

Métodos Diagnósticos en Microbiología

María Teresa Ulloa Flores
Programa Microbiología Micología ICBM.
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

2010

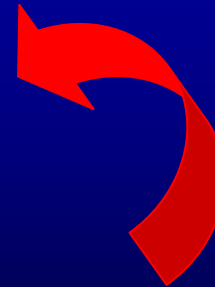
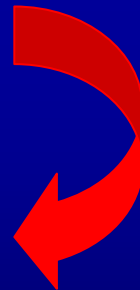
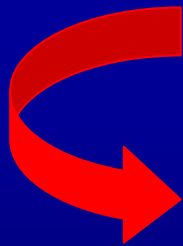
TENDENCIAS EN EL DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO

**RESULTADOS
MAS OBJETIVOS**

**RESULTADOS
MAS RAPIDOS**

**IMPACTO
CLINICO**

COSTO ADICIONAL



OBJETIVO

Realizar el **diagnóstico etiológico** de una enfermedad infecciosa con el fin de apoyar una terapia específica y, en algunos casos, determinar la gravedad.

Diagnóstico Etiológico

Muestra paciente



DIRECTO
Antígeno

Tradicional

Inmunológico

Molecular



INDIRECTO
Anticuerpo

Inmunológico

Diagnóstico Directo

Muestra paciente

DIRECTO
Antígeno

Tradicional



Diagnóstico Tradicional : Etapas

1. Toma de muestra y transporte
2. Observación microscópica (fresco, Tinciones)
3. Cultivo
4. Identificación del agente

Estudio de susceptibilidad

MUESTRA

REPRESENTATIVA DE LA INFECCION

1.- Obtención de la muestra

SITIO ESTERIL



Muestras

Cantidad suficiente

Cultivo corriente	Indicar si hay administración de antibióticos.	Vena periférica de fácil acceso, aplicar tórula de algodón con alcohol 70% en forma concéntrica. Aspirar usando guantes y mascarilla. Desinfectar la tapa del vial con alcohol al 70%.	Viales de hemocultivos Automatizados. Tomar mediante técnica toma de muestra al vacío en adultos. No escriba sobre código de barras. Escriba con lápiz que no se borre.	10 cc de sangre para adultos. 3 cc de sangre para niños
Cultivo anaerobio	Obtener la muestra antes o durante el peak de temperatura.	Tomar 2 para adultos y 1-2 para niños, con intervalo de 1 hora entre cada uno y de distintos sitios.	Transportar en los viales al laboratorio.	
Cultivo hongos				



TRANSPORTE

“MANTENER LA MUESTRA LO MAS CERCANO POSIBLE A SU ESTADO ORIGINAL”

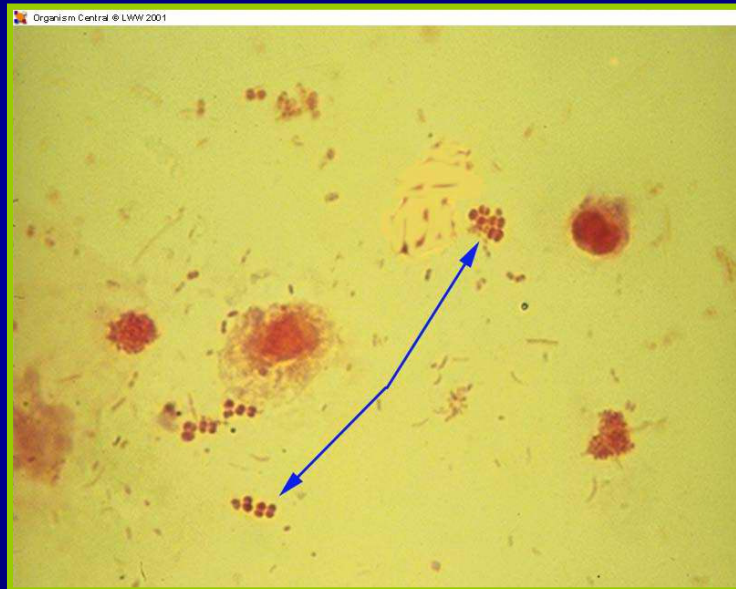
FUNDAMENTAL :

RECuento BACTERIANO

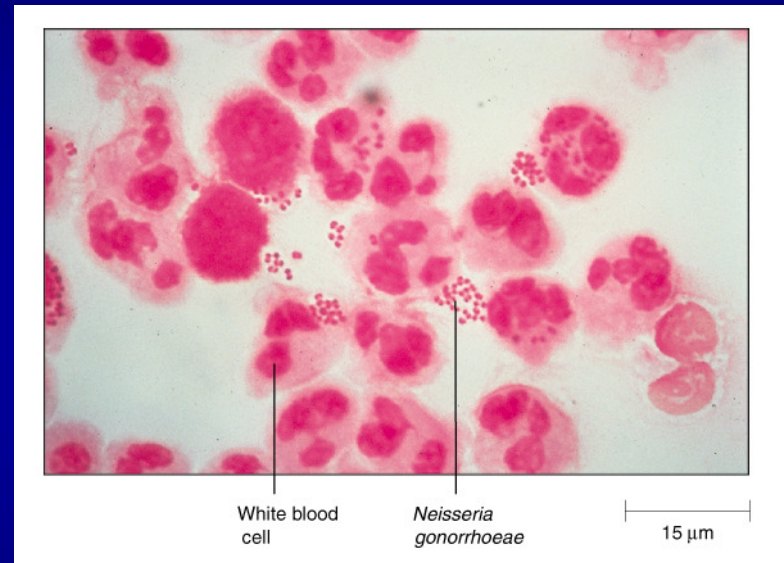
•UROCULTIVO



Tinción de Gram

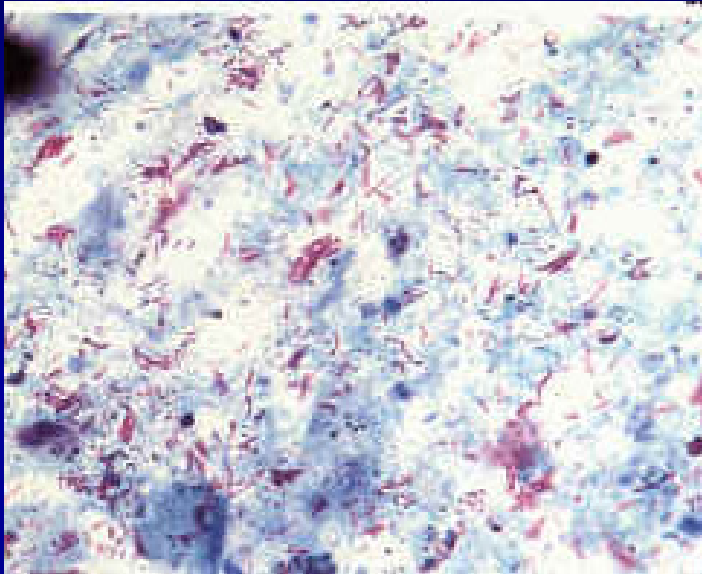


Directa de LCR



Directa diagnóstica: Gonorrea en el hombre

Tinciones en situaciones especiales



Ziehl Nielsen
Tuberculosis



Tinta china:
LCR VIH-SIDA
Cápsula de *Cryptococcus*

Cultivo

- Piedra angular del diagnóstico etiológico de enfermedad infecciosa.
- Permite recuperar el microorganismo para realizar estudio de susceptibilidad.



Medios de cultivo

Preparados estériles que contienen todos los nutrientes necesarios para el desarrollo de determinadas bacterias

Líquido

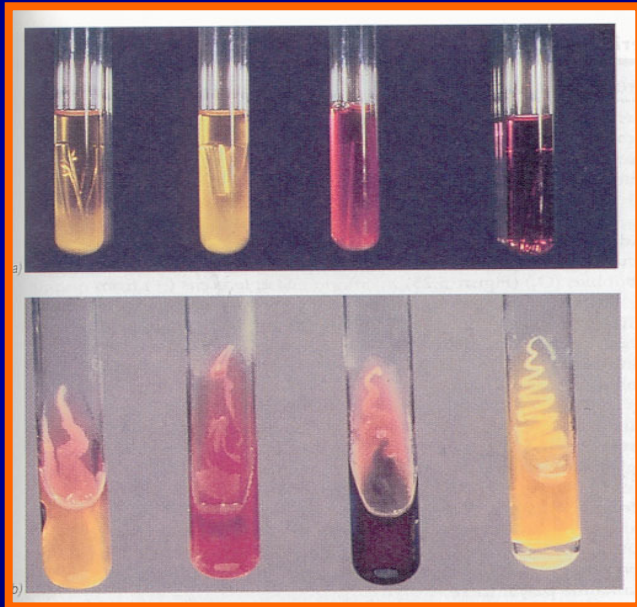


Sólido



Pruebas de Diagnóstico

Bacilos Gram Negativo



Fermentación de azúcares y
degradación de aa sulfurados

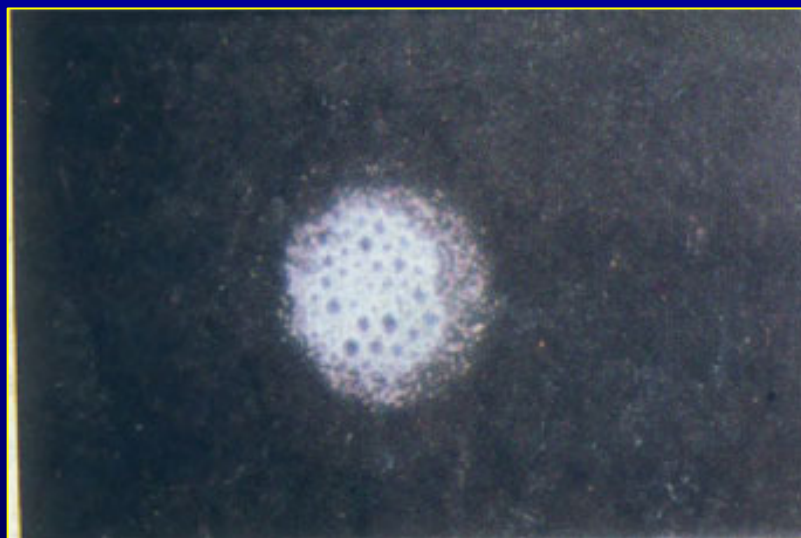
Utilización de citrato como fuente de carbono

Pruebas de Diagnóstico

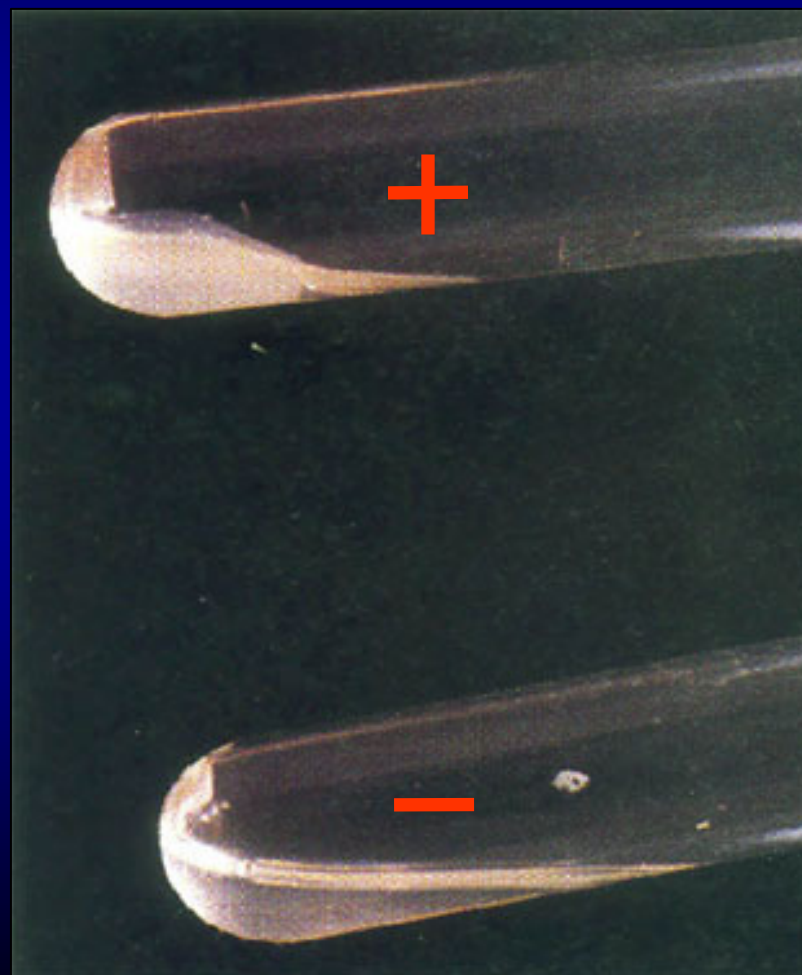
Bacterias Gram Positivo

Coagulasa

Catalasa



Presencia de enzimas



**Estudio de susceptibilidad
ANTIBIOGRAMA POR DIFUSIÓN
(Técnica de Kirby-Bauer)**

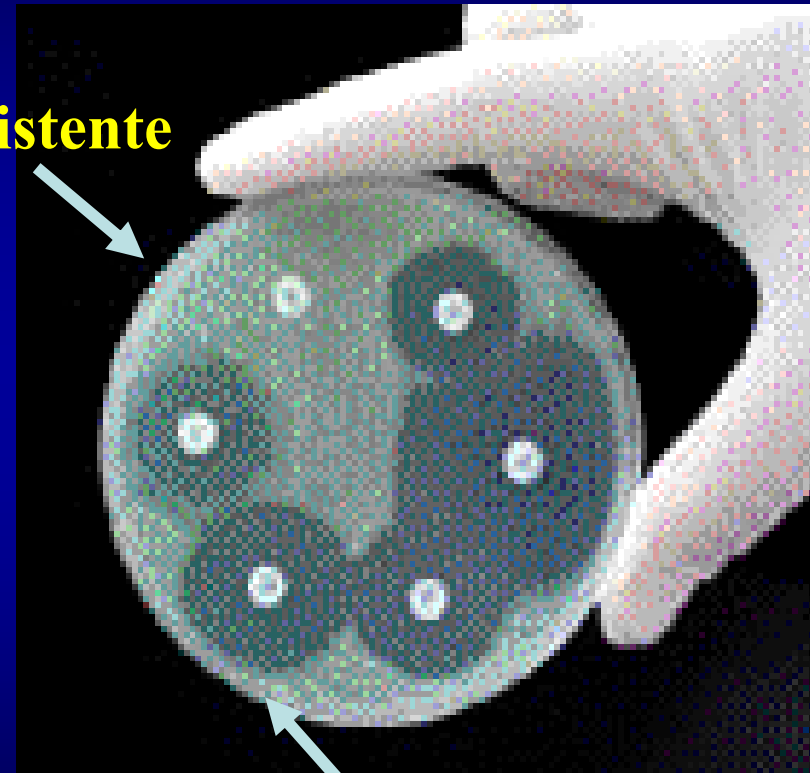
Sensible

Resistente



**Análisis de
varios antibióticos**

Resistente



Sensible

Diagnóstico Directo

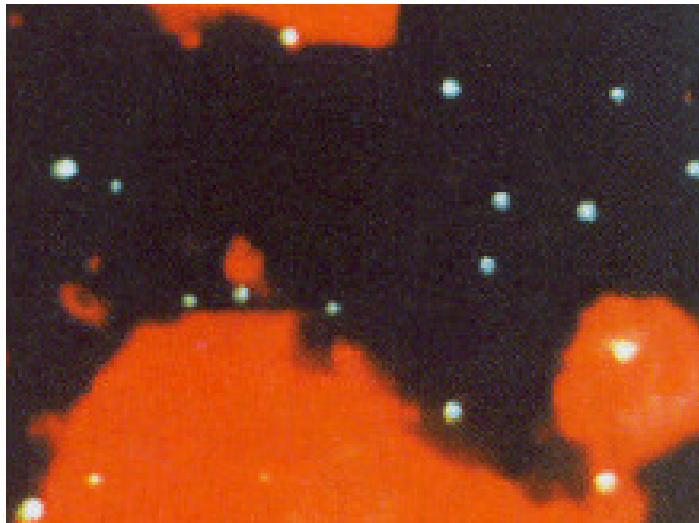
Muestra paciente

DIRECTO

Detección del antígeno



INMUNOFLUORESCENCIA



Inmunofluorescencia
directa (IFD)

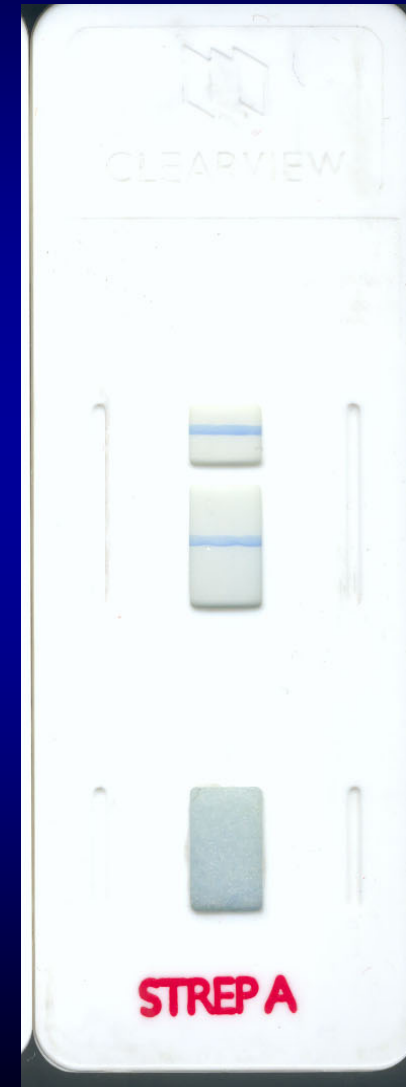
- sec. conjuntival
- ANF
- muestras genitales

Chlamydia

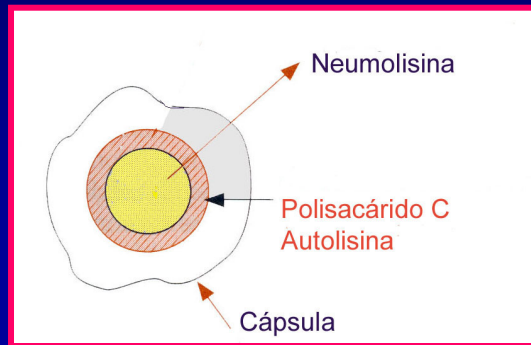
Faringitis: S. pyogenes
DETECCIÓN DE ANTÍGENO DIRECTO



Frotis faríngeo



Neumonía en adultos: Detección de ag. urinario



Detecta polisacárido-C de *S. pneumoniae* en orina, mediante reacción de antígeno-anticuerpo sobre soporte sólido (membrana), revelando una línea coloreada si el resultado es positivo.



Diagnóstico Directo

Muestra paciente

DIRECTO
Antígeno

Molecular





PCR



Fundamento de la PCR

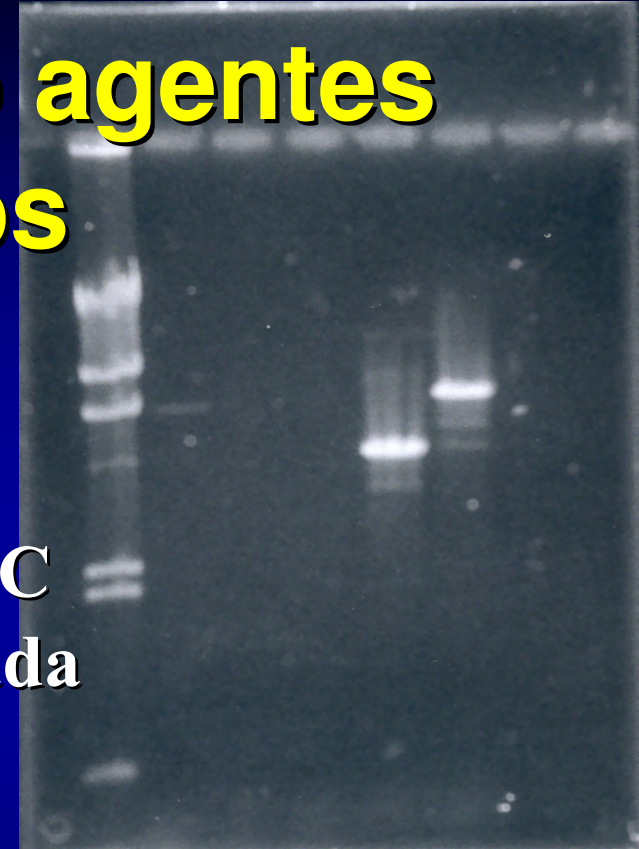
Síntesis de ADN utilizando una DNA polimerasa resistente a altas temperaturas usando partidores específicos.

Partidores: secuencias cortas de ADN que se adhieren o hibridan con la hebra de ADN que será copiada



PCR: Diagnóstico agentes bacterianos

- No crecen en "in vitro"
- Cultivo poco sensible
- Requieren medios complejos /CC
- Tiempo de incubación prolongada

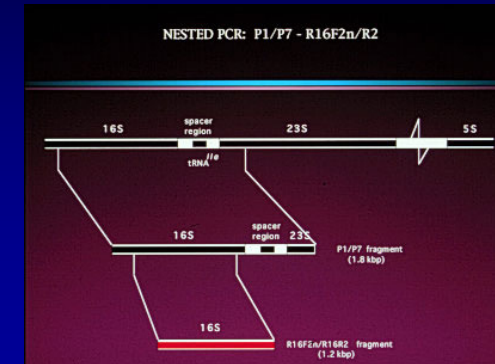
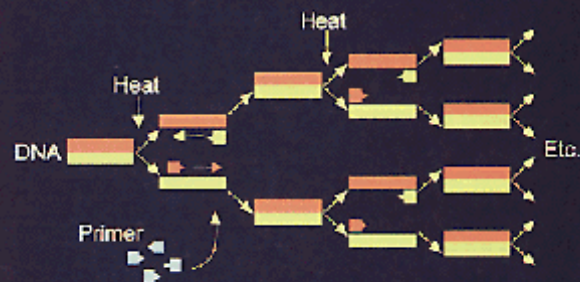


- MUESTRAS: REFRIGERADAS
- CONSERVAR EL ADN

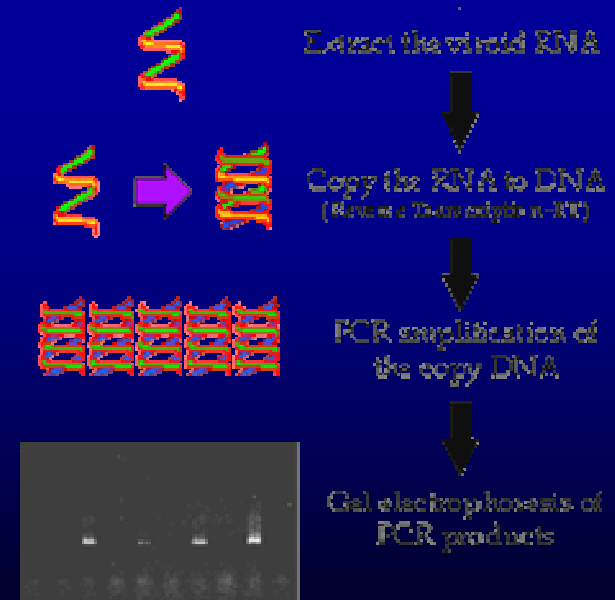


PCR

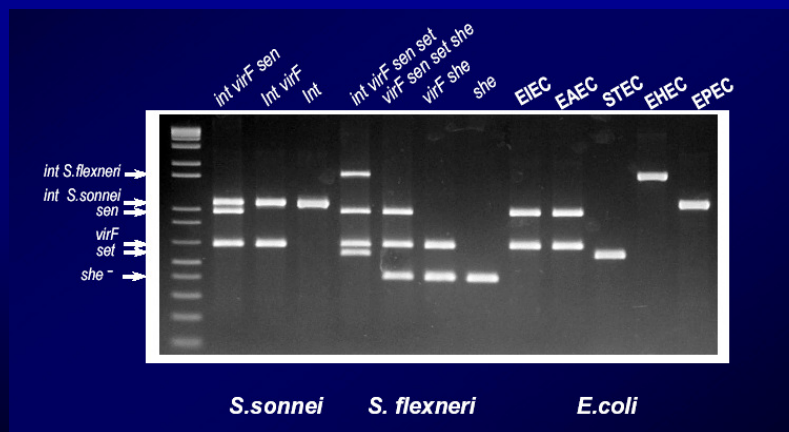
Polymerase Chain Reaction (PCR)



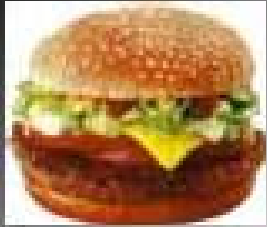
PCR nested



RT PCR



PCR multiplex



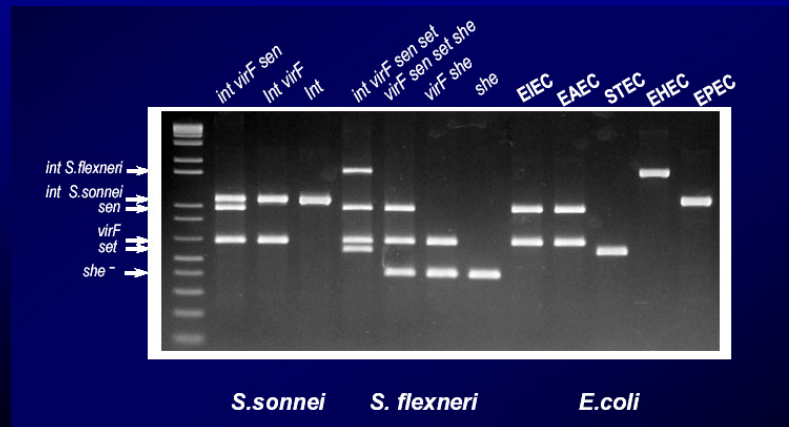
GENOTIPO : virulencia



EcEH

gen sxt1

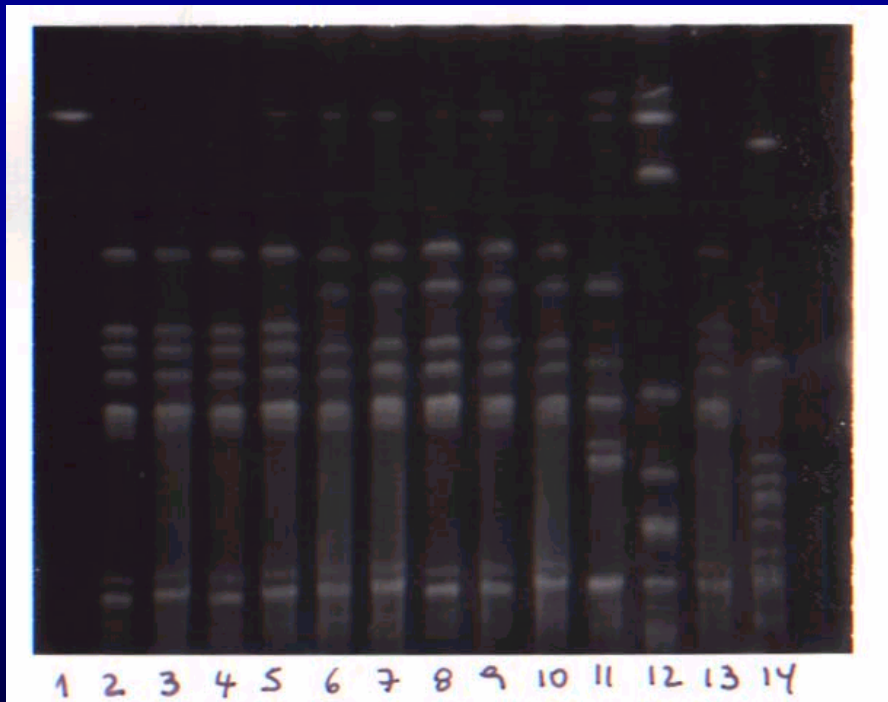
sxt2



EPIDEMIOLOGIA:

Brotes IH

ECP: Estudio de clonalidad de las cepas



1. Marcador PM
2. RN
3. RN
4. RN
5. Puérpera
6. Puérpera
7. Puérpera
8. Puérpera
9. Puérpera
10. Puérpera
11. Portador
12. Portador
13. Portador
14. ATCC 19685

MICROARRAY

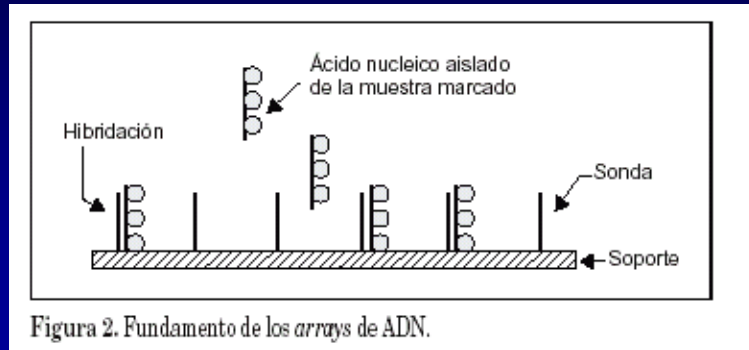


Figura 2. Fundamento de los arrays de ADN.

Sondas específicas de agentes infecciosos inmovilizadas en una plataforma

Reaccionan con el ADN de la muestra

Emite una señal: Detecta con un scanner

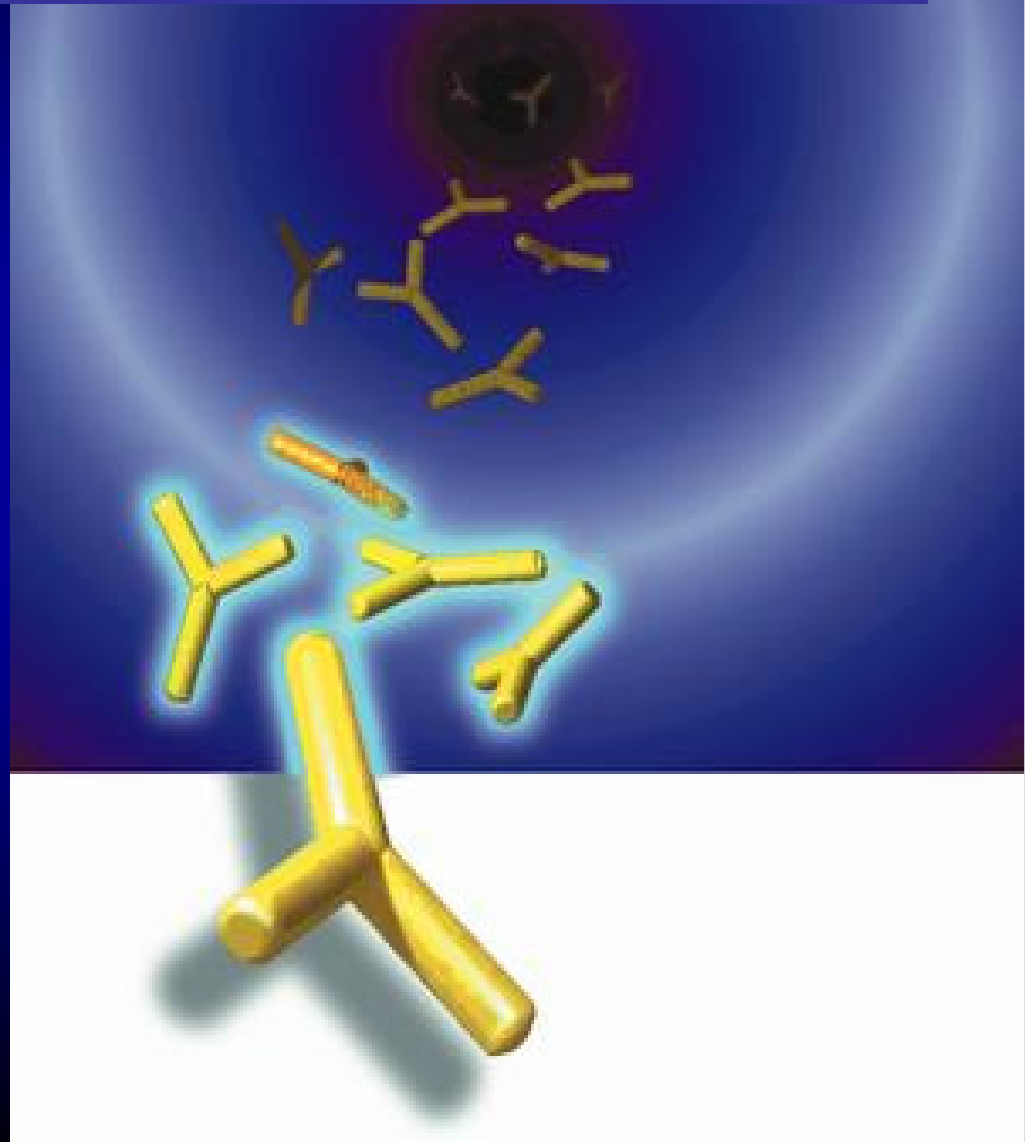
Ventaja: Diagnóstico directo de varios agentes simultáneamente

Diagnóstico Indirecto

Muestra paciente

INDIRECTO
Anticuerpo

Inmunológico



INMUNODIAGNOSTICO

•DETECCION DE RESPUESTA INMUNE:

Immunoglobulinas

Igs clase específica

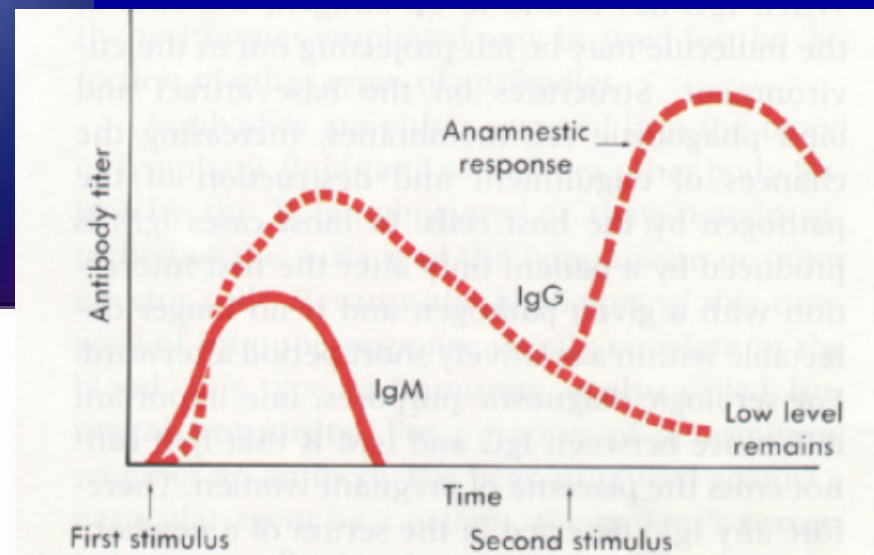
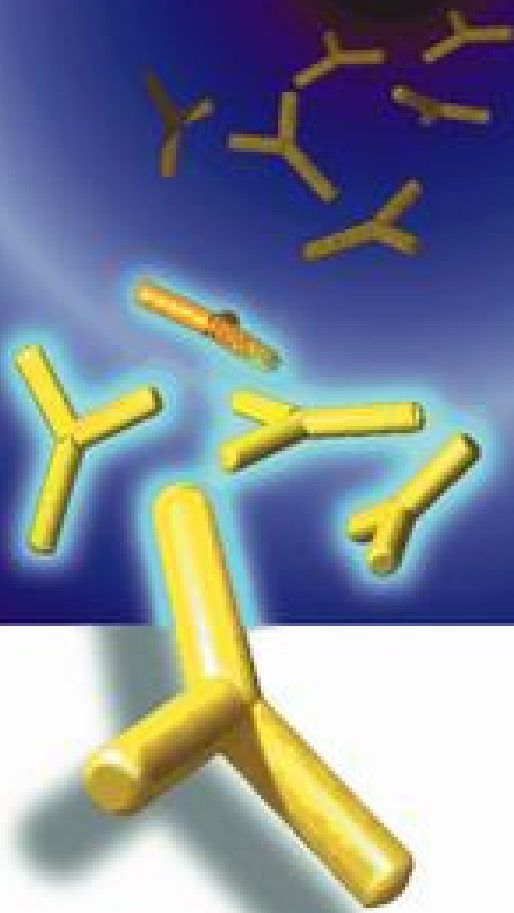


FIGURE 13.4

Relative humoral response to antigen stimulation over time.

RESPUESTA DE Ac. A UNA INFECCIÓN



- Variable según huésped
- Test serológico utilizado (tipo de Ag y técnica)

La ausencia de Ac. puede reflejar:

- Poca inmunogenicidad del agente
- Uso de técnica inapropiada
- Momento de obtención de muestra inadecuado.

DETECCION DE ANTICUERPOS

- Cultivos no disponibles:
 - Metodología no desarrollada (*T.pallidum*)
 - Impracticables en laboratorio de rutina (*Mycoplasmas*, *Chlamydia*)
- Terapia antimicrobiana previa



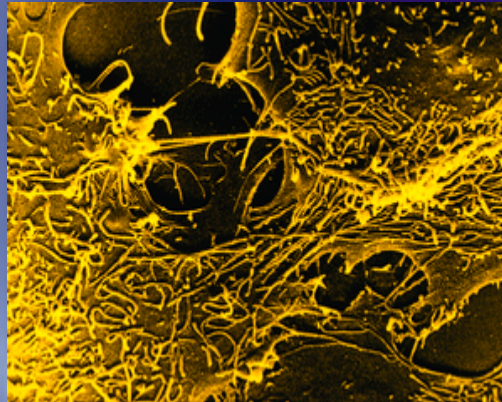
ELISA

ELISA "SANDWICH" DIRECTO



ELISA INDIRECTO





IFI: Infecciones respiratorias

M. pneumoniae
C. pneumoniae



TENDENCIAS EN EL DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO

**RESULTADOS
MAS OBJETIVOS**

**RESULTADOS
MAS RAPIDOS**

**IMPACTO
CLINICO**

COSTO ADICIONAL

