de que se observe una respuesta inmune adaptativa eficaz (Tabla 2.6).

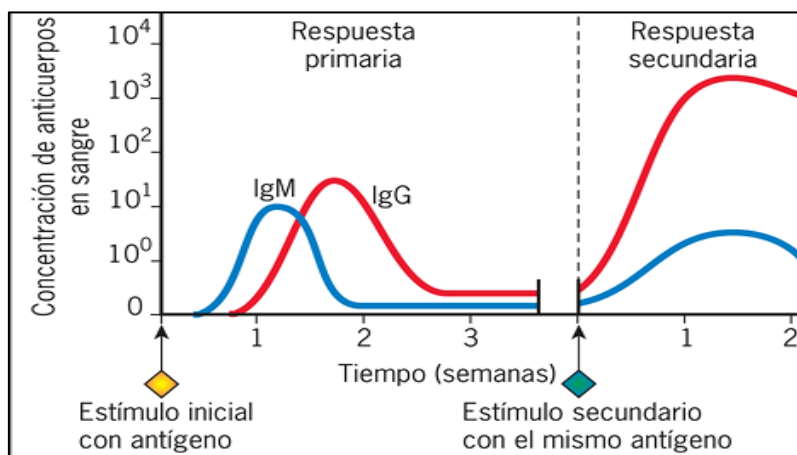
La respuesta inmune secundaria se produce cuando el organismo se encuentra nuevamente con el mismo antígeno (AG-TD). Gracias a la memoria inmunológica, los linfocitos T y B específicos para el patógeno se han mantenido en estado de reposo después de la primera infección. Estos linfocitos de memoria pueden responder más rápidamente y de manera más eficaz ante una segunda exposición. La respuesta inmune secundaria se caracteriza por una proliferación rápida de linfocitos de memoria y una producción inmediata de grandes cantidades de anticuerpos. Esta respuesta suele ser suficiente para neutralizar el patógeno antes de que cause síntomas clínicos, proporcionando una protección más eficiente y duradera (Tabla 2.6).

La fuerza de unión antígeno-anticuerpo (AG-AC) se conoce como afinidad. A mayor fuerza de unión, mayor complementariedad epítopo-paratopo y por ende, mayor afinidad. Este tipo de unión se consigue con cuando la fuerza de unión AG-AC es de alta afinidad. En síntesis, una mayor afinidad indica que hubo maduración de la respuesta inmune. Un mecanismo inmunológico para la generación de AC de alta afinidad es la producción de cambios muy pequeños en una región variable (región V) de las inmunoglobulinas. Estos cambios aparecerán solamente en los clones de linfocitos B que han sido estimulados por el Ag original. Este proceso llamado maduración de la respuesta inmune da lugar al aumento de la afinidad de los Ac frente a un mismo Ag a medida que la respuesta inmune evoluciona.

En resumen, los AG-TD producen una respuesta inmune con memoria inmunológica por lo que, cada nuevo ingreso del AG-TD a un organismo genera una respuesta inmune más rápida y duradera que la anterior. En este caso se observa una respuesta inmune primaria (primer ingreso de AG-TD) y respuesta inmune secundaria (ingresos sucesivos del AG-TD) (Figura 2.4). Por el contrario, los AG-TI estimulan determinados linfocitos B (CD5+) para que se desencadene la producción de IgM específica, pero no son capaces de dejar memoria inmunológica, es decir, una vez eliminado el AG-TI, no queda registro inmune en el organismo.

Figura 2.4

Cinética de la respuesta inmune primaria y secundaria



La memoria inmunológica es fundamental para la generación de protección inmune frente a las infecciones. La inmunización por medio de las vacunas consiste en aplicar antígenos para desafiar al sistema inmune con antígenos (respuesta primaria) y cuando el individuo se enfrente a los microorganismos ya posea memoria para reconocerlos y desencadenar una respuesta más eficiente para combatir la infección (respuesta secundaria). Por el contrario, los Ag-TI no generan memoria inmunológica, por lo tanto no son adecuados para utilizarlos como antígenos vacunales. En estos casos, las vacunas aplican una estrategia distinta y mezclan en la misma vacuna AG-TI y AG-TD (vacunas conjugadas) que generan memoria y protección frente a futuras infecciones.

Tabla 2.6

Características de la respuesta inmune adaptativa primaria y secundaria

Característica	Respuesta Inmune Primaria	Respuesta Inmune Secundaria
Tiempo de respuesta	Lenta (mayor a siete días)	Rápida (menor a siete días)
Período pre serológico	más largo	más corto
Intensidad de la respuesta	Menor	Mayor
Células involucradas	Linfocitos vírgenes (T y B)	Linfocitos de memoria (T y B)
Naturaleza del antígeno	Diversa	Proteica
Isotipos de anticuerpos producidos	IgM > IgG	IgG > IgM, presencia de IgA o IgE según el origen del antígeno
Afinidad de anticuerpos	Baja	Alta
Producción de anticuerpos	Menor cantidad	Mayor cantidad
Memoria inmunológica	Formación de memoria	Activación de memoria
Mecanismos de control	Regulación por citoquinas, apoptosis	Regulación por citoquinas, células T reguladoras

Inmunidad Activa y Pasiva

La inmunidad activa se refiere a la protección que se desarrolla como resultado de la exposición a un antígeno, ya sea a través de una infección natural o mediante la vacunación. Este tipo de inmunidad implica la activación del sistema inmunológico, la producción de anticuerpos específicos y la generación de células de memoria. La inmunidad activa es duradera y proporciona una protección a largo plazo contra la reexposición al mismo patógeno.

La inmunidad pasiva se refiere a la transferencia de anticuerpos de una fuente externa a un individuo ya sea por vía transplacentaria, lactancia materna o mediante un suero inmune (inmunoglobulinas terapéuticas). Este tipo de inmunidad proporciona protección inmediata pero temporal, ya que los anticuerpos no son producidos por el propio sistema inmunológico del individuo y, por tanto, no se genera memoria inmunológica (Tabla 2.7)

Tabla 2.7*Inmunidad activa y pasiva*

Inmunidad	Natural	Artificial
Activa	Infección natural (enfermedad infecciosa)	Inmunización (aplicación de antígenos vacunales)
Pasiva	Transferencia de anticuerpos maternos (vía transplacentaria)	Aplicación de sueros inmunes (anticuerpos preformados)

Desarrollo del Sistema Inmune Fetal

El sistema inmunológico comienza a desarrollarse tempranamente en la vida fetal. Los primeros signos de actividad inmunológica se observan en el hígado fetal, que actúa como el principal órgano hematopoyético hasta aproximadamente la semana 12 de gestación. Posteriormente, la médula ósea fetal asume esta función. Durante el desarrollo fetal, los linfocitos B comienzan a surgir alrededor de la octava semana de gestación. Estos linfocitos son responsables de la producción de inmunoglobulinas. A partir de la semana 20, los linfocitos B en el bazo y los ganglios linfáticos fetales comienzan a sintetizar inmunoglobulinas IgM, aunque en cantidades limitadas. La IgM fetal puede indicar infecciones intrauterinas, ya que no atraviesa la placenta y su presencia refleja exclusivamente la respuesta inmune del feto. La IgG, que es crucial para la protección neonatal, es transportada de la madre al feto a través de la placenta, proporcionando así inmunidad pasiva al recién nacido. Este proceso alcanza su pico máximo al término del embarazo, asegurando que el recién nacido tenga niveles elevados de IgG, que son esenciales para la defensa contra patógenos en los primeros meses de vida.

Respuesta Inmune Humoral en el Recién Nacido

La respuesta inmune humoral en el recién nacido incluye la inmunidad pasiva y activa.

Inmunidad Pasiva: transferencia materna de anticuerpos

Al nacer, el recién nacido depende en gran medida de la inmunidad pasiva adquirida de la madre. Las IgG transferidas a través de la placenta proporcionan una protección inmediata contra las infecciones. Esta inmunidad pasiva es temporal, ya que los niveles de IgG materna disminuyen gradualmente durante los primeros seis meses de vida. Además de la transferencia placentaria de IgG, la lactancia materna juega un papel crucial en la protección inmunológica del recién nacido. La leche materna contiene altos niveles de IgA secretora, que protege las mucosas del tracto gastrointestinal del bebé contra patógenos. También contiene otros factores inmunológicos, como lactoferrina y oligosacáridos, que contribuyen a la defensa inmune.

Inmunidad activa: desarrollo de la inmunidad activa

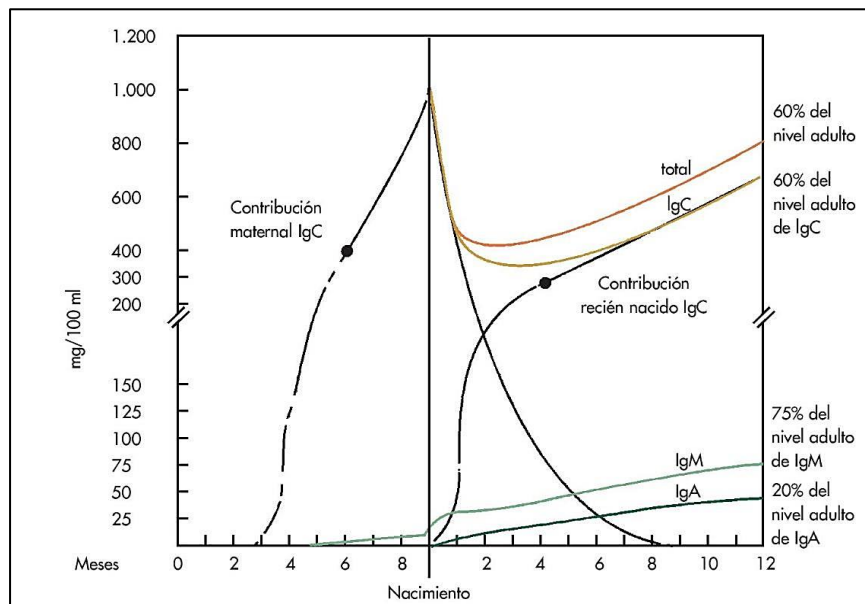
El sistema inmunológico del neonato comienza a activarse y desarrollarse rápidamente después del nacimiento. Los linfocitos B comienzan a producir inmunoglobulinas, aunque la

respuesta es inicialmente limitada y menos efectiva en comparación con la de un individuo adulto. La producción de IgM es la primera en aumentar, seguida por la IgG e IgA. La IgG materna es reemplazada paulatinamente por la IgG propia, que comienza a sintetizarse entre la segunda y cuarta semana de vida. Sin embargo, la maduración del sistema inmune demora entre 12 y 15 meses en completarse. (Figura 2.5)

La respuesta inmune humoral del recién nacido es menos diversa y afinada, pero se desarrolla a medida que el sistema inmune se expone a antígenos ambientales y patógenos. Las vacunas infantiles juegan un papel crucial en este proceso, estimulando la producción de anticuerpos específicos y fortaleciendo la respuesta inmune del niño.

Figura 2.5

Cinética de la producción de anticuerpos en el feto y el recién nacido



En resumen, el sistema inmunológico está compuesto por mecanismos innatos y adaptativos que trabajan de manera coordinada para proteger al organismo contra infecciones. La respuesta inmune primaria establece la base para la memoria inmunológica, mientras que la respuesta inmune secundaria proporciona una protección más rápida y eficaz en caso de reinfección. La diferencia entre antígenos timo-dependientes y timo-independientes radica en su capacidad para activar linfocitos B con o sin la ayuda de células T helper, respectivamente. Estos conocimientos no solo son fundamentales para entender la inmunología básica, sino que también tienen importantes implicaciones clínicas en el desarrollo de vacunas y terapias inmunológicas.

Desde la producción inicial de inmunoglobulinas en el feto hasta el desarrollo de la respuesta inmune humoral en el recién nacido y el adulto, cada etapa está adaptada para enfrentar diferentes desafíos infecciosos. La inmunidad activa y pasiva representa dos enfoques complementarios para la defensa inmunológica, cada una con sus ventajas y limitaciones.

Entender estos mecanismos es fundamental para la medicina y la biología, ya que nos permite desarrollar estrategias efectivas para prevenir y tratar enfermedades infecciosas.

Preguntas Guía

1. Describa las dos grandes categorías de la respuesta inmune.
2. Explique cómo las barreras físicas y químicas contribuyen a la defensa del organismo.
3. ¿Qué son las defensinas y cuál es su papel en la inmunidad innata?
4. ¿Cómo contribuye la microbiota habitual a la defensa del organismo?
5. ¿Cuál es el proceso de presentación de antígenos en la respuesta inmune adaptativa?
6. Describa cómo los linfocitos B activados contribuyen a la defensa del organismo.
7. Explique las dos propiedades principales de los antígenos.
8. ¿Qué tipos de moléculas pueden actuar como antígenos y cuál es la más potente?
9. Refiera cómo los anticuerpos contribuyen a la eliminación de antígenos en el organismo.
10. ¿Qué diferencias existen entre inmunidad activa y pasiva?

Referencias

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2018). *Inmunología celular y molecular*. Elsevier.
- Comité Asesor de Vacunas e Inmunizaciones (CAV-AEP). Manual de Inmunizaciones en línea de la AEP [Internet]. Madrid: AEP; 2025. [Consultado el 14/02/2025]. Disponible en: <http://vacunasaep.org/documentos/manual/manual-de-vacunas>
- Hillion, S., Arleevskaya, M. I., Blanco, P., Bordron, A., Brooks, W. H., Cesbron, J. Y., Kaveri, S. V., Vivier, E., & Renaudineau, Y. (2020). The Innate Part of the Adaptive Immune System. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 58(2), 151–154. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/S12016-019-08740-1>
- Hoffman, M. D., y Weber, K. (2001). Fetal immune response: Distinct from newborn or adult, a role for the placenta. *Current Opinion in Immunology*, 13(1), 58-64.
- Janeway, C. A., y Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20(1), 197-216.
- Kawai T. y Akira S. (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International Immunology*, 21(4): 317–337.
- Magistro, G. y Stief, CG. (2019). The Urinary Tract Microbiome: The Answer to All Our Open Questions? *European Urology Focus* 5 (1): 36–38.
- Plato, A., Hardison, S.E., Brown, G.D. (2014). Pattern recognition receptors in antifungal immunity. *Seminars of Immunopathology*, 37(2): 97-106.
- Suresh, R. y Mosser, D.M. (2013). Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology. *Advances in Physiology Education* 37(4): 284-291.

Wang, R., Lan, C., Benlagha, K., Câmara, N.O., Miller, H., Kubo, M., Heegaard, S., Lee, P., Lu, Y., Forsman, H., Li, X., Zhai, Z. y Liu, C. (2024). The interaction of innate immune and adaptive immune system. *Medicine Communications*, 5(10). E714-e51. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/mco2.714>

CAPÍTULO 3

Mecanismos de respuesta inmune frente a patógenos

Judith Celina Bernstein y Martín Enrique Rabassa

Inmunidad Innata

La inmunidad innata representa el mecanismo defensivo más antiguo en la escala evolutiva, presente en prácticamente todos los organismos multicelulares, desde invertebrados primitivos hasta vertebrados superiores. Su conservación a través de millones de años de evolución subraya su eficacia como sistema de protección basado en la detección de moléculas que no presentan variaciones en su composición.

La respuesta inmune innata constituye la primera línea de defensa del organismo frente a agentes patógenos o daño tisular. Esta respuesta se activa de manera inmediata tras la detección de amenazas, principalmente en los sitios de entrada de microorganismos o en el plasma sanguíneo. Emplea receptores especializados (PRRs) localizados en diversas células centinela como células epiteliales, macrófagos, mastocitos, células linfoides innatas y células dendríticas. Estos receptores, al detectar patrones moleculares asociados a patógenos o a daño celular (PAMPs y DAMPs), desencadenan la liberación de mediadores químicos y citocinas responsables de los mecanismos efectores: inflamación y estado antiviral.

La inflamación constituye un proceso coordinado que comprende una respuesta vascular inicial que aumenta el flujo sanguíneo local, el reclutamiento selectivo de células fagocíticas hacia el foco de infección y la movilización de componentes adicionales del sistema inmune. En condiciones fisiológicas, el proceso inflamatorio sigue un ciclo que finaliza con la eliminación del agente nocivo y la subsecuente reparación tisular, restaurando así la homeostasis inicial del tejido afectado.

El estado antiviral comprende una red de señalización paracrina y endocrina que prepara a las células para resistir la replicación y diseminación viral, potencia los mecanismos de reconocimiento molecular y facilita la activación de la respuesta inmune adaptativa.

Más allá del tipo de microorganismo patógeno y el tipo de respuesta efectora que se ponga en juego, un objetivo fundamental de las respuestas inmunes innatas consiste en optimizar la presentación antigénica y garantizar una activación eficiente de los linfocitos de la inmunidad adaptativa, estableciendo así un puente funcional entre ambos sistemas de defensa.

Inmunidad Adaptativa

La inmunidad adaptativa representa una innovación evolutiva presente exclusivamente en vertebrados que surgió hace aproximadamente 500 millones de años. Este sistema defensivo complementa la inmunidad innata, aportando especificidad, memoria inmunológica y una extraordinaria capacidad de reconocimiento antigénico. Su desarrollo permitió a los organismos vertebrados establecer mecanismos de defensa precisos frente a la creciente complejidad y diversidad de patógenos, constituyendo una ventaja selectiva fundamental para su supervivencia.

La respuesta inmune adaptativa se desencadena posteriormente a la activación de la inmunidad innata y alcanza su máxima eficacia cuando recibe e integra las señales moleculares proporcionadas por esta última. El reconocimiento antigénico ocurre principalmente en los órganos linfoides secundarios y en los tejidos linfoides asociados a mucosas, donde los antígenos interactúan con los linfocitos a través de receptores específicos de membrana. Los linfocitos B reconocen antígenos en su conformación nativa mediante sus receptores BCR (Inmunoglobulinas D o M de membrana), mientras que los linfocitos T identifican fragmentos peptídicos derivados de proteínas antigénicas. Estos péptidos son presentados por moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), que funcionan como adaptadores moleculares para el reconocimiento vía receptores TCR. Una diferencia fundamental radica en que los linfocitos B pueden detectar antígenos solubles de manera autónoma, mientras que los linfocitos T requieren la presentación de péptidos en el contexto del MHC, expresado en la superficie de células presentadoras de antígenos.

La activación completa de los linfocitos requiere la integración de múltiples señales. El reconocimiento antigénico constituye la "señal 1", necesaria pero insuficiente para la activación celular. La "señal 2" proviene de moléculas coestimuladoras expresadas en la superficie de células presentadoras de antígenos u otros linfocitos cooperadores, cuya función es contrarrestar señales inhibitorias concurrentes. El balance entre estas señales estimuladoras e inhibitorias determina la viabilidad de la activación linfocitaria. Adicionalmente, el microambiente donde ocurre el reconocimiento antigénico contiene diversas citocinas que conforman la "señal 3" y modulan tanto la activación linfocitaria como sus consecuencias funcionales. El contexto metabólico local, definido por la presencia de determinados metabolitos, configura la denominada "señal 4" e influye significativamente en el desarrollo de la respuesta inmune.

El linfocito *naïve* que integra positivamente estas señales experimenta activación, iniciando un proceso de amplificación clonal. Este fenómeno implica la expansión de un número inicial reducido de linfocitos específicos para el antígeno, generando mediante divisiones celulares aceleradas, clones de células hijas que pueden alcanzar números de cientos de miles a millones. Durante esta expansión, algunos linfocitos se diferencian adquiriendo funciones efectoras especializadas. Los linfocitos T efectores secretan citocinas o eliminan células infectadas mediante citotoxicidad directa. Los linfocitos B se transforman en células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Paralelamente, tanto linfocitos T como B pueden diferenciarse en células de

memoria, fundamentales para respuestas futuras frente al mismo antígeno, o en células reguladoras que participan en el control homeostático de la respuesta inmune.

La generación de linfocitos de memoria permite distinguir dos modalidades de respuesta adaptativa: primaria y secundaria. La respuesta adaptativa primaria, correspondiente al primer contacto con un antígeno específico, presenta una cinética relativamente lenta. En contraste, la respuesta adaptativa secundaria, mediada por células de memoria preexistentes, se caracteriza por presentar una mayor rapidez e intensidad, reflejando la capacidad del sistema inmune adaptativo para "recordar" encuentros antigénicos previos.

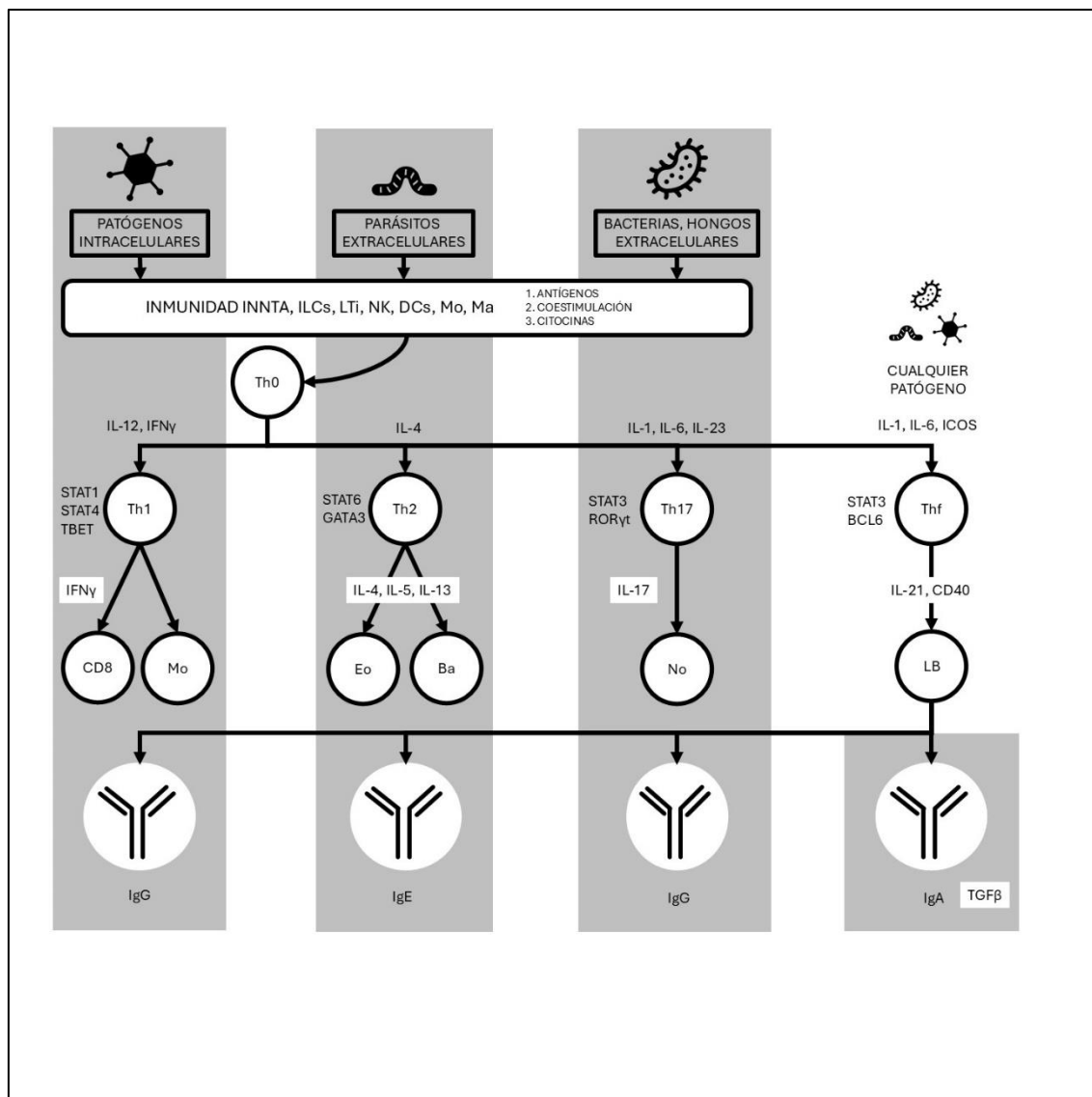
Es importante destacar, que tanto las respuestas inmunes innatas como adaptativas poseen un potencial patogénico considerable, pudiendo ocasionar daño tisular extenso o incluso comprometer la supervivencia del hospedador. Consecuentemente y por este motivo, su activación y desarrollo están sujetos a un sistema de control extraordinariamente riguroso, cuya disfunción puede manifestarse como inmunodeficiencias, autoinmunidad o inmunopatologías diversas.

Respuestas inmunes frente a patógenos

Los mecanismos efectores inmunológicos constituyen el repertorio funcional mediante los cuales el sistema inmune neutraliza, contiene y elimina agentes potencialmente patógenos, células transformadas o tejidos dañados. La eficacia de estos mecanismos efectores radica no solo en su potencia, sino también en su especificidad y precisión con que se despliegan en respuesta a diferentes desafíos inmunológicos.

Como hemos visto, la inmunidad innata emplea un sistema de reconocimiento basado en receptores que detectan estructuras moleculares altamente conservadas en microorganismos. Esta estrategia de detección determina la naturaleza de la respuesta efectora inmediata, activando vías inflamatorias y/o antivirales, según el tipo de patógeno. Paralelamente, este reconocimiento inicial configura el contexto inmunológico que dirigirá el desarrollo subsecuente de la respuesta adaptativa mediante la secreción de citocinas específicas, la expresión de moléculas coestimuladoras y la presentación antigénica.

La inmunidad adaptativa recibe e interpreta estas señales procedentes de la respuesta innata, generando a su vez efectores altamente específicos, dirigidos contra determinantes antigénicos particulares del patógeno. Este diálogo entre ambos sistemas inmunitarios asegura que la respuesta adaptativa se configure de manera óptima según el tipo de amenaza. A continuación, se desarrollan los mecanismos de detección y efectores que el sistema inmune pone en juego para cada uno de los mayores grupos de patógenos: bacterias extracelulares, bacterias intracelulares, virus, parásitos y hongos (Figura 3.1). En cada sección se detallarán los medios por los cuales estos microorganismos evitan su reconocimiento y eliminación.

Figura 3.1*Respuesta inmune a los patógenos*

Bacterias extracelulares

Los principales mecanismos efectores para la eliminación de bacterias extracelulares o sus toxinas son la inflamación, la fagocitosis, el complemento y la producción de anticuerpos. Los PRR situados en las células epiteliales y en fagocitos detectan patrones moleculares asociados a bacterias entre los cuales se incluyen lipopolisacáridos, peptidoglicano y flagelina, entre otros. Tras el reconocimiento de estos componentes bacterianos, los PRRs celulares inician cascadas de señalización intracelular que culminan en la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias. Estas vías de señalización activan factores de transcripción como NF- κ B e IRFs, que regulan la expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria.

Las citocinas proinflamatorias desempeñan un papel crucial en el inicio y mantenimiento del proceso inflamatorio. Entre ellas, la interleucina-1 β (IL-1 β) es un mediador clave que induce fiebre, inflamación y activa las células inmunitarias. Por su capacidad de activar células endoteliales, la IL-1 β desempeña un papel decisivo en el inicio de la respuesta inflamatoria, desencadenando una cascada de acontecimientos que conducen al reclutamiento y la activación de otras células inmunitarias. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es otra citoquina pro inflamatoria que interviene en la inflamación, la fiebre y la apoptosis. Contribuye sustancialmente al reclutamiento de monocitos y neutrófilos. La interleucina 6 (IL-6) es una citocina multifuncional que estimula la producción de proteínas de fase aguda en el hígado. La IL-6 también contribuye al desarrollo de la fiebre y desempeña un papel en la perpetuación del estado inflamatorio. La IL-18 actúa de forma sinérgica con la IL-1 β , aumentando la respuesta inflamatoria. Comparte similitudes estructurales con la IL-1 β y contribuye a la activación de las células NK y T, amplificando aún más la respuesta inmunitaria.

Los PAMPs bacterianos también pueden detectarse mediante receptores solubles presentes en el plasma. Los receptores solubles como la lectina de unión a manosa (MBL) y la proteína C reactiva (CRP) reconocen los PAMPs bacterianos y pueden activar el sistema del complemento, lo que da lugar a una mayor fagocitosis y lisis bacteriana. Además, estos receptores solubles pueden funcionar como opsoninas, recubriendo la superficie de los patógenos y facilitando su reconocimiento y eliminación por las células fagocíticas.

La inflamación induce un aumento del flujo sanguíneo a la zona afectada, una mayor permeabilidad vascular y el reclutamiento de células inmunitarias como neutrófilos y macrófagos en el lugar de la infección. Guiados por factores quimiotácticos endógenos y exógenos los fagocitos reconocen a las bacterias y las fagocitan. Las bacterias engullidas quedan contenidas en los fagosomas, que maduran y se fusionan con los lisosomas para formar los fagolisosomas, que matan a las bacterias.

El proceso de fagocitosis implica el reconocimiento y la unión de los componentes bacterianos a través de diversos receptores expresados en las células fagocíticas, incluidos los receptores tipo Toll (TLR), los receptores Fc (FcR), los receptores del complemento (CR), los receptores de manosa y los receptores basureros (*scavenger receptors*, en inglés). La opsonización mejora significativamente este reconocimiento. Posteriormente, la membrana plasmática del fagocito extiende pseudópodos formando un fagosoma. Este fagosoma naciente experimenta un proceso de maduración caracterizado por la fusión secuencial con vesículas endocíticas, que culmina en la formación de un fagolisosoma. El fagolisosoma representa un entorno microbicida rico en enzimas hidrolíticas, especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS), péptidos antimicrobianos y un pH ácido. Las enzimas lisosomales, que incluyen proteasas, lipasas, nucleasas y lisozima, facilitan la degradación bacteriana. Las ROS, generadas por la NADPH oxidasa, y las RNS, producidas por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), ejercen potentes efectos antimicrobianos. Los péptidos antimicrobianos, como las defensinas y las catelicidinas, alteran la integridad de la membrana bacteriana. El pH ácido del

fagolisosoma optimiza la actividad de las enzimas lisosomales garantizando una eliminación eficaz de los patógenos bacterianos extracelulares.

Los neutrófilos, además de fagocitar microorganismos, pueden liberar sus gránulos al exterior o formar trampas extracelulares compuestas de su propio ADN (NETs) y proteínas antimicrobianas para capturar y eliminar bacterias. Estos componentes forman una estructura similar a una telaraña que puede atrapar e inmovilizar físicamente a los microorganismos, impidiendo su propagación por el organismo. La combinación del atrapamiento físico y la exposición a estos agentes antimicrobianos crea un entorno hostil para bacterias, hongos y otros microorganismos. Además, las NETs pueden activar otras células inmunitarias y contribuir a la respuesta inflamatoria general. Si bien las NETs son principalmente beneficiosas para la defensa del huésped, la formación excesiva o desregulada de NETs se ha relacionado con diversas afecciones patológicas, como los trastornos autoinmunitarios y la trombosis.

Finalmente, las citocinas producidas durante la inflamación activan y modulan el sistema inmunitario adaptativo, tendiendo así un puente entre la inmunidad innata y la adaptativa. Esta activación de la inmunidad adaptativa da lugar a la producción de anticuerpos y al desarrollo de células de memoria, que confieren una protección a largo plazo frente a patógenos específicos.

Las tres funciones principales de la inmunidad humoral en la lucha contra las bacterias extracelulares, son: bloquear la infección, eliminar los microorganismos y neutralizar las toxinas. Los anticuerpos pueden impedir la adhesión de las bacterias a las células del huésped, inhibiendo así las fases iniciales de la infección. También facilitan la destrucción de las bacterias mediante procesos como la opsonización, que potencia la fagocitosis por parte de las células inmunitarias, y la activación del complemento, que conduce a la lisis bacteriana. Además, los anticuerpos pueden unirse a las toxinas bacterianas y neutralizarlas, haciéndolas inofensivas para las células del huésped.

La respuesta inmunitaria celular contra las bacterias extracelulares se caracteriza por la activación de linfocitos Th17 que conduce a la producción de citocinas proinflamatorias, como la interleucina-17 (IL-17) y la interleucina-22 (IL-22). Estas citocinas estimulan la producción de quimiocinas por parte de las células epiteliales y endoteliales, lo que atrae a los neutrófilos al sitio de la infección. Además, los linfocitos Th17 promueven la producción de péptidos antimicrobianos por parte de las células epiteliales, como las β -defensinas. No solo las células Th17 CD4⁺ producen IL-17, sino también células $\gamma\delta$, colaborando con la respuesta inmune adaptativa.

Las bacterias cuentan con numerosos mecanismos para evadir la acción del sistema inmune. Los polisacáridos de las cápsulas de las bacterias se clasifican como antígenos T-independientes porque pueden estimular a los linfocitos B para que produzcan anticuerpos sin la participación directa de los linfocitos T helper. Esta característica se deriva de la naturaleza repetitiva de las estructuras de los polisacáridos, que pueden entrecruzar múltiples receptores de células B, proporcionando una fuerte señal de activación. La respuesta de anticuerpos generada contra los antígenos polisacáridos está compuesta principalmente por IgM, con un cambio de clase limitado a otros isotipos. Esta respuesta suele ser de corta duración y no induce memoria inmunológica.

En consecuencia, el sistema inmunitario humoral, en particular la producción de anticuerpos se convierte en el principal mecanismo de defensa contra las bacterias encapsuladas.

Además de las ventajas de una cápsula, las bacterias poseen una gran variedad de moléculas que le permiten evadir o manipular las respuestas inmunitarias. En el caso de *Staphylococcus aureus*, la bacteria interfiere con la función de los neutrófilos a través de varios mecanismos: inhibe la extravasación y la quimiotaxis de los neutrófilos, bloquea la activación del complemento y la fagocitosis y resiste los mecanismos de eliminación mediados por radicales libres. Además, elimina directamente las células inmunitarias a través de diversas toxinas y manipula la coagulación sanguínea, formando barreras protectoras de fibrina alrededor de las comunidades bacterianas.

S. aureus subvierte las respuestas inmunitarias adaptativas de dos maneras. Primero, manipula las respuestas de las células B a través de la proteína A (SpA), una molécula con gran afinidad por las porciones Fc de anticuerpos humanos. Segundo, interfiere con las respuestas de las células T a través de superantígenos, moléculas que activan de forma eficiente los linfocitos T vírgenes al producir un reconocimiento no específico entre TCR y MHC (independiente de antígenos). Estas moléculas producen una activación inespecífica e inútil del sistema inmune adaptativo, la secreción excesiva de inmunoglobulinas y citocinas (tormentas de citocinas) y la anergia o eliminación por apoptosis de los linfocitos.

Bacterias intracelulares

Las bacterias intracelulares desarrollaron la notable capacidad de proliferar y subsistir dentro de las células de sus huéspedes. Esta categoría abarca bacterias facultativas, que pueden replicarse tanto en entornos intracelulares como extracelulares, como *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Mycobacterium* y *Legionella*, como bacterias obligadas, que dependen por completo del ambiente intracelular para su supervivencia y replicación, incluyendo *Chlamydia* y *Rickettsia*.

La respuesta inmune del huésped se organiza en base al reconocimiento de PAMPs mediante PRRs. Tanto los receptores de tipo Toll (TLRs) de endomembranas como de tipo NOD (NLRs), RIG-I (RLRs) y tipo AIM (ALRs), que reconocen ácidos nucleicos en citosol, participan en la detección de este tipo de microorganismos. Por ejemplo, Los RLRs detectan el ARN bacteriano y el receptor cGAS reconoce el ADN citosólico, lo que activa la vía de señalización STING y la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Por otra parte, el IFN- γ , producido por las células NK y otras células inmunes, es fundamental para activar la actividad microbicida de los macrófagos.

La activación del inflamasoma mediada por los NLRs puede desencadenar la piroptosis, una forma de muerte celular inflamatoria que libera contenido intracelular, alertando así al sistema inmune. Por otro lado, la autofagia es un proceso celular que implica el secuestro de componentes citoplasmáticos, incluyendo bacterias, en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas. Estos autofagosomas se fusionan con los lisosomas, donde el material

secuestrado se degrada, contribuyendo a la eliminación de microorganismos intracelulares y a la presentación antigénica a la inmunidad adaptativa.

La respuesta inmune celular es fundamental para la eliminación de bacterias intracelulares, ya que la producción de anticuerpos resulta ineficiente para su erradicación. La activación de linfocitos T CD4+ y su diferenciación al perfil Th1 permiten la producción de IFN- γ y TNF- α lo que a su vez, favorece la capacidad microbicida de los macrófagos. En modelos de infección por *Salmonella* y *Chlamydia* se ha demostrado que las células CD4+ Th1 son esenciales para la resolución exitosa de la infección primaria. Eventualmente, la producción excesiva de IFN- γ y TNF- α ante la persistencia de los microorganismos pueden llevar al establecimiento de una respuesta granulomatosa, con la intención de contener su diseminación.

La activación de los linfocitos T CD8+ es otro aspecto importante de la respuesta inmune adaptativa. Las células infectadas por bacterias intracelulares pueden presentar antígenos bacterianos en moléculas MHC de clase I a los linfocitos T CD8+. Este proceso requiere que los antígenos bacterianos sean procesados en el citosol y cargados en las moléculas MHC de clase I. La presentación cruzada de antígenos exógenos por las células dendríticas también puede conducir a la activación de los linfocitos T CD8+. Tras su activación, los linfocitos T CD8+ se diferencian en linfocitos T citotóxicos (CTLs), que son capaces de eliminar directamente las células infectadas.

Las bacterias intracelulares pueden evadir la acción del sistema inmune impidiendo la fusión de los fagolisosomas. Este fenómeno fue descrito en modelos de infección por *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila* y *Chlamydia trachomatis*. Otras bacterias, como *Listeria monocytogenes* y *Shigella*, han desarrollado la capacidad de lisar la membrana del fagosoma y escapar al citosol, donde pueden replicarse sin ser alcanzadas por los mecanismos de destrucción lisosomales. La resistencia a las enzimas lisosomales y a las especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno, así como la prevención de acidificación del fagolisosoma también ha sido descrita.

La evasión de la respuesta inmune adaptativa incluye la interferencia sobre la presentación antigénica. Algunas bacterias, como *Chlamydia trachomatis*, pueden disminuir la expresión de moléculas MHC de clase I y II en la superficie de las células infectadas. Otra estrategia importante es la inducción de inmunosupresión en el huésped. Algunas bacterias pueden promover la expansión o activación de células T reguladoras (Tregs), que tienen la capacidad de suprimir la respuesta inmune efectora, creando un ambiente más permisivo para la persistencia bacteriana. También pueden inducir la producción de citocinas inmunosupresoras, como la interleucina-10 (IL-10), que inhibe la actividad de otras células inmunes, disminuyendo la capacidad del huésped para eliminar la infección. En infecciones crónicas, algunas bacterias pueden contribuir al agotamiento funcional de los linfocitos T efectores, lo que reduce su capacidad para eliminar las células infectadas.

Virus

Los virus son reconocidos por el sistema inmune innato a través de sus PRRs que detectan ácidos nucleicos. Entre los TLRs, TLR3 reconoce el ARN viral de doble cadena (ARNds), TLR7 y TLR8 reconocen el ARN de cadena simple (ARNs), particularmente TLR7 detecta oligonucleótidos de ARNs que contienen secuencias ricas en guanosina y uridina. Ya en el citosol, las proteínas de la familia RIG reconocen distintas configuraciones de ARN de origen viral. Por ejemplo, RIG-I reconoce ARNds cortos con características específicas como 5'-trifosfato o 5'-difosfato. También reconoce ARN no modificado 5' fosforilado, común en virus ARN de cadena negativa. Otro receptor de la familia, MDA5, prefiere detectar ARNds más largos (>500 pb) y para ello no requiere extremos trifosfato; participa en el reconocimiento de ARNds que se observan en infecciones por virus ARN de cadena positiva. En el caso de los virus ADN los TLRs endosomales pueden reconocer ADN viral. Por ejemplo, TLR9 reconoce el ADN rico en CpG no metilado. Los sensores de ADN (como cGAS e IFI16) reconocen ADN viral en el citoplasma. El receptor cGAS produce cGAMP al unirse al ADN citoplasmático, lo que activa STING para inducir la producción de interferones.

Tanto las células epiteliales como las células dendríticas, en especial las plasmocitoides y las células NK, poseen este tipo de PRRs y producen como consecuencia de su activación interferones de tipo I (IFNs, IFN- α e IFN- β), además de las citocinas clásicas de la inflamación. Los IFNs generan un “estado antiviral” que impacta sobre la misma célula o sobre las células vecinas, entorpeciendo el desarrollo de la replicación viral y su diseminación.

La respuesta inmune adaptativa frente a las infecciones virales depende en gran medida de la activación de linfocitos T CD4+ y su cooperación con otros mecanismos efectores del sistema, como lo son los linfocitos T CD8+ y los linfocitos B, los primeros para producir células citotóxicas específicas para la eliminación de células propias infectadas y los segundos para la generación de anticuerpos, preferentemente neutralizantes, que impidan la diseminación de los virus.

Los linfocitos T CD4+ pueden tener funciones efectoras directas al diferenciarse a células Th1 y producir IFN- γ . Este interferón puede inhibir la replicación viral por diversos mecanismos que incluyen la regulación de proteínas blanco para la entrada de virus a las células, la inhibición de las vías de transporte endosomal, la inhibición de la replicación del ARN viral o su traducción a proteínas y la inhibición de las vías de excreción y ensamblado de viriones. Es debido a esto que se encuentra relacionado con la regulación de la reactivación de infecciones virales con latencia, como se ha demostrado en los casos de infección por el Virus Herpes Humano 8 (VHH-8), Virus Herpes Simple 1 (VHS-1) y virus JC (VJC). Por otra parte, el IFN- γ es un potente activador de las funciones de presentación antigénica, favoreciendo la actividad de los proteosomas y la expresión de MHC de clase I y II en las células infectadas y las APCs.

Las células CD8+ pueden diferenciarse a CTLs con o sin la cooperación de las células CD4+, pero las respuestas resultan más eficientes con su participación, más aún si la estimulación se obtiene por la presentación cruzada de antígenos exógenos a través de la vía endógena del MHC I en las APCs. La eliminación de las células blanco es muy eficiente, por lo que el sistema deberá

evaluar correctamente la intensidad de la reacción, de modo que no dañe por demás los tejidos propios o se agote antes de tiempo. En las infecciones virales crónicas la sobreestimulación antigénica de los CTLs se asocia con la presencia de numerosas moléculas inhibitoras en su superficie y el agotamiento prematuro de estas células, caracterizado por la pérdida progresiva de la producción de IL-2, TNF- α e IFN- γ y la incapacidad de proliferar y matar células.

La respuesta humoral necesita de la diferenciación de los linfocitos T CD4+ a células Th foliculares (Thf) de forma que estas puedan proveer de las señales adecuadas a los linfocitos B para generar la reacción de centro germinal. Por medio de mutaciones en las regiones de reconocimiento antigénico, se logra una maduración de la afinidad de las inmunoglobulinas hacia los epítopes virales. Por otro lado, se favorece un cambio de clase de Igs secretadas hacia IgG. La neutralización, es decir, la unión de las Igs a sitios clave de las moléculas virales involucradas en la entrada a las células huésped, es uno de los mecanismos más eficientes asociados a la inmunidad humoral. Eventualmente, las inmunoglobulinas pueden facilitar la lisis mediada por el sistema del complemento o la fagocitosis por parte de los macrófagos, especialmente en el caso de virus con envoltura. La generación de memoria inmunológica mediante la adquisición de células T y B de memoria y la presencia de células plasmáticas de vida media larga es de vital importancia para el desarrollo de respuestas inmunes secundarias, tan eficientes que pueden evitar nuevas infecciones.

Los virus han desarrollado diversas estrategias sofisticadas para evadir la respuesta inmune del huésped. Un fenómeno común es la supresión de la producción de interferones y otras citocinas proinflamatorias. Muchos virus codifican proteínas que interfieren directamente con las vías de señalización intracelular involucradas en la activación de la respuesta inmune innata. Por ejemplo, los Poxvirus como el virus Vaccinia (VACV) codifican proteínas que inhiben la apoptosis y las vías de señalización que conducen a la producción de IFNs y citocinas proinflamatorias. Algunos virus no solo evaden sino que también subvierten las cascadas de señalización para su propio beneficio, ciertos Herpesvirus aprovechan la vía de señalización STING para promover su propia replicación.

Otros mecanismos comunes de evasión en los virus están relacionados con las respuestas efectoras de la inmunidad adaptativa. Por ejemplo, los virus pueden variar sus blancos antigénicos mediante mutaciones, recombinación y regulación de la expresión de antígenos. De esta manera, el virus de la influenza modifica la hemaglutinina y neuraminidasa, generando nuevas variantes cada año; el Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) acumula mutaciones en epítopes reconocidos por linfocitos T CD8+ durante el transcurso de la infección en un mismo huésped, dificultando su eliminación; finalmente, el virus Herpes simple inhibe la presentación antigénica al bloquear las proteínas TAP, evitando la carga de péptidos al MHC I y el reconocimiento por células T.

Además de la variación antigénica, los virus interfieren con las respuestas efectoras de la inmunidad adaptativa de varias maneras. Por ejemplo, el Citomegalovirus humano (CMV) regula las moléculas MHC de clase I para ocultar las células infectadas del reconocimiento de las células T. Otros virus también pueden inducir células supresoras, como macrófagos supresores, células

supresoras derivadas de mieloides (MDSC) y células T reguladoras, que contribuyen a la inmunosupresión.

Hongos

Los hongos representan un grupo diverso de patógenos con características morfológicas altamente variables. Su diversidad incluye desde formas unicelulares hasta estructuras multicelulares complejas. Estos organismos pueden alcanzar tamaños que superan considerablemente la capacidad fagocítica de las células del sistema inmunológico, lo que complica su eliminación. Una característica distintiva de muchos hongos es su habilidad para formar hifas, estructuras filamentosas que pueden penetrar y colonizar tejidos, incrementando su resistencia a la fagocitosis y favoreciendo infecciones persistentes. La diversidad morfológica de los hongos se refleja no solo en su tamaño, sino también en la composición de su pared celular, la presencia de esporas y la formación de estructuras especializadas para la reproducción y dispersión. Esta heterogeneidad morfológica contribuye a su adaptabilidad a diferentes nichos ecológicos y a su capacidad para evadir las respuestas inmunitarias del huésped. Son capaces de causar infecciones extracelulares o intracelulares, a menudo de manera oportunista en un contexto de deficiencia del sistema inmunológico. El tipo de mecanismo efector del sistema inmune estará relacionado con el tipo de infección fúngica en cuestión. Si se trata de hongos extracelulares, los principales mecanismos de defensa son la activación del complemento, la fagocitosis y la activación de linfocitos Th17; mientras que si se trata de hongos intracelulares será la activación de linfocitos Th1 y de macrófagos.

Los principales PAMPs reconocidos a partir de hongos son componentes de su pared celular, dentro de los cuales podemos mencionar a los β -1,3-glucanos, reconocidos por la lectina de tipo C Dectina-1, mananos presentes en *Candida* spp., reconocidos por el receptor de manosa (MR) y la Dectina-2, fosfolipomananos y quitina reconocidos por TLR2, así como otros componentes de membranas como el ergosterol.

Si los hongos pueden ser fagocitados, los receptores tipo toll de endomembranas pueden detectar sus ácidos nucleicos. Un evento clave en la activación de la inmunidad innata frente a hongos tiene lugar con la activación del complejo MBC, que incluye al mediador CARD9 y la activación del inflammasoma y producción de citoquinas proinflamatorias. La llegada de fagocitos con el estímulo inflamatorio es necesario para la contención de los hongos, especialmente la degranulación y NETosis (forma especializada de muerte celular programada de los neutrófilos), con liberación de ROS para el control de hongos que forman hifas.

Como fue mencionado, las respuestas inmune adaptativas serán diferentes si se trata de hongos extracelulares o intracelulares, predominando las respuestas Th17 en los primeros y Th1 en los segundos. En este sentido, los pacientes con déficit del eje Th17 son susceptibles a infecciones por hongos del género *Candida*, mientras que los pacientes con déficit de la inmunidad Th1 y compromiso en las respuestas de CD8+ son susceptibles a infecciones

oportunistas por *H. capsulatum*, *C. neoformans* o *P. jirovecii*. En las infecciones por algunos tipos de hongos, la producción de anticuerpos parece jugar algún rol de importancia en su control.

Parásitos

Los parásitos representan también un grupo heterogéneo de microorganismos patógenos que comprenden tanto formas intracelulares como extracelulares de protozoos, así como metazoos complejos, entre los cuales se destacan los helmintos.

Los principales mecanismos de defensa frente a parásitos, al igual que los hongos, dependerán de la localización celular de los mismos. Los protozoos intracelulares como *Plasmodium* spp., generan respuestas Th1 con producción de CTLs a partir de la activación de linfocitos T CD8+. Otros, como *Leishmania* spp., activan respuestas Th1 con producción de IFN- γ y activación de macrófagos. Las respuestas inmunes humorales, en cambio, son útiles en respuestas frente a protozoos extracelulares como las amebas. Algunos parásitos pueden cambiar su composición antigénica superficial durante los distintos estadios de su ciclo vital o bien ésta cambia para evitar ser reconocidos por el sistema inmune.

Las respuestas frente a helmintos se caracterizan por la presencia de una intensa eosinofilia y producción de IgE. Los helmintos inducen respuestas inmunes tipo Th2 que son esenciales para la expulsión de los parásitos y la protección del huésped. Estas respuestas son mediadas por citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, que inducen la activación de macrófagos alternativamente activados, la producción de eosinófilos y basófilos y el aumento de la producción de mucinas.

Las células B contribuyen a la producción de anticuerpos de tipo IgE, mientras que los macrófagos alternativamente activados ayudan a suprimir la inflamación mediada por las respuestas Th1. La citoquina IL-10, aunque es conocida por su papel inmunosupresor, promueve la diferenciación Th2 al suprimir la expresión de IFN- γ , lo que favorece la respuesta Th2 durante la infección por helmintos; también limita el daño tisular agudo causado por la migración de los parásitos a través de tejidos vitales, promoviendo la cicatrización y la fibrosis.

Los helmintos poseen diversos mecanismos que le permiten evadir las respuestas inmunes del huésped. Estos mecanismos incluyen la producción de moléculas inmunomoduladoras que interfieren con la función de las células inmunes, lo que resulta en una supresión general de la inmunidad, permitiéndoles establecer infecciones crónicas. Estos parásitos secretan una amplia gama de moléculas inmunomoduladoras, conocidas como productos de excreción/secreción, que pueden suprimir o desviar la respuesta inmune del huésped. Estas moléculas interactúan con los PRRs tales como los receptores tipo Toll y los receptores de lectina tipo C, alterando las vías de señalización intracelular en las células presentadoras de antígenos y modulando las respuestas inmunes innatas y adaptativas. Los helmintos no solo producen proteínas inmunomoduladoras, sino también pequeñas moléculas y metabolitos con propiedades antiinflamatorias. Estos mecanismos les permiten establecer un ambiente inmunorregulador favorable para su supervivencia a largo plazo en el huésped. Por ejemplo, *Trichinella spiralis*

evade el sistema inmunitario del hospedador principalmente mediante la secreción de calreticulina (Ts-CRT) e inhibidores de serina proteasa (TsSERPs), que inhiben la activación del complemento y las funciones de los neutrófilos. Además, puede modular las respuestas inmunitarias del hospedador a través de citocinas y la inducción de células T reguladoras.

Preguntas guía

1. ¿Cuáles son las principales diferencias entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa en la respuesta frente a patógenos?
2. ¿Cómo reconoce el sistema inmune innato a las bacterias extracelulares y cuáles son los principales mecanismos efectores para su eliminación?
3. ¿Qué papel juegan los linfocitos T CD4+ y CD8+ en la respuesta inmune frente a bacterias intracelulares y virus?
4. ¿Puede explicar detalladamente el papel de los interferones en la respuesta antiviral?
5. ¿Cuáles son las principales estrategias de evasión inmune utilizadas por los virus?
6. ¿Cómo difiere la respuesta inmune frente a hongos extracelulares e intracelulares?
7. ¿Qué caracteriza a la respuesta inmune frente a helmintos y qué mecanismos utilizan estos parásitos para evadir el sistema inmune?

Referencias

- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R. y Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413 (6857):732-738.
- Dellière, S., Sze Wah Wong, S. y Aimanianda, V. (2020). Soluble mediators in anti-fungal immunity. *Current Opinion Microbiology*, 58, 24-31. Doi: 10.1016/j.mib.2020.05.005.
- Foster, T.J., Geoghegan, J.A., Ganesh, V.K. y Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1): 49–62.
- García Vidal, C. y Salaver Lletí, M. (2014). Inmunopatología de las micosis invasivas por hongos filamentosos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 31 (4), 219-228. Doi: 10.1016/j.riam.2014.09.001
- Gazzinelli-Guimaraes, P.H. y Nutman, T.B. (2018). Helminth parasites and immune regulation. *F1000Research*, 7, 1685. Doi: 10.12688/f1000research.15596.1.
- Halenius, A., Hauka, S., Dölken, L., Stindt, J., Reinhard, H., Wiek, C., Hanenberg, H., Koszinowski, U.H., Momburg, F. y Hengel, H. (2011). Human cytomegalovirus disrupts the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex and inhibits tapasin gene transcription. *Journal of Virology*, 85(7): 3473-3485. Doi: 10.1128/JVI.01923-10.

- Harris, N. y Gause, W.C. (2010). To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminths. *Trends in Immunology*, 32(2): 80–88.
- Li, L., Dickinson, M.S., Coers, J. y Miao, E.A. (2023). Pyroptosis in defense against intracellular bacteria. *Seminars of Immunology*, 69, 101805. Doi: 10.1016/j.smim.2023.101805.
- Mcdermott, A.J. y Klein, B.S. (2018). Helper T-cell responses and pulmonary fungal infections. *Immunology*, 155(2): 155–163.
- Morales-Montor, J., McKay, D.M. y Terrazas, L.I. (2022). Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases. *Pathogens*, 11(7), 811. Doi: 10.3390/pathogens11070811.
- Rashidi, S., Mansouri, R., Ali-Hassanzadeh, M., Muro, A., Nguewa, P., Manzano-Román, R. (2022). The Defensive Interactions of Prominent Infectious Protozoan Parasites: The Host's Complement System. *Biomolecules*, 12(11), 1564. Doi: 10.3390/biom12111564.
- Spaan, A.N., Surewaard, B.G.J., Nijland, R. y van Strijp, J.A.G. (2013). Neutrophils versus *Staphylococcus aureus*: a biological tug of war. *Annual Reviews in Microbiology*; 67: 629–650.
- Tian, J., Liu, H., Che, J., Song, L. (2024). Editorial: Innate immunity against intracellular bacteria: mechanisms and strategies. *Frontiers on Immunology*, 15, 1396114. Doi: 10.3389/fimmu.2024.1396114.
- Wiedemann, M. y Voehringer, D. (2020). Immunomodulation and Immune Escape Strategies of Gastrointestinal Helminths and Schistosomes. *Frontiers in Immunology*, 11: 572865. Doi: 10.3389/fimmu.2020.572865.
- Yeshi, K., Loukas, A., Ruscher, R. y Wangchuk, P. (2022). Immunomodulatory and biological properties of helminth-derived small molecules: Potential applications in diagnostics and therapeutics. *Frontiers in Parasitology* 9; 1:984152. Doi: 10.3389/fpara.2022.984152

CAPÍTULO 4

Diagnóstico etiológico de las enfermedades infecciosas

Nora Beatriz Molina

En el contexto de la microbiología clínica, el diagnóstico de una enfermedad infecciosa puede realizarse por métodos directos o indirectos. Los *métodos directos* se basan en la detección del agente etiológico completo o de alguno de sus componentes (proteínas, toxinas, metabolitos, ácidos nucleicos), mientras que los *métodos indirectos* ponen de manifiesto la respuesta inmune a la infección, es decir, se basan en la detección de anticuerpos específicos.

Por lo general, la detección de microorganismos ha dependido en buena medida de su visualización microscópica en el material, o bien de la proliferación de los patógenos en medios de laboratorio. En términos generales, la identificación se ha basado en las características fenotípicas, como los perfiles de fermentación en el caso de las bacterias; los efectos citopáticos de los cultivos hísticos en busca de agentes virales; y la morfología microscópica de hongos y parásitos. Si bien estas técnicas son fiables, en general requieren de un mayor tiempo hasta la obtención del resultado. El empleo de sondas a base de ácido nucleico se ha tornado cada vez más como el método habitual de detección, cuantificación e identificación de patógenos en el laboratorio de microbiología clínica y ha sustituido de manera gradual a la definición fenotípica y los métodos de visualización microscópica.

La elección del método diagnóstico más adecuado dependerá de numerosos factores a considerar, como el tipo de agente etiológico, las características morfológicas y biológicas del agente causal, el mecanismo de patogenia microbiano, la localización anatómica del patógeno, el período evolutivo de la enfermedad infecciosa, el equipamiento del laboratorio, la sensibilidad y especificidad de los ensayos, el período preerológico, el estado inmune y las comorbilidades del paciente, entre otros (figura 4.1).

Figura 4.1*Clasificación de los métodos de diagnóstico etiológico*

Métodos	Fundamento
Directos	Observación del patógeno o sus componentes (genoma, antígenos) en la muestra clínica
Indirectos	Respuesta inmune frente a la infección en la muestra clínica (anticuerpos)

Diagnóstico directo

El diagnóstico microbiológico directo se enfoca en la identificación del agente etiológico completo (bacterias, virus, hongos o parásitos) o de sus componentes en muestras clínicas como los tejidos, líquidos o secreciones del hospedador. Para lograr esto, se emplean diversas técnicas que pueden dividirse en dos categorías principales: detección del agente etiológico completo y detección de sus componentes

Métodos directos: Detección del patógeno

En primer lugar, la detección del agente etiológico completo incluye varios métodos. La microscopía óptica, por ejemplo, se utiliza para la observación directa de bacterias, hongos y parásitos. El método más sencillo de valoración microscópica es la preparación húmeda, que se emplea, por ejemplo, para estudiar el líquido cefalorraquídeo (LCR) en busca de *Cryptococcus neoformans*, con tinta china que sirve como trasfondo contra el cual se delinean hongos con grandes cápsulas. Los preparados húmedos con iluminación de campo oscuro también se utilizan para detectar espiroquetas obtenidas de muestras de lesiones en genitales y para identificar *Treponema pallidum*, *Borrelia* o *Leptospira* en la sangre. Las muestras de piel obtenidas por raspadura y las de cabello se examinan en una preparación húmeda que utiliza hidróxido de potasio o blanco de calcoflúor e iluminación ultravioleta para detectar elementos micóticos, a manera de estructuras fluorescentes. A menudo se usa la tinción de preparados húmedos para la identificación morfológica, por ejemplo, la tinción azul de algodón con lactofenol en busca de elementos micóticos.

Las bacterias son difíciles de observar con microscopia de luz clara, a menos que se sometan a tinción. La tinción de Gram permite diferenciar entre bacterias con paredes de peptidoglucanos gruesas (gram positivas) y las que tienen paredes delgadas con una membrana externa (gram negativas). La tinción de Gram es particularmente útil para el estudio de esputo en busca de polimorfonucleares (PMN) y bacterias. Las muestras de esputo obtenidas de sujetos con buena función inmunitaria que tienen ≥ 25 polimorfonucleares y < 10 células epiteliales por campo de baja amplificación aportan por lo regular información clínica útil. La tinción de Gram de muestras de material vaginal obtenido con aplicador se emplea para identificar células epiteliales cubiertas con bacterias gram positivas, en ausencia de lactobacilos y presencia de bacilos gram negativos, un signo considerado de vaginosis bacteriana. La detección de cocos gram negativos en pares en pus obtenida del meato de un varón con disuria se orienta al diagnóstico de gonorrea. Además, el estudio de muestras obtenidas de sitios corporales normalmente estériles, como los líquidos cefalorraquídeo, sinovial, pleural o peritoneal mediante tinción de Gram, tiene utilidad para identificar la presencia de bacterias, PMN o ambos.

La tinción de Zielh Neelsen permite identificar bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR) por la retención del colorante carbolfucsina después del lavado con solvente ácido/orgánico. Esta técnica es muy útil para la detección de micobacterias como *Mycobacterium tuberculosis* en distintas muestras biológicas: esputo, lavado broncoalveolar, líquido cefalorraquídeo, líquidos de punción o muestras tisulares. Las modificaciones de la técnica permiten diferenciar entre *Actinomyces* y *Nocardia* u otros microorganismos con la propiedad acidorresistente débil o parcial.

Las tinciones con fluorocromos, como la que utiliza naranja de acridina, permiten identificar leucocitos, levaduras y bacterias en líquidos corporales. Los colorantes para cápsulas, flagelos y esporas se emplean para identificar o demostrar estructuras características.

Las tinciones de inmunofluorescencia utilizan anticuerpos específicos acoplados a un compuesto fluorescente (fluoresceína) dirigidos contra un blanco antigénico específico para visualizar los microorganismos. Si se analizan las muestras en condiciones apropiadas, el compuesto de fluoresceína absorbe la luz ultravioleta y la refleja con una longitud de onda más alta, que se torna visible para el ojo humano. En la técnica indirecta de anticuerpos inmunofluorescentes, un anticuerpo sin marcar (objetivo o blanco) se une a un antígeno específico; a continuación, la muestra se tiñe con un anticuerpo marcado con fluoresceína, dirigida contra el anticuerpo blanco. Cada anticuerpo blanco sin marcar unido al antígeno apropiado tiene múltiples sitios de unión del segundo anticuerpo y por esta razón se intensifica la señal visual. La inmunofluorescencia se emplea para detectar antígenos virales (Citomegalovirus, virus Herpes simple y virus respiratorios) dentro de las células cultivadas o muestras clínicas, al igual que *Legionella pneumophila*, una bacteria difícil de cultivar en muestras clínicas.

El cultivo es otra técnica esencial para el diagnóstico etiológico, ya que permite el aislamiento e identificación de bacterias y hongos en medios específicos. Por ejemplo, el diagnóstico de infecciones vaginales por *Candida* spp. se realiza mediante el cultivo del hongo en agar

Sabouraud. En el caso de los virus, el cultivo se realiza en líneas celulares, como en el diagnóstico de infecciones por virus Herpes simple.

Métodos directos: Detección de componentes del patógeno

Las técnicas de detección de componentes del agente etiológico se enfocan en identificar elementos específicos como proteínas, toxinas, metabolitos y ácidos nucleicos. Estas técnicas son cruciales para un diagnóstico preciso y rápido.

En primer lugar, la detección de proteínas específicas del patógeno se realiza mediante varios tipos de inmunoensayos. Por ejemplo, el inmunoensayo de fluorescencia (IFA) utiliza anticuerpos marcados con fluorocromos para detectar antígenos en muestras clínicas. La emisión de fluorescencia puede observarse bajo un microscopio de fluorescencia, lo que permite la identificación del patógeno. Un ejemplo de esta técnica es la detección de antígenos de *Plasmodium falciparum* en sangre o de antígenos de *Chlamydia trachomatis* en muestras genitales.

Las técnicas de aglutinación con látex son rápidas y sencillas para identificar microorganismos, toxinas extracelulares y agentes virales por medio de antígenos. Dichos procedimientos se pueden realizar de manera directa en muestras clínicas o después de la proliferación de los microorganismos en placas de agar o cultivos para virus. Se utilizan anticuerpos unidos a un portador como las partículas de látex o eritrocitos para detectar las reacciones de unión de antígenos-anticuerpo.

Otra técnica muy utilizada es el ensayo de inmunoanálisis ligado a enzimas (ELISA) que utiliza anticuerpos unidos a enzimas que, al reaccionar con su sustrato, generan un cambio de color. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. Por ejemplo, el ELISA se emplea para el diagnóstico de infecciones por *Helicobacter pylori* mediante la detección de antígenos en heces del paciente.

Los ensayos de inmunocromatografía son métodos rápidos y sencillos, poseen una especificidad alta, pero su sensibilidad es intermedia. Estas pruebas se utilizan para detectar antígenos de *Streptococcus pyogenes*, virus Influenza y Virus Sincitial Respiratorio o toxinas bacterianas como las toxinas A y B de *Clostridium difficile* en muestras fecales.

Asimismo, los metabolitos específicos producidos por microorganismos patógenos pueden ser detectados y cuantificados mediante técnicas avanzadas de análisis químico. Por ejemplo, la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) combina la cromatografía de gases con la espectrometría de masas para separar e identificar metabolitos volátiles en una muestra. Un caso práctico de esta técnica es el diagnóstico de infecciones urinarias mediante la detección de ácidos orgánicos producidos por bacterias en muestras de orina. Adicionalmente, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se utiliza para separar y cuantificar compuestos no volátiles en una muestra. Un ejemplo es la detección de ácidos micólicos en muestras de esputo para el diagnóstico de tuberculosis.

Finalmente, la detección de ácidos nucleicos específicos del patógeno es una de las técnicas más sensibles y precisas disponibles actualmente. Por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplifica secuencias específicas de ADN o ARN, permitiendo la detección de cantidades muy pequeñas de material genético del patógeno. Un ejemplo es el diagnóstico de infecciones por virus del papiloma humano (VPH) mediante PCR en muestras cervicales. Además, la PCR en tiempo real (qPCR) es similar a la PCR convencional, pero permite la cuantificación del material genético en tiempo real, lo cual es útil para determinar la carga viral en pacientes infectados por VIH. Por último, la secuenciación de nueva generación (NGS) permite la secuenciación masiva y paralela de fragmentos de ADN, proporcionando una visión detallada del genoma del patógeno y su resistencia a medicamentos. Un ejemplo de esto es el diagnóstico y caracterización de infecciones hospitalarias por *Klebsiella pneumoniae* resistente a antibióticos carbapenémicos.

Diagnóstico indirecto

Los métodos indirectos de diagnóstico etiológico se basan en la detección de la respuesta inmunitaria del hospedador frente a la infección, en lugar de detectar directamente el agente patógeno. Estos métodos son esenciales cuando el microorganismo es difícil de aislar o cuando la infección es crónica o pasada. La detección de anticuerpos específicos en el paciente con sospecha de enfermedad infecciosa puede realizarse en forma cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa. Las técnicas cualitativas informan presencia/ausencia del anticuerpo, las técnicas semicuantitativas informan resultados en valores numéricos (diluciones), mientras que las cuantitativas informan la concentración o título de anticuerpos (Tabla 4.1).

Tabla 4.1

Clasificación de las técnicas inmunológicas de diagnóstico etiológico

Técnicas	Tipo de resultado	Unidades (ejemplos)
Cualitativas	Presencia / ausencia	Positivo No detectado No reactivo
Semicuantitativas	Unidades relativas	8 diluciones 1/64
Cuantitativas	Unidades absolutas	mg/dL g/L

En general, las técnicas de aglutinación se evalúan a ojo desnudo y permiten obtener directamente el resultado (si se observa aglutinación, el resultado es positivo, caso contrario, el resultado es negativo). En cambio, si la detección de anticuerpos en el suero del paciente se

realiza por métodos automatizados o mediante equipo de medición, el resultado de la prueba será un número que deberá compararse con un valor conocido para esa prueba y determinado por el fabricante, denominado *punto de corte o cut-off*. En este caso, el resultado será positivo si el valor hallado en el paciente es mayor al punto de corte y se considera negativo, si dicho valor es menor a él.

Las técnicas semicuantitativas se realizan mediante diluciones seriadas e informan resultados en unidades relativas. En estos métodos no puede conocerse la concentración verdadera del analito, por lo tanto el resultado se expresa en función de diluciones. En estos casos, surge el concepto de título de una reacción, el cual se define como la máxima dilución de la muestra que da positiva en una prueba inmunológica. Para estimar el título de anticuerpos, se realizan diluciones seriadas del suero del paciente y se enfrentan a una concentración constante y conocida de antígeno. El *título* se expresa como la máxima dilución de suero que produce un resultado positivo con dicha prueba.

Las técnicas cuantitativas expresan su resultado en cantidades. Los resultados pueden expresarse como concentraciones, unidades o índices. Estas unidades se calculan comparando el valor obtenido con la muestra problema con la de un patrón o muestra calibradora (realizadas simultáneamente). Por definición, el suero calibrador marca el límite entre los valores positivos clínicamente significativos y los resultados negativos, de tal manera que los valores superiores al calibrador se consideran positivos y los inferiores al mismo se consideran resultados negativos. Sin embargo, la utilización de unidades es sumamente compleja porque: no todas las pruebas tienen definido el valor de la unidad internacional, el calibrador se define de forma estadística en el país fabricante de la prueba y además, el valor del calibrador puede variar con el fabricante. Para solucionar este problema se ha propuesto expresar los resultados en forma de Índice, que se define como la relación entre el valor de la muestra problema sobre la del calibrador. De esta forma, toda muestra con índice superior a 1 será clasificada como positiva y si es inferior como negativa. La ventaja de este método, una vez ajustado el calibrador, es que el valor significativo siempre será el superior a la unidad y tanto más positivo cuanto más elevado sea. La utilización del índice como forma de expresión unificaría los resultados haciendo comparables las diferentes marcas entre sí.

Los estudios serológicos cuantitativos para identificar un cambio en la concentración de anticuerpos (título de anticuerpos) utilizan el *par serológico*. Estas técnicas implican la recolección de dos muestras de suero, una obtenida al inicio de la enfermedad y otra, dos semanas después (muestras de fase aguda y de la convalecencia).

La *seroconversión* se refiere al cambio en el estado serológico de negativo a positivo para un anticuerpo específico, lo cual indica una infección reciente. Por ejemplo, en el caso de la infección por el virus de la rubéola, la seroconversión de anticuerpos anti-rubéola se produce semanas después de la exposición inicial al virus y es un marcador crucial para el diagnóstico de la infección. Si ambas muestras de suero presentan anticuerpos, entonces, un incremento de cuatro veces de los títulos totales de anticuerpos entre la fase aguda y la de convalecencia, se considera evidencia de infección activa.

La detección de IgM específica es útil para diagnosticar infecciones agudas. Esta inmunoglobulina es el primer tipo de anticuerpo que se produce en respuesta a una infección. Por ejemplo, la presencia de anticuerpos para Citomegalovirus de tipo IgM (IgM-CMV) en sangre del neonato indica una infección intrauterina, ya que la IgM materna no puede atravesar placenta. Esta estrategia también es aplicable a las personas adultas. Por ejemplo, una paciente tiene diagnóstico presuntivo de varicela, una enfermedad producida por el virus Varicela zoster (VZV). Un resultado positivo de IgM contra el virus varicela (IgM-VVZ) indica que la paciente se encuentra cursando la infección al momento de la toma de muestra.

Finalmente, otra posibilidad de estudiar la evolución temporal de una infección es determinar la avidez de los anticuerpos específicos. La avidez es un concepto inmunológico que se asocia con la fuerza de la unión antígeno-anticuerpos y depende de la maduración de la respuesta inmune. Por lo tanto, la presencia de anticuerpos específicos de baja afinidad es indicador de una infección reciente. Este parámetro se utiliza principalmente para estudiar infecciones por *Toxoplasma gondii* y Citomegalovirus.

El diagnóstico de una enfermedad infecciosa se basa en tres pilares: la presentación clínica del paciente, los aspectos epidemiológicos de la infección y el diagnóstico etiológico basado en métodos de laboratorio. Ninguna prueba puede identificar todos los microorganismos, por lo tanto, el profesional tendrá que seleccionar las pruebas más adecuadas en función del diagnóstico presuntivo y deberá interpretar los resultados de los estudios solicitados en función del contexto clínico-epidemiológico de la enfermedad infecciosa.

Infecciones en el binomio madre-hijo

Las infecciones en el binomio madre-hijo representan un área crítica en la salud pública y la medicina, ya que pueden afectar tanto la salud materna como la del recién nacido. Estas infecciones pueden clasificarse en infecciones adquiridas durante la gestación (infecciones maternas) e infecciones congénitas (infecciones transmitidas al feto, ya sea *in útero*, durante el parto, o por vía postnatal a través de la lactancia).

Algunas de las principales infecciones con implicaciones congénitas de prevalencia en nuestro medio incluyen la sífilis, la toxoplasmosis y la infección por Citomegalovirus,

La sífilis afecta de manera significativa el embarazo, con consecuencias que pueden incluir deformidades óseas, lesiones cutáneas y otras anomalías en el recién nacido. La identificación temprana y el tratamiento con antibióticos durante el embarazo son vitales para minimizar estos riesgos.

La toxoplasmosis suele ser una infección asintomática en las madres pero puede tener efectos devastadores en el feto, llevando a condiciones como hidrocefalia, calcificaciones cerebrales y retinopatía. La prevención, a través de medidas higiénicas y educativas sobre la alimentación y exposición a los gatos, es fundamental, junto con la vigilancia en mujeres embarazadas de alto riesgo.

La infección por Citomegalovirus constituye una de las causas más comunes de discapacidad mental, ocular y auditiva en niños. La infección puede ser asintomática en la madre, pero puede tener consecuencias graves en el feto, incluyendo microcefalia, sordera y daño ocular. El diagnóstico se basa en la realización de pruebas específicas en neonatos con signos clínicos sospechosos o en situaciones de riesgo identificado.

El estudio de las infecciones congénitas es esencial, debido a su potencial impacto en el desarrollo del feto y la salud del recién nacido. Por lo tanto, el reconocimiento temprano y el manejo adecuado de estas infecciones son cruciales para prevenir daños permanentes y mejorar el pronóstico de los niños.

Estudio de infecciones en la gestante y en la infección congénita

El algoritmo diagnóstico es una herramienta clave para abordar el diagnóstico y manejo de infecciones en embarazadas. Generalmente, el enfoque incluye una evaluación para identificar signos y síntomas que sugieren la presencia de una infección, como la fiebre, erupciones cutáneas o síntomas sistémicos. A continuación, se realiza una historia clínica que recopila información sobre los antecedentes de salud, exposiciones (viajes, actividades) y pruebas serológicas previas. Después de esta evaluación inicial, se llevan a cabo pruebas diagnósticas mediante el uso de pruebas serológicas y cultivos específicos para identificar patógenos. Por ejemplo, el uso de técnicas de detección de ácidos nucleicos permite identificar infecciones virales como el VIH y el virus de la hepatitis B, mientras que las pruebas serológicas sirven para identificar anticuerpos específicos de infecciones como la rubéola o la sífilis. Posteriormente, es fundamental realizar una evaluación del riesgo que determine el riesgo de transmisión al feto y el posible daño asociado. Basado en esta información, el manejo y tratamiento se define conforme a los hallazgos diagnósticos, lo que puede incluir la administración de antibióticos, antivirales o intervenciones complementarias. Finalmente, se establece un seguimiento para monitorear la salud materna y fetal a lo largo del embarazo, enfocándose en posibles secuelas.

En conclusión, la comprensión y el manejo de las infecciones en el binomio madre-hijo son esenciales para la salud y bienestar tanto de la madre como del recién nacido. La implementación de algoritmos diagnósticos adecuados y una vigilancia cuidadosa permiten una intervención temprana y mitigación de los riesgos, optimizando así los resultados en la salud materno-infantil. La educación y la prevención se constituyen como procesos continuos en la atención a mujeres embarazadas, lo que subraya la importancia de una atención integral durante el embarazo.

Preguntas Guía

1. ¿Cuál es la diferencia principal entre los métodos directos e indirectos de diagnóstico de las enfermedades infecciosas?

2. Describa la importancia de la microscopía óptica en el diagnóstico microbiológico directo.
3. Explique la utilidad de la tinción de Gram en la identificación de las bacterias.
4. ¿Qué es la tinción de Zielh-Neelsen y para qué se utiliza en microbiología clínica?
5. ¿Cómo se utiliza la PCR en tiempo real (qPCR) en el diagnóstico de enfermedades infecciosas?
6. Explique la diferencia entre las técnicas cualitativas, semicuantitativas y cuantitativas en la detección de anticuerpos.
7. ¿Qué es la seroconversión y por qué es importante en el diagnóstico de las infecciones?
8. ¿Qué es el par serológico y cuál es su utilidad en el diagnóstico de las infecciones?
9. Describe la utilidad de la IgM específica en el diagnóstico de las infecciones agudas.
10. Explique el concepto de avididad de los anticuerpos y su aplicación en el diagnóstico de las infecciones.

Referencias

- Doern, C.D. y Butler-Wu S.M (2016). Emerging and future applications of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory: A report of the Association for Molecular Pathology. *Journal of Molecular Diagnosis*, 18: 789-796.
- Dubberke, E.R. y Burnham, C.A. (2015). Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: Treat the patient, not the test. *JAMA* 175: 1801-1802. Doi: 10.1001/jamainternmed.2015.4607.
- García Palomo, J.D., Agüero Balbín, J., Parra Blanco, J.A. y Santos Benito, M.F. (2010). Enfermedades infecciosas. Concepto. Clasificación. Aspectos generales y específicos de las infecciones. Criterios de sospecha de enfermedad infecciosa. Pruebas diagnósticas complementarias. Criterios de indicación. *Medicine (Madrid)*; 10(49): 3251-3264. Doi: 10.1016/S0304-5412(10)70027-5
- Hanson, K.E. y Couturier M.R. (2016). Multiplexed molecular diagnostics for respiratory, gastrointestinal, and central nervous system infections. *Clinical Infectious Diseases*, 63: 1361-1369.
- Lavezzo, E., Barzon, L., Toppo, S. y Palù, G. (2016). Third generation sequencing technologies applied to diagnostic microbiology: benefits and challenges in applications and data analysis. *Expert in Review Molecular Diagnosis*, 16(9): 1011-23. Doi: 10.1080/14737159.2016.1217158.
- Lockhart, S.R., Ghannoum, M.A. y Alexander B.D. (2017). Establishment and Use of Epidemiological Cutoff Values for Molds and Yeasts by Use of the Clinical and Laboratory Standards Institute M57 Standard. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(5): 1262-1268. Doi: 10.1128/JCM.02416-16.

Xavier, B.B., Das, A.J., Cochrane, G., De Ganck, S., Kumar-Singh, S., Aarestrup, F.M., Goossens, H. y Malhotra-Kumar, S. (2016). Consolidating and Exploring Antibiotic Resistance Gene Data Resources. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(4): 851-859.

CAPÍTULO 5

Propiedades generales de las pruebas de diagnóstico microbiológico

Nora Beatriz Molina

Las pruebas inmunológicas son técnicas utilizadas para el estudio de enfermedades infecciosas y deben cumplir con criterios estrictos de precisión, exactitud, validez y seguridad para poder ser utilizadas en el diagnóstico de una enfermedad. Dichas pruebas se suelen caracterizar teniendo en cuenta dos propiedades intrínsecas: sensibilidad y especificidad.

La *sensibilidad analítica* es el límite inferior de detección de un antígeno o anticuerpo en una prueba. Indica la cantidad de antígeno o anticuerpo que es capaz de detectar, por lo tanto, cuanto más sensible es una técnica, menor concentración de antígeno o anticuerpo puede detectar. Una alta sensibilidad analítica es crucial para identificar infecciones en etapas tempranas o en casos con baja carga patogénica.

La *especificidad analítica* es el grado en que la prueba distingue entre el antígeno o anticuerpo en cuestión y otros componentes que pueden ser detectados en la prueba. En este caso, una técnica con alta especificidad detecta solamente un antígeno (o anticuerpo) y no presenta reacciones cruzadas entre antígenos (o anticuerpos) similares. Una alta especificidad analítica reduce la interferencia de sustancias no deseadas y mejora la precisión del diagnóstico.

Otra forma de estudiar la sensibilidad y la especificidad es a través de la utilidad diagnóstica de una prueba de laboratorio:

La *sensibilidad diagnóstica* es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. En resumen, la sensibilidad diagnóstica es la capacidad de la prueba para detectar a los sujetos enfermos. Una alta sensibilidad diagnóstica minimiza la probabilidad de falsos negativos.

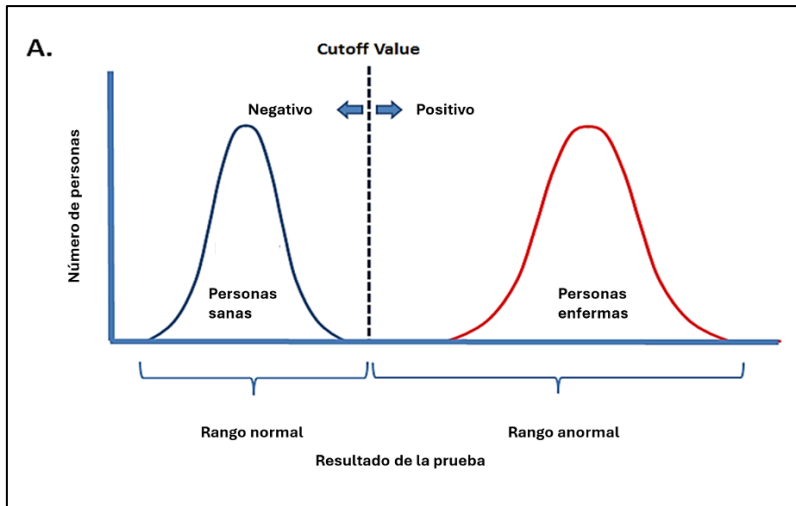
La *especificidad diagnóstica* se define como la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. En otras palabras, se puede definir la especificidad diagnóstica como la capacidad de una prueba para detectar a los sujetos sanos. Una alta especificidad diagnóstica minimiza la probabilidad de falsos positivos.

Las pruebas inmunológicas ideales presentan resultados con alta sensibilidad y especificidad, sin resultados falsos positivos o falsos negativos. Este tipo de pruebas presentan una división clara entre los pacientes sanos y enfermos como dos poblaciones bien separadas. Este valor de

la prueba que divide a los pacientes sanos (valores normales) de los enfermos (valores anormales) se denomina *valor de corte* o *cut-off value* (Figura 5.1).

Figura 5.1

Prueba inmunológica ideal



En la práctica diaria, las pruebas diagnósticas reales pueden presentar un solapamiento de dos poblaciones: individuos enfermos (verdaderos positivos, VP) y sanos (verdaderos negativos, VN). Esta situación suele generar dificultades para identificar claramente a las personas sanas de las enfermas. Además, la complejidad de la técnica real para asignar el valor de corte suele generar la aparición de resultados falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN) (figura 5.2 y figura 5.3)

Figura 5.2

Prueba inmunológica real

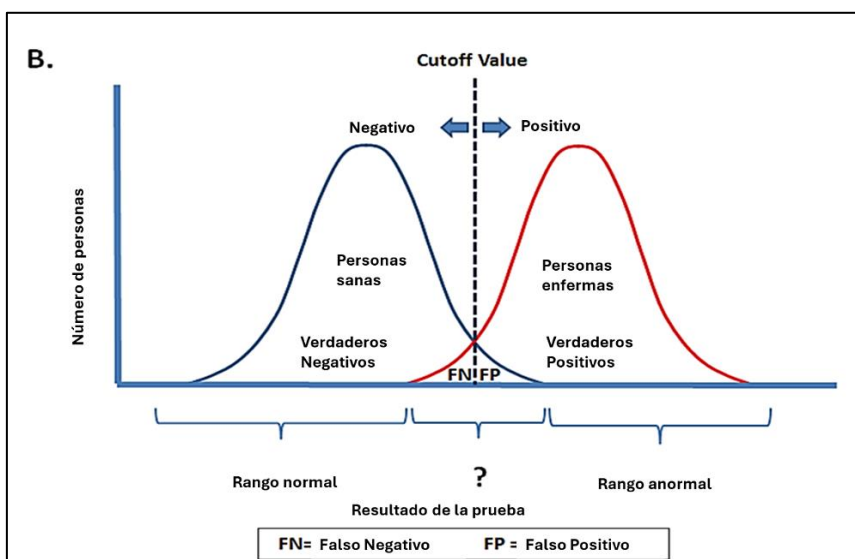


Figura 5.3

Resultados de la prueba inmunológica. Se considera una prueba dicotómica donde positivo significa enfermo y negativo significa sano

Prueba / Paciente	Paciente Enfermo	Paciente Sano
Prueba Positiva	Verdadero Positivo (VP)	Falso Positivo (FP)
Prueba Negativa	Falso Negativo (FN)	Verdadero Negativo (VN)

Teniendo en cuenta la sensibilidad y especificidad de una técnica de diagnóstico podemos plantear dos ejemplos extremos: A) técnica con sensibilidad máxima y B) técnica con especificidad máxima.

A) Técnica con sensibilidad máxima

En este caso, cuando la sensibilidad de la técnica real tiende a su valor máximo, los resultados falsos negativos disminuyen pero suelen aumentar los resultados falsos positivos (figura 5.4 y figura 5.5)

Figura 5.4

Prueba inmunológica con sensibilidad máxima. Punto de corte: valor de corte

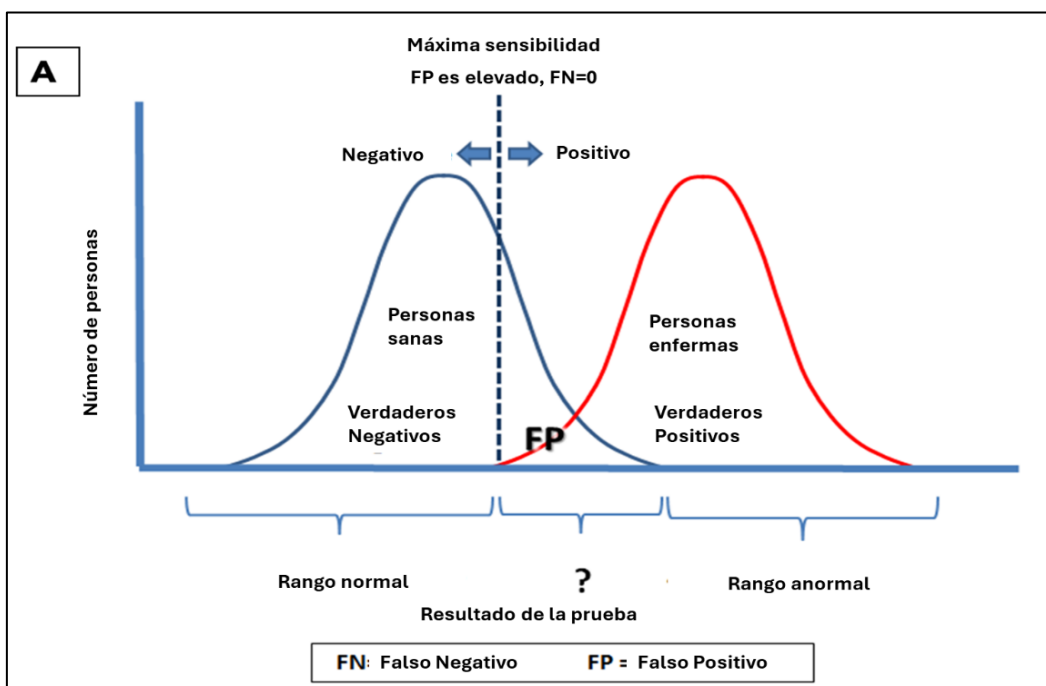


Figura 5.5

Prueba diagnóstica con alta sensibilidad. Se considera una prueba dicotómica donde positivo significa enfermo y negativo significa sano

Prueba diagnóstica con *alta sensibilidad*

	Paciente enfermo	Paciente sano
Prueba positiva	Verdadero positivo	<i>Falso positivo</i>
Prueba negativa	Falso Negativo	Verdadero negativo

Considerando una prueba dicotómica donde un *resultado positivo* significa enfermo y un *resultado negativo* significa sano

B) técnica con especificidad máxima

En este caso, cuando la especificidad de la técnica real tiende a su valor máximo, los resultados falsos positivos disminuyen pero suelen aumentar los resultados falsos negativos (figura 5.6 y figura 5.7).

Figura 5.6

Prueba inmunológica con especificidad máxima. Punto de corte: valor de corte

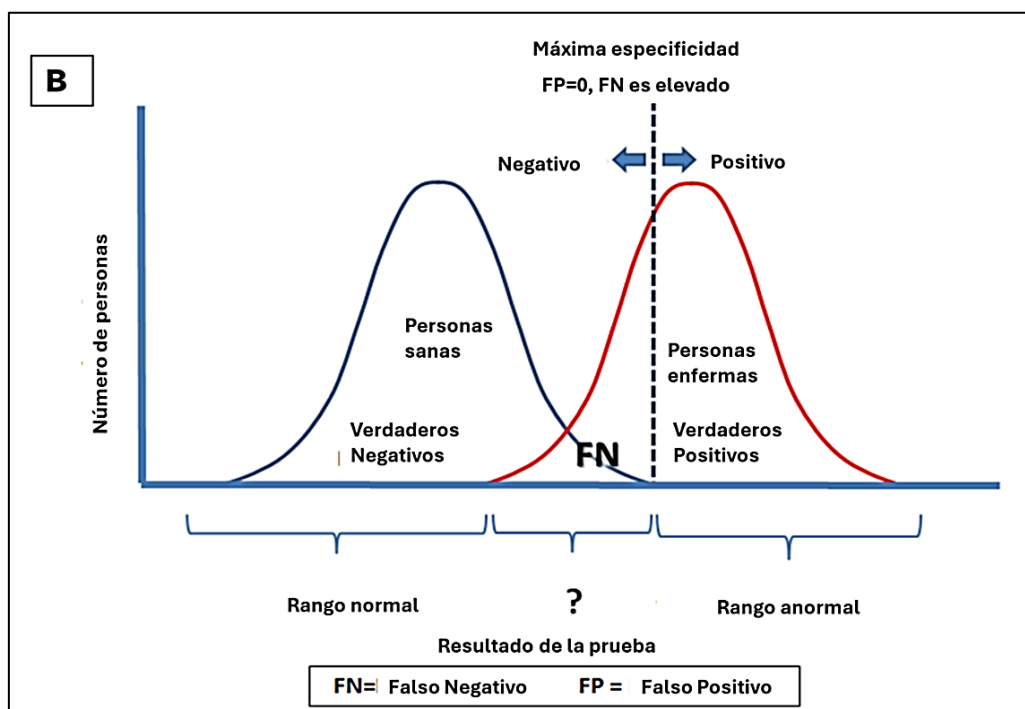


Figura 5.7

Prueba diagnóstica con alta especificidad. Se considera una prueba dicotómica donde positivo significa enfermo y negativo significa sano

Prueba diagnóstica con *alta especificidad*

	Paciente enfermo	Paciente sano
Prueba positiva	Verdadero positivo	Falso positivo
Prueba negativa	Falso Negativo	Verdadero negativo

Considerando una prueba dicotómica donde un *resultado positivo* significa enfermo y un *resultado negativo* significa sano

¿Cuál es la importancia de conocer la sensibilidad y la especificidad de las técnicas de laboratorio? Veamos un ejemplo: a 100 personas se les extrae sangre para realizar el diagnóstico de una enfermedad infecciosa con una técnica que presenta una sensibilidad de 70% y una especificidad de 95%. En el caso de la sensibilidad, esta técnica mostrará 30% de falsos negativos, es decir, de cada 100 personas enfermas, habrá 30 a las que no se les detectó la enfermedad. Por otro lado, una especificidad de 95% implica que habrá 5% de falsos positivos, indicando que 5 personas de cada 100 tendrán un resultado positivo (enfermedad presente) aunque no estén enfermos.

En resumen, la sensibilidad se define como el cociente entre los Verdaderos Positivos (VP) sobre los Verdaderos Positivos más los Falsos Negativos (FN). La especificidad se define como los Verdaderos Negativos (VN) sobre los Verdaderos Negativos (VN) más los Falsos Positivos (FP) (Figura 5.8).

Figura 5.

Sensibilidad y especificidad de una prueba

	Condición o Enfermedad Presente	Condición o Enfermedad Ausente	
Prueba positiva	VP	FP	Total de individuos con prueba positiva
Prueba negativa	FN	VN	Total de individuos con prueba negativa
	Total de individuos enfermos	Total de individuos sanos	Total de individuos
Sensibilidad= $\frac{VP}{VP + FN}$		Especificidad= $\frac{VN}{FP + VN}$	

Valor predictivo de una técnica inmunológica

El Valor Predictivo se define como la probabilidad que un individuo con resultado positivo esté realmente infectado (VPP) o de que un individuo con resultado negativo esté realmente no infectado (VPN). Los valores predictivos dependen de la prevalencia o frecuencia de la enfermedad en la población objeto de estudio. El aumento de la prevalencia se acompaña de un aumento significativo del valor predictivo positivo (VPP) y la caída drástica del valor predictivo negativo (VPN).

El VPP es la probabilidad de que un individuo tenga la enfermedad, dado que el resultado de la prueba es positivo. El VPP se calcula como el cociente entre los Verdaderos Positivos (VP) sobre los Verdaderos Positivos (VP) más los Falsos Positivos (FP). Un VPP alto indica que los resultados positivos son confiables y que la técnica es eficaz para identificar correctamente a los infectados.

El VPN es la probabilidad de que un individuo no tenga la enfermedad, dado que el resultado de la prueba es negativo. El VPN se calcula como el cociente entre los Verdaderos Negativos (VN) sobre los Verdaderos Negativos más los Falsos Negativos (FN). Un VPN alto asegura que los resultados negativos son confiables y que la técnica es efectiva para descartar correctamente a los no infectados. (Figura 5.9).

Figura 5.9

Valores predictivos de una prueba

	Condición o Enfermedad presente	Condición o Enfermedad ausente	
Prueba positiva	VP	FP	Total de individuos con prueba positiva
Prueba negativa	FN	VN	Total de individuos con prueba negativa
	Total de individuos enfermos	Total de individuos sanos	Total de individuos
$+VPP = \frac{VP}{VP + FP}$		$-VPN = \frac{VN}{FN + VN}$	

Veamos un ejemplo de aplicación: el análisis preocupacional incluye la detección de sífilis (una enfermedad de transmisión sexual producida por el *Treponema pallidum*); para este análisis se buscan anticuerpos en el suero del paciente mediante una técnica serológica. La mejor estrategia para no perder ningún paciente que pudiera tener anticuerpos sería utilizar un método con alta sensibilidad (detectará anticuerpos en muy bajas cantidades). Ahora bien, toda técnica

altamente sensible suele ser menos específica, por lo tanto pueden presentarse reacciones cruzadas dando resultados falsos positivos. Por lo tanto, el siguiente paso en el diagnóstico es confirmar los resultados de todos los pacientes que dieron positivos en la prueba de tamizaje utilizando un método muy específico, ya que de esta manera se pueden discriminar los positivos verdaderos (VP) de los falsos positivos (FP). En el caso particular de la sífilis, primero se realizará una prueba de tamizaje con una técnica con buena sensibilidad como la VDRL (Laboratorio de investigación de enfermedades venéreas) y luego todos los pacientes con resultados positivos (sin importar el título) se confirmarán técnicas específicas como la FTA-ABS (Absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes) o la MHA-TP (Micro hemaglutinación para *T. pallidum*).

La sensibilidad y especificidad son propiedades intrínsecas de la técnica, mientras que el VP es un parámetro que depende de la prevalencia de la infección. Esto supone que el resultado de una misma prueba serológica pueda tener diferente valor predictivo: Si empleamos una prueba para detección del virus de hepatitis B con una sensibilidad y especificidad de 99% en un banco de sangre (prevalencia en donantes de 0,8%) el VPP será de 47%. Esa misma prueba empleada en una población de pacientes con síntomas compatibles de enfermedad presenta un VPP de 91%. Así, en un área de alta endemidad el VPP de un resultado positivo es más alto que en una zona no endémica (y por lo tanto la probabilidad de resultado falso positivo es menor).

Las técnicas inmunológicas son fundamentales en el diagnóstico de enfermedades infecciosas debido a su capacidad para detectar específicamente antígenos y anticuerpos. La sensibilidad y especificidad, tanto analíticas como diagnósticas, junto con la consideración de falsos positivos y negativos, y los valores predictivos, son esenciales para evaluar la eficacia de estas técnicas. Estos parámetros garantizan que los diagnósticos sean precisos y fiables, contribuyendo significativamente al manejo adecuado de las enfermedades infecciosas.

Cocientes de Probabilidad

Los cocientes de probabilidad relacionan sensibilidad y especificidad de una prueba en un solo índice y no dependen de la prevalencia. El *cociente de probabilidad de una prueba positiva* (CPP) o razón de verosimilitud positiva refleja con qué frecuencia se obtiene un resultado positivo entre los enfermos, en comparación con los sanos. El *cociente de probabilidad de una prueba negativa* (CPN) o razón de verosimilitud negativa, refleja qué frecuente es obtener un resultado negativo entre los enfermos en comparación con los sanos.

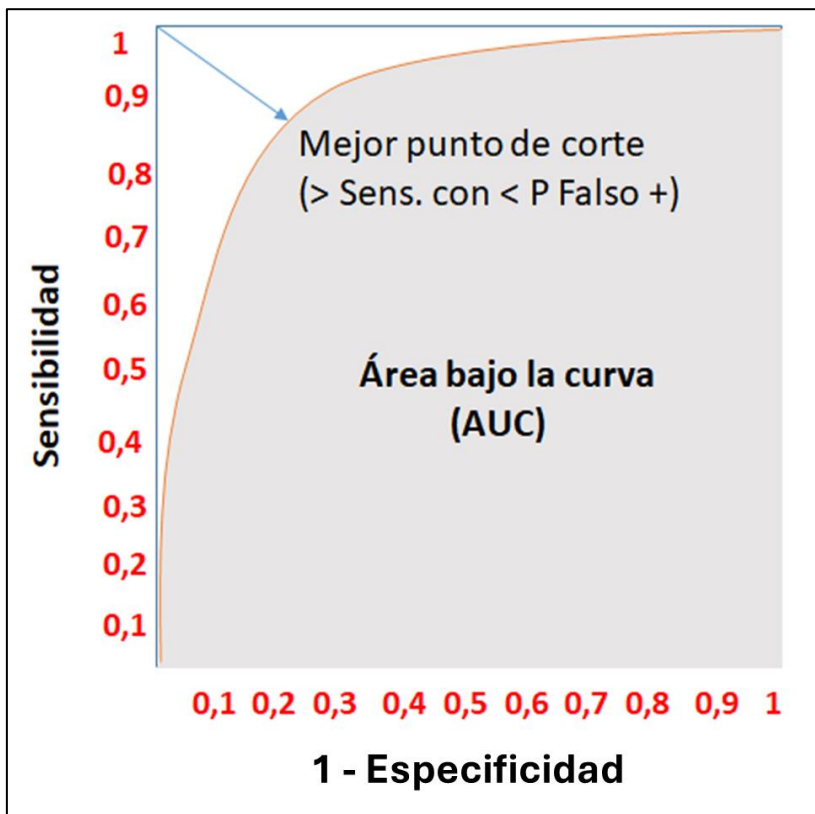
Validez de pruebas diagnósticas con valores continuos

Los resultados de muchas pruebas diagnósticas son valores numéricos continuos. En ellas debemos decidir a partir de qué valor numérico o punto de corte, los resultados se considerarán positivos o negativos.

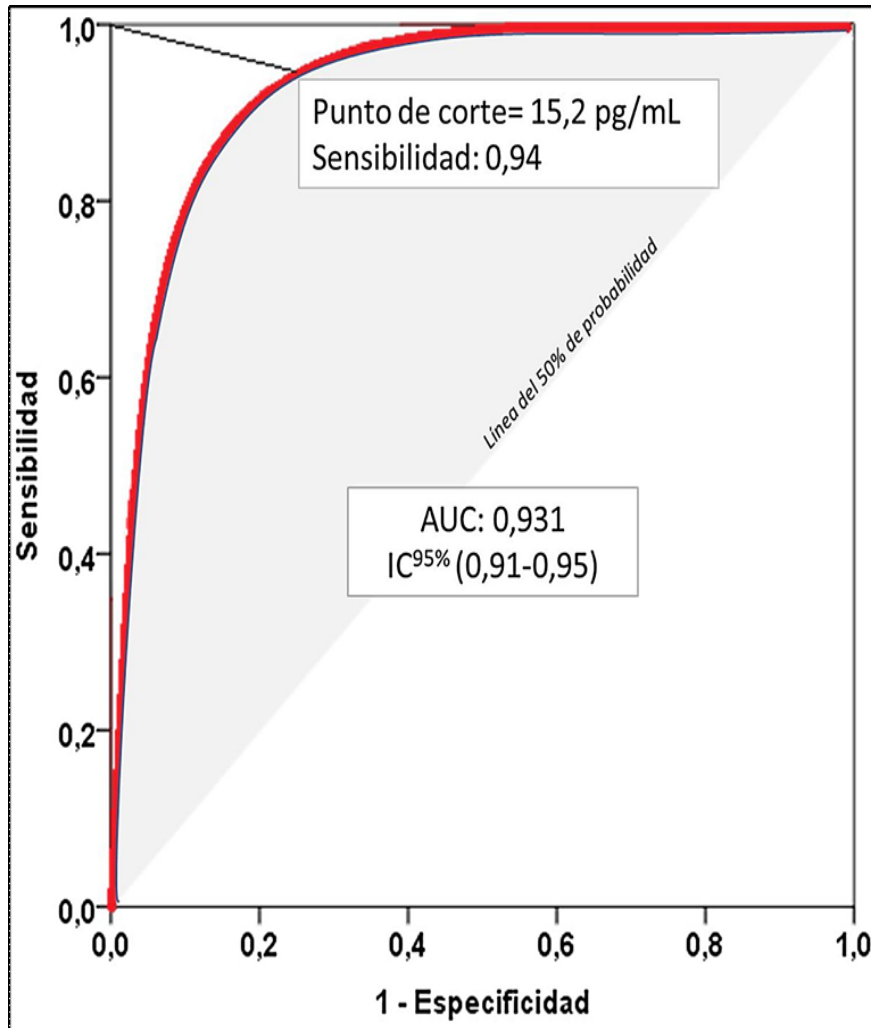
Las curvas de características funcionales (Característica de funcionamiento del receptor [ROC]) representan gráficamente los pares de valores de sensibilidad y especificidad resultantes de la variación continua de los puntos de corte en todo rango de resultados observados. En dichas curvas, cada punto representa un par de sensibilidad y especificidad. Por lo tanto, la curva ROC permite elegir el punto de corte más adecuado para la prueba, conocer el rendimiento global de la prueba y comparar la capacidad discriminativa de varias pruebas diagnósticas. La representación gráfica de curvas ROC permite una apreciación directa de las diferencias entre varios puntos de corte de una misma prueba diagnóstica o entre varias pruebas diagnósticas (figura 5.10).

Figura 5.10

Representación de una curva ROC

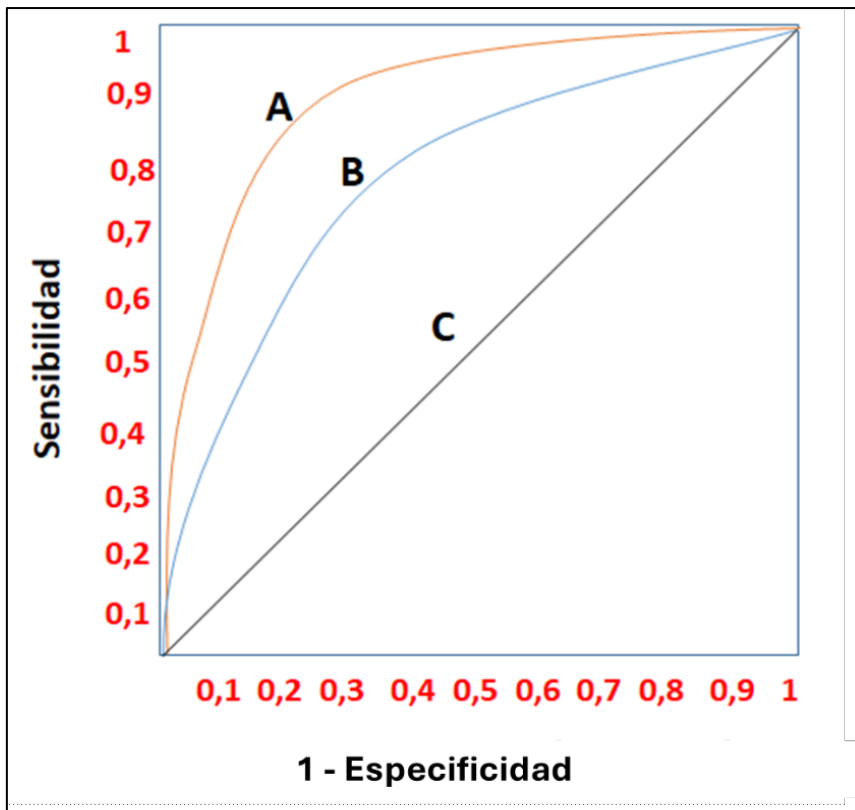


El área bajo la curva ROC (AUC) oscila entre 0 y 1, y es un excelente indicador de la validez diagnóstica de la prueba, de modo que, a mayor valor de esta área, mayor capacidad de la prueba de discriminar correctamente entre enfermos y no enfermos. Una prueba ideal (S y E de 100%) tiene un área bajo la curva de 1. Una prueba cuya curva ROC tenga un AUC > 0,9 se considera muy exacta, entre 0,7-0,9 de exactitud moderada y entre 0,5-0,7 de exactitud baja (figura 5.11).

Figura 5.11*Ejemplo de una curva ROC. AUC: área bajo la curva*

Uso de ROC para comparar pruebas de diagnóstico

Al trazar el desempeño de dos o más curvas ROC de pruebas diagnósticas, podremos comparar este desempeño de forma gráfica. En la figura 5.12 se observa que la curva marcada con la letra A, tiene un poder discriminatorio mejor (mayor proporción de verdaderos positivos que falsos positivos para cada punto de corte) que la curva marcada con la letra B. Así mismo, se entiende que el área bajo la curva (AUC) de la curva A es mayor que el área bajo la curva de B, por lo que podemos concluir que a mayor área bajo la curva ROC de una prueba diagnóstica, mayor será el poder discriminatorio de esa prueba. La curva marcada con la letra C es la línea de no discriminación, ya que para cualquier punto de corte, la prueba arroja igual proporción de resultados verdaderos positivos que falsos positivos (AUC = 0,5).

Figura 5.12*Curva ROC. Comparación de 2 pruebas diferentes*

Cuestionario Guía

1. Defina los siguientes términos: sensibilidad analítica, especificidad diagnóstica, valor predictivo positivo y negativo.
2. Complete la siguiente frase con las palabras correctas: El Valor Predictivo Positivo (VPP) es la probabilidad de que un individuo *tenga/no tenga* la enfermedad dado que el resultado de la prueba es *positivo/negativo*.
3. Explique la importancia de la sensibilidad y especificidad en las pruebas diagnósticas y cómo afectan a la interpretación de los resultados. Considere las siguientes preguntas: ¿Cómo influyen estos parámetros en la identificación de falsos positivos y falsos negativos? ¿Qué impacto tienen en el manejo de las enfermedades infecciosas?
4. Defina el cociente de probabilidad de una prueba positiva (CPP).
5. Justifique la necesidad de utilizar tanto la sensibilidad como la especificidad en la evaluación de una técnica diagnóstica.
6. ¿Qué es el área bajo la curva y que representa?

Referencias

- Cerda, J. y Cifuentes, L. (2012). Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos. *Revista chilena de infectología*, 29(2), 138-141. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000200003>
- Obero C.E. (2018). Módulo de Bioestadística. Recuperado 27 de octubre de 2024. Disponible en <https://modulodeestadistica.wordpress.com/curva-operador-receptor-roc/>
- Pérez, I., Taito-Vicenti, I.Y., González-Xuriguera, C.G., Carvajal, C., Franco, J. y Loézar, C. (2021). How to interpret diagnostic tests. *Medwave*, 21(7): e8432 Doi 10.5867/medwave.2021.07.8432
- Sancho-Insenser, J. y González-Castillo, A. (2022). Pruebas diagnósticas. ¿Cómo describir su validez? *Cirugía Española*, 100(9): 590-594
- Vizcaino Salazar G. (2017) Importancia del cálculo de la sensibilidad, la especificidad y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnóstico clínico y de laboratorio. *Medicina y Laboratorio*; 23(7-8): 365-386.

CAPÍTULO 6

Técnicas inmunológicas aplicadas al diagnóstico de las enfermedades infecciosas

Nora Beatriz Molina

Las técnicas inmunológicas son herramientas esenciales en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Estas técnicas se basan en la interacción antígeno-anticuerpo y pueden emplearse para detectar la presencia de patógenos o la respuesta inmune del huésped.

Las técnicas de diagnóstico inmunológico se pueden clasificar en técnicas de interacción primaria y secundaria según el tipo de interacción entre antígenos y anticuerpos. Las técnicas de interacción primaria se basan en la interacción epítipo-paratope de un antígeno con un anticuerpo específico y no son visibles a simple vista. En el caso de las técnicas de interacción secundaria se produce una interacción de antígenos y anticuerpos complementarios que genera un resultado visible (Figura 6.1, Tabla 6.1)

Figura 6.1

Ejemplos de interacción Antígeno-Anticuerpo. A: interacción primaria, B: interacción secundaria

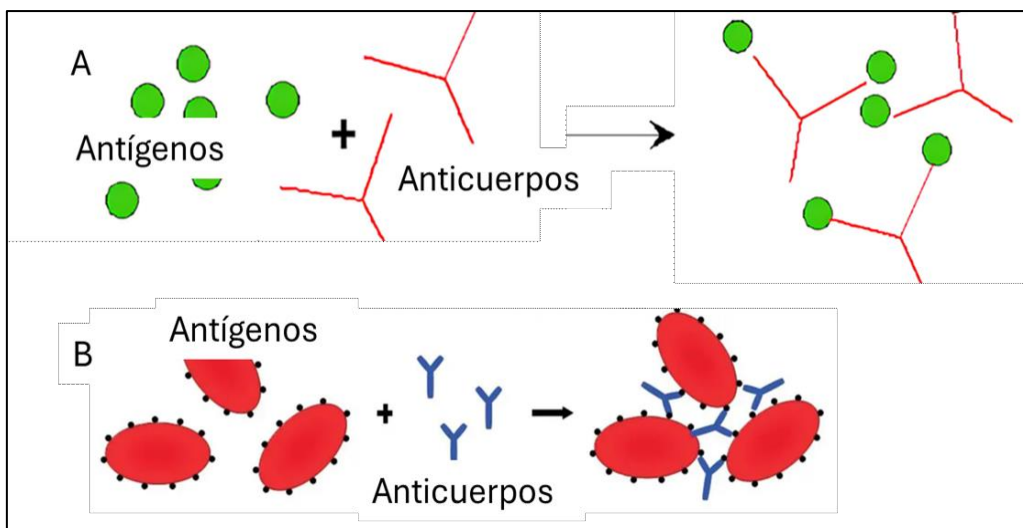


Tabla 6.1*Características de las pruebas inmunológicas*

Características de las pruebas inmunológicas	Técnicas inmunológicas de Interacción Primaria	Técnicas inmunológicas de Interacción Secundaria
Tipo de interacción	simple, Ag-Ac	formación de complejos macromoleculares
Tipo de lectura	indirecta	directa
Visible a ojo desnudo	NO	SI
Requiere equipamiento para su detección	SI	NO
Tipo de Ag y Ac	monovalentes o polivalentes	polivalentes
Sensibilidad analítica	mayor	menor
Ejemplos	Enzimoanálisis Fluoroanálisis	Aglutinación Precipitación

Técnicas inmunológicas de interacción primaria

Estas técnicas se basan en la unión directa entre un antígeno y un anticuerpo. Son la base de muchos ensayos inmunológicos y proporcionan información cualitativa y cuantitativa sobre la presencia de patógenos o la respuesta inmune del huésped.

Técnicas de Inmunoensayos

Los inmunoensayos son un conjunto de técnicas de laboratorio que se basan en la interacción altamente específica entre un antígeno y un anticuerpo. Estas técnicas son ampliamente utilizadas en el diagnóstico de enfermedades infecciosas por su elevada sensibilidad y especificidad. Sin embargo, para su utilización se requiere instrumental específico y personal altamente capacitado.

Los inmunoensayos se clasifican en función del marcador utilizado para detectar la interacción antígeno-anticuerpo (Tabla 6.2).

Tabla 6.2*Técnicas inmunológicas de interacción primaria*

Método de marcación del Ac o Ag	Tipo de método
Radiactividad	Radioinmunoanálisis
Enzimas	Enzimoimunoanálisis
Fluorescencia	Fluoroinmunoanálisis
Luminiscencia	Quimioluminoanálisis

Radioinmunoanálisis

Son métodos en los que los anticuerpos están marcados con compuestos radiactivos. La detección de las emisiones radiactivas se realiza en un contador de rayos gamma. Los métodos más conocidos son RIA (radioinmunoensayo) e IRMA (ensayo radioinmunométrico). Presentan la ventaja de su gran sensibilidad, pero su aplicación ha caído en desuso porque los isótopos radiactivos son peligrosos y contaminan el medio ambiente.

Enzimoimunoanálisis

Estos métodos se basan en la medición de la intensidad de color y utilizan anticuerpos marcados con una enzima que cataliza una reacción dando un producto detectable. Los enzimoimunoanálisis pueden ser cualitativos o cuantitativos; los cualitativos presentan un cambio neto de color y su resultado se expresa como positivo o negativo. Por el contrario, los cuantitativos permiten cuantificar el analito (concentración) pero suelen requerir curvas de calibración y valores de corte para la expresión de los resultados.

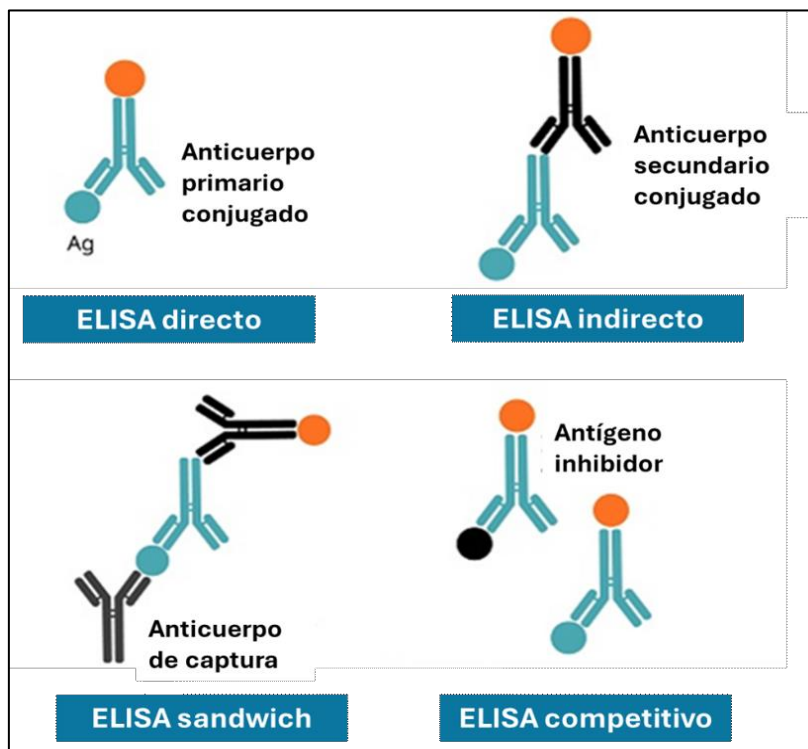
El método más utilizado es el ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas). Este inmunoensayo puede utilizarse para la detección de numerosos antígenos o anticuerpos en muestras biológicas (Figura 6.2, Tabla 6.3). Estas técnicas pueden utilizarse para detectar al virus de Hepatitis A, B y C, virus de Epstein Barr, virus de la Rubéola, VIH.

A continuación se describen los principales tipos de ELISA:

- ELISA directo: El antígeno se adhiere directamente a la placa de microtitulación. Posteriormente se añade un anticuerpo primario marcado con una enzima, que se unirá específicamente al antígeno.
- ELISA indirecto: El antígeno se adhiere a la placa. Luego, se añade la muestra que contiene el anticuerpo primario (si está presente), el cual se unirá al antígeno. Posteriormente, se añade un anticuerpo secundario marcado con una enzima, que reconocerá al anticuerpo primario.
- ELISA tipo sándwich: Un anticuerpo de captura se adhiere a la placa. A continuación, se añade la muestra que contiene el antígeno. El antígeno queda atrapado entre el anticuerpo de captura y un segundo anticuerpo (de detección) marcado con una enzima.
- ELISA competitivo: Se basa en la competencia entre un antígeno marcado y el antígeno presente en la muestra por unirse a un anticuerpo específico. A menor cantidad de antígeno en la muestra, mayor será la señal del antígeno marcado.

Tabla 6.3*Ventajas y limitaciones de los principales tipos de ELISA*

Tipo de ELISA	Ventajas	Limitaciones
Directo	Sencillo, rápido	Requiere el uso de anticuerpos primarios marcados
Indirecto	Mayor sensibilidad que el ELISA directo	Mayor número de pasos
Sándwich	Alta especificidad y sensibilidad. Útil para antígenos solubles	Requiere el uso de dos o más anticuerpos específicos
Competitivo	Permite cuantificar pequeñas cantidades de antígenos	Mayor complejidad

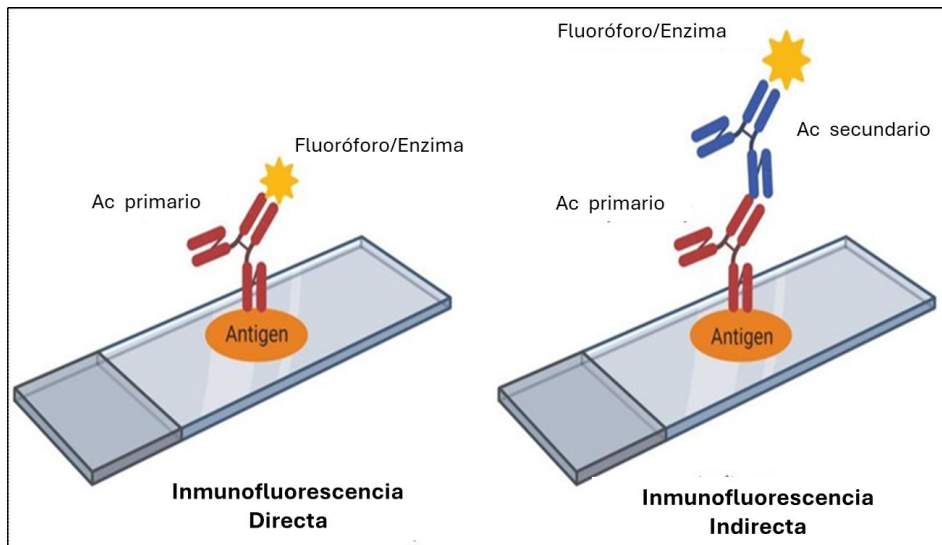
Figura 6.2*Tipos de ELISA (directo, indirecto, sándwich y competitivo)***Fluoroimmunoanálisis**

Son métodos de elevada sensibilidad que utilizan anticuerpos marcados con sustancias fluorescentes (fluorocromos). Estas técnicas se dividen en dos grandes grupos, inmunofluorescencia directa (IFD) e inmunofluorescencia indirecta (IFI). En general, la IFD se suele utilizar para la detección de Ag virales en muestras de secreciones bronquiales (panel

respiratorio) buscando virus respiratorios como el Virus Influenza, Adenovirus o Virus Sincicial Respiratorio. En cambio, la IFI se suele utilizar para la búsqueda de Ac específicos en suero del paciente con infecciones como Rubéola o Dengue (Figura 6.3).

Figura 6.3

Esquema de inmunofluorescencia directa e indirecta



Quimioluminoinanálisis

Es un método que utiliza anticuerpos marcados con sustancias que producen luz como resultado de una reacción química. Permite realizar la detección de numerosos analitos en muestras biológicas. Actualmente es uno de los métodos más utilizados en el laboratorio clínico por su elevada sensibilidad y especificidad.

Técnicas de Inmunoblots

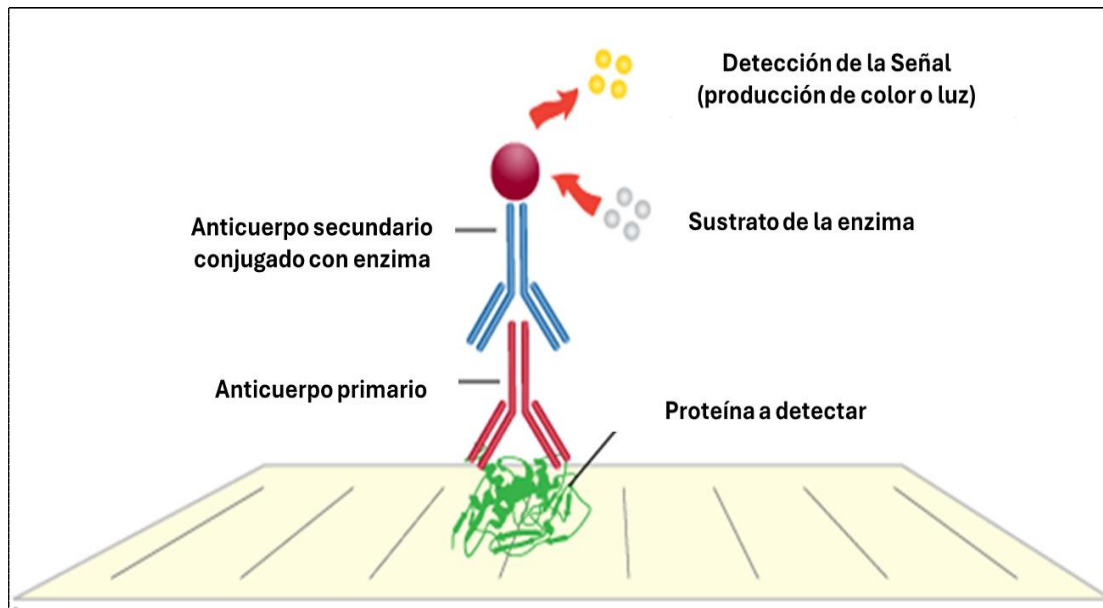
El inmunoblot es una técnica de laboratorio altamente específica, ampliamente utilizada en el diagnóstico de diversas enfermedades, especialmente aquellas de origen infeccioso. Este método se basa en la interacción altamente específica entre antígenos del patógeno y anticuerpos producidos por el sistema inmune en respuesta a la infección. Las reacciones antígeno-anticuerpo se desarrollan sobre el soporte (nitrocelulosa) y se revelan en forma similar a un ELISA (anticuerpo marcado con una enzima). La formación del complejo inmune se pone de manifiesto por bandas coloreadas sobre el papel. La interpretación se realiza comparando en forma visual la respuesta de la muestra del paciente con los controles positivos y negativos. Los inmunoblots pueden ser ensayos directos (anticuerpo primario está directamente conjugado a

una enzima) o indirectos (se utiliza un anticuerpo secundario marcado con una enzima para detectar el anticuerpo primario unido al antígeno). Este último método es más sensible y versátil.

Los inmunoblots se suelen utilizar para confirmar resultados positivos de anticuerpos en muestras de suero obtenidos con otras técnicas inmunológicas. Los inmunoblots más utilizados en microbiología son el *Western blot* para infección por VIH y *Recombinant immunoblot assay* (RIBA) para infección por virus de Hepatitis C (Figura 6.4).

Figura 6.4

Western blot (inmunoblot)



Técnicas inmunológicas de interacción secundaria

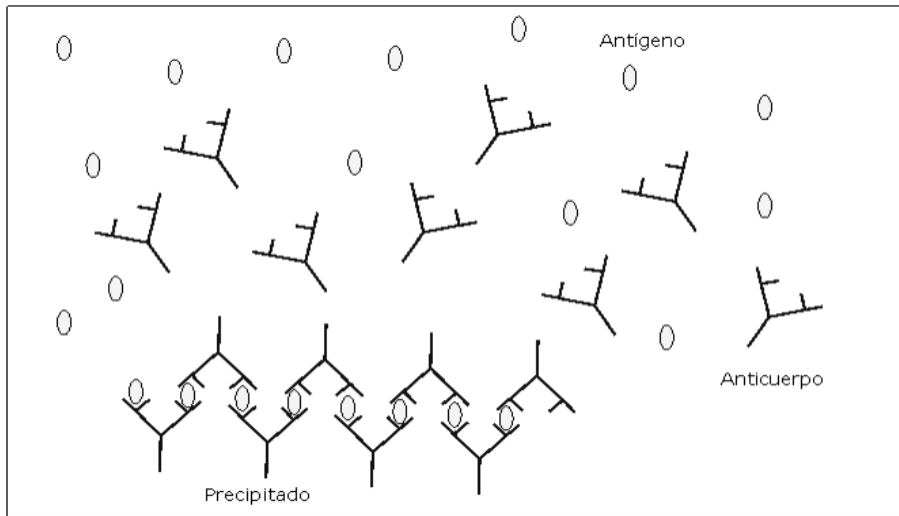
Los métodos de interacción secundaria se basan en las reacciones de antígeno-anticuerpo que pueden ser visualizadas de manera indirecta. Estas técnicas son útiles para detectar y cuantificar interacciones más débiles o indirectas entre antígenos y anticuerpos. Estas técnicas son más sencillas y económicas, sin embargo, su sensibilidad y especificidad suelen ser menores que las observadas en las técnicas de interacción primaria.

Técnicas de precipitación

La precipitación es una técnica inmunológica que combina antígenos y anticuerpos complementarios y solubles que reaccionan entre sí, produciendo un complejo insoluble que precipita (Figura 6.5).

Figura 6.5

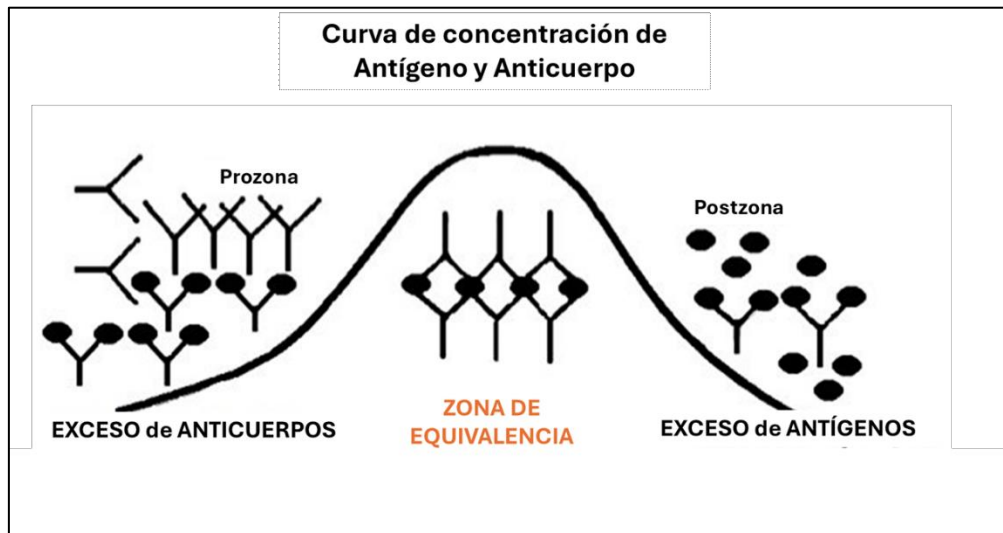
Esquema de una reacción de precipitación



La precipitación depende de las proporciones relativas de antígeno y anticuerpo presente. La zona donde la precipitación es óptima se denomina “zona de equivalencia” y se produce cuando las concentraciones de antígeno y anticuerpo son equivalentes (Figura 6.6).

Figura 6.6

Curva de concentración de antígeno y anticuerpo



Estas técnicas pueden realizarse en medio sólido o en medio líquido y la formación de los complejos inmunes puede detectarse en forma cualitativa o cuantitativa.

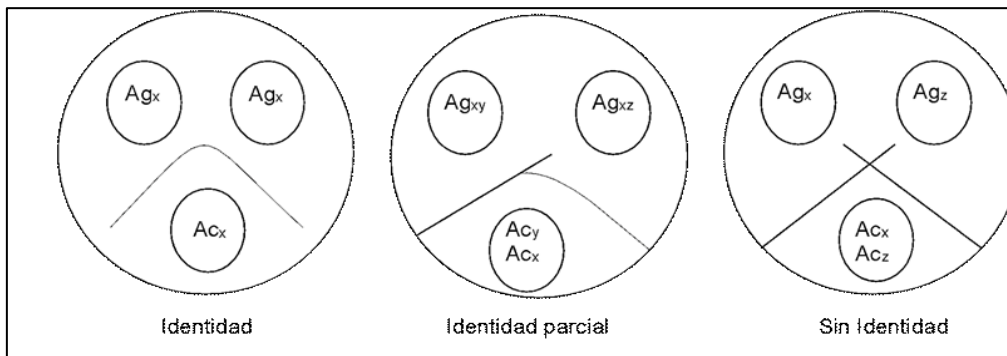
La precipitación en medio sólido se evidencia como una o varias líneas de precipitación visibles sobre un soporte de agar. Este tipo de precipitación puede realizarse por difusión pasiva

o mediante la aplicación de un campo eléctrico (electroforesis). Las técnicas más utilizadas en microbiología son la Doble Inmunodifusión (IDD) y la Contrainmunolectroforesis (CIEF).

La IDD permite reconocer si dos antígenos son iguales (identidad), distintos (sin identidad) o comparten algún epítopo (identidad parcial) (Figura 6.7). Otra utilidad de la técnica es que permite enfrenar distintos sueros de pacientes (anticuerpos) contra un mismo antígeno conocido. Un ejemplo de aplicación de la IDD es en el diagnóstico de Hidatidosis (infección causada por el parásito *Echinococcus granulosus*). En este caso en particular, la técnica se denomina Arco 5 o doble difusión arco 5 o DD5.

Figura 6.7

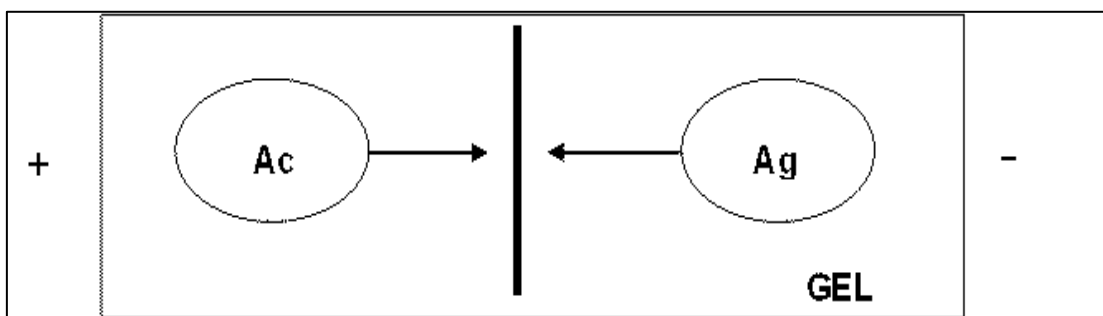
Doble Inmunodifusión



La CIEF es una técnica similar a la IDD pero presenta la ventaja de ser más rápida ya, que se aplica un campo eléctrico; de esta manera, los antígenos y anticuerpos difunden con mayor velocidad y precipitan en menor tiempo (Figura 6.8). Esta técnica es muy utilizada en infecciones micóticas producidas por hongos de micelio filamentosos como *Aspergillus*, *Histoplasma* o *Paracoccidioides*.

Figura 6.8

Contrainmunolectroforesis



En medio líquido, los resultados de las técnicas de precipitación se evalúan por turbidimetría o nefelometría. En este caso se utilizan equipos especiales (nefelómetros) para medir una señal, que indica la variación de la intensidad de la luz transmitida en el tubo de reacción producida

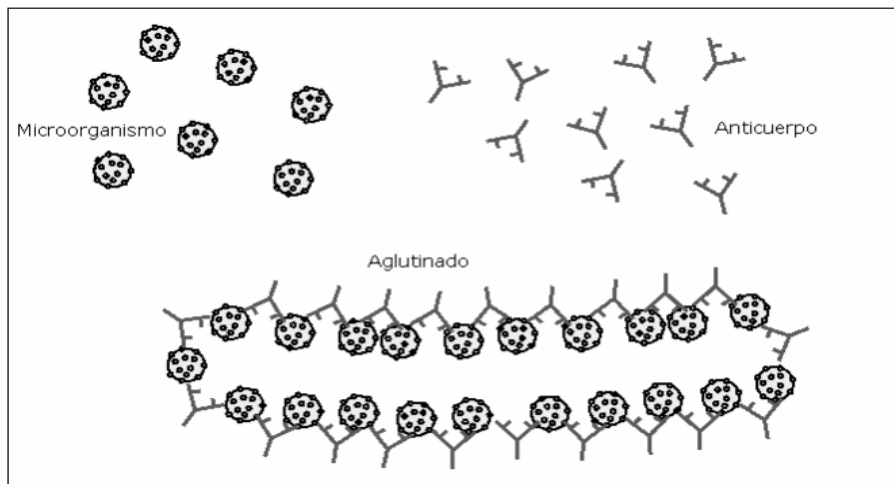
cuando se forman los complejos inmunes. Este tipo de medición tiene la ventaja adicional que permite detectar anticuerpos no precipitantes y antígenos en solución.

Técnicas de aglutinación

La aglutinación es una técnica inmunológica que utiliza antígenos o anticuerpos adheridos a partículas inertes como látex, bentonita, eritrocitos o bacterias muertas, que al ponerse en contacto con el anticuerpo o antígeno complementario, se produce un agregado visible (Figura 6.9). Estas pruebas pueden ser cualitativas (positivo/negativo) o semicuantitativas (título expresado en diluciones). Toda prueba debe realizarse respetando la técnica validada por el fabricante y siempre debe verificarse la reacción mediante controles positivos y negativos.

Figura 6.9

Esquema de una técnica de aglutinación



Existen muchos tipos de técnicas de aglutinación y se las agrupa de acuerdo con el tipo de partícula utilizada en la reacción, o según si se adhiere un antígeno o un anticuerpo al soporte inerte. Aunque la aglutinación no requiere instrumental complejo, se han desarrollado varios sistemas para aumentar la sensibilidad. Las metodologías actuales utilizan turbidimetría y nefelometría, que incrementan la sensibilidad y el límite de detección de antígenos solubles.

Aglutinación directa

La aglutinación directa (AD) es una técnica que utiliza antígenos que naturalmente se encuentran en una partícula. Un ejemplo lo constituye la identificación de las bacterias. Si se combina una suspensión bacteriana con un antisuero (suspensión de anticuerpos conocidos) y se produce una aglutinación, esto indica una reacción positiva. Este método requiere la aplicación de controles positivos y negativos procesados junto con las muestras.

La serotipificación de *Salmonella* spp. es un ejemplo. Esta reacción se basa en la aglutinación de la bacteria con anticuerpos que reaccionan contra los distintos antígenos bacterianos: O

(somático) y H (flagelar). Otro ejemplo habitual es la serotipificación de *Escherichia coli* para la detección del serotipo O157:H7 productor de toxina que causa el síndrome urémico hemolítico.

Aglutinación pasiva

La aglutinación pasiva (AP) emplea partículas inertes recubiertas de antígenos. Se pueden utilizar partículas de látex, bentonita o glóbulos rojos; en este último caso se habla de hemaglutinación. Un ejemplo muy utilizado en Microbiología es la detección de anticuerpos contra antígenos de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo beta hemolítico grupo A), una bacteria productora de faringitis en niños, con una gran variedad de complicaciones supurativas y no supurativas. También se utiliza para la detección de anticuerpos anti-*Trichinella spiralis*, parásito productor de la triquinosis. Este método puede presentar aglutinaciones inespecíficas debidas a la IgM, por lo tanto, las condiciones de reacción deben ser cuidadosamente controladas e interpretadas.

La aglutinación es una metodología empleada en el banco de sangre para la identificación de pacientes con brucelosis, infección producida por bacterias del género *Brucella*. En este caso, la reacción de aglutinación se denomina Reacción de Huddleson y detecta anticuerpos en el suero del paciente. Otras aplicaciones muy frecuentes, son la detección de anticuerpos en el suero contra parásitos como *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, o contra virus como el VIH o el virus de hepatitis B.

Aglutinación reversa pasiva

En la aglutinación reversa pasiva (ARP), las partículas inertes tienen adherido el anticuerpo con la zona de unión al antígeno libre para reaccionar. Este tipo de test se utiliza fundamentalmente para la detección de antígenos microbianos, permite detectar antígenos de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo beta hemolítico grupo B) causante de meningitis y septicemia neonatal; *Staphylococcus aureus*, productor de infecciones piógenas, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pyogenes* y *Haemophilus influenzae* tipo b, agentes causales de meningitis y otras infecciones graves. Además, permite detectar otros microorganismos como *Rotavirus*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*.

Inhibición de la hemaglutinación

Las reacciones de inhibición de aglutinación pueden utilizarse para la detección de antígenos o de anticuerpos. Si las partículas utilizadas son glóbulos rojos, entonces la prueba se denomina inhibición de la hemaglutinación o IHA. Este test también es utilizado para la detección de anticuerpos contra ciertos virus como el virus de la Rubéola, Sarampión, Influenza y Adenovirus.

Coaglutinación

La Coaglutinación (CoA) es una técnica de aglutinación que utiliza bacterias muertas como soporte inerte de la reacción. La bacteria más utilizada es *Staphylococcus aureus*, porque naturalmente une anticuerpos por su región constante (Fc) dejando el sitio activo del anticuerpo

libre para interactuar con el antígeno específico. Esta prueba se utiliza para la detección de antígenos bacterianos en líquidos biológicos. Permite identificar bacterias en el líquido cefalorraquídeo productoras de meningitis: *Neisseria meningitidis* (meningococo), *Haemophilus influenzae* tipo b y *Streptococcus pneumoniae* (neumococo).

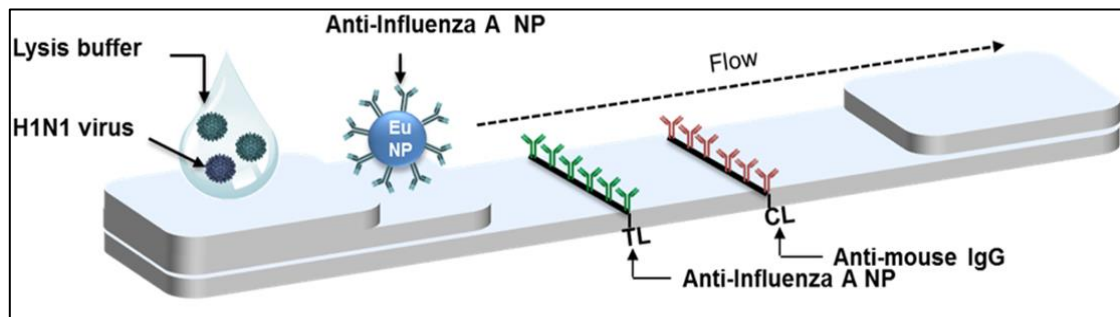
Inmunocromatografías

La inmunocromatografía es una técnica rápida y sencilla que se basa en la migración de un analito (antígeno o anticuerpo) a través de una membrana y su revelado mediante un anticuerpo específico marcado (Figura 6.10). Esta técnica es ampliamente utilizada en pruebas diagnósticas rápidas, como las pruebas de embarazo o las pruebas de detección de antígenos de COVID-19.

Las ventajas son su rapidez, sencillez, bajo costo y fácil lectura sin equipamiento sofisticado. Las principales limitaciones son su menor sensibilidad comparada con otras técnicas y la mayor probabilidad de resultados falsos positivos o negativos.

Figura 6.10

Esquema de una inmunocromatografía para la detección de antígenos de Virus Influenza H1N1



En resumen, las técnicas inmunológicas se basan en la especificidad de unión entre un antígeno y un anticuerpo. Son la base de muchos ensayos inmunológicos y proporcionan información cualitativa y cuantitativa sobre la presencia de patógenos o la respuesta inmune del huésped.

Preguntas Guía

1. ¿Cómo se clasifican las técnicas de diagnóstico inmunológico según el tipo de interacción entre antígenos y anticuerpos?
2. Indique cuál es la diferencia principal entre las técnicas de interacción primaria y secundaria
3. ¿Cómo se clasifican los inmunoensayos según el marcador utilizado para detectar la interacción antígeno-anticuerpo?

4. ¿Qué es el radioinmunoanálisis y por qué ha caído en desuso?
5. ¿Cómo funcionan los enzimoimmunoanálisis y cuáles son sus aplicaciones más comunes?
6. ¿Qué diferencias existen entre la inmunofluorescencia directa e indirecta y para qué se utiliza cada una?
7. ¿Qué es un inmunoblot y en qué casos se utiliza esta técnica?
8. ¿Cómo se diferencian las técnicas de precipitación en medio sólido y en medio líquido?
9. Explique qué es la aglutinación y cómo se clasifica según el tipo de partícula utilizada en la reacción
10. ¿Qué es la zona de equivalencia en las técnicas de precipitación y por qué es importante?
11. ¿Qué ventajas presenta la contrainmuno-electroforesis en comparación con la doble inmunodifusión?
12. ¿Qué ventajas y limitaciones presenta la inmunocromatografía en comparación con otras técnicas inmunológicas?

Referencias

- Alonso C., Bartolomé, R., Domínguez, J., Matas, L. y Rabella N. (2005). Técnicas rápidas de detección de antígenos. Procedimientos en Microbiología Clínica. SEIMC.
- García Espinosa, B., Rubio Campal F. y Romero Burguillos R. (2016). *Técnicas de inmunodiagnóstico*. Editorial: Paraninfo.
- González Maglio, D.H., Paz, M.L., Friedrich, A.D. y Leoni, J. (2019) Fundamentos de técnicas para el inmunodiagnóstico de las infecciones. En: Basualdo, Coto y Torres (Eds.), *Microbiología Biomédica*. Editorial Atlante.
- Lomonte, B. (2009). *Técnicas de Laboratorio en Inmunología Clínica*. Editorial Universidad de Costa Rica.
- Mérida de la Torre F. y Moreno Campoy E. (2015). Módulo VI. *Técnicas de inmunodiagnóstico. Manual para Técnico Superior de Laboratorio Clínico y Biomédico*. Editorial Médica Panamericana.
- Rich R.R. (2019). *Técnicas básicas de laboratorio en inmunología clínica*. Editorial Elsevier.
- Siachoque Montañez, H.O. (2006). *Inmunología. Diagnóstico e interpretación de pruebas de laboratorio*. Colección Lecciones de Medicina. Centro Editorial Universidad de Rosario.

CAPÍTULO 7

Técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico de las enfermedades infecciosas

Nora Beatriz Molina

La microbiología clínica es una ciencia orientada a la estudio e identificación del agente etiológico y a la detección de la resistencia antimicrobiana. La identificación precoz del agente etiológico responsable de una enfermedad infecciosa es crucial, porque el tratamiento oportuno del paciente previene las complicaciones graves y disminuye la mortalidad asociada a la infección. Un diagnóstico temprano puede disminuir la duración de la hospitalización y el uso de recursos médicos, lo que resulta en una reducción de costos tanto para el sistema de salud como para los pacientes. En el caso de las enfermedades transmisibles, el diagnóstico rápido es fundamental para implementar medidas de control y prevención, aislando a los pacientes y deteniendo la propagación del patógeno. El cultivo convencional y la identificación fenotípica son ampliamente utilizados en el diagnóstico etiológico de una enfermedad infecciosa. Sin embargo, la microbiología clásica está asociada a inconvenientes, como largos periodos de crecimiento, condiciones especiales de cultivo, muestras mal recogidas que complican la interpretación de los resultados o incluso imposibilitan su obtención.

Los métodos moleculares en microbiología clínica presentan ventajas significativas en la detección y diagnóstico de patógenos. Estos métodos permiten la detección de ADN o ARN en una amplia variedad de muestras biológicas (sangre, orina, tejidos y fluidos corporales), tienen la capacidad de detectar múltiples patógenos e identificar microorganismos de difícil crecimiento. La biología molecular también ha permitido identificar y caracterizar microorganismos patógenos causantes de brotes infecciosos. Como toda técnica de laboratorio debe ser validada para su uso en el diagnóstico de patologías humanas, ser llevada a cabo utilizando controles de reacción y ser realizada por personal altamente calificado.

El aumento de la tasa de infecciones graves causadas por bacterias resistentes a antibióticos ha sido otra de las causas por las que se han intentado encontrar nuevas tecnologías que permitan establecer de forma más rápida los tratamientos y disminuir los errores asociados a tratamientos empíricos. Los avances en estas técnicas también han hecho que aumenten los conocimientos sobre la resistencia bacteriana a los antimicrobianos.

Las aplicaciones de los métodos moleculares son muy variadas y pueden utilizarse para distintos fines, entre ellos:

- Diagnóstico de una infección (coqueluche, infección por Hantavirus, influenza, dengue)

- Identificación de bacterias que no crecen en medios de cultivo (*Rickettsia*, *Mycoplasma* o *Mycobacterium leprae*).
- Detección de microorganismos en una muestra clínica (líquido cefalorraquídeo, sangre)
- Detección de clones epidémicos (*E. coli* ST131)
- Genotipificación de cepas bacterianas (STEC O157:H7)
- Detección de genes de virulencia (toxinas Shiga: *stx-1* y *stx-2*)
- Estimación de la carga viral (VIH, Virus de la hepatitis C)
- Detección de resistencia antimicrobiana (resistencia a colistin: gen *mcr-1*)

A los fines prácticos, los métodos de diagnóstico molecular se pueden dividir en dos grandes grupos: técnicas sin amplificación y técnicas con amplificación de los ácidos nucleicos de los microorganismos.

Técnicas sin amplificación de ácidos nucleicos del patógeno

Los métodos moleculares sin amplificación genómica se basan en la detección de los ácidos nucleicos microbianos presentes en la muestra biológica.

Hibridación

La hibridación es una técnica molecular sin amplificación del genoma. Esta técnica permite la identificación, visualización y cuantificación de microorganismos en muestras biológicas diversas; utiliza una sonda de ADN o ARN complementaria al ADN o ARN del microorganismo a detectar. Dicha sonda se encuentra marcada con un compuesto que desarrollará una respuesta medible cuando se una al ácido nucleico del patógeno (Figura 7.1). Las sondas son altamente específicas y pueden ser usadas para detectar agentes infecciosos directamente de una muestra clínica (esputo, orina, biopsia) o para confirmar la identificación de un cultivo que por otros métodos tardaría varios días (*Legionella pneumophila*, *Chlamydia trachomatis*).

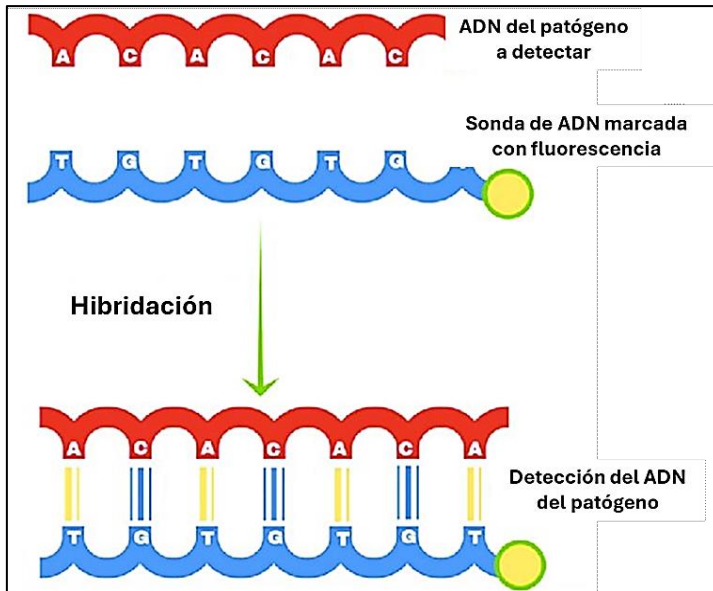
La visualización del resultado dependerá del método usado para marcar la sonda (color, fluorescencia, radioactividad o quimioluminiscencia). La elección del sistema de detección estará determinada principalmente por el tipo de marca de la sonda utilizada y por el tipo de procedimiento. Los métodos de marcación del reactivo pueden ser directos o indirectos; en los métodos directos, la marca está unida directamente a la sonda (moléculas reporteras, enzimas, radioisótopos y fluoróforos), mientras que en los métodos indirectos la marca se incorpora en forma indirecta a través de otras moléculas accesorias (haptenos, biotina, digoxigenina, o anticuerpos).

Un ejemplo de hibridación es la técnica FISH (hibridación fluorescente *in situ*) que se basa en la hibridación de los ácidos nucleicos a detectar y combina la precisión de la genética molecular

con la microscopía para la identificación del patógeno. Esta técnica utiliza sondas fluorescentes específicas que se ponen de manifiesto mediante la observación en un microscopio de fluorescencia.

Figura 7.1

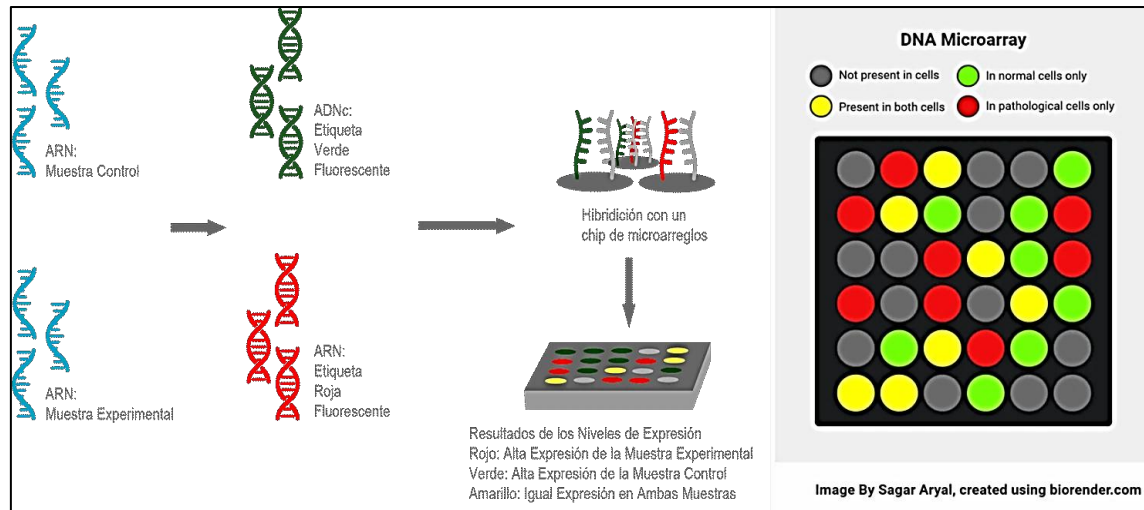
Técnica de hibridación



Microarray (chip de ácidos nucleicos)

El microarray es una técnica molecular sin amplificación del genoma. La base de la tecnología de microarrays es la automatización de las técnicas clásicas de hibridación molecular. La principal ventaja es la posibilidad de inmovilizar miles de sondas de ADN en la superficie del microarray, permitiendo el análisis de la presencia/ausencia o de la expresión de miles de genes, en un solo experimento. Un microarray de ADN se define como una serie de sondas de ADN unidas a una superficie sólida en una disposición regular y prefijada. El soporte utilizado con mayor frecuencia es un portaobjetos de vidrio por su baja fluorescencia basal y porque admite tratamientos de superficie para la unión covalente de las sondas de ADN (Figura 7.2).

La tecnología de microarrays generalmente proporciona un método rápido de análisis para una variedad de disciplinas y campos. En el diagnóstico etiológico, la tecnología de microarrays se encuentra en una etapa de desarrollo dinámico con muchas alternativas y opciones disponibles. Las aplicaciones incluyen la detección de niveles de expresión de genes de virulencia, la detección de agentes infecciosos bacterianos, virales, parasitarios y fúngicos a nivel de serotipo o subespecie, la identificación de agentes que causan lesiones similares, la determinación de interacciones microorganismo-hospedador en una infección, estudios de genómica comparativa, genotipado molecular y filogenia microbianas.

Figura 7.2*Esquema de un microarray*

Técnicas con amplificación del ácido nucleico del patógeno

Los métodos moleculares con amplificación genómica se basan en la multiplicación de los ácidos nucleicos microbianos presentes en una muestra biológica antes de su detección.

Reacción de Polimerasa en cadena

Esta técnica permite la amplificación exponencial de secuencias específicas de ácidos nucleicos a partir de pequeñas cantidades presentes en una muestra biológica. Los altos valores de sensibilidad y especificidad de esta técnica, junto a la rapidez de obtención de los resultados, han transformado a esta metodología en una de las más utilizadas en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas y en muchos casos se consideran los estándares de oro para el diagnóstico, sobre todo en las infecciones virales, desplazando al cultivo como método de referencia.

La reacción de polimerasa en cadena (PCR) está diseñada para la detección de material genético (ADN o ARN) de bacterias o virus. El proceso comienza con la extracción del ADN o ARN de la muestra, que posteriormente se somete a ciclos térmicos de amplificación. Si el material extraído es ARN, el primer paso será convertir el ARN en ADN (conocido técnicamente como ADN complementario o ADNc). Los ciclos térmicos consisten en un proceso de 3 pasos: 1) desnaturalización, 2) alineamiento y 3) extensión, en el que se obtiene como resultado la duplicación del ADN presente en la muestra. Por lo tanto, para cada ciclo (1 Ct), suponiendo una eficiencia del 100%, se obtendrá el doble de ADN presente. El objetivo es continuar con el proceso de amplificación hasta que se detecte suficiente ADN para que la muestra sea positiva.

o hasta 30-40 ciclos, según el diseño de la prueba específica utilizada. Las técnicas de PCR se suelen clasificar en dos grandes grupos: PCR de punto final y PCR en tiempo real (qPCR), cada una con características y aplicaciones distintas.

PCR de punto final

La PCR de punto final se refiere a un enfoque tradicional donde la amplificación del ADN se lleva a cabo en ciclos de desnaturalización, alineación y extensión. Al finalizar el ciclo de PCR, se realiza un análisis post-PCR, generalmente mediante electroforesis en gel, para visualizar los productos de la amplificación. Este método es útil para la detección de la presencia o ausencia de un patógeno, así como para el análisis de variaciones en la longitud de fragmentos de ADN. Sin embargo, su capacidad para cuantificar la cantidad de ADN amplificado es limitada, ya que sólo se evalúa al final del proceso.

PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real (qPCR), por otro lado, permite la monitorización de la amplificación de ADN en tiempo real durante los ciclos de PCR. Utiliza sondas fluorescentes o colorantes intercalantes que emiten señales cuando se unen al ADN amplificado. La qPCR permite cuantificar simultáneamente la cantidad de producto amplificado durante cada ciclo, lo que ofrece datos más precisos y sensibles. La qPCR es especialmente valiosa en aplicaciones donde se requiere una cuantificación exacta de los niveles de ADN, como en la detección de patógenos en infecciones, análisis de expresión génica y estudios de resistencia a antibióticos.

Existen diferentes sistemas comerciales que se basan en la qPCR. El sistema LightCycler® de Roche, es una plataforma de alto rendimiento de PCR que proporciona varios métodos para la detección de genes, análisis de expresión génica, análisis de variación genética y validación de datos de matriz. Microorganismos que se pueden identificar con esta plataforma son: *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Brucella* spp., *Bordetella pertussis*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Listeria monocitogenes*, *Salmonella Typhi*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Aspergillus fumigatus*, *Pneumocystis jirovecii*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium* spp., *Leishmania* spp., Virus Herpes simple (VHS), Virus Varicela Zoster (VVZ), Virus de Epstein Barr (VEB), Citomegalovirus (CMV), Parvovirus B19, virus JC y virus BK.

Otro sistema es la plataforma Cobas® de la empresa Roche. Esta plataforma se basa en la utilización de la sonda TaqMan®, asociada a un fluoróforo en el extremo 5' y a un aceptor de energía (quencher). La detección se realiza con el fotodetector del equipo. Microorganismos que se pueden identificar con esta plataforma son el Virus de hepatitis B (VHB), Virus de la hepatitis C (VHC) y el Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Esta plataforma es útil para seguimiento y monitorización de la carga viral.

La tecnología GeneXpert® de Cepheid utiliza cartuchos de un único uso para cada PCR. En el interior del cartucho se encuentran los reactivos de PCR liofilizados. Microorganismos que se pueden identificar con esta plataforma son: *Streptococcus agalactiae*, Enterovirus,

Staphylococcus aureus, *Mycobacterium tuberculosis*. Además, este equipo permite detectar genes que aportan resistencia a la rifampicina en *Mycobacterium tuberculosis*, genes de resistencia a la meticilina (MecA) en *Staphylococcus aureus* y genes de carbapenemasas frecuentes en *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.

La plataforma Alinity® de Abbot® es un sistema totalmente automatizado que permite realizar el proceso completo en forma automatizada (extracción de ácidos nucleicos de la muestra, amplificación en tiempo real y análisis de los resultados). Microorganismos que se pueden identificar con esta plataforma: *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, VIH, VHC, VHB, VEB, VVZ, VHS, CMV, Parvovirus B19 y Virus del papiloma humano (VPH).

El sistema FilmArray® es un sistema comercial de Biomerieux® de PCR multiplex que integra la preparación de muestras, amplificación, detección y análisis. Este sencillo sistema requiere manipulación mínima de la muestra del paciente y obtiene resultados en pocas horas. El sistema permite la detección simultánea de bacterias, virus, levaduras, parásitos y genes de resistencia a los antimicrobianos. Está diseñado para ser utilizado con paneles integrales (respiratorio, hemocultivos, tracto gastrointestinal, meningitis); cada uno ofrece pruebas para grupos de patógenos asociados a algunos de los desafíos de salud más acuciantes de la actualidad.

La utilización de paneles para la identificación del microorganismo causante presenta diferentes ventajas e inconvenientes. Por un lado, destaca la rapidez con la que se obtienen los resultados (y la precoz instauración del tratamiento), la realización de estudios epidemiológicos y la identificación de brotes. Pero por el otro, destaca el alto coste asociado a la realización de estas pruebas, la realización de un panel dirigido a población general y no individualizado, la posible detección de portadores y no personas enfermas, posibilidad de obtención de resultados falsos positivos y la necesidad en muchos casos de realizar pruebas tradicionales de forma paralela.

Carga viral

En las infecciones virales se suele considerar la carga viral (CV). La CV es un concepto fundamental en virología, que se refiere a la concentración de virus en un fluido biológico. Dicho parámetro es crucial para comprender la dinámica de las infecciones virales y su impacto en la salud del individuo. En microbiología, la CV tiene diversas aplicaciones; por ejemplo, su valor se puede utilizar para analizar la progresión de infecciones (VIH, hepatitis, SARS-CoV-2), para evaluar el riesgo de transmisión (VIH) o la eficacia de nuevos medicamentos o terapias con el fin de desarrollar tratamientos más efectivos.

La CV se utiliza en la determinación cuantitativa de ARN del VIH que está presente en la sangre del paciente. Hay varios tipos de pruebas diferentes para medirla:

- PCR cuantitativa (qPCR). Los resultados de la prueba se presentan como copias/mL de plasma.
- Branched DNA (análisis de la cadena ramificada del ADN), también se usa con frecuencia. Estos resultados se presentan como unidades/mL de plasma.

- NASBA (amplificación de la secuencia del ácido nucleico), se emplea con menor frecuencia y presenta resultados de la prueba como unidades/mL de plasma.

Los cambios en la CV a menudo se informan como cambios logarítmicos. Este término matemático denota un cambio en el valor de lo que está siendo cuantificado por un factor de 10. Por ejemplo, si la carga viral inicial por PCR fue de 20,000 copias/mL de plasma, luego un aumento de 1 registro equivale a unas 10 veces el aumento o 200.000 copias/mL de plasma. Un aumento de 2 registros equivale a 2.000.000 copias/mL de plasma, o un aumento de 100 veces. Dado que las pruebas no dan exactamente los mismos resultados, es importante solicitar siempre el mismo tipo de prueba de la CV; ésto le permitirá al médico un punto de referencia contra el cual puede evaluar cambios.

¿Qué significa tener un nivel de virus VIH no detectable, o sea CV no detectable? En algunos individuos infectados, el VIH no se detecta por pruebas de laboratorio después de tomar una combinación de medicamentos. Esto no significa que la persona no esté infectada, sino que las pruebas actuales no son lo suficientemente sensibles para medir niveles extremadamente bajos de virus en la sangre. En resumen, la CV es una herramienta clave en microbiología porque proporciona información esencial para el manejo clínico de infecciones virales, la investigación y la salud pública.

Técnicas de amplificación isotérmica

Las técnicas de amplificación isotérmica se han convertido en herramientas sumamente útiles para el diagnóstico rápido de las enfermedades infecciosas. Estos métodos ofrecen ventajas significativas con respecto a la PCR tradicional, como la simplicidad, la velocidad y la capacidad de funcionar sin equipos complejos. Si bien la amplificación isotérmica presenta numerosas ventajas, siguen existiendo desafíos, como la necesidad de una mayor validación en diversos entornos y el desarrollo de protocolos estandarizados para garantizar la confiabilidad en todas las aplicaciones.

La amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) es una técnica molecular que se basa en la amplificación de ADN blanco en condiciones isotérmicas (temperatura constante). La ventaja más significativa de la LAMP es la capacidad que tiene para amplificar secuencias específicas de ADN a una temperatura constante entre 63°C y 65°C; por ende, solo requiere un equipamiento simple (bloque térmico) para ser incorporado en laboratorios del primer nivel de atención. En la actualidad, la LAMP se considera un método fiable porque, además de ser rentable, sencillo e innovador, permite amplificar ácidos nucleicos sin necesidad de una gran estructura de gestión de laboratorio (Tabla 7.1).

El desarrollo de la metodología LAMP está dado por la amplificación de la secuencia específica del ADN con alta sensibilidad y especificidad bajo condiciones isotérmicas. LAMP emplea una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de la cadena, junto con dos

iniciadores internos y dos externos, los cuales reconocen seis regiones separadas dentro del ADN objetivo del patógeno. La prueba de LAMP es altamente específica porque la reacción de amplificación ocurre sólo cuando las seis regiones dentro del ADN objetivo son correctamente reconocidas por los iniciadores. En el primer paso de reacción se genera una estructura en forma de asa o bucle inicial. Luego, un iniciador interno se hibrida con el asa y se inicia la síntesis con desplazamiento de la cadena de ADN. El producto final de la amplificación por LAMP corresponde al bucle inicial con varias repeticiones invertidas del ADN objetivo.

Tabla 7.1

Técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle

Propiedades LAMP	Descripción
Simplicidad	Amplificación isotérmica en un solo paso Detección del resultado: color, fluorescencia
Rapidez	60 minutos aproximadamente
Especificidad	Elevada
Tipo de ácidos nucleicos	ADN o ARN (con transcriptasa reversa)

Las aplicaciones de LAMP al estudio de las enfermedades infecciosas se han incrementado en los últimos años. En particular, dicha técnica ha sido utilizada para la detección de *Mycobacterium bovis*, *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Brucella* spp., *Leptospira* spp., Citomegalovirus, Virus de Epstein Barr, Virus Herpes Simple, Virus Dengue, Virus Zika, Virus Chikunguya y *Plasmodium* spp., entre otros.

Nuevas herramientas de diagnóstico molecular

Las herramientas moleculares son de gran utilidad para la prevención, el diagnóstico, el tratamiento y el seguimiento de un amplio espectro de enfermedades, incluidas condiciones genéticas, patologías crónicas y enfermedades infecciosas. Con el creciente desarrollo tecnológico, existen varias plataformas que han demostrado un gran impacto en la investigación biomédica que lentamente se están incorporando a la práctica clínica.

Estudio de polimorfismos genéticos

El estudio de polimorfismos genéticos (SNP) ha tenido un fuerte impacto en la biomedicina, debido a que la presencia de estas variaciones en el ADN del paciente puede tener un gran impacto en la respuesta frente a un microorganismo, a un fármaco o explicar una condición patológica particular. El estudio de estas variantes genéticas y su impacto en la salud humana ha llevado a plantear el concepto de “medicina personalizada”, que consiste en entregar un

tratamiento adecuado al paciente (genoma) adecuado, basado en que cada individuo presenta una genética diferente y única.

Secuenciación de nueva generación

La secuenciación de nueva generación (SNG) es un grupo de técnicas diseñadas para secuenciar millones de segmentos de ADN de forma eficiente. Esto significa que la NGS es capaz de secuenciar mayor cantidad de fragmentos de ADN, en forma paralela, con un menor costo y mayor rapidez. Todas las técnicas SNG aplican un abordaje metodológico similar que puede resumirse en los siguientes pasos:

- 1) Fragmentación del ADN.
- 2) Marcación del ADN con *primers* o adaptadores.
- 3) Amplificación de los fragmentos de ADN marcados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 4) Secuenciación de los fragmentos de ADN.
- 5) Reconstrucción de la secuencia completa por comparación con genoma de referencia y análisis bioinformático.

El análisis de sus resultados es sumamente complejo y requiere de un proceso bioinformático y clínico exhaustivo para su adecuada interpretación. Los datos de genomas completos de referencia de bacterias, hongos y virus se encuentran disponibles en diversas plataformas web. Por ejemplo, Enterobase3 (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) es una plataforma que permite analizar genomas de enterobacterias por *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Otra plataforma de interés es *Pathogenwatch* (<https://pathogen.watch/>) que permite analizar secuencias propias, realizar filogenias y predecir la resistencia a antimicrobianos. Por último, la plataforma *Microreact4* (<https://microreact.org/showcase>) permite una visualización integrada de los conjuntos de datos de secuenciación (árboles filogenéticos, determinantes de resistencia y virulencia), datos geográficos y temporales, y otras variables de interés para realizar epidemiología genómica.

La investigación en tecnologías de secuenciación de ADN se encuentra en continuo desarrollo. Actualmente, la secuenciación de tercera generación, como la secuenciación por Nanopore®, se caracteriza por la generación de fragmentos de lectura largos sin necesidad de amplificación por PCR, lo que evita sesgos y permite una cobertura mucho más homogénea del genoma.

La secuenciación masiva aplicada a la microbiología se puede realizar secuenciando pequeños fragmentos del ADN o amplicones previamente amplificados (secuenciación dirigida), o bien secuenciando todo el ADN previamente fragmentado de forma aleatoria (secuenciación *shotgun*). La primera aproximación permite obtener la secuencia del mismo gen (ARNr 16S para bacterias y 18S para hongos) en muchas muestras biológicas diferentes; por lo tanto, este

análisis revela la composición microbiana de cada muestra. Por el contrario, la segunda aproximación permite la obtención del genoma microbiano completo. El conocimiento del genoma completo facilita la detección de diferencias como mutaciones, polimorfismos de nucleótido único (SNPs), inserciones o deleciones (InDels) entre genomas (genómica comparada), lo que es de gran utilidad en la identificación de los mecanismos de resistencia a antibióticos y en estudios de epidemiología molecular y dinámica de transmisión, así como de filogenética y filogeografía.

En los últimos años, la biología molecular se instaló en la práctica clínica. Las numerosas ventajas de las técnicas moleculares con respecto a las técnicas clásicas han impulsado la implementación de laboratorios de biología molecular en el sistema de salud público y privado. A pesar de este crecimiento masivo, existen varios desafíos que deben ser enfrentados para asegurar diagnósticos precisos y de calidad. Por otra parte, es importante informar y educar al equipo médico y a los futuros profesionales de la salud sobre este tipo de técnicas, indicando sus ventajas y limitaciones, de manera tal de fomentar el desarrollo de equipos multidisciplinarios, que en el futuro puedan diseñar, implementar, estandarizar, controlar e interpretar estas herramientas diagnósticas.

Preguntas Guía

1. ¿Por qué es crucial la identificación precoz del agente etiológico en una enfermedad infecciosa?
2. ¿Qué ventajas presentan los métodos moleculares en microbiología clínica en comparación con los métodos tradicionales?
3. ¿Qué tipos de muestras biológicas pueden ser analizadas mediante métodos moleculares?
4. ¿Cuáles son las aplicaciones de los métodos moleculares en el diagnóstico de enfermedades infecciosas?
5. ¿En qué se basa la técnica de hibridación y cuáles son sus aplicaciones en microbiología clínica?
6. ¿Qué es un microarray y cómo se utiliza en el diagnóstico de enfermedades infecciosas?
7. ¿Qué diferencia existe entre la PCR de punto final y la PCR en tiempo real (qPCR)?
8. ¿Qué es la técnica LAMP y cuáles son sus ventajas en el diagnóstico de enfermedades infecciosas?
9. ¿Cómo ha impactado la secuenciación de nueva generación (SNG) en el campo de la microbiología clínica?
10. ¿Cómo contribuyen los métodos moleculares a la detección de la resistencia antimicrobiana?
11. ¿Qué es la técnica FISH y cómo se utiliza en la identificación de patógenos?
12. ¿Cuáles son las principales diferencias entre los métodos de amplificación isotérmica y la PCR tradicional?

13. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas de utilizar paneles integrales como el sistema FilmArray® en el diagnóstico de enfermedades infecciosas?
14. ¿Cómo se mide la carga viral y por qué es importante en el manejo de infecciones virales?
15. ¿Qué es la secuenciación por Nanopore® y cómo se diferencia de otras técnicas de secuenciación?
16. ¿Qué aplicaciones tiene la secuenciación masiva en estudios de epidemiología molecular?

Referencias

- Amaya, G., Contrera, M., Arrieta, F., Montano, A. y Pérez, C. (2020). Rendimiento del GeneXpert en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar y extrapulmonar en la edad pediátrica. *Archivos de Pediatría Uruguay*, 91(supl 2): 12-23. Disponible en: <https://doi.org/10.31134/ap.91.s2.2>
- Blanco, E. y Alves, R.C. (2020). Diagnósticos point-of-care: amplificación isotérmica mediada por asas como alternativa para la detección y prevención del síndrome urémico hemolítico. *Revista Científica ANMAT*, 2020: 33-43.
- Chau, S.B. y Thomas R.E. (2015). The AmpliChip: A Review of its Analytic and Clinical Validity and Clinical Utility. *Current Drugs Safety*, 10: 113-124.
- Kapalamula, T.F., Thapa, J., Akapelwa, M.L., Hayashida, K., Gordon, S.V., Hang' Ombe, B.M., Munyeme, M., Solo, E.S., Bwalya, P., Nyenje, M.E., Tamaru, A., Suzuki, Y. y Nakajima, C. (2021). Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for specific detection of *Mycobacterium bovis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(1): e0008996. Doi: 10.1371/journal.pntd.0008996.
- Ehtisham, M., Wani, F., Wani, I., Kaur, P. y Nissar, S. (2016). Fundamentals of *In situ* Hybridization: A Review. *International Research Journal of Clinical Medicine*, 1(4): 23-29.
- Fesseha, H., Tilahun, H. (2021). Principles and applications of deoxyribonucleic acid microarray: A review. *Pathology Laboratory Medicine Open Journal* 3(1): 1-9.
- Goodwin, S., McPherson, J.D. y McCombie, W.R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6): 333-351. Doi: 10.1038/nrg.2016.49
- Hernández, M., Quijada, N.M., Rodríguez-Lázaro, D. y Eiros, J.M. (2020). Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2): 150-161.
- Lira Carmona, R., De la Cruz Pérez, J., Maldonado Rodríguez, A. y Rojas Montes, O. (2018). Isothermal amplification systems for the molecular detection of zika, dengue and chikungunya viruses. *Mensaje Bioquímico* 42: 92-102.
- Mori Y. y Notomi T. (2005) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 15: 62-69. Disponible en: <http://doi.10.1007/s10156-009-0669-9>

- Rincón Caballero, O.L. y Aristizábal Bernal, B.H. (2010). Utilidad diagnóstica de la amplificación isotérmica con la formación de asas (LAMP) para la detección de ADN de citomegalovirus, Epstein Barr y herpes simple 1 y 2 en muestras biológicas: revisión sistemática. *Hechos Microbiológicos*, 1(1): 41-48.
- Singh, S., y Bedekar, M.K. (2012). DNA microarray and its applications in disease diagnosis. *International Journal of Science and Research*, 3: 1572-1573.
- Tan B., Ng C., Nshimiyimana J.P., Loh L.L., Gin K.Y. y Thompson J.R. (2015). Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities. *Frontiers in Microbiology*, 25: 1027-1036.
- Theel, E.S., Carpenter, A.B. and Binnicker, M.J. (2015). Immunoassays for Diagnosis of Infectious Diseases. In Manual of Clinical Microbiology (eds J.H. Jorgensen, K.C. Carroll, G. Funke, M.A. Pfaller, M.L. Landry, S.S. Richter, D.W. Warnock, S.S. Richter and R. Patel). Disponible en: <https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch7>
- Vengesai, A., Kasambala, M., Mutandadzi, H., Mduluza-Jokonya, T.L., Mduluza, T. y Naicker, T. (2022) Scoping review of the applications of peptide microarrays on the fight against human infections. *PLoS ONE*, 17(1): e0248666. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248666>
- Xiang, L., Xiaolong, Z., Xiaoli, S., Hongfei, S., Zhouping, W. y Chifang, P. (2022). Review in isothermal amplification technology in food microbiological detection. *Food Science and Biotechnology*, 31: 1501-1511. Doi: 10.1007/s10068-022-01160-6
- Xiong, J., Cheng, J., Shen, H., Ren, C., Wang, L., Gao, C., Zhu, T., Li, X., Ding, W., Zhu, D., y Wang, H. (2021). Detection of HPV and Human Chromosome Sites by Dual-Color Fluorescence *In Situ* Hybridization Reveals Recurrent HPV Integration Sites and Heterogeneity in Cervical Cancer. *Frontiers in Oncology*, 11: 734758. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.734758>
- Yang, N., Zhang, H., Han, X., Zhifeng, L., Lu, Y. (2024). Advancements and applications of loop-mediated isothermal amplification technology: a comprehensive overview. *Frontiers in Microbiology*, 15: 1406632. Doi: 10.3389/fmicb.2024.1406632

CAPÍTULO 8

Interpretación clínica de las pruebas diagnósticas en las enfermedades infecciosas

Nora Beatriz Molina y Judith Celina Bernstein

La detección e identificación del agente causal puede estudiarse por métodos directos o indirectos. El *diagnóstico directo* de una infección se basa en la demostración del agente causal en el paciente: detección del patógeno, detección de antígenos microbianos (proteínas, toxinas, metabolitos) o detección del genoma del microorganismo, entre otros. Por ejemplo, ante una meningitis bacteriana, el patógeno puede detectarse mediante tinciones permanentes, cultivo bacteriológico, detección de antígenos por coaglutinación o detección del genoma microbiano por métodos moleculares (Figura 8.1).

Figura 8.1

Métodos de diagnóstico etiológico



El *diagnóstico indirecto* de una infección se basa en la demostración de la respuesta inmune a la infección, es decir la detección de anticuerpos específicos (Figura 8.1). En una infección, el período preserológico, período ventana o ventana inmunológica se define como el tiempo mínimo a partir del cual comienzan a detectarse los anticuerpos en la sangre del paciente. Este período

de tiempo es variable y depende tanto del antígeno (composición, vía de ingreso al organismo) como del individuo (estado inmune, historia inmunológica), entre otros factores.

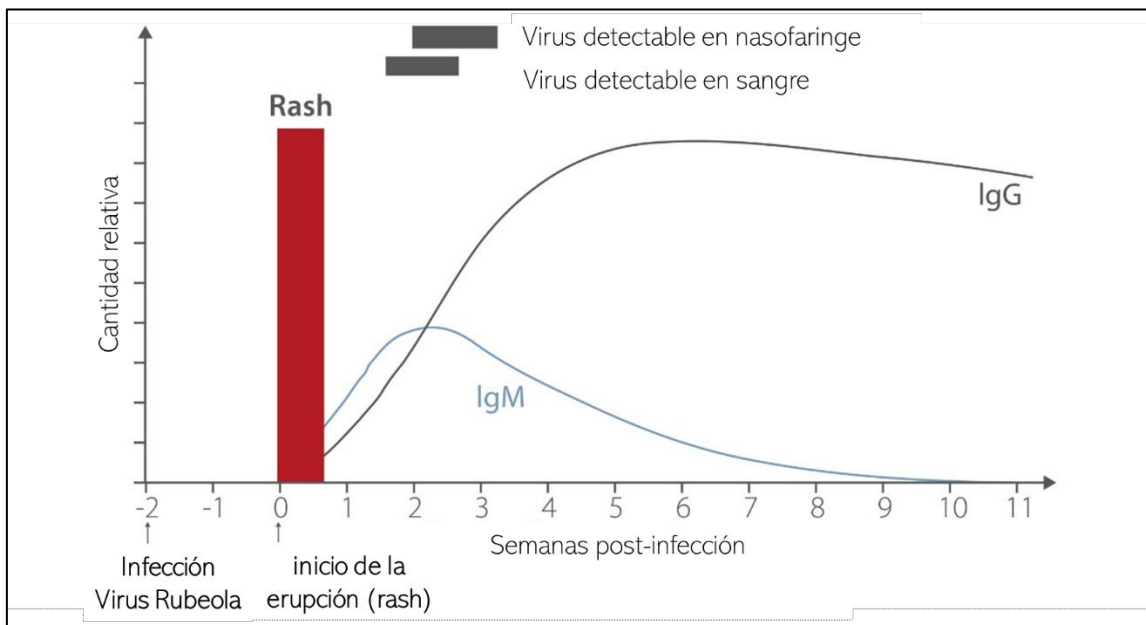
El diagnóstico indirecto de una infección aguda se basa en la demostración de anticuerpos en el paciente utilizando diversas estrategias diagnósticas. Las más utilizadas en la práctica clínica incluyen la detección de IgM específica, el aumento significativo del título de anticuerpos, la seroconversión o la estimación de la avidéz de los anticuerpos específicos.

Detección de IgM específica

Como regla general, la detección de IgM específica para un microorganismo se correlaciona con una infección aguda. Por ejemplo, la presencia de anticuerpos para Citomegalovirus (CMV) de tipo IgM (IgM-CMV) en la sangre del neonato indica una infección intrauterina, ya que la IgM materna no puede atravesar la placenta. Esta estrategia también es aplicable a las personas adultas; veamos un caso: una paciente tiene diagnóstico presuntivo de rubéola. En este caso, se puede solicitar la detección de IgM contra el virus Rubéola en suero. (Figura 8.2).

Figura 8.2

Evolución temporal de la infección por virus Rubéola



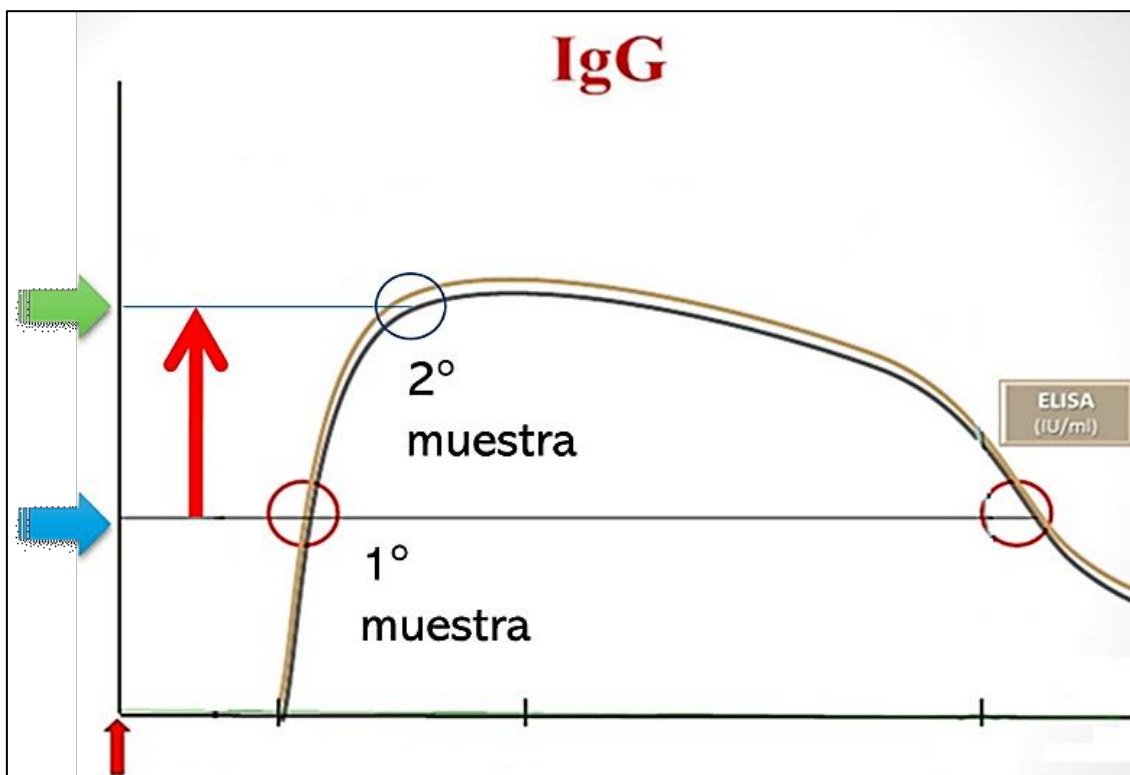
Aumento significativo del título de anticuerpos

Ante un cuadro infeccioso que no cuenta con métodos de diagnóstico para determinación de IgM específica, la infección aguda puede evaluarse mediante el par serológico.

Esta metodología de trabajo consiste en la toma de dos muestras de suero de un paciente, separadas por dos semanas (10-15 días); una muestra se recolectará en el período agudo de la enfermedad y la otra en el de convalecencia. Ambas muestras deberán procesarse para la cuantificación de anticuerpos IgG específicos, utilizando el mismo método y al mismo tiempo para disminuir la variabilidad analítica de las determinaciones. Por último, se comparan ambos títulos. Una infección se considera aguda si el título de anticuerpos IgG específicos por lo menos se cuadruplica entre la primera y la segunda muestra (figura 8.3).

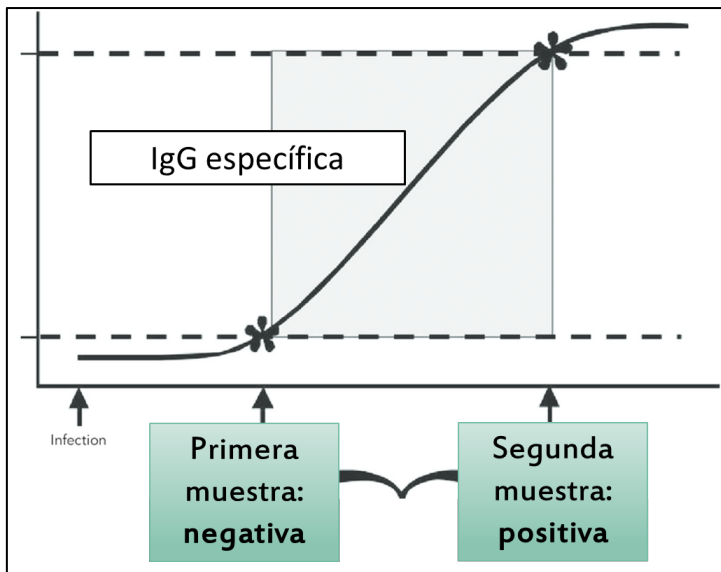
Figura 8.3

Esquema de par serológico para el estudio de una infección aguda

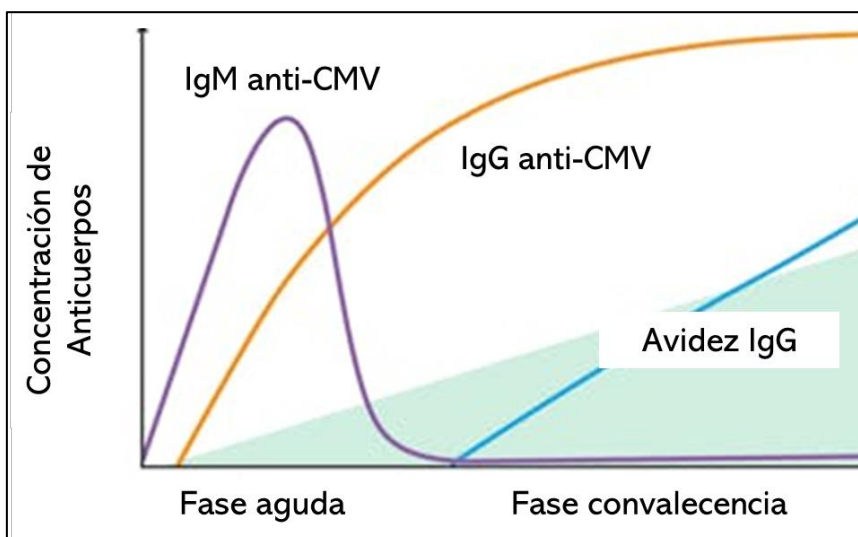


Seroconversión

La seroconversión se refiere al cambio de una prueba serológica de un resultado negativo (o no reactivo) a un resultado positivo (reactiva). En este caso, el método presenta el mismo fundamento del par serológico. El primer estudio que determina IgG específica es negativo (no se detectan anticuerpos) mientras que la segunda determinación de IgG es positiva (se detectan anticuerpos) (Figura 8.4).

Figura 8.4*Seroconversión de anticuerpos específicos***Avidez de los anticuerpos específicos**

La avididad de los anticuerpos depende de la maduración de la respuesta inmune; por lo tanto, la presencia de anticuerpos específicos de baja afinidad es indicador de una infección reciente. La detección de avididad suele utilizarse para confirmar una infección aguda por *Toxoplasma gondii* o Citomegalovirus (Figura 8.5).

Figura 8.5*Evolución temporal de la infección por Citomegalovirus (CMV)*

En conclusión, el diagnóstico de una enfermedad infecciosa se basa en tres pilares, la presentación clínica del paciente, los aspectos epidemiológicos de la infección y el diagnóstico etiológico basado en métodos de laboratorio. Ninguna prueba puede identificar todos los microorganismos por lo tanto, el profesional sanitario tendrá que seleccionar las pruebas más adecuadas en función del diagnóstico presuntivo y deberá interpretar los resultados de los estudios solicitados en función del contexto clínico-epidemiológico de la enfermedad infecciosa.

Casos clínicos de aplicación

Caso clínico 1: niño con diarrea

Concurre a la consulta una niña de 3 meses de edad con un cuadro diarreico de 3 días de evolución. El diagnóstico presuntivo es diarrea viral por Rotavirus.

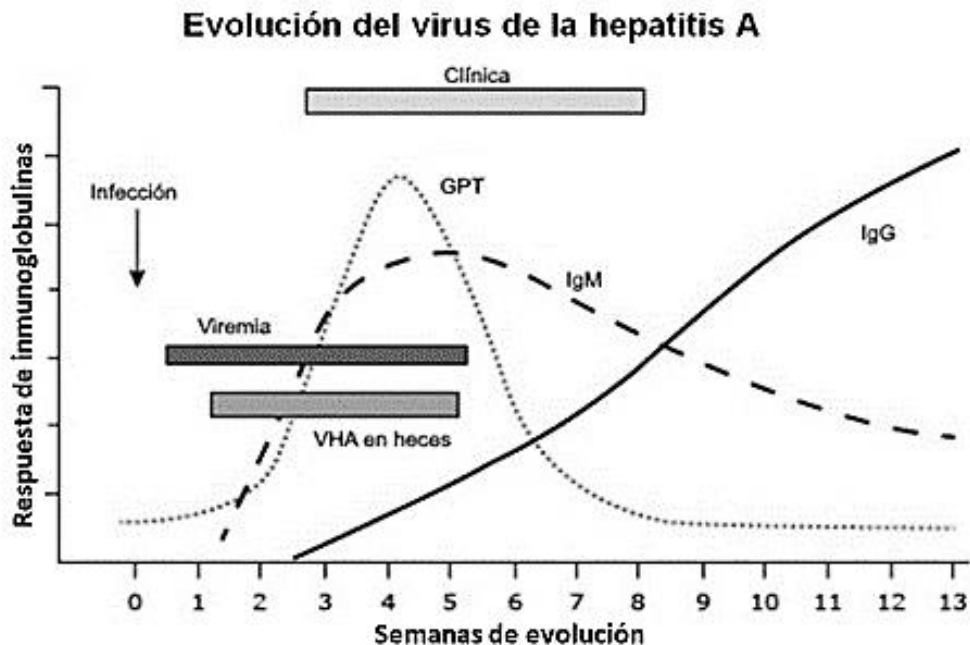
Responda:

- ¿Qué métodos de laboratorio elegiría para confirmar el diagnóstico: métodos directos o indirectos? Realice la orden para los estudios de laboratorio.
- ¿El día de la consulta médica, puede recolectarse la muestra para el diagnóstico de laboratorio? Justifique.
- ¿Cómo interpreta un resultado positivo o negativo del estudio solicitado?

Caso clínico 2: adolescente con ictericia

Ud. recibe la consulta de un adolescente de 14 años, previamente sano, con un cuadro icterico de 4 semanas de evolución. El paciente presentó decaimiento, fiebre, náuseas y vómitos, anorexia, heces blanquecinas y orina oscura. Se desconoce su estado vacunal. El diagnóstico presuntivo basado en las características clínicas y epidemiológicas es hepatitis A.

En el siguiente cuadro usted puede observar la evolución clínica de la enfermedad.

Figura 8.6*Evolución del virus de la hepatitis A*

Indique:

- ¿Cuál es el método de elección para confirmar o descartar la hepatitis A aguda en el paciente? Realice la orden y prescriba los estudios de laboratorio que indica.
- El día de la consulta, ¿puede recolectarse la muestra para el diagnóstico de laboratorio? Justifique.
- ¿Cómo interpreta un resultado positivo o negativo del estudio solicitado?

Caso clínico 3: mujer con sífilis

Ud. recibe la consulta de una mujer de 32 años, que consulta por presentar desde hace algunos meses un exantema cutáneo generalizado que incluye palmas y plantas, no pruriginoso, el cual remite y vuelve nuevamente. La paciente refiere haber consultado anteriormente por el mismo cuadro, habiéndosele indicado un antialérgico. Especifica además haber presentado hace un tiempo una lesión en la vulva de tipo ulcerativa, indolora, que remitió espontáneamente. Su diagnóstico presuntivo es sífilis en el período secundario.

Indique:

- ¿Cuáles son las pruebas que pueden utilizarse para confirmar su diagnóstico?
- En cada caso, especifique cómo interpreta los posibles resultados.

Caso clínico 4: neonato con sospecha de infección congénita por virus Rubéola

La rubéola es una enfermedad infecciosa de etiología viral que puede transmitirse de la madre al hijo durante la gestación (transmisión vertical).

Responda:

- a. Ante la sospecha de un recién nacido con síndrome de rubéola congénita ¿qué tipo de inmunoglobulina específica solicitaría para confirmar el diagnóstico? Fundamente su respuesta.
- b. Realice la orden y prescriba los estudios de laboratorio que solicita al niño y a la madre.
- c. ¿Cómo interpreta un resultado positivo o negativo de los estudios solicitados?

Cuestionario guía

1. Explique en qué se basan los métodos directos de diagnóstico de una infección.
2. Mencione un ejemplo de diagnóstico directo de una enfermedad infecciosa.
3. ¿En qué se basan los métodos indirectos de diagnóstico de una infección?
4. Mencione un ejemplo de diagnóstico indirecto de una enfermedad infecciosa.
5. ¿Qué es el período ventana o ventana inmunológica en el contexto de una infección?
6. ¿Qué factores pueden influir en el período ventana de una infección?
7. ¿Qué indica la detección de IgM específica en un individuo adulto y en un recién nacido?
8. Explique el concepto de par serológico y su importancia en el diagnóstico de las infecciones.
9. ¿Qué se entiende por seroconversión en el diagnóstico de las infecciones?
10. ¿Cómo se relaciona la avidez de los anticuerpos específicos con la maduración de la respuesta inmune?

Referencias

- Blaser, M.J., Cohen, J.L., Holland, S.M. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 10° ed. 2025, Elsevier.
- Longo, D.L., Fauci, A.S., Kasper, D.L., Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J, Holland SM, Langford, C.A. Harrison's Principles of Internal Medicine. 22° ed. 2025, McGraw Hill.
- Molina, N., Obed, M., Treviño, N. Sífilis materna y congénita: una aproximación al diagnóstico. Material de cátedra. Microbiología y Parasitología. FCM. UNLP. 2021. Disponible en <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/119688>
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A. Medical Microbiology. 10° ed. 2025, Elsevier.
- Prats, G. Microbiología y Parasitología Médicas. 2° ed. 2023, Editorial Médica Panamericana.

- Sartori, P., Egloff, C., Hcini, N., Vauloup Fellous, C., Périllaud-Dubois, C., Picone, O., & Pomar, L. (2023). Primary, Secondary, and Tertiary Prevention of Congenital Cytomegalovirus Infection. *Viruses*, 15(4), 819. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/v15040819>
- Sociedad Argentina de Pediatría. Consenso de Infecciones Perinatales. Disponible en: <http://www.sap.org.ar/staticfiles/educacion/consensos/infecc%20perinatal/infperin.htm>
- Theel, E.S., Carpenter, A.B. and Binnicker, M.J. (2015). Immunoassays for Diagnosis of Infectious Diseases. In *Manual of Clinical Microbiology* (eds J.H. Jorgensen, K.C. Carroll, G. Funke, M.A. Pfaller, M.L. Landry, S.S. Richter, D.W. Warnock, S.S. Richter and R. Patel). Disponible en: <https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch7>

Bibliografía

- Basualdo JA, Coto C, de Torres R. Microbiología Biomédica. Tomo 1. 3° ed. 2023. Editorial Atlante.
- Blaser MJ, Cohen JL, Holland SM. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 10° ed. 2025, Elsevier.
- Botero D, Restrepo M. Parasitosis humanas. 6° ed., Fondo Editorial CIB, Libros de Fundamentos de Medicina, 2019.
- Carballal G, Oubiña RO. Virología Médica. 4° ed. Editorial corpus, 2014.
- Carroll KC, Morse SA, Mietzner T, Miller S. Microbiología Médica. Jawetz, Melnick y Adelberg. 27° ed. México DF. Mcgraw-Hill/Interamericana Editores, 2016.
- Fainboim L, Geffner J. Introducción a la Inmunología Humana. 6° ed. Ed. Médica Panamericana, 2011.
- Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J, Holland SM, Langford CA. Harrison's Principles of Internal Medicine. 22° ed. 2025, McGraw Hill.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 10° ed. 2025, Elsevier.
- Pavon L, Jiménez Martínez M, Garcés Álvarez M. Inmunología molecular, celular y traslacional. 1° ed. México DF: Editorial Wolters-Kluwer, 2016.
- Prats G. Microbiología y Parasitología Médicas. 2° ed. 2023, Editorial Médica Panamericana.
- Roitt I, Delves PJ. Inmunología. Fundamentos. 10° edición. Ed. Panamericana. 2003.
- Sociedad Argentina de Pediatría. Consenso de Infecciones Perinatales. Disponible en <http://www.sap.org.ar/staticfiles/educacion/consensos/infecc%20perinatal/infperin.htm>
- Stevens C. Clinical Immunology and Serology. A Laboratory Perspective. Ed. Davis Company. 1996.

Lista de tablas

Tabla 2.1: Componentes de las barreras naturales

Tabla 2.2: Componentes de la inmunidad innata

Tabla 2.3: Componentes de la inmunidad adquirida

Tabla 2.4: Principales características de la inmunidad innata y adaptativa

Tabla 2.5: Características de las respuestas timo independiente y timodependiente

Tabla 2.6: Características de la respuesta inmune adaptativa primaria y secundaria

Tabla 2.7: Inmunidad activa y pasiva

Tabla 4.1: Clasificación de las técnicas inmunológicas de diagnóstico etiológico

Tabla 6.1: Características de las pruebas inmunológicas

Tabla 6.2: Técnicas inmunológicas de interacción primaria

Tabla 6.3: Ventajas y limitaciones de los principales tipos de ELISA

Tabla 7.1: Técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle

Lista de figuras

Figura 1.1: Etapas de la respuesta inmune

Figura 1.2: estructura básica de una Inmunoglobulina monomérica

Figura 1.3: funciones y distribución de los principales isotipos de inmunoglobulinas en el humano

Figura 2.1: Respuesta inmune innata y adquirida

Figura 2.2: Composición del microbioma humano

Figura 2.3: Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y asociados a daño (DAMP).

Figura 2.4: Cinética de la respuesta inmune primaria y secundaria

Figura 2.5: Cinética de la producción de anticuerpos en el feto y el recién nacido

Figura 3.1: Respuesta inmune a los patógenos

Figura 4.1: Clasificación de los métodos de diagnóstico etiológico

Figura 5.1: Prueba inmunológica ideal

Figura 5.2: Prueba inmunológica real

Figura 5.3: Resultados de la prueba inmunológica

Figura 5.4: Prueba inmunológica con sensibilidad máxima

Figura 5.5: Prueba diagnóstica con alta sensibilidad

Figura 5.6: Prueba inmunológica con especificidad máxima

Figura 5.7: Prueba diagnóstica con alta especificidad

Figura 5.8: Sensibilidad y especificidad de una prueba

Figura 5.9: Valores predictivos de una prueba

Figura 5.10: Representación de una curva ROC

Figura 5.11: Ejemplo de una curva ROC

Figura 5.12: Curva ROC. Comparación de 2 pruebas diferentes

Figura 6.1: Ejemplos de interacción antígeno-anticuerpo.

Figura 6.2: Tipos de ELISA (directo, indirecto, sándwich y competitivo).

Figura 6.3: Esquema de inmunofluorescencia directa e indirecta

Figura 6.4: Western blot (inmunoblot)

Figura 6.5: Esquema de una reacción de precipitación

Figura 6.6: Curva de concentración de antígeno y anticuerpo.

Figura 6.7: Doble Inmunodifusión

Figura 6.8: Contraelectroforesis

Figura 6.9: Esquema de una técnica de aglutinación

Figura 6.10: Esquema de una inmunocromatografía para la detección de antígenos del virus Influenza H1N1

Figura 7.1: Técnica de hibridación

Figura 7.2: Esquema de un microarray

Figura 8.1: Métodos de diagnóstico etiológico

Figura 8.2: Evolución temporal de la infección por virus Rubéola

Figura 8.3: Esquema de par serológico para el estudio de una infección aguda.

Figura 8.4: Seroconversión de anticuerpos específicos

Figura 8.5: Evolución temporal de la infección por Citomegalovirus

Figura 8.6: Evolución del virus de la Hepatitis A

Autores

Molina, Nora Beatriz

Doctora en Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Magister en Ciencias del Laboratorio Clínico (Facultad de Ciencias Exactas, UNLP). Bioquímica Especialista en Microbiología Clínica. Egresada Distinguida de Postgrado (Doctorado UNLP). Profesora Asociada de la Cátedra de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP. Profesora Adjunta de Microbiología de las Enfermedades Infecciosas, Carrera Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP. Investigadora categorizada, UNLP y Miembro del Consejo Directivo del Centro Universitario de Estudios Microbiológicos y Parasitológicos (CUDEMyP, UNLP), Centro asociado a la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC). Directora de proyectos de investigación acreditados en el área de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas. Member of the Latin American Coalition for *Escherichia coli* Research (LACER).

Bernstein, Judith Celina

Doctora en Medicina. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Buenos Aires, Argentina. Médica Especialista Consultora en Infectología. Colegio de Médicos de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Profesora Titular de la Cátedra de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP. Docente Universitaria Autorizada. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP. Investigadora categorizada, UNLP y Miembro del Consejo Directivo del Centro Universitario de Estudios Microbiológicos y Parasitológicos (CUDEMyP, UNLP), Centro asociado a la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC). Investigadora integrante del staff del Centro de Investigaciones Biológicas - UNLP- Japan International Cooperation Agency (JICA). Ex Jefa de la Unidad de Infectología del Hospital Zonal General de Agudos "Mi Pueblo", Florencio Varela, provincia de Buenos Aires, Argentina.

Rabassa, Martín Enrique

Doctor en Medicina. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Buenos Aires, Argentina. Profesor Titular de inmunología. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP. Profesor Adjunto Cátedra de Patología B. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP. Docente Universitario Autorizado. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP. Investigador del Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas. Facultad de Ciencias Médicas, UNLP- Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires.

Molina, Nora Beatriz

Diagnóstico etiológico de las enfermedades infecciosas : fundamento e interpretación clínica de las técnicas inmunológicas y moleculares / Nora Beatriz Molina ; Judith Celina Bernstein ; Martín Enrique Rabassa. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata ; La Plata : EDULP, 2026.

Libro digital, PDF - (Libros de cátedra)

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-950-34-2756-9

1. Diagnostico inmunológico. 2. Medicina. I. Bernstein, Judith Celina II. Rabassa, Martín Enrique III. Título
CDD 610

Diseño de tapa: Dirección de Comunicación Visual de la UNLP

Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata

48 N.º 551-599 / La Plata B1900AMX / Buenos Aires, Argentina

+54 221 644 7150

edulp.editorial@gmail.com

www.editorial.unlp.edu.ar

EduLP integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2026

ISBN 978-950-34-2756-9

© 2026 - EduLP

n
naturales


EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA