

Métodos Diagnósticos en Microbiología

Maria Teresa Ulloa Flores.
Programa Microbiología Micología ICBM.
Facultad de Medicina, Universidad de Chile
2012

Técnica de diagnóstico ideal

- **Confiables: 100% S y 100% E**
- **Rápidas: resultados antes de dejar la consulta**
- **Baratas: costo beneficio**
- **Ojalá a partir de muestras no invasivas**

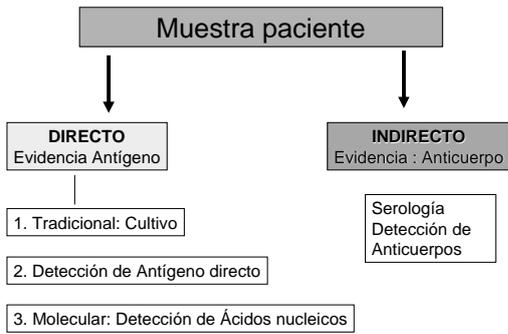
TENDENCIAS EN EL DIAGNOSTICO MICROBIOLÓGICO



OBJETIVO

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

Diagnóstico Etiológico

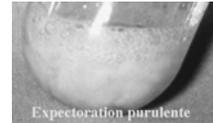


MUESTRA

REPRESENTATIVA DE LA INFECCION

1.- Obtención de la muestra

SITIO ESTERIL

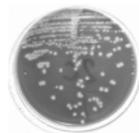
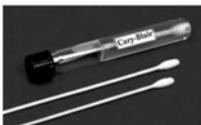


TRANSPORTE

"MANTENER LA MUESTRA LO MAS CERCANO POSIBLE A SU ESTADO ORIGINAL"
FUNDAMENTAL:

RECUBIERTO BACTERIANO
-UROCULTIVO

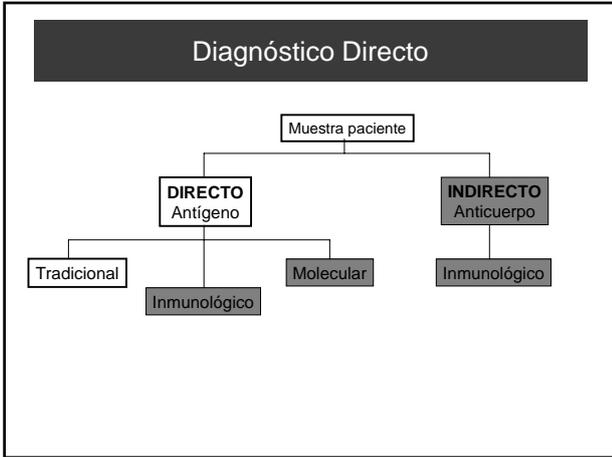
MUESTRA DE DEPOSICIÓN



SANGRE: HEMOCULTIVO

- Numero de hemocultivos
 - 1 hemocultivo: Sensibilidad 80 -91 %
 - 2 hemocultivos: Sensibilidad 98- 99%
 - 3 hemocultivos: Sensibilidad 99%
 - Recomendación 2
- Volumen
 - Bacteriemias: <1 - 10 bacterias/ml
 - Por cada ml adicional 6% de positividad
- Recomendación: Adultos 20 – 30 ml por set (adultos)
 - RN 1 – 2 ml (0.5 a 1 ml / frasco)
 - 1m – 2a 2 – 3 ml
 - Escolares 5 – 6 ml
- Mantener relación con el medio liquido
 - 1/5 o 1/10





Tinción de Gram

- Se basa en las características de la pared celular bacteriana

Tinción de Gram

- Reacción tintorial
- Forma
- Agrupación

GRAM +		GRAM -
○	↓ Fixation	○
●	↓ Crystal Violet	●
●	↓ Iodine treatment	●
○	↓ Decolorization	○
●	↓ Counter stain (safranin)	●

Ejemplos de Observación microscópica directa de la muestra * Informe preliminar

Meningitis bacteriana aguda

Normal anatomy of brain and spinal cord vs. Brain and spinal cord with bacterial meningitis.

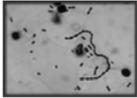
Se analiza el LCR para determinar el número de glóbulos blancos y rojos

La punción lumbar se realiza para obtener líquido cefalorraquídeo (LCR)

Tinción de Gram

Directa de LCR

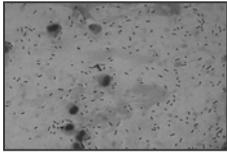
Tinción de Gram



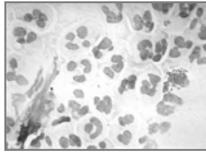
Directa de LCR

Permiten realizar diagnóstico etiológico preliminar y orientar terapia inicial.

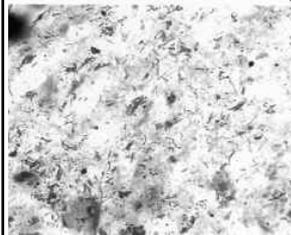
Directa: calidad de la muestra



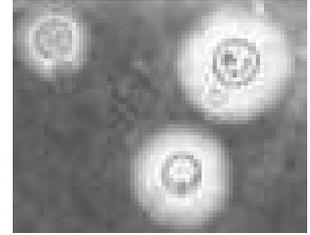
Directa diagnóstica: Gonorrea en el hombre



Cont' Tinciones en situaciones especiales



BACILOSCOPIA:
T. Ziehl Nielsen
Tuberculosis



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

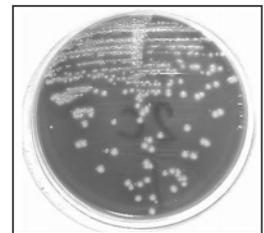
Diagnóstico Directo

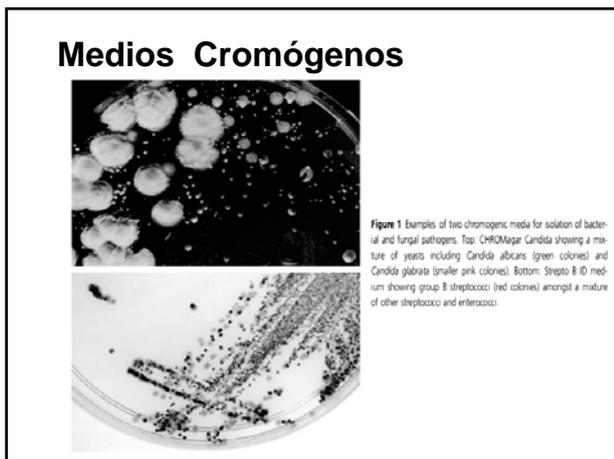
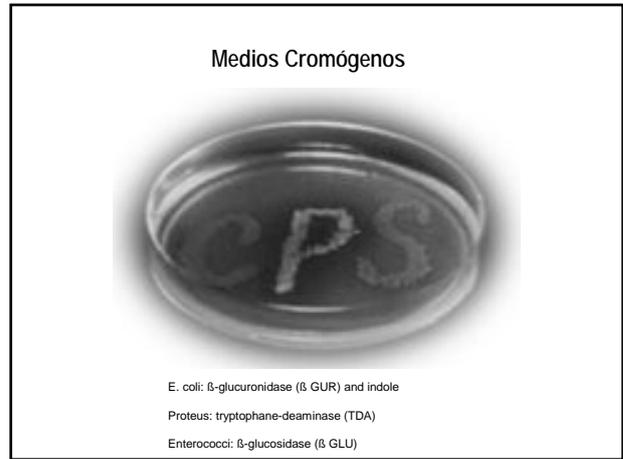
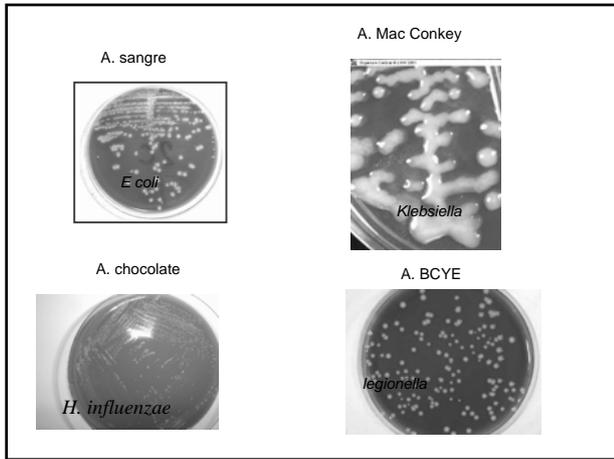
¿CÓMO SE PROCESA UN CULTIVO?

- Toma de muestra
 - Medio de transporte
 - Siembra y Tinción de Gram directa
 - Medios de cultivo
 - Incubación
 - Identificación de colonias
 - Tinción de Gram y pruebas bioquímicas
 - Antibiograma
 - Informe definitivo
- 16-24 horas
- 8-24 horas

Cultivo

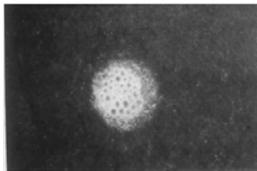
- Piedra angular del diagnóstico etiológico de enfermedad infecciosa.
- Permite recuperar el microorganismo para realizar estudio de susceptibilidad.....
- Cuando las etapas previas (TM, transporte, siembra) se han realizado correctamente:
Especificidad 100%



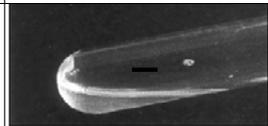
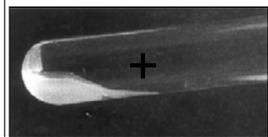


Pruebas de Diagnóstico
Bacterias Gram Positivo
Coagulasa

Catalasa

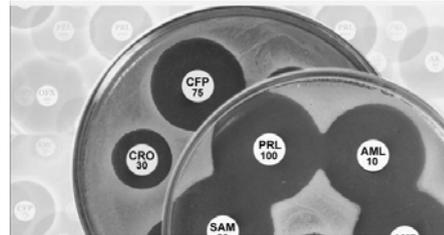


Presencia de enzimas



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

Análisis de
 varios antibióticos



Sensible

Resistente

Identificación: Fenotípica



Manual miniaturizado



Automatizado(VITEK)



Diagnóstico Directo:
Detección de antígeno

Diagnóstico Directo

Muestra paciente

2. Detección de antígeno directo de la muestra

Detección de antígenos

- Fundamento: detección de partículas antigénicas de un determinado agente infeccioso mediante reacción antígeno-anticuerpo
- Tipos:
 - Látex (*S. aureus*, RotaV)
 - EIA: ELISA, IF, RIA
 - EIA: SGA, *C. difficile*, *S. pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, VRS, RotaV)
 - IF: *Bordetella*, *Chlamydia trachomatis*, virus resp.)
 - Western blots (HIV, HTLV, HCV, *Borrelia burgdorferi*)

Detección de antígenos

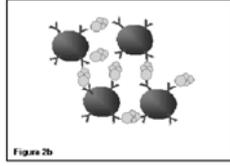
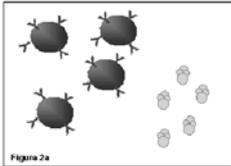
- Consideraciones:
 - Sensibilidad variable según agente y cantidad de antígeno.
 - Especificidad variable según tipo Ac utilizado y antígeno buscado.
- No reemplaza cultivo (gold standard)

Direct Antigen Detection Tests by Agglutination Assays or by Enzyme Immunoassays

Tabla 2.- Microorganismos con técnica rápida disponible para su detección en muestras clínicas

Microorganismos	Muestras	Técnicas disponibles
Bacterias		
<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b	LCR ^a	Aglutinación
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	LCR, orina, muestras respiratorias	Aglutinación (LCR), IC ^b (orina)
<i>Neisseria meningitidis</i>	LCR	Aglutinación
<i>Legionella pneumophila</i>	Muestras respiratorias, orina	IFD ^c (respiratorias), IC, EIA ^d (orina)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Exudado faríngeo, lesiones cutáneas, líquidos estériles	IC
<i>Brucella</i> spp.	Sangre	Aglutinación
<i>Clostridium difficile</i>	Heces	Aglutinación, EIA
**		

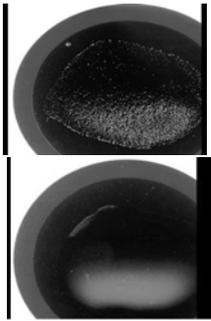
LATEX



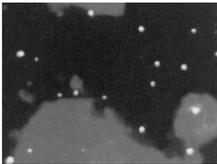
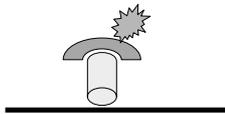
LATEX



LCR

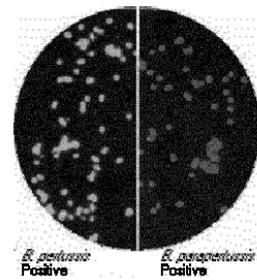


IFD directa



Inmunofluorescencia directa (IFD)
-sec. conjuntival
-ANF
-muestras genitales

IFD *Bordetella*



Accu-MAb™ Test Kits



Diagnóstico de *S. pyogenes* : Detección de ag. directo



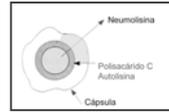
	Cultivo +	cultivo -	total
StrepA +	38	1	39
StrepA -	4	107	111
Total	42	108	150

Prevalencia: 42/150 : 28%

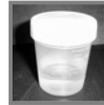
Especificidad 99%
Sensibilidad 90.5%

Ulloa MT et al. Congreso Chileno de Microbiología. Valdivia 2000

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.



Xpect® Clostridium difficile Toxin A/B-24650

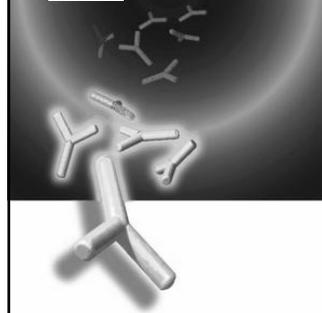
• Prueba cualitativa de inmunoensayo para la detección directa de *C. difficile* Toxinas A&B en muestras de deposición

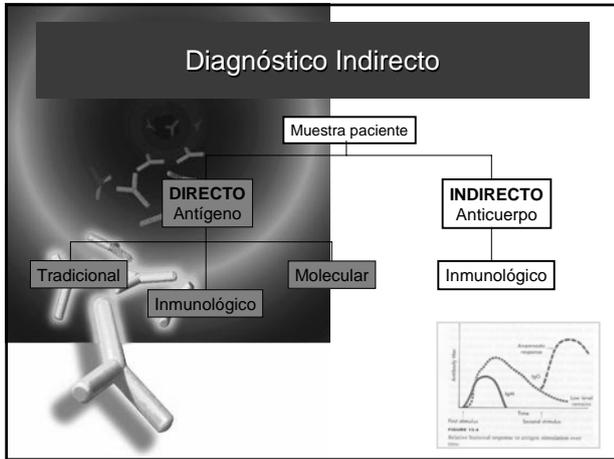
- Combina detección de Toxina A & B
- Resultados en 20 minutos
- En prueba actualmente



- Sensibilidad: 86.3%
- Especificidad: 96.2%
- Valor Predictivo Positivo: 84.1%
- Valor Predictivo Negativo: 96.8%

Diagnóstico Indirecto





INMUNODIAGNOSTICO

•DETECCION DE RESPUESTA INMUNE:

Inmunoglobulinas
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)

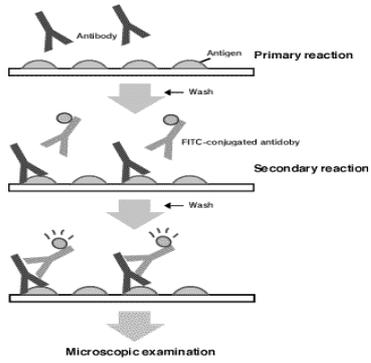
La ausencia de Ac. puede reflejar:

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

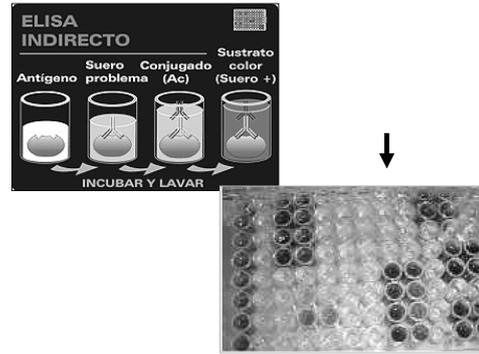
DETECCION DE ANTICUERPOS

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

Inmunofluorescencia indirecta



ELISA



Detección de anticuerpos

- Técnicas de diagnóstico indirecto y presuntivo
- IgM o IgG pareada (15d): respuesta aguda
- IgG: Infección pasada

Infecciones bacterianas *Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia psittaci, C. pneumoniae y C. trachomatis, Brucella, Leptospira, Treponema pallidum, Bartonella henselae, Borrelia, Yersinia.*

Infecciones virales Hepatitis A, B, C, E, VIH, Rubéola, Varicela, Parotiditis, Sarampión, Herpes, Epstein Barr, CMV, Dengue, Parvovirus B19.

- **Métodos:** ELISA, IF, Western Blot