



Microbiología II

Seminario 1

Diagnóstico Microbiológico



Cátedra 1 – Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología
Facultad de Cs. Médicas - Universidad de Buenos Aires

Objetivos

- Conocer el **esquema del diagnóstico microbiológico** (toma de muestra → procesamiento → informe → interpretación).
- Conocer los **métodos** de diagnóstico microbiológico y las principales **técnicas** que se utilizan en cada uno de ellos.
- Interpretar los parámetros que determinan su **validez y utilidad** en la práctica médica.

Importancia Clínica del Diagnóstico Microbiológico

- **Identificar el agente etiológico de una infección.**
- **Conocer la susceptibilidad a una infección.**
- **Determinar la sensibilidad del agente etiológico al tratamiento.**
- **Modificar la terapia inicial empírica.**
- **Establecer medidas de profilaxis adecuadas.**

Propiedades de las técnicas diagnósticas

Son **propiedades intrínsecas** de las técnicas utilizadas

Sensibilidad (S)

- Indica la capacidad de la prueba para detectar a un sujeto **enfermo** (con infección).
- Mide la proporción (%) de infectados que son identificados con el test en estudio.
- Una prueba diagnóstica con alta S: posee la capacidad de detectar a la mayoría de los individuos con infección.

Especificidad (E)

- Indica la capacidad que tiene la prueba de identificar como **sanos** (sin infección) a los que efectivamente lo son.
- Mide la proporción (%) no infectados que son identificados por el test en estudio.
- Una prueba diagnóstica con alta E: cuando es negativa descarta infección en pacientes sanos.

Propiedades extrínsecas (dependen de la prevalencia)

Valor predictivo positivo (VPP)

- Es la probabilidad de que los individuos con una prueba positiva tengan realmente la enfermedad (infección)
- Cuanto mayor es el valor, mayor probabilidad de que un individuo con prueba positiva posea la infección.
- Ante un resultado positivo
¿Cuál es la probabilidad de que el individuo padezca la infección ?
Usar el VPP.

Valor predictivo negativo (VPN)

- Es la probabilidad de que los individuos con una prueba negativa no tengan realmente la enfermedad (infección).
- Cuanto mayor es el valor, mayor probabilidad de que un individuo no presente la infección
- Ante un resultado negativo
¿Cuál es la probabilidad de que el individuo no presente la infección? Usar el VPN.

Métodos de Diagnóstico Microbiológico

DIRECTO



Implican la demostración directa de un agente (presencia) o sus distintos componentes en las muestras clínicas de un paciente.

INDIRECTO



Permiten demostrar que el agente ha tomado contacto con el sistema inmune del individuo.

Indica que el patógeno está o estuvo presente en algún momento.

Estos métodos comparten muchas técnicas de laboratorio

Métodos de Diagnóstico Microbiológico

– DIRECTO

- Observación microscópica
- Cultivo
- Detección de antígenos
- Detección de ácidos nucleicos

– INDIRECTO

- Detección de anticuerpos específicos
- Intradermorreacciones

TOMA de la MUESTRA

- Elegir el material más representativo del proceso infeccioso, evitando contaminaciones.
- Tomar la muestra en el momento adecuado y en lo posible antes de que el paciente reciba antimicrobianos.
- Utilizar un recipiente adecuado para su conservación y transporte.
- Identificar la muestra correctamente.
- Enviar al laboratorio lo más rápidamente posible.

TOMA de la MUESTRA

Sitios anatómicos

Estériles

Colonizados por microbiota



Biopsia de tejidos

**Sangre
LCR**



Orina
(punción suprapúbica)



Orina
(micción espontánea o al acecho)

Espuito

Material fecal



**Hisopado
rectal o
nasofaríngeo**

Conservación y transporte de muestras

Conservar a temperatura ambiente

**Sangre
LCR**

Refrigerar a 4 °C

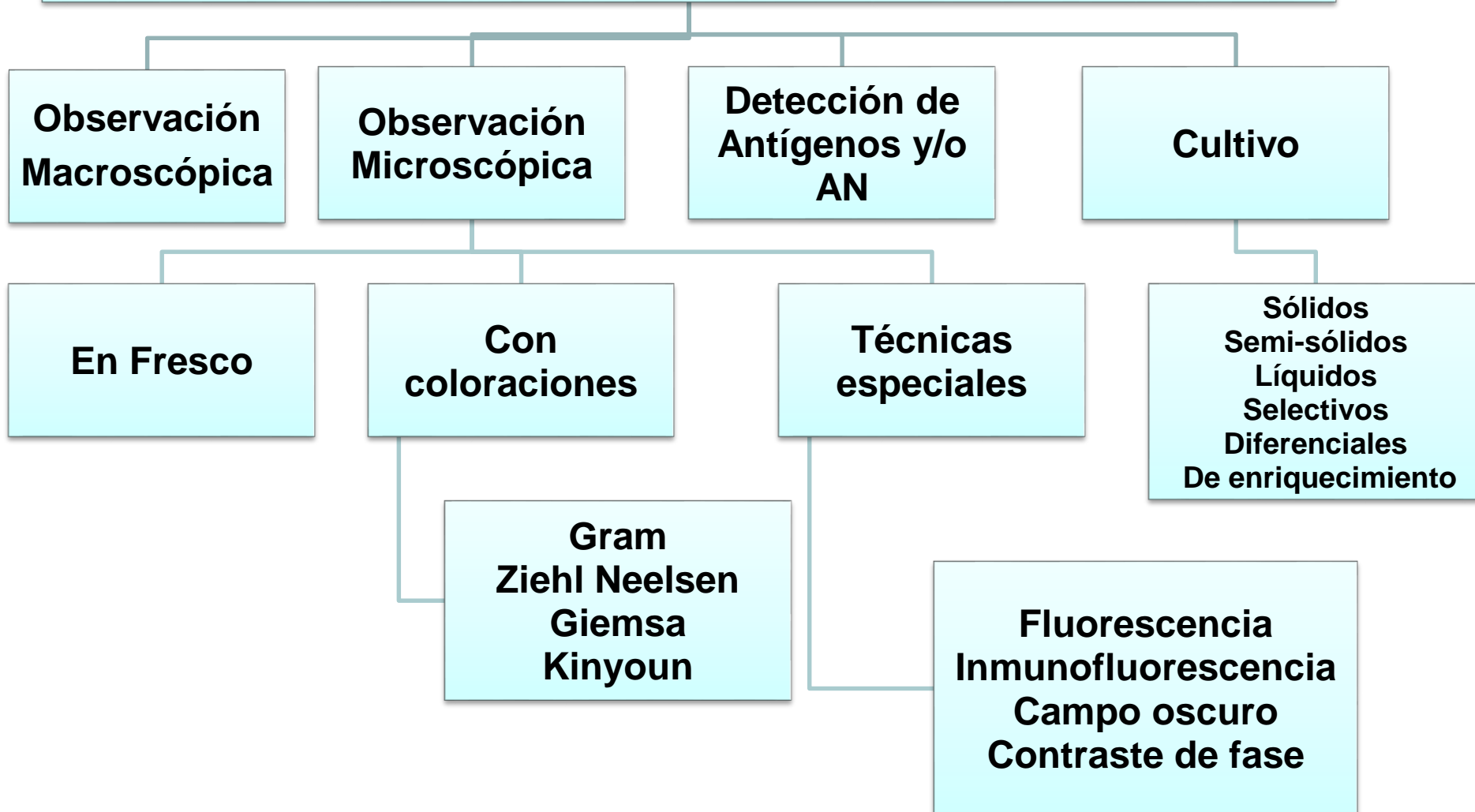
**Orina
Materia Fecal**

**Conservar a temperatura ambiente en un medio de transporte
(Carry & Blair, Stuart, Amies, etc)**

**Exudados genitales
Exudados de piel y tejidos blandos
Exudados faríngeos**

¿Por qué requieren distintas condiciones de conservación para su transporte?

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DIRECTO

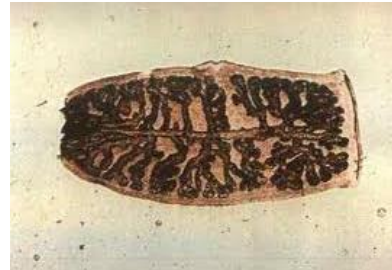


Métodos Directos de diagnóstico microbiológico (I)

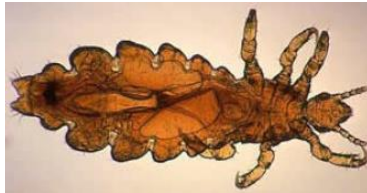
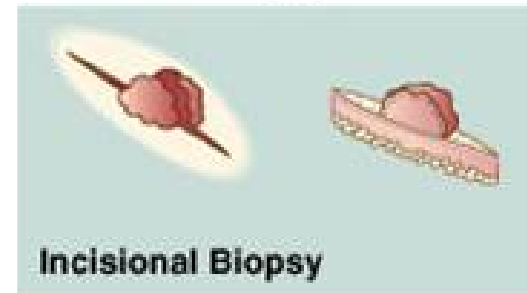
OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE LA MUESTRA



Ascaris lumbricoides



Proglótides
de *Taenia*



Pthirus pubis



Enterobius vermicularis



Métodos Directos de diagnóstico microbiológico (II)

Observación microscópica de material en fresco



Microscopía

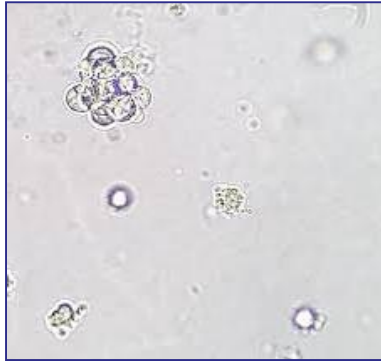


**Enterobius
vermicularis**

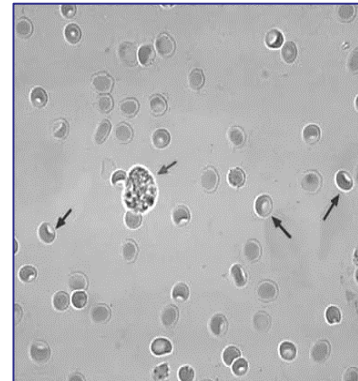


Pseudohifas

Levaduras



Piocitos



Hematíes

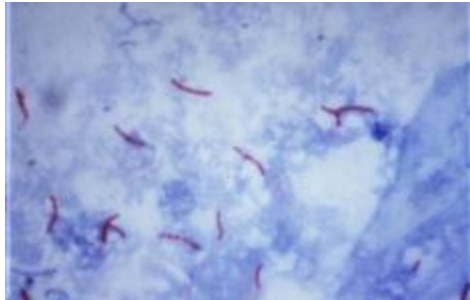
Métodos Directos de diagnóstico microbiológico (III)

Observación microscópica con uso de tinciones (Luz blanca / Fluorescencia)



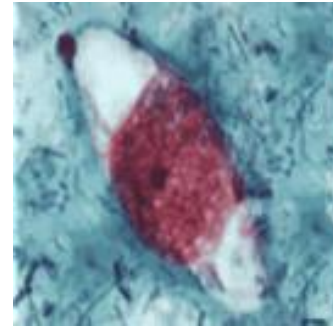
Microscopía

Ziehl Neelsen



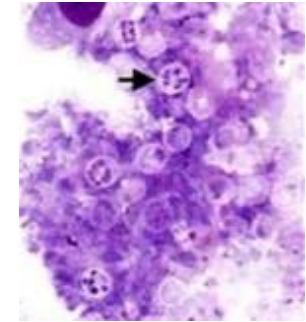
Mycobacterium tuberculosis

Kinyoun



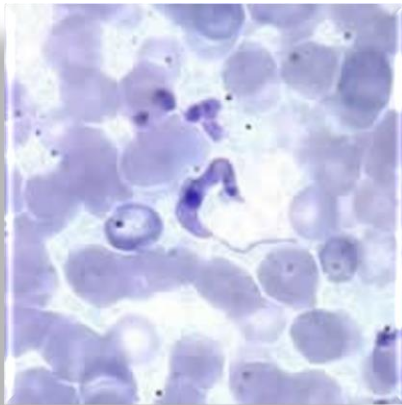
Cystoisospora belli

Giemsa



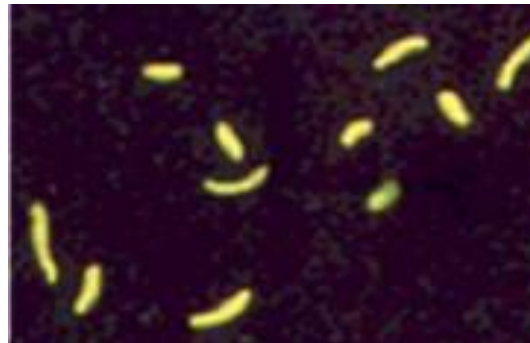
P. jirovecii

Giemsa



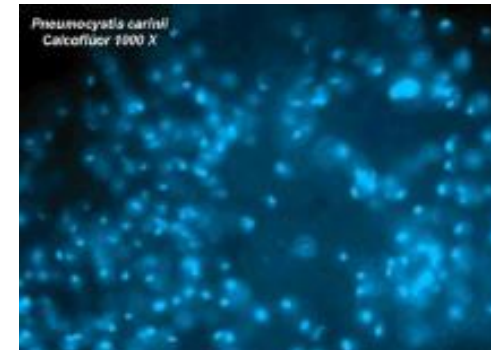
T. cruzi

Auramina



Mycobacterium tuberculosis

Calcofluor



P. jirovecii

Métodos Directos de diagnóstico microbiológico (IV)

Identificación Bacteriana (definir género y especie)

Observación
microscópica



Cultivo
(aislamiento del
germen puro)



Medios Selectivos
Medios diferenciales
Medios de
enriquecimiento

**Detección de
antígenos**



**Métodos
moleculares**



Pruebas bioquímicas
(características
metabólicas)

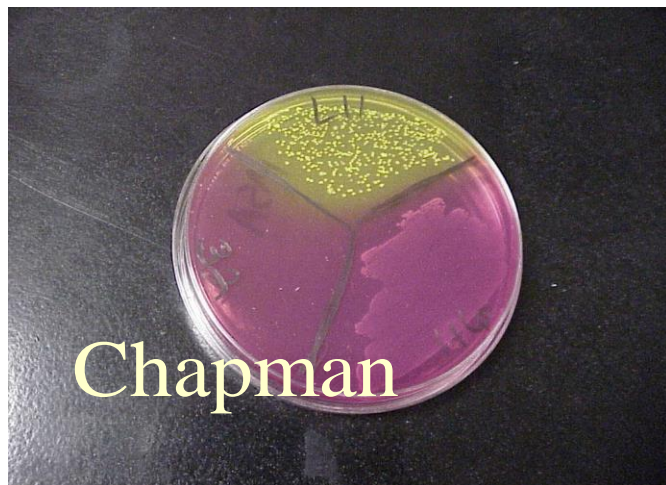
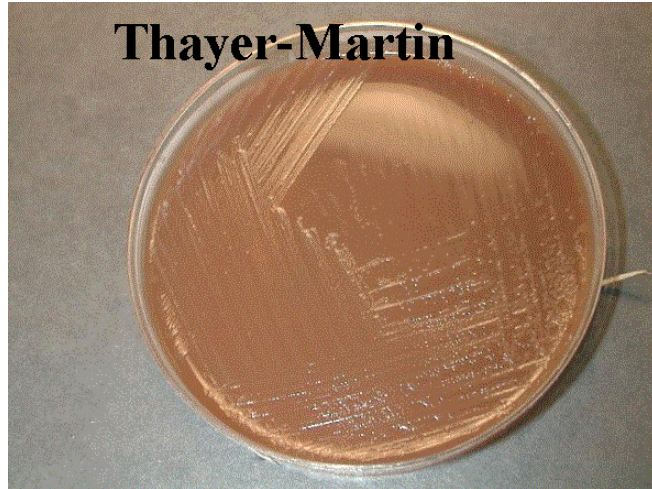
Identificación

Sensibilidad antibiótica



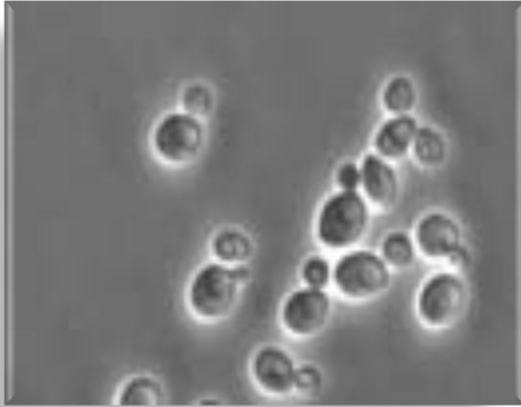
Métodos Directos de diagnóstico microbiológico (V)

Identificación Bacteriana: uso de medios Selectivos y Diferenciales



Métodos Directos de diagnóstico microbiológico (VI)

Identificación de Hongos



Talo levaduriforme

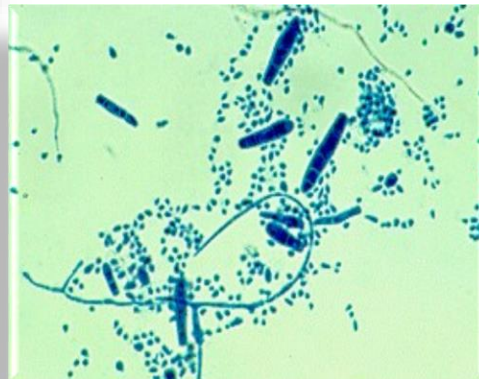
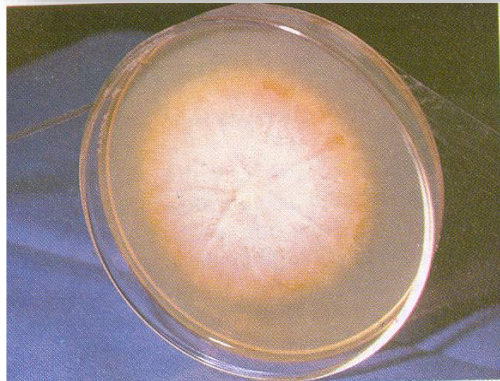
Aspectos morfológicos:
Utilización de azúcares,
compuestos orgánicos



Temperatura de
incubación 28°C y
37°C

Talo micelial

Aspectos morfológicos:
macroscópicos y
microscópicos

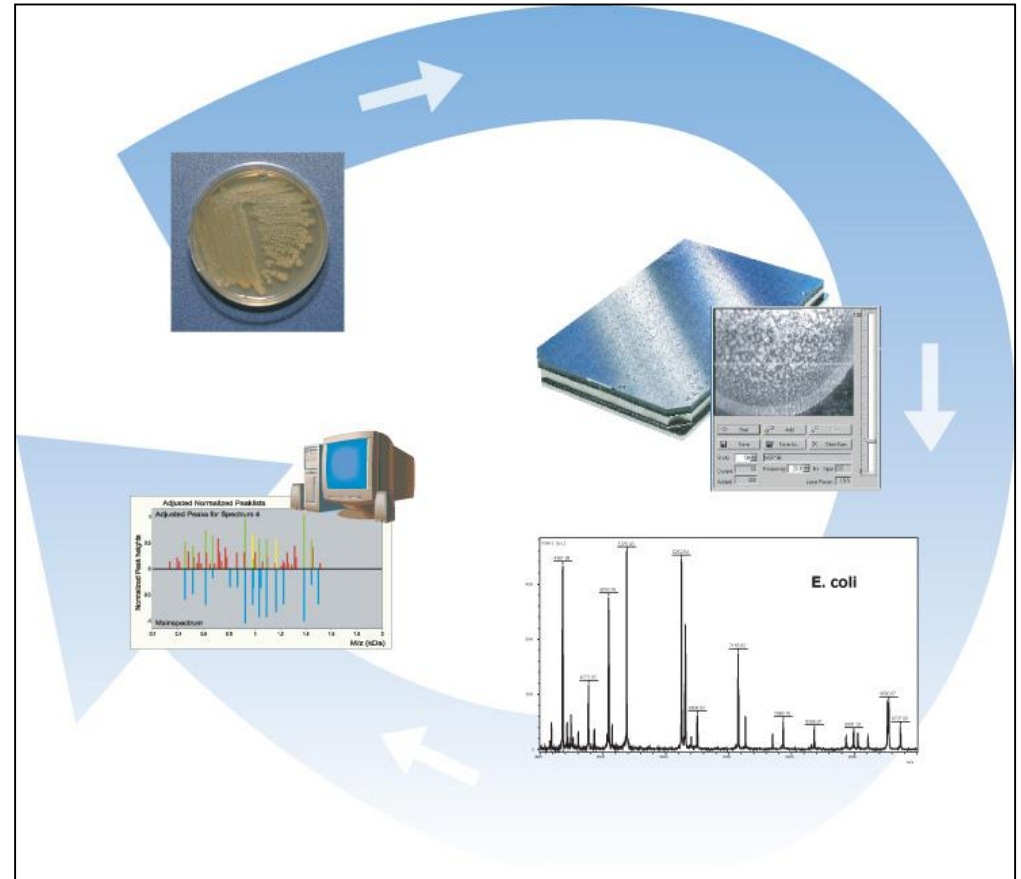


Métodos Directos diagnóstico microbiológico (VII)

Identificación Bacterias, Hongos, Virus: uso del MALDI-TOF

MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionization- time of flight*), es una técnica de ionización suave que permite la separación e identificación de macromoléculas por su masa molecular, sin romperlas.

- Identificación de proteínas de bacterias, hongos, y virus.
- Análisis de la resistencia a antimicrobianos.
- Rápido, pero costoso (disponibilidad limitada)



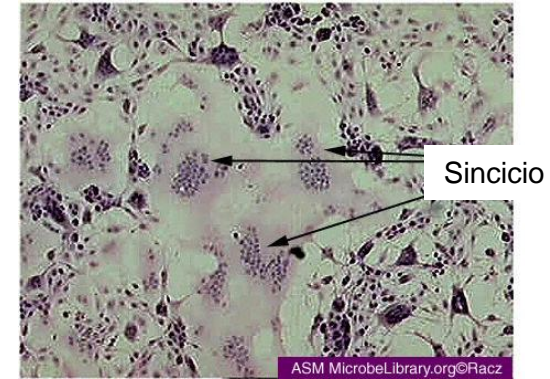
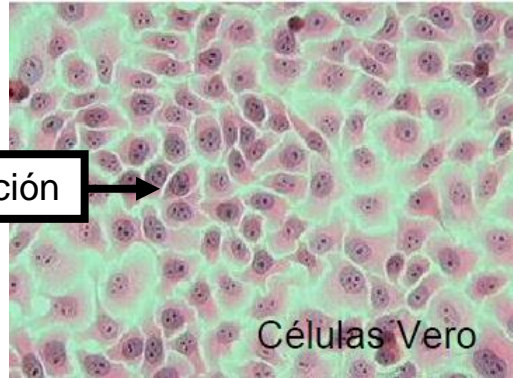
Métodos Directos diagnóstico microbiológico (VIII)

Identificación de Virus

Aislamiento de virus en cultivo + identificación



identificación



- ✓ Efecto o Acción Citopático (ACP)
- ✓ Neutralización
- ✓ Inmunofluorescencia

Cultivo en *shell vial*

Permite acortar los tiempos



- **Restringido por lo laborioso, costoso**
- **Puede demorar tiempos improcedentes para el Dx.**
- **Limitaciones**
 - No todos los virus pueden replicar en cultivo.
 - No todos los virus producen ACP.
 - La misma ACP puede ser producida por diferentes virus

Métodos Directos diagnóstico microbiológico (IX)

Detección de proteínas/polisacáridos, o genoma del microorganismo

Muestra biológica colectada

Inmunofluorescencia

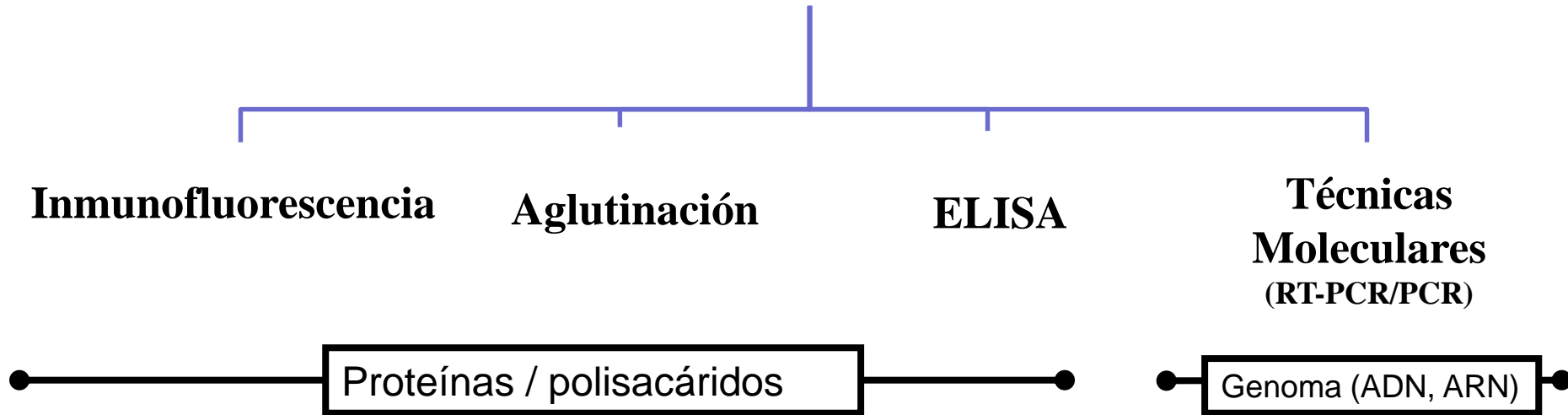
Aglutinación

ELISA

**Técnicas
Moleculares
(RT-PCR/PCR)**

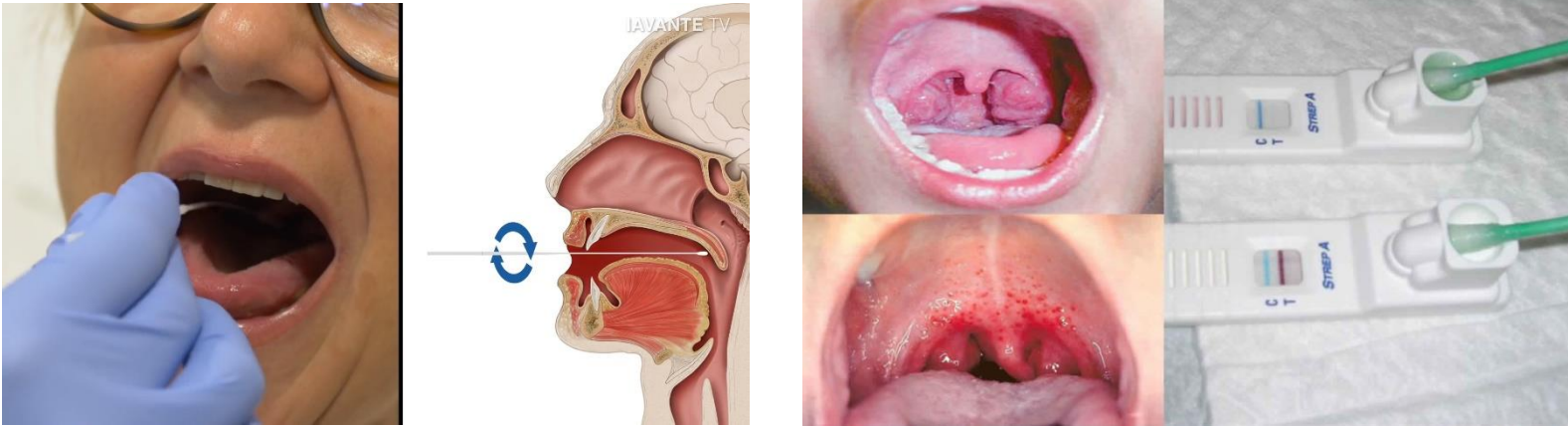
Proteínas / polisacáridos

Genoma (ADN, ARN)

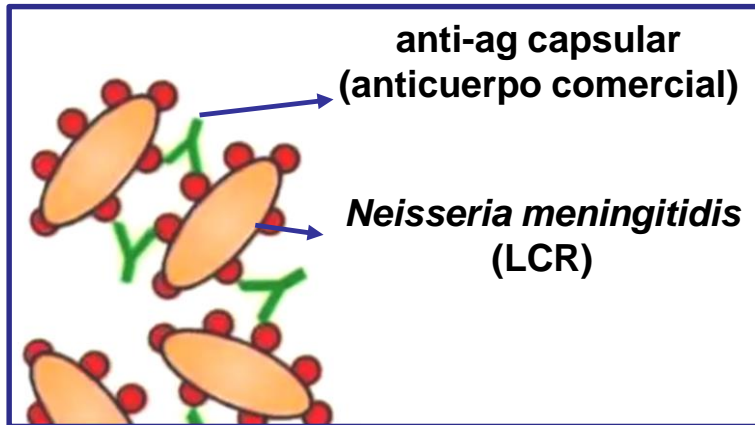


Métodos Directos diagnóstico microbiológico (IX)

Detección de proteínas del microorganismo



Detección de *Streptococcus* β hemolítico. Específico y rápido 15 a 20 min.



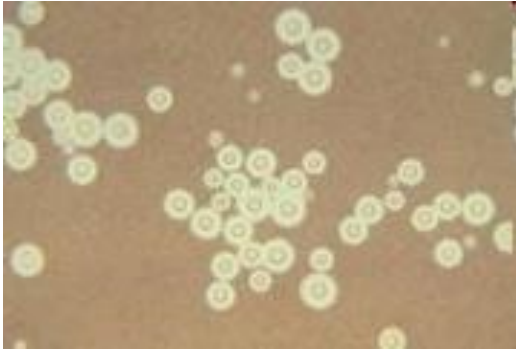
Aglutinación de látex para
Ags capsulares de
S. pneumoniae
H. influenzae
N. meningitidis

Orina, suero
o LCR

Métodos Directos diagnóstico microbiológico (IX)

Detección de polisacáridos del microorganismo

❖ Componentes de la cápsula

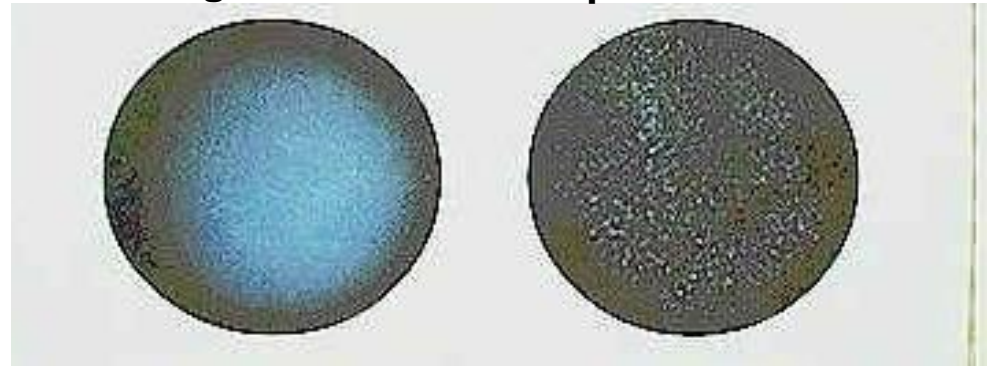


GXM (glucuronoxilomanano) y
GalXM (galactoxilomanano)

LCR,
suero,
orina

negativo

positivo



Agglutinación de partículas látex

❖ Componentes de la pared

PANFÚNGICO

β (1–3) glucano (suero).

ELISA, prueba cromogénica



Infección fúngica invasora

Galactomanano (suero y LBA)

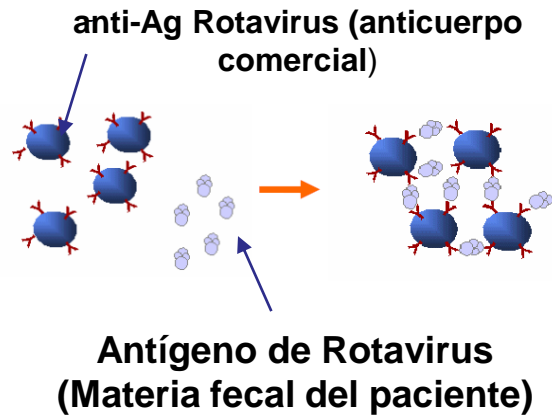
Quimioluminiscencia



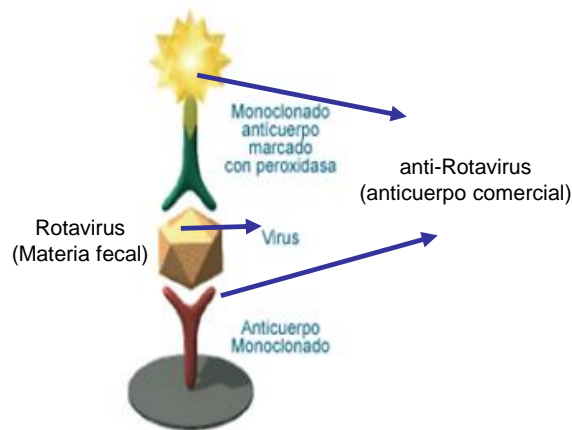
**Infección fúngica invasora por
*Aspergillus***

Métodos Directos diagnóstico microbiológico (IX)

Detección de proteínas virales: diferentes técnicas

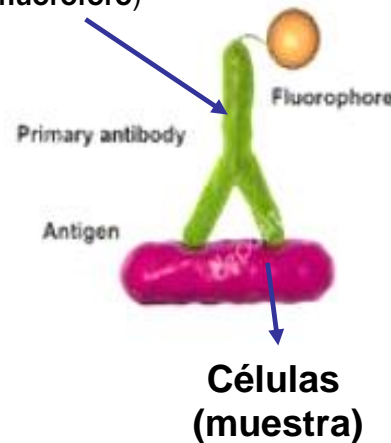


Aglutinación de látex:
Detección de proteínas de la cápside viral en una suspensión

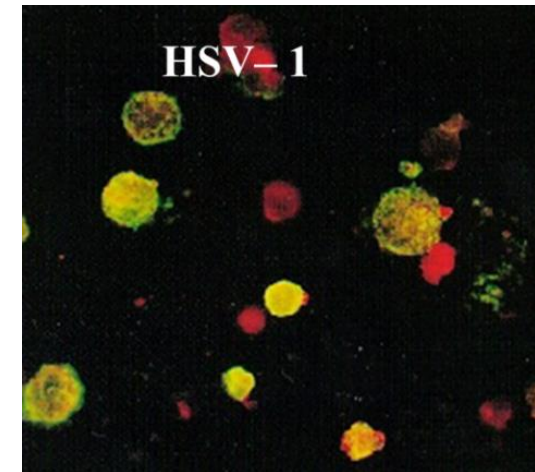


ELISA: Detección de antígenos virales en suspensión (rotavirus, adenovirus, calicivirus, astrovirus, HIV, VSR, HBV)

anti-HSV (anticuerpo comercial marcado con fluoróforo)



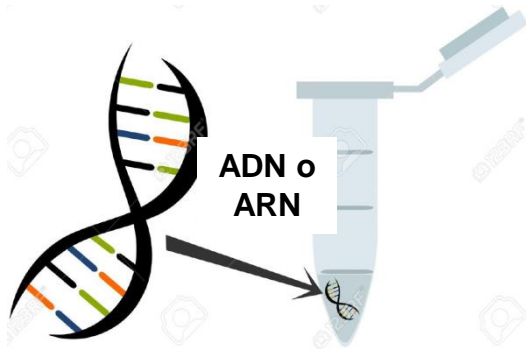
Inmunofluorescencia: detección de antígenos virales en células



Métodos Directos diagnóstico microbiológico (IX)

Detección del genoma del microorganismo: PCR

La presencia de genoma se basa en la detección de un fragmento genómico de tamaño definido



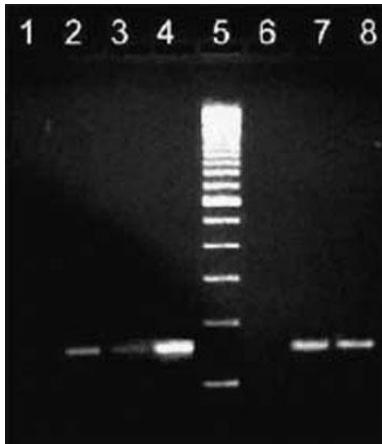
Extracción de ADN/ARN de la muestra clínica



Amplificación de ácidos nucleicos por técnica de PCR



Visualización del producto (ADN) esperado en geles de agarosa (con transiluminación por luz UV)



Detección de un fragmento del genoma de Enterovirus en muestras de LCR de niños con meningitis aséptica

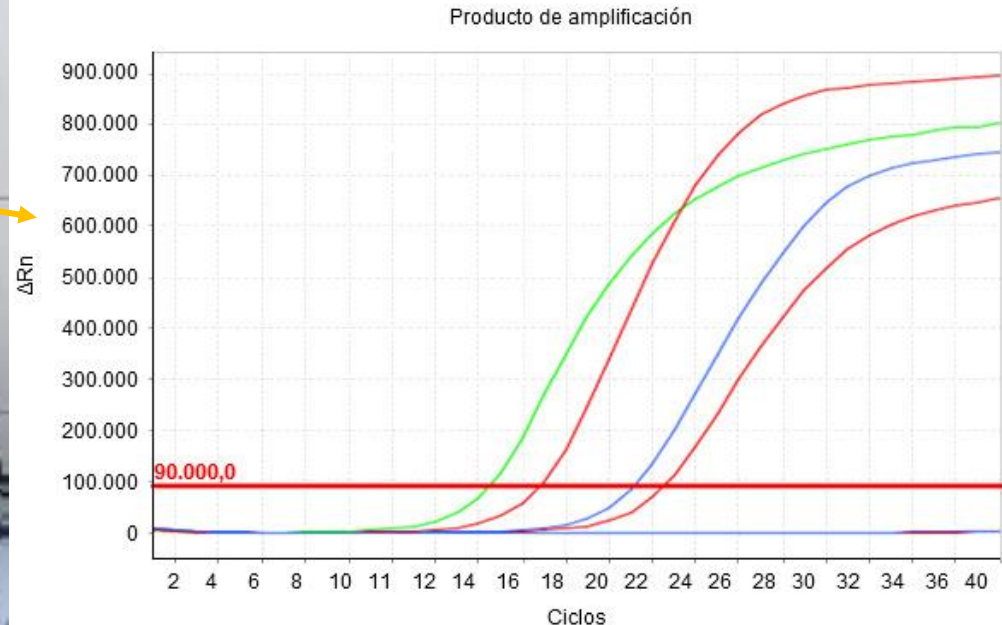
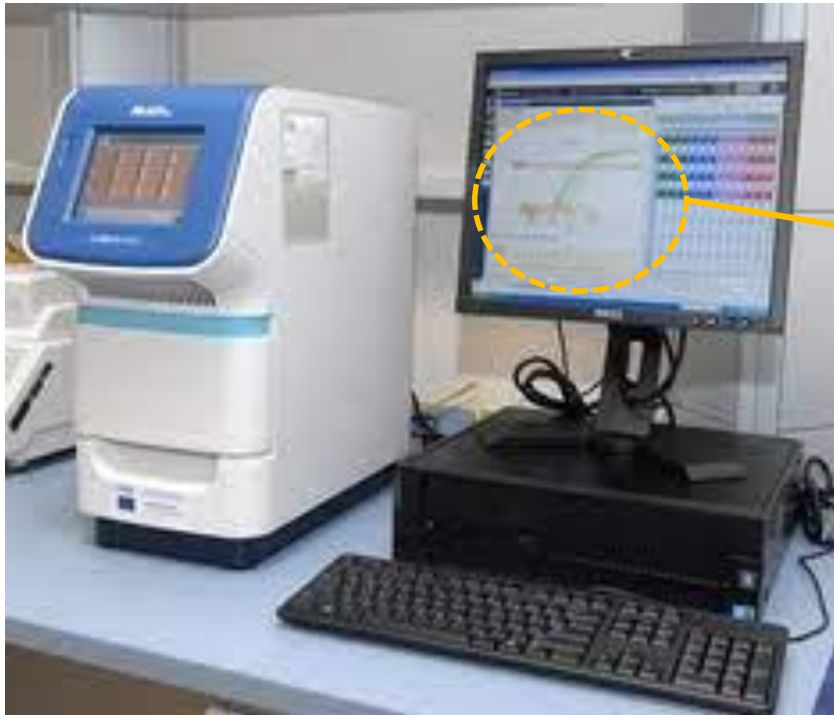
Fotografía de un gel de agarosa donde se hizo la electroforesis de los productos obtenidos por RT-PCR. La calle 1 es un control negativo, la 4 un control positivo, la 5 es un indicador de tamaño genómico con escala de 100 pares de bases (100, 200, 300, etc.). El producto esperado tiene 170 pb.

Métodos Directos diagnóstico microbiológico (IX)

Detección del genoma del microorganismo: Real-time PCR

PCR cuali o cuantitativa en **tiempo real**: permite la detección/cuantificación del genoma según transcurre la reacción.

Ampliamente utilizada para determinaciones de **carga viral**.



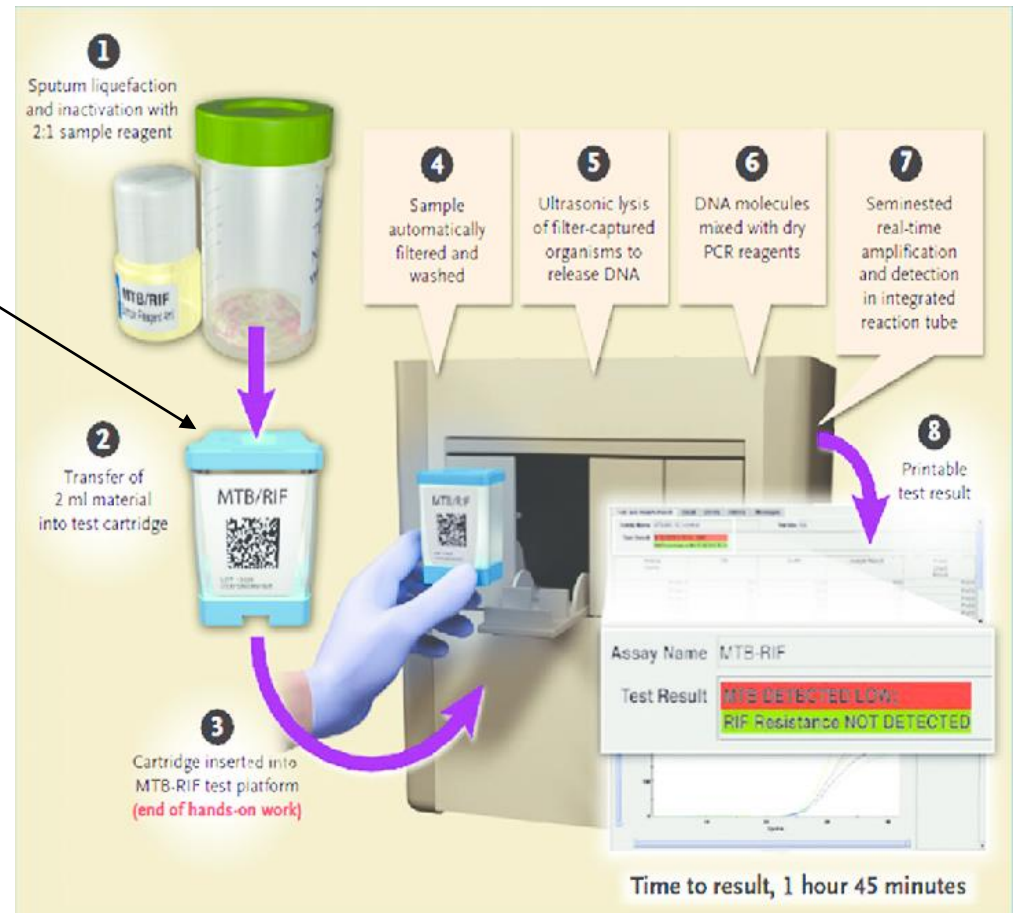
Métodos Directos diagnóstico microbiológico (IX)

Detección de genes específicos: Xpert

Es una PCR en tiempo real completamente automatizada en un cartucho que puede detectar *Mycobacterium tuberculosis* y **resistencia a rifampicina**, en menos de 2 horas

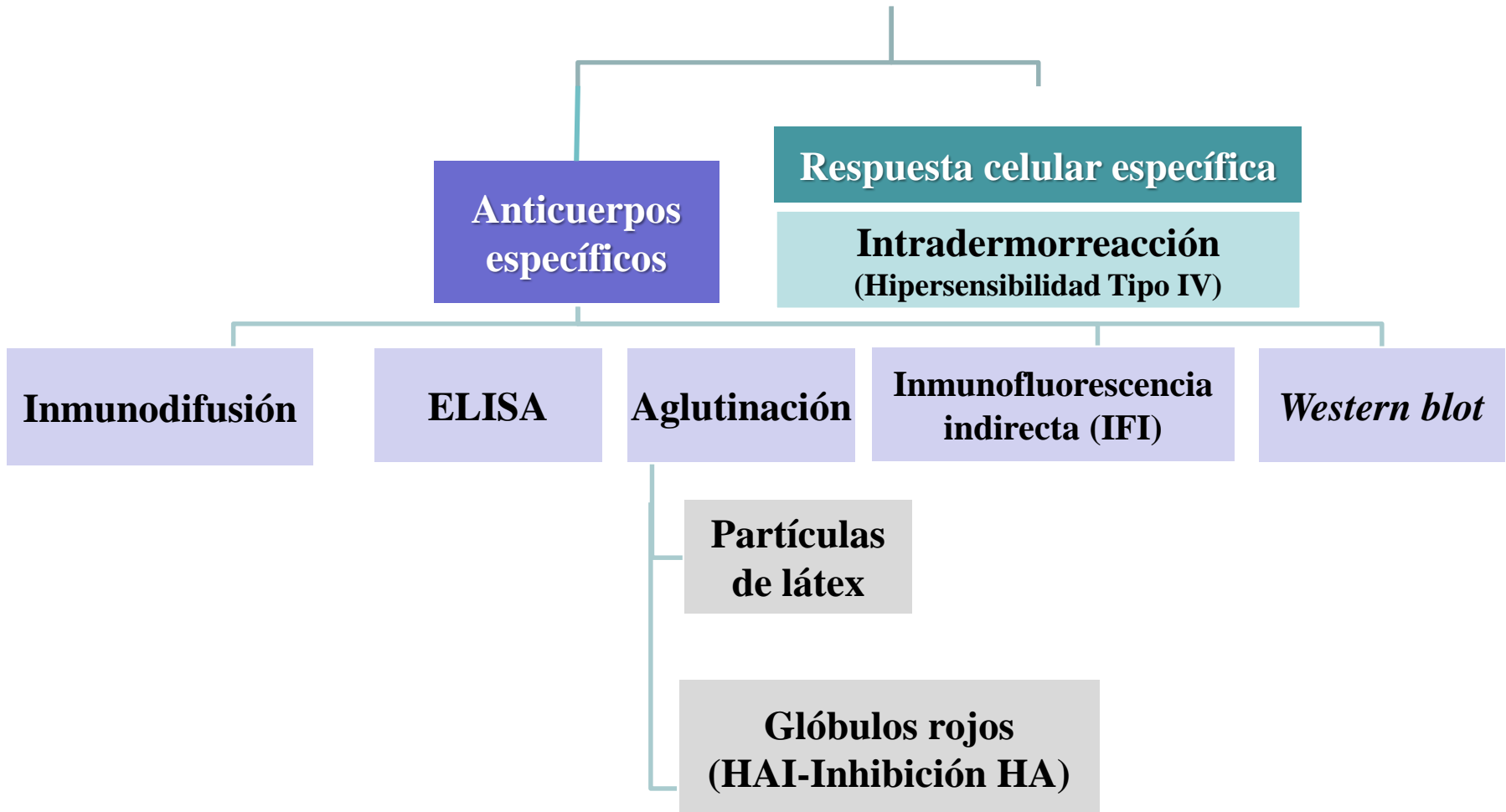
El procesamiento, la amplificación y la detección están integrados en una unidad independiente cerrada que es el cartucho XpertMTB/RIF.

Tiene una alta sensibilidad que permite su uso en muestras de esputo con baciloscopia (-). No tiene reacción cruzada con otras micobacterias.



Métodos Indirectos Diagnóstico Microbiológico (I)

Detección de la respuesta inmune específica del paciente dirigida hacia el agente etiológico

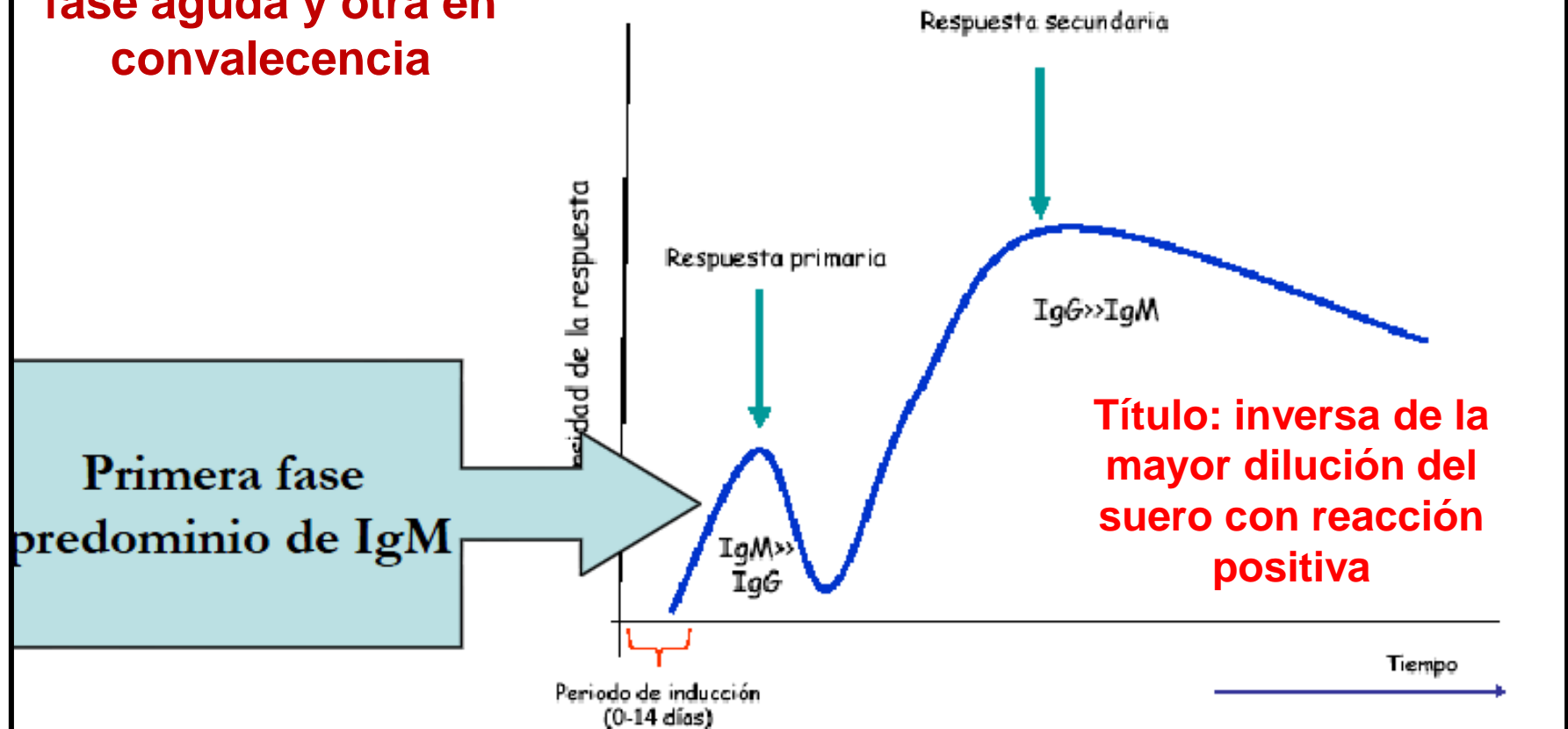


¿Cuál es la diferencia entre las *técnicas* que comparten los métodos de diagnóstico directo e indirecto?

Métodos Indirectos Diagnóstico Microbiológico (II)

Seroconversión

Aumento de 4 veces
el título de Ac en dos
muestras. Una de
fase aguda y otra en
convalecencia

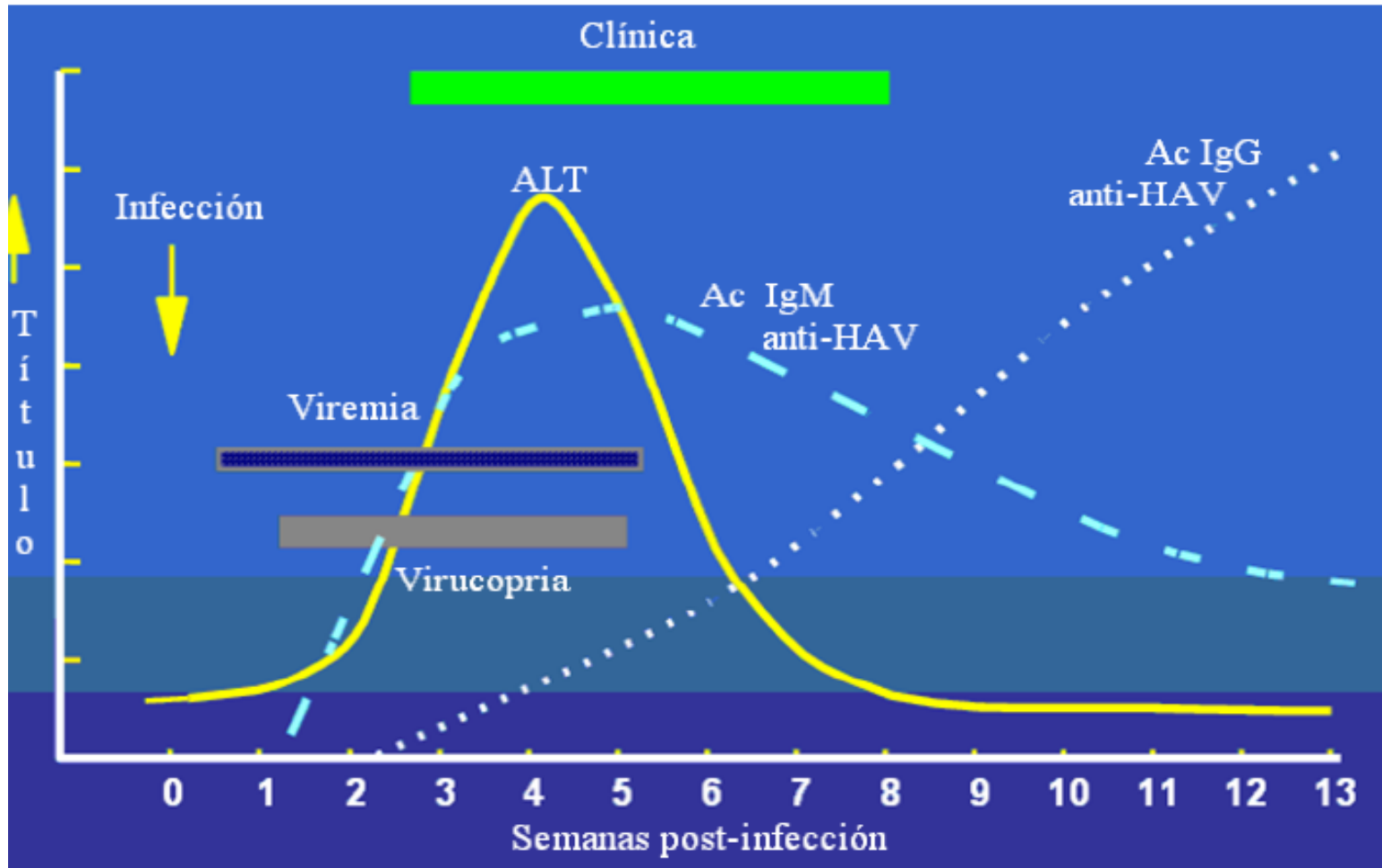


Establece un diagnostico retrospectivo

Métodos Indirectos Diagnóstico Microbiológico (III)

Temporalidad de la infección I

Ejemplo: Infección aguda por virus hepatitis A (HAV) detección de IgM específica anti-HAV

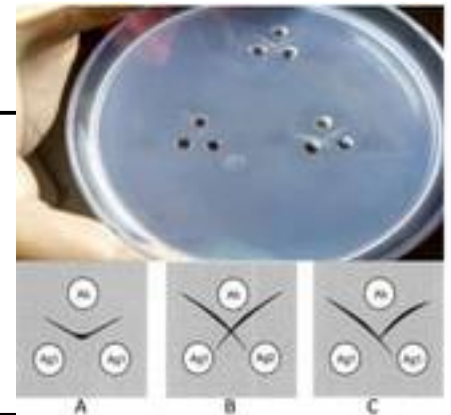


Métodos Indirectos Diagnóstico Microbiológico (IV)

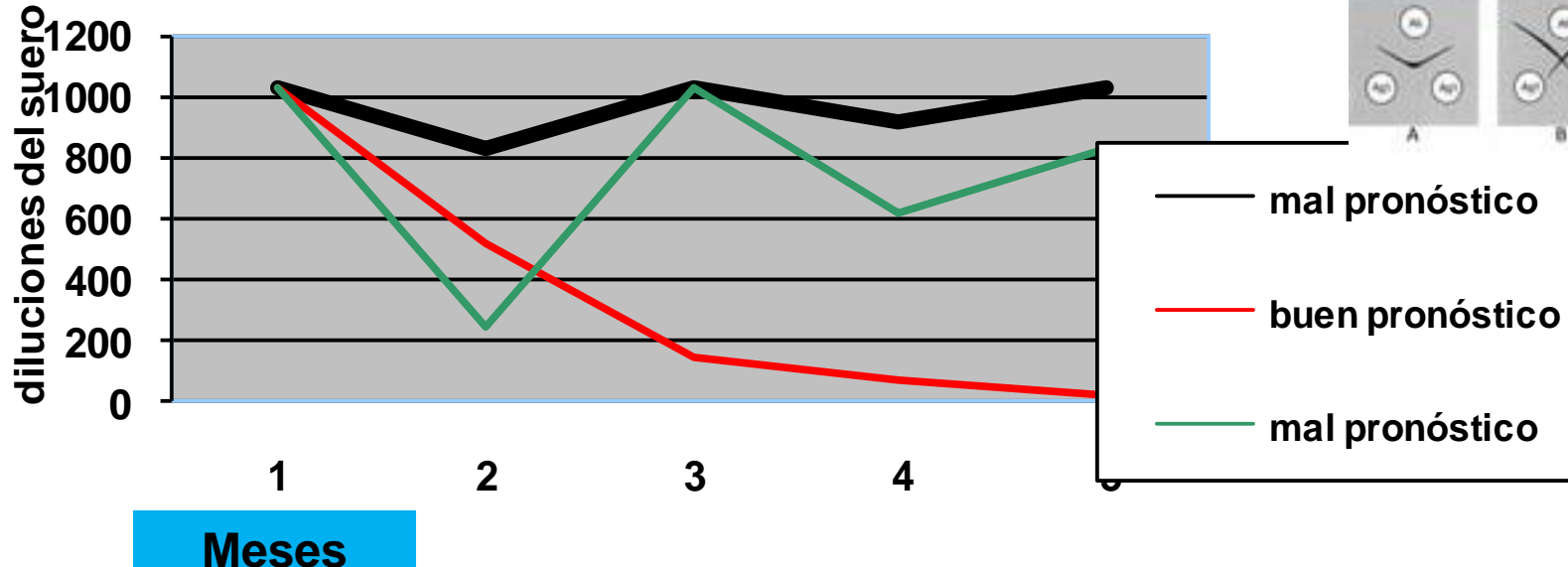
Pronóstico sobre la evolución de la enfermedad y diagnóstico

MICOSIS ENFERMEDAD en Histoplasmosis, Paracoccidioidomicosis, Coccidioidomicosis. Aspergilosis cavitaria.

Inmunodifusión radial



Evolución del título de anticuerpos



Manejo adecuado de los TIEMPOS en el Dx

El ***diagnóstico precoz*** es fundamental en las enfermedades infecciosas:

- Indicar el tratamiento antimicrobiano específico.
- Mejorar el pronóstico.
- Evitar uso inadecuado de antimicrobianos (reducir la resistencia).
- Establecer medidas preventivas.