

## Investigación de un Brote – Serie de Videos Dr. Max Teplitski

<https://www.youtube.com/playlist?list=PLvgkamPnkczk53-mLCNSaysR8mr4yg1h7>

### Transcripción, Video 2: Detección de Patógenos Usando Métodos Basados en Cultivo

El cultivo de los organismos culpables de un brote es generalmente el primer paso hacia su identificación. Muchos medios especializados han sido desarrollados para el enriquecimiento, el aislamiento y la identificación rápida de patógenos bacterianos comunes a los seres humanos, animales y plantas. Aunque no todos los patógenos humanos pueden cultivarse, los virus son notoriamente difíciles de cultivar y muchos no son cultivables. Los virus cultivables, se propagan en los tejidos susceptibles, ya sea cultivos de líneas celulares humanas o animales y no en medios comunes de laboratorio. Patógenos eucariotas tales como *Cryptosporidium* y *Giardia* no se cultivan durante la identificación. Por lo tanto, las técnicas genéticas o inmunológicas serán cruciales para la detección e identificación de patógenos virales y eucariotas.

Recuerde que la identificación basada en el cultivo de patógenos requiere por lo menos 24 horas y, a veces, hasta una semana. Por lo tanto, antes de proceder a este paso, debe tener varias hipótesis razonables a probar. Estas hipótesis deben formularse basándose en los resultados de la encuesta epidemiológica y ser respaldadas por los síntomas presentados por los pacientes. Tenga en cuenta que muchos de los síntomas transmitidos por los patógenos de la comida y del agua son muy parecidos. Por lo tanto, preste atención a los detalles sutiles, como los períodos de incubación y la capacidad del patógeno para transmitirse de humano a humano. Tener varias, estrechas y sólidas hipótesis es fundamental para el éxito de su investigación, ya que será imposible probar cada muestra para cada posible patógeno transmitido, ya sea por agua o comida.

Por ejemplo, si los pacientes desarrollaron diarrea y vómitos, la lista de patógenos potenciales es bastante larga. Sin embargo, si durante la investigación epidemiológica ha aprendido que ninguno de los miembros de la familia de los pacientes desarrolló los mismos síntomas, se pueden descartar patógenos altamente contagiosos tales como el norovirus, la Hepatitis A o *Shigella*. También si ha aprendido que los pacientes que recibieron antibióticos comunes se están recuperando con rapidez, se pueden descartar patógenos virales y eucariotas, contra los cuales los antibióticos son ineficaces. Basándose en esta información, por ejemplo, se puede formular la hipótesis que el brote está probablemente causado por *Salmonella* o *E. coli* patógena. Los resultados de la investigación epidemiológica también deben indicar las posibles fuentes del patógeno culpable.

Una vez que ha formulado sus hipótesis, envíe muestras de sus pacientes para completar los análisis basados en el cultivo. Recuerde que una reanimación, enriquecimiento o etapa de concentración quizás sean necesarios si el patógeno está presente en números bajos (por ejemplo, en una muestra de agua) o si el patógeno se presenta en estado viable pero no cultivable (por ejemplo, en productos congelados o alimentos deshidratados). Tenga en cuenta que los medios selectivos a menudo contienen agentes antibióticos o bactericidas, lo que reduce el poder del medio de cultivo para crecer a los patógenos, haciendo necesarios pasos de pre-enriquecimiento o de reanimación. Medios líquidos específicos, tales como caldo Rappaport-Vassiliadis, disponibles de una amplia variedad de proveedores comerciales, podrían ser utilizados para un paso de pre-enriquecimiento o reanimación de los agentes patógenos. No olvide que el enriquecimiento puede ser la clave para la detección de patógenos porque se amplifican enormemente los números de patógenos en la muestra. La desventaja es que, no será capaz de

determinar el número de células del patógeno en la muestra original, tras una etapa de enriquecimiento.

La concentración de los agentes patógenos en las muestras diluidas (tal como agua o jugo clarificado) podría llevarse a cabo utilizando una simple filtración con un filtro de 0.2 micras. Una vez que se filtra la muestra, puede ser capaz de colocar el filtro directamente sobre el medio selectivo, no sólo para identificar el potencial patógeno, sino también para estimar el número de las células del patógeno en la muestra.

Alternativamente, si se sospecha de un patógeno en particular, la separación inmunomagnética podría ser utilizada. La separación inmunomagnética consiste en emplear microesferas paramagnéticas, que están recubiertas con un ligando específico, por ejemplo, un anticuerpo contra un patógeno particular. Cuando son añadidas a una suspensión de la muestra ambiental, la cual contiene al patógeno de interés, las microesferas se unen al patógeno blanco. Esta unión se produce debido a las interacciones específicas entre el anticuerpo y el agente patógeno contra el cual el anticuerpo es específico. Luego usando un potente imán, el complejo de microesferas asociadas a los patógenos se retiran de la suspensión. Después de enjuagar con una solución tampón débil, lo que queda son los organismos objetivo purificados. La metodología específica puede variar en función al kit y al organismo objetivo (o toxina) que está quiere detectar. Muestras densas o concentradas, tales como heces pueden necesitar ser diluidas antes de ser cultivadas.

Elija un medio adecuado para probar sus hipótesis. Los medios selectivos típicamente contienen un antibiótico o un agente biocida para reducir el crecimiento de organismos no deseados, y seleccionan para el patógeno de interés que es típicamente resistente a los biocidas. Estos medios también contienen fuentes específicas de carbono y nitrógeno que son utilizadas selectivamente por el patógeno de interés. Los medios selectivos son comúnmente de colores brillantes debido a la incorporación de colorante, que es sensible a cambios de pH en el medio. Una vez que su patógeno de interés utiliza una fuente de carbono o nitrógeno específico, produce metabolitos que cambian el pH en las proximidades de la colonia, por lo que vuelve al medio más ácido o alcalino, dependiendo del caso. Estos cambios en el pH hacen que el colorante indicador cambie y así generar una manera fácil de detectar al patógeno blanco. Es importante entender cómo estos medios de cultivo funcionan para anticiparse a posibles falsos negativos o falsos positivos. Eche un vistazo a la información de apoyo proporcionado por el fabricante del medio a usar: ¿qué otros organismos no objetivo también pueden crecer en estos medios de cultivo?, ¿pueden estos organismos no objetivo causar los mismos síntomas en sus pacientes?

Mientras que lleve a cabo los análisis basados en cultivo, debe seguir adelante y probar su comida, agua y muestras ambientales. Si un brote está asociado con alimentos, considere conseguir acceso a las líneas de producción y las instalaciones de venta al por menor. En las instalaciones de producción y venta al por menor, los agentes patógenos a menudo residen en biofilms. Los biofilms son comunidades microbianas multicelulares y multiorganísmicas. Los biofilms se forman en cualquier superficie húmeda. La mayor parte de los biofilms en instalaciones de producción y al por menor se compone generalmente de microbios ambientales benignos. Por lo general estos organismos producen grandes cantidades de polímeros extracelulares que dan a los biofilms su apariencia viscosa al tacto. En el medio ambiente, los patógenos humanos, tales como *Salmonella*, *Listeria* y *E. coli* patógena se encuentran comúnmente en estos biofilms. Dentro de los biofilms, protegidos por los polímeros extracelulares de las biofilms, estos patógenos humanos evitan la desecación y pueden escapar tratamientos de saneamiento y desinfección. Por lo tanto, es importante localizar biofilms en las líneas de producción e instalaciones minoristas, que probablemente hayan estado en contacto con los alimentos relacionadas al brote.

Una vez que se haya realizado el cultivo en los medios adecuados y se les haya dado al menos 24 horas de incubación, es el momento de analizar las placas. No hay que olvidar que, además del presunto patógeno, todas las muestras son susceptibles a contener otros microorganismos. La interpretación de los resultados de cultivos provenientes de heces puede ser particularmente difícil. La mayoría de miembros de la benigna microbiota intestinal forman colonias en los mismos medios selectivos, además pueden presentar una estructura prácticamente similar si estos se encuentran estrechamente relacionados con los patógenos.

Echemos un vistazo a esta placa de medio XLD. Este medio contiene desoxicolato, la cual es una sal biliar, lo que desalienta el crecimiento de bacterias gram positivas y bacterias ambientales. Patógenos humanos Gram-negativos, tales como *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* patógena son resistentes a las sales biliares. Placas XLD también contienen lisina, xilosa y lactosa. La utilización de los azúcares (xilosa o lactosa) por organismos tales como *E. coli* conduce a la acidificación del medio y la utilización del aminoácido lisina por un organismo tal como *Salmonella* hace que el medio pase a convertirse en alcalino. Estos cambios en el pH se detectan debido a un colorante indicador, como rojo de fenol el cual se añade al medio. El medio también contiene tiosulfato de sodio y citrato de amonio férrico, los cuales reaccionan con el sulfuro de hidrógeno producido por *Salmonella*, la reacción con el hierro da origen a un precipitado negro, que a su vez da lugar a la característica apariencia de color negro de las colonias.

Si una muestra de heces de un paciente que sufre de gastroenteritis se cultivó en este medio, se podrían detectar al menos 3 diferentes tipos de colonias: colonias negras, colonias amarillas y colonias incoloras que adquieren el color del medio y aparecen de color rosa. Al consultar la guía para la interpretación de resultados de detección basada en cultivos utilizando medio XLD, aprenderás que las colonias negras son características de *Salmonella*, colonias amarillas son de *E. coli* u otros coliformes, mientras que las colonias transparentes o rosadas pueden tratarse de *Shigella*. Tenga en cuenta que la microbiota intestinal de humanos y otros animales contiene *E. coli*, por lo tanto no es de extrañar que las colonias amarillas aparezcan en este medio. Cualquiera de estos organismos procedentes de estos tres géneros pueden ser responsables de los síntomas de gastroenteritis. Entonces, ¿cómo proceder de aquí para identificar al culpable? A principios de la investigación, hemos destacado la importancia de la obtención de muestras de control, muestras ambientales y también muestras de alimentos y agua con las que los pacientes han estado en contacto últimamente. También hablamos sobre lo importante que es la obtención de muestras control (por ejemplo, heces, o sangre) de las personas (por lo general miembros de la familia o del hogar) que comieron la misma comida, bebían de la misma agua y participaron en las mismas actividades recreativas con los pacientes. Independientemente de si los miembros del hogar presentaron síntomas o no, las muestras de ahí obtenidas serán cruciales para identificar al culpable del brote. Tener patógenos bacterianos en el medio de cultivo también le permitirá determinar a qué antibióticos son resistentes, a fin de agilizar el proceso de tratamiento. Un cultivo puro del patógeno también será fundamental para los experimentos de seguimiento con técnicas moleculares.

Sin embargo, usando solo datos basados en medios de cultivo, será imposible identificar de manera concluyente al culpable del brote. Se tendrán que realizar pruebas de ácidos nucleicos para determinar si los organismos que se detectó en las placas son patógenos. Al llevar a cabo ensayos inmunológicos se buscará establecer que sus pacientes están realmente sufriendo de la enfermedad ligada al patógeno que ya tentativamente identificó, por último, tendrá que realizar el análisis de "huellas digitales" (*fingerprinting*) para confirmar que el agente patógeno que recuperó de los pacientes y de las muestras ambientales, de agua o de alimentos es el mismo.