



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA, PARASITOLOGÍA E
INMUNOLOGÍA
CÁTEDRA 1**

SEMINARIO 1

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

OBJETIVOS

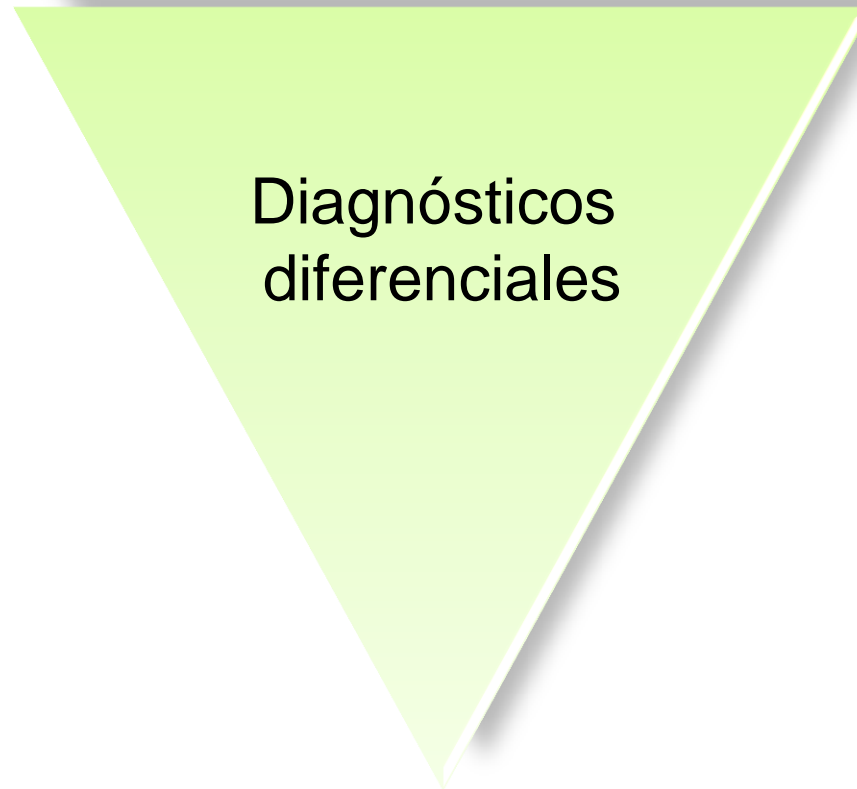
- ❖ Conocer el algoritmo del diagnóstico microbiológico**
- ❖ Conocer los diferentes procedimientos del diagnóstico microbiológico.**
- ❖ Interpretar parámetros de sensibilidad (s), especificidad (e), valor predictivo positivo (vpp) y valor predictivo negativo (vpn)**

Metodología de diagnóstico de las enfermedades infecciosas

Interrogatorio:

- Epidemiología
- Síntomas

- Examen físico.
- Análisis clínicos.
- Diagnóstico por imágenes



Diagnósticos
diferenciales

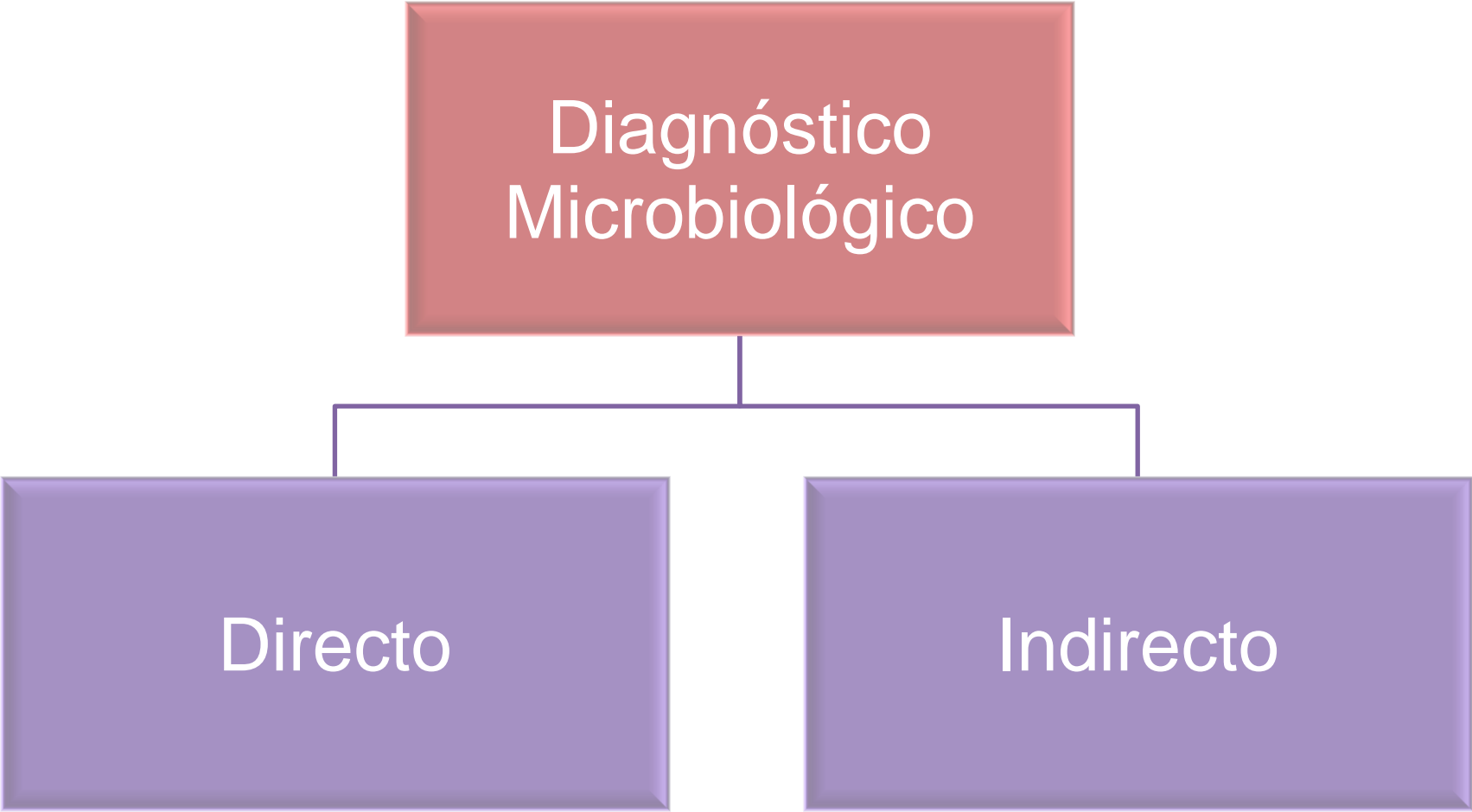
Diagnóstico
microbiológico
de certeza



Tratamiento



Diagnóstico Microbiológico



```
graph TD; A[Diagnóstico Microbiológico] --> B[Directo]; A --> C[Indirecto]
```

A hierarchical diagram showing the classification of Microbiological Diagnosis. The root node is 'Diagnóstico Microbiológico' (red box), which branches into two sub-nodes: 'Directo' (purple box) and 'Indirecto' (purple box).

Directo

Indirecto

DIAGNÓSTICO MICROBIOLOGICO

- **SELECCION DE LA MUESTRA**

Obtención y recolección de la muestra

- **TRANSPORTE Y CONSERVACION**

- **PROCESAMIENTO/ DIAGNOSTICO.**

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Especificidad y sensibilidad

- Son indicadores estadísticos básicos para evaluar el desempeño de una prueba diagnóstica.
- Evalúan el grado de eficacia inherente a una prueba diagnóstica
- Miden la discriminación diagnóstica de una prueba en relación a una prueba de referencia, que se considera la verdad.
- Reflejan la correcta (verdadera) o incorrecta (falsa identificación):
 - Del microorganismo.
 - De los componentes del microorganismos (antígenos, ácidos nucleicos).
 - De la respuesta inmune frente a la infección

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

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.

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.

Epidemiología de las enfermedades infecciosas: Medidas de frecuencia.

Prevalencia

- Es la proporción de la población que padece la enfermedad en estudio en un momento dado.
- Se expresa como casos por 1 000 o por 100 habitantes.

Incidencia

- Número de casos nuevos de una enfermedad en una población determinada y en un periodo determinado.
- La Incidencia acumulada es el nº de individuos que enferman durante el período de observación en relación al número de individuos libres de la enfermedad al comienzo del estudio.

Diagnóstico microbiológico

- Informar al paciente que procedimiento se realizará para la obtención de la muestra clínica.
- Recolección de la muestra.
- Transporte adecuado de la muestra.
- Conservación en condiciones adecuadas.

Conceptos basicos para la recolección de la muestra clínica

- ❖ Elegir el material más representativo del proceso infeccioso.
- ❖ Tomar la muestra en el momento adecuado y en lo posible antes de que el paciente reciba antimicrobianos.
- ❖ Obtener la muestra evitando contaminarla con la microbiota normal del paciente.
- ❖ Tamaño de la muestra adecuado.
- ❖ Evitar el agregado de antibióticos que inhiban el desarrollo.
- ❖ Utilizar un recipiente estéril y adecuado para su conservación y transporte
- ❖ Identificar la muestra correctamente.
- ❖ Enviar al laboratorio lo más rápidamente posible.

Recolección y conservación de las muestras clínicas

Las muestras para estudios microbiológicos requieren la utilización de medios de transporte:

Para Cultivo:

- ❖ Mantener viables los microorganismos en la muestra.**
- ❖ Evitar la proliferación de contaminantes.**

La mayoría de estos microorganismos son sensibles a la desecación y en algunos casos a la temperatura.

Por ello necesitamos de

LOS MEDIOS DE TRANSPORTES

Recolección y conservación de las muestras clínicas

MEDIOS DE TRANSPORTE

BACTERIOLOGÍA

- Medio de Stuart
- Medio de Cary Blair
- Medio para anaerobios (PRAS)
- Medio para *Chlamydia*
- Medio para *Mycoplasma*

PARASITOLOGÍA

- Formol
- PVA (fenol-alcohol-formol)

VIROLOGÍA

- Medios de transporte (Aspirado nasofaríngeo)
- EDTA (sangre)
- Envío inmediato sin medio de transporte para LCR y suero.

¿CÓMO SE CONSERVAN LAS MUESTRAS EN BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA?

MATERIAL	ALMACENAMIENTO	CONSERVACION
Liquidos de punción	Recipiente estéril	Temperatura ambiente
Biopsias	Recipiente estéril (SF)	Temperatura ambiente
Materia fecal	Medio de transporte*	Temperatura ambiente
	Recipiente estéril	Heladera
Orina	Recipiente estéril	Heladera
Secreciones vaginales, oculares Aspirado nasofaríngeo Exudados de fauces	Medio de transporte*	Temperatura ambiente
Espujo/aspirado traqueal/BAL	Recipiente estéril	Heladera
Hemocultivos	Frasco para hemocultivo	Temperatura ambiente
Materiales para cultivo de germenes anaerobios	Medio conservación para anaerobios	Temperatura ambiente

***Stuart; Cary Blair**

¿CÓMO SE CONSERVAN LAS MUESTRAS EN VIROLOGÍA?

MATERIAL	ALMACENAMIENTO	CONSERVACION
Líquidos de punción (amniótico, LCR)	Recipiente estéril Jeringa	Refrigerado
Biopsias	Recipiente estéril con MT*	Refrigerado
Materia fecal	Hisopado en MT*	Refrigerado
	Recipiente estéril	Refrigerado
Orina	Recipiente estéril	Refrigerado
Secreciones vaginales Secreciones oculares Exudados de fauces	Hisopo en Medio de transporte*	Refrigerado
Aspirado nasofaríngeo/ traqueal/BAL	Recipiente estéril	Refrigerado
Sangre y Medula ósea	Aspirado en tubos con EDTA	Refrigerado
Piel	Hisopo (contenido de vesículas) o escarificación de base de la lesión en MT *	Refrigerado

***MT: Medio de transporte**

MEDIOS DE TRANSPORTE



Frascos para hemocultivos automatizados



Líquidos estériles



Hisopo con medio de Stuart :
Neisseria gonorrhoeae .



Port-A-Cul vial: Líquidos y exudados obtenidos por aspiración



Envase esteril: Biopsias, tejidos, orinas, líquidos, esputos, secreciones bronquiales.

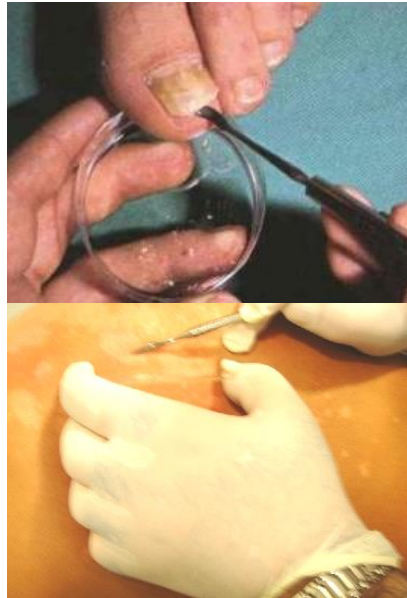


Tubos de trasportes para
Chlamydia

MEDIOS DE TRANSPORTE



Medio de transporte para virus



Escamas en placas de Petri o portaobjetos



Frasco para parasitológico recolección seriada



Frasco para parasitológico recolección en fresco



Aspirado nasofaríngeo



Pelos tracción con pinzas



Test de Graham o escobillado anal

Motivos para rechazar una muestra clínica en el laboratorio.

Muestra clínica inadecuada

- Tamaño inadecuado
- Falta de identificación
- Inadecuada recolección
- Condiciones de transporte deficiente.
- Presencia de sustancias que interfieren con el procesamiento de la muestra.



**Falla en la recuperación
del microorganismo**

Orden para un estudio microbiológico

Rp./ NOMBRE APELLIDO
EDAD:
SEXO

Examen bacteriológico
y cultivo de
LCR -

Dx presuntivos: síndrome
meníngeo -

Fecha

ADRIANA GARCÍA LÓPEZ DANERI
MÉDICA
M. N. 97.696
SCH soubeiran chobet
ESPECIALIDADES MEDICINALES DESDE 1912

Rp./ F MA 60 2071971
EDAD:
SEXO:

Examen microbiológico
de cultivo y cultivo
de LCR

Dx presuntivos: Relato de
síndrome meníngeo
FECMA FIRMA

SCH SEICO
soubeiran chobet
ESPECIALIDADES MEDICINALES DESDE 1912

Características de la muestra clínica

Muestra obtenida de un sitio estéril (orina)



Agente
etiológico

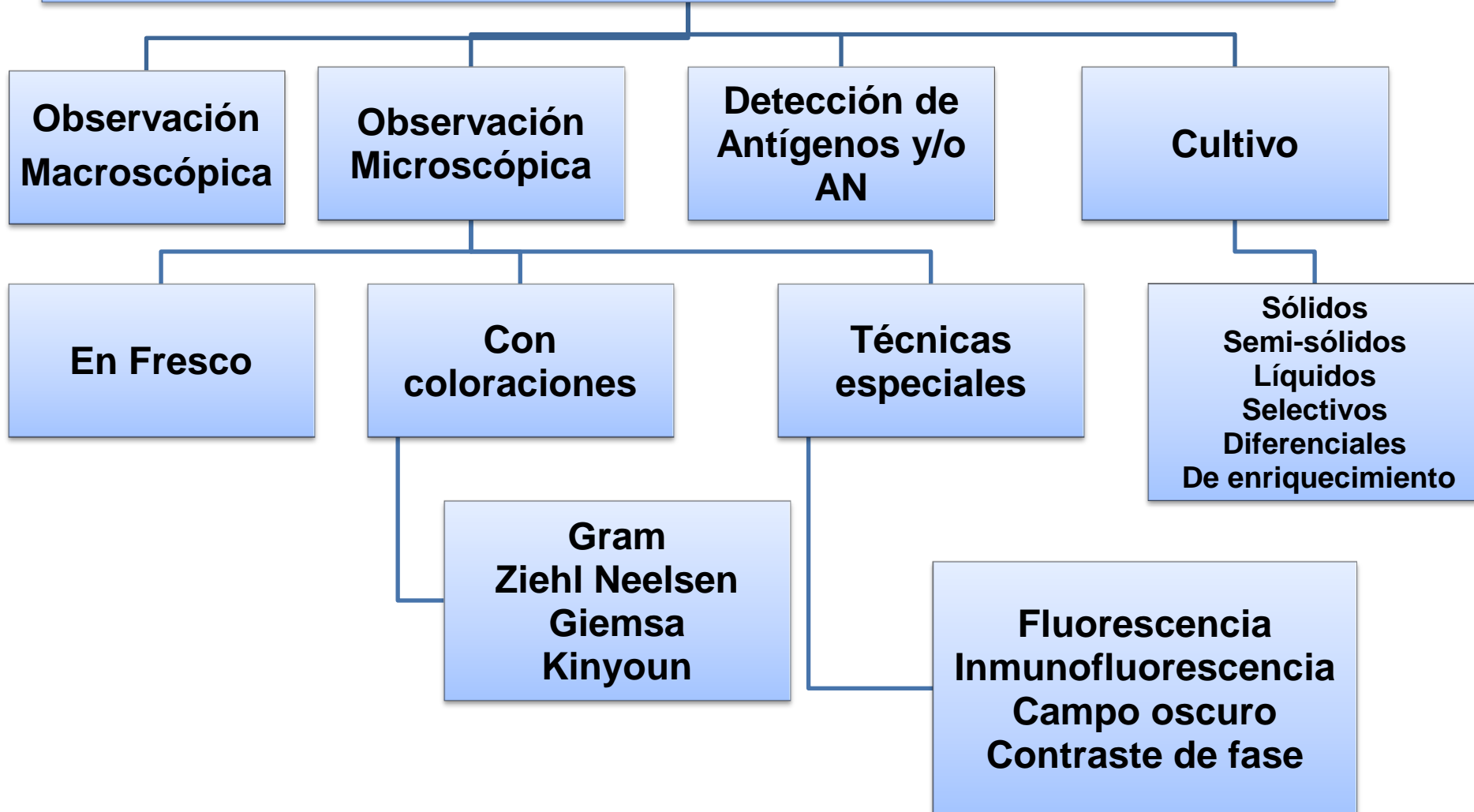
Muestra contaminada
con microbiota
(materia fecal, esputo)



Muestra clínica
polimicrobiana

**La conservación y el transporte
adecuado de las muestras evitan
la proliferación de la microbiota**

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DIRECTO



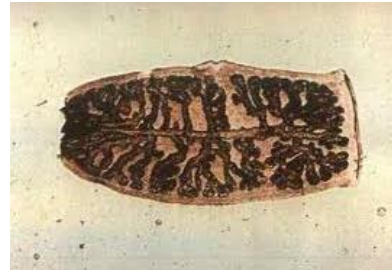
Métodos Directos

OBSERVACION MACROSCOPICA DE LA MUESTRA

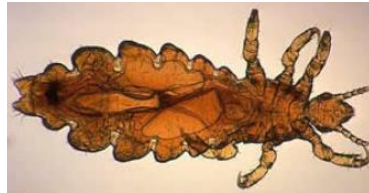
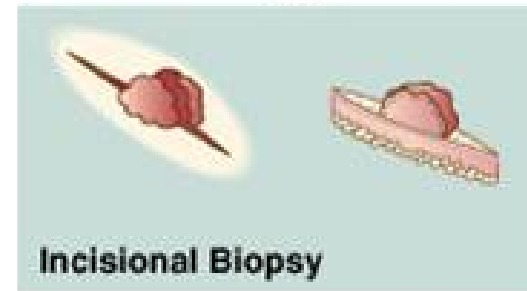


15-30 cm largo

Ascaris lumbricoides



Proglótides
de *Taenia*



Pthirus pubis



0.5-1 cm largo



Enterobius vermicularis



granos

Métodos Directos

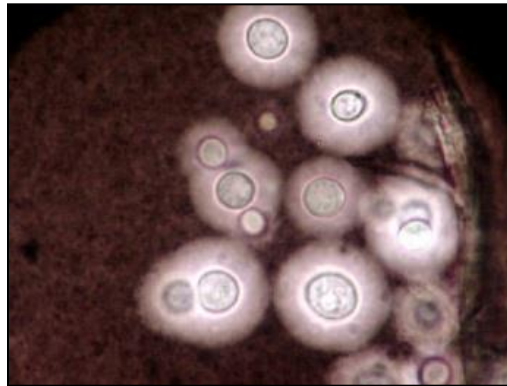
Microscopía Óptica

Examen en fresco:

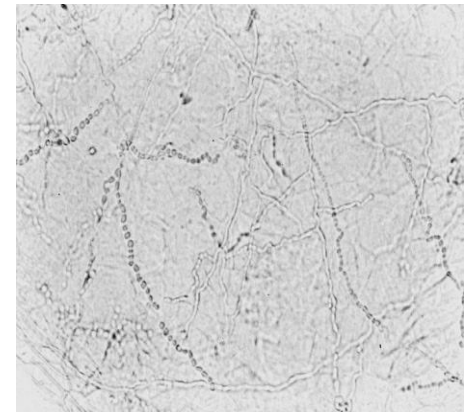
Características de la muestra : glóbulos rojos, glóbulos blancos, células epiteliales, piocitos, cilindros, cristales de Charcot-Leyden.



Materia fecal:
Giardia lamblia



LCR: Tinch china:
Cryptococcus neoformans



Uña. KOH al 40%
Dermatofitos
Filamentos y artroconidios

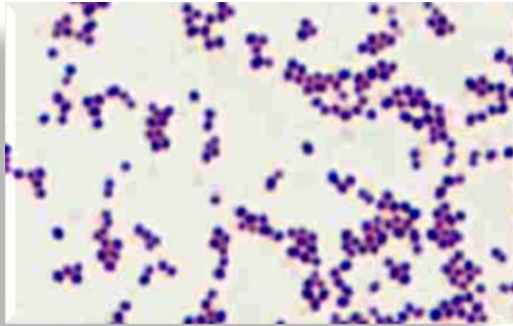
Métodos Directos

Microscopía Óptica

-Con tinción de Gram



Bacilos Gram positivos:
Corynebacterium diphtheriae,



Cocos Gram positivos en
racimo: *Staphylococcus* spp



Levaduras y pseudohifas Gram
positivas

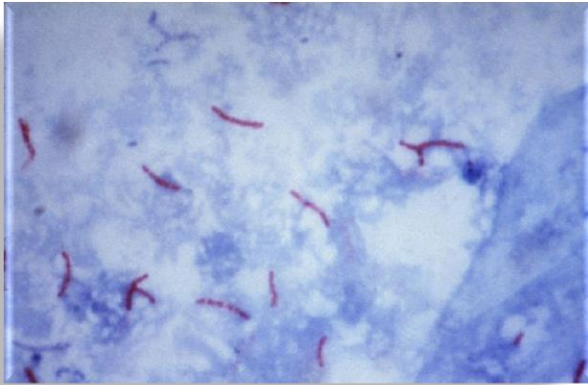


Bacilos Gram negativos: Enterobacterias.

Métodos Directos

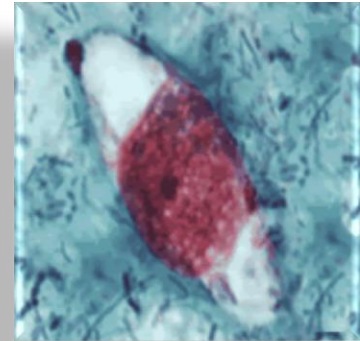
Microscopía Óptica

-Con tinción Ziehl Neelsen

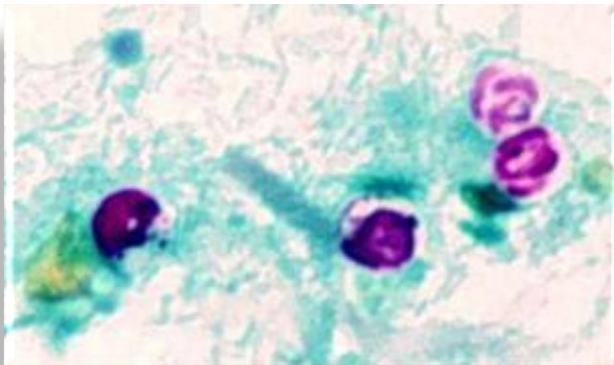


Bacilos ácido alcohol resistente.
Mycobacterium tuberculosis

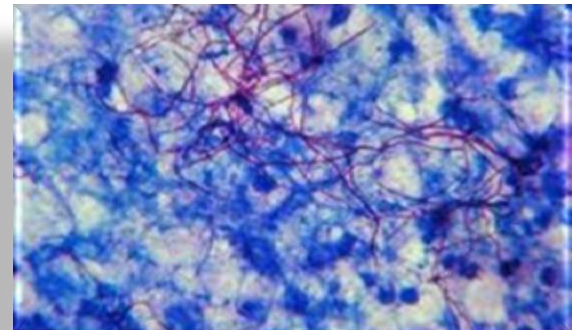
-Con coloración Kinyoun



Cystoisospora belli



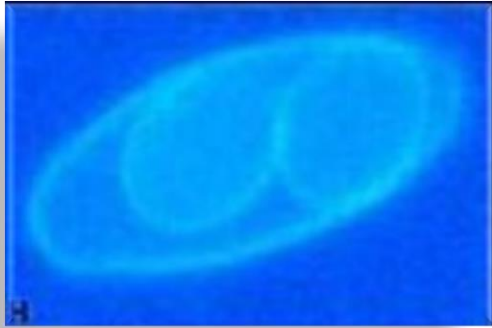
Cryptosporidium spp.



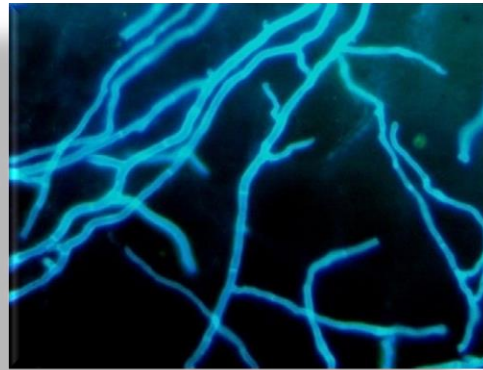
Nocardia spp

Métodos Directos

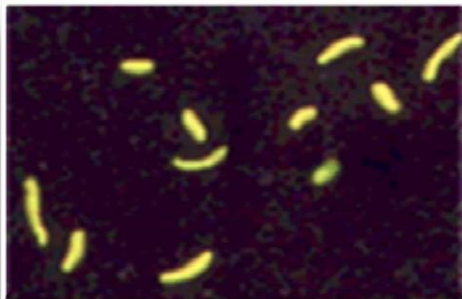
Microscopia de fluorescencia



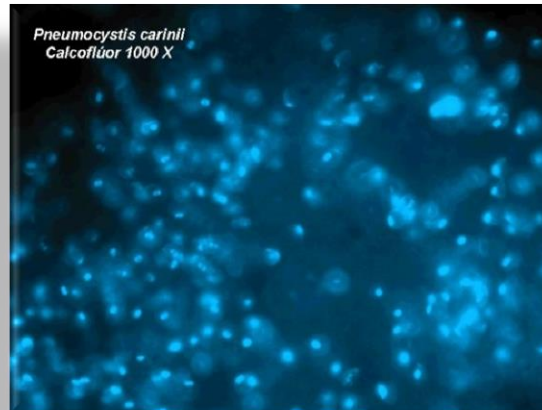
C. belli.
Autofluorescencia



Hifas



M. tuberculosis
Fluorescencia con
auramina



P. jirovecii
Calcofluor

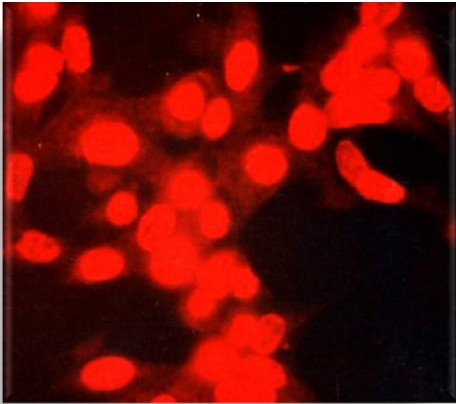


Gram: Sensibilidad

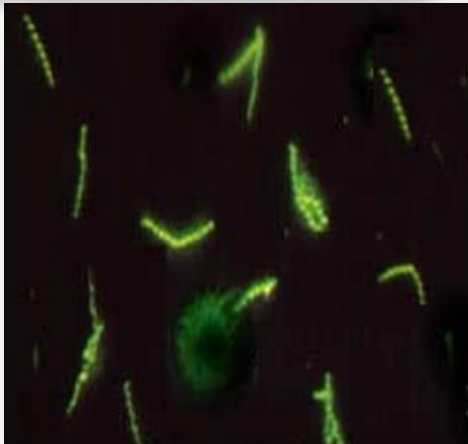
- **10^5 UFC/ml de muestra**
- **La coloración fluorescente con naranja de acridina aumenta la sensibilidad a 10^4 UFC/ml.**

Métodos Directos

Microscopia de fluorescencia



IFI de HSV-1
Marcación
intranuclear roja,
por rodamina.



IFI
T. pallidum

Campo Oscuro



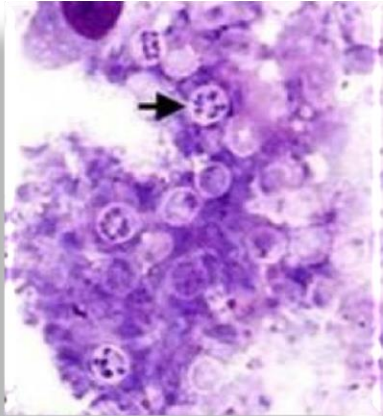
T. pallidum

Métodos Directos

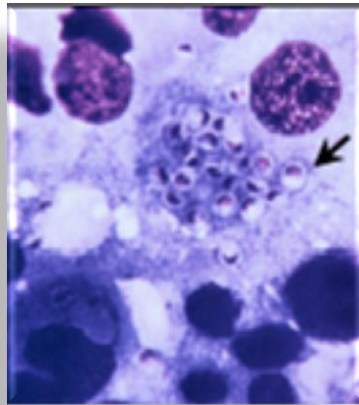
Hemoparasitosis

Tinción de GIEMSA

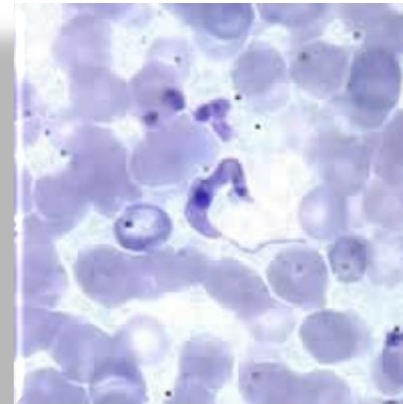
Hongos



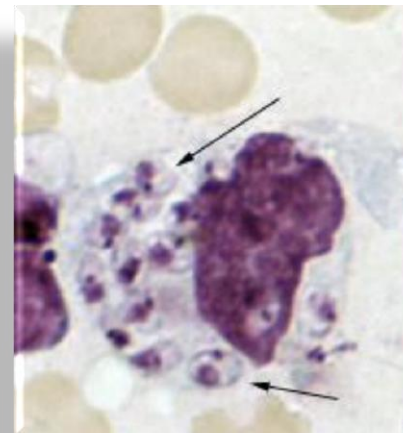
P. jirovecii



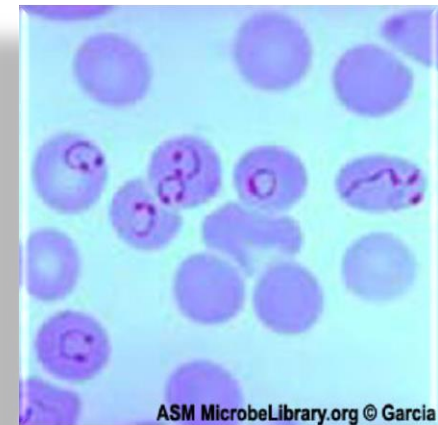
Histoplasma capsulatum



Tripomastigotes
T. cruzi



Amastigotes
Leishmania spp



Trofozoítos anulares
Plasmodium falciparum

IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

CLÍNICA

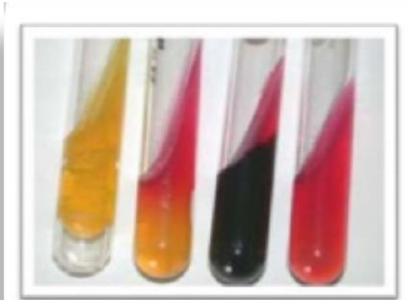
- Reconocimiento etiopatogénico de la enfermedad.
- Presunción del foco originario de la infección.
- Elección de la terapia inicial y modificación de la empírica.
- Diagnóstico rápido de algunas infecciones.

MICROBIOLÓGICA

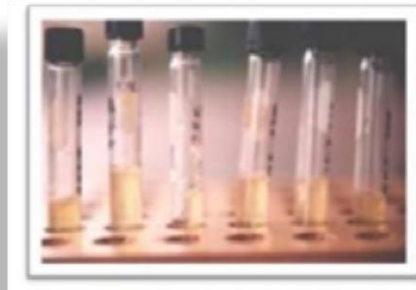
- Elección del esquema inicial de identificación.
- Elección de las pruebas de sensibilidad antibiótica y los antimicrobianos a ensayar.
- Elección de los medios de cultivo.
- Diagnóstico de infecciones por microorganismos difíciles de cultivar.

Métodos Directos

- El cultivo es el medio adecuado para el crecimiento de los microorganismos (colonias).
- Se realiza en medios solidos (agar), en medios líquidos (caldo) y en células (línea celular).
- Es el método principal para el aislamiento de microorganismos
- Permite la identificación del microorganismo por técnicas de serotipificación (Ag O, H, K)
- Se utiliza para test de resistencia antimicrobiana.



Medios semisólidos



Medios líquidos



Medios sólidos



Condiciones adecuadas para anaerobios

IDENTIFICACION DEL AISLAMIENTO

Aislamiento en placa de cultivo



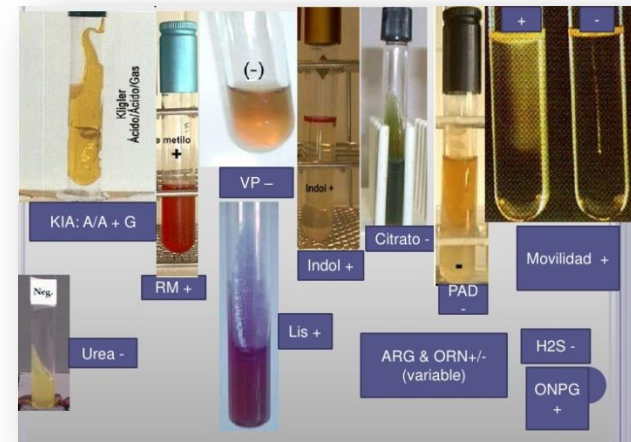
Identificación



Pruebas bioquímicas



Aislamiento de colonias

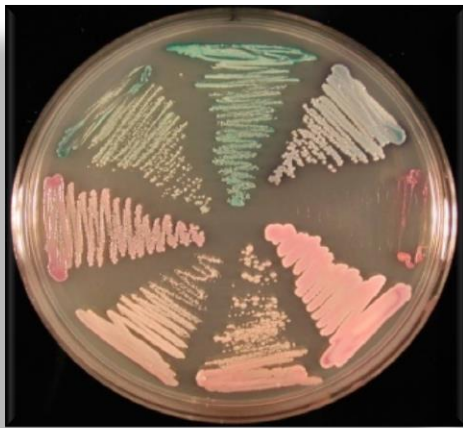


Pruebas bioquímicas para identificación de Enterobacterias

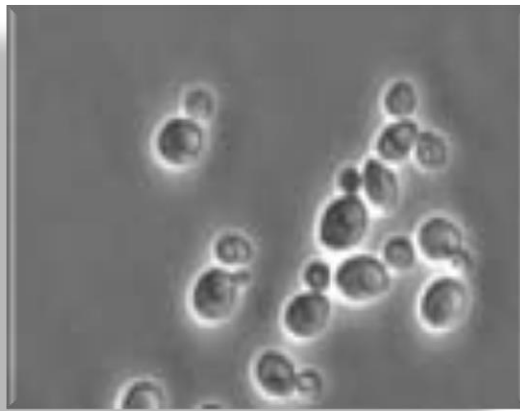


API

Sistemas de identificación bacteriana



**Medios
cromogénicos**

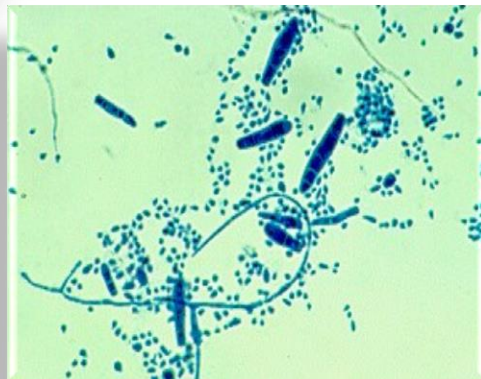
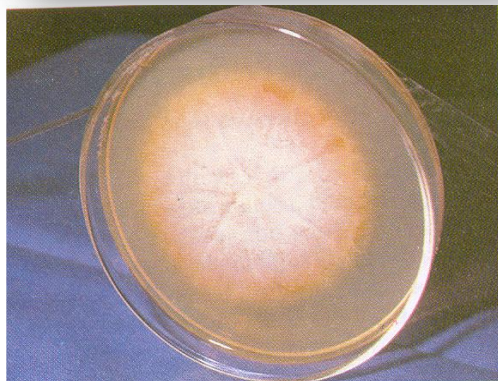


Talo levaduriforme
Aspectos morfológicos:
Utilización de azúcares,
compuestos orgánicos



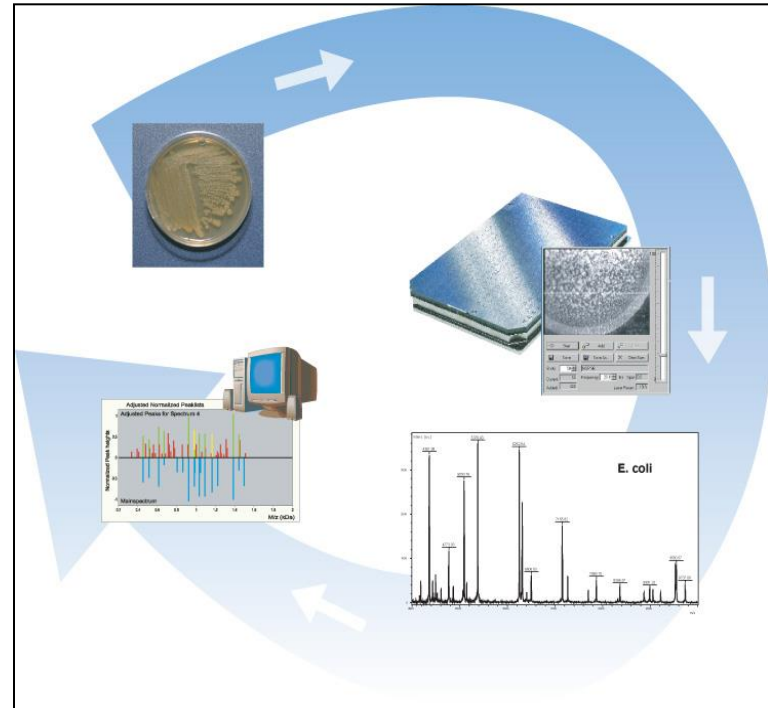
**Temperatura de
incubación 28°C y
37°C**

Talo micelial
Aspectos morfológicos:
macroscópicos y
microscópicos



Nuevo desarrollo: MALDI-TOF

- Detección del espectro de proteínas de bacterias y hongos.
- Acorta los tiempos de identificación y pruebas de resistencia.
- Principio: espectrometría de masas

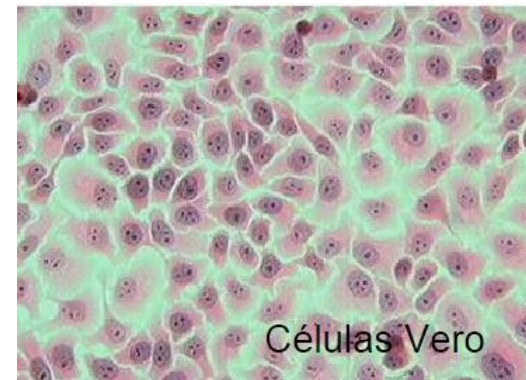


Matrix-Assisted Laser Desorption
Ionization Time Of Flight Mass
Spectrometry

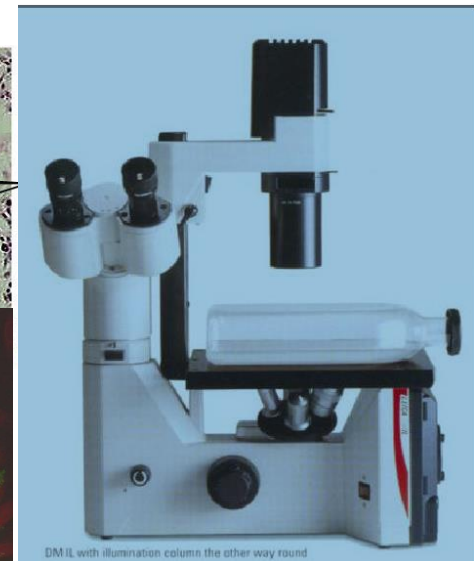
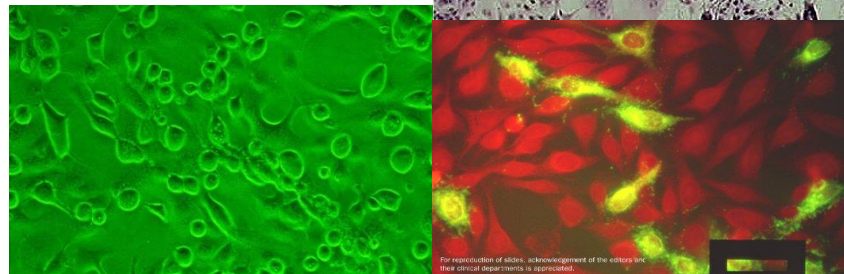
¿Cómo se evidencia la presencia de un agente viral en un cultivo celular?

Efecto o Acción Citopática (ECP o ACP)

- Fundamentalmente en Investigación
- Tiempo variable. Tardío para Dx.
- No todos los virus producen ACP.
- No todos los virus pueden replicar en cultivo.
- La misma ACP puede ser producida por diferentes virus
- Laborioso y costoso



Inmunofluorescencia con Ac. monoclonales (IF)



Métodos Directos

Detección de componentes del microorganismos o genoma

Detección de Antígenos y/o Ácidos nucleicos

**IFD
IFI**

Aglutinación

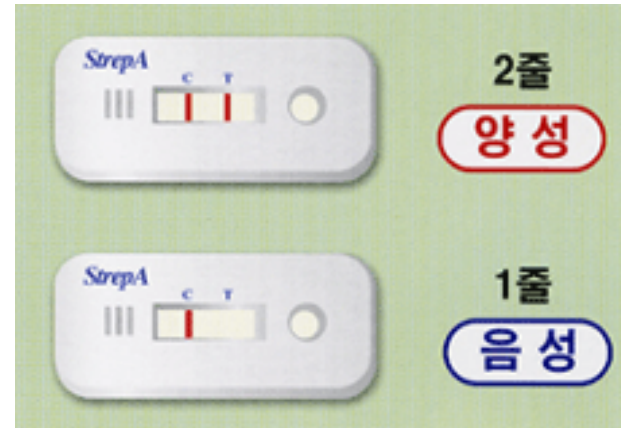
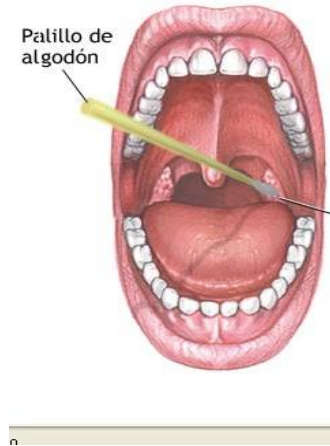
ELISA

**Técnicas
Moleculares**

**PCR
(cuali –
cuantitativas)**

Métodos Directos

Detección de componentes del microorganismos



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

Aglutinación de látex para **Ag capsulares** de

St. pneumoniae

H. influenzae

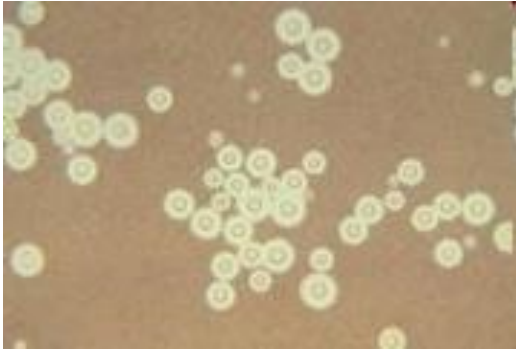
N. meningitidis

en orina
suero o LCR

Métodos Directos

Detección de componentes del microorganismos

❖ Componentes de la capsula

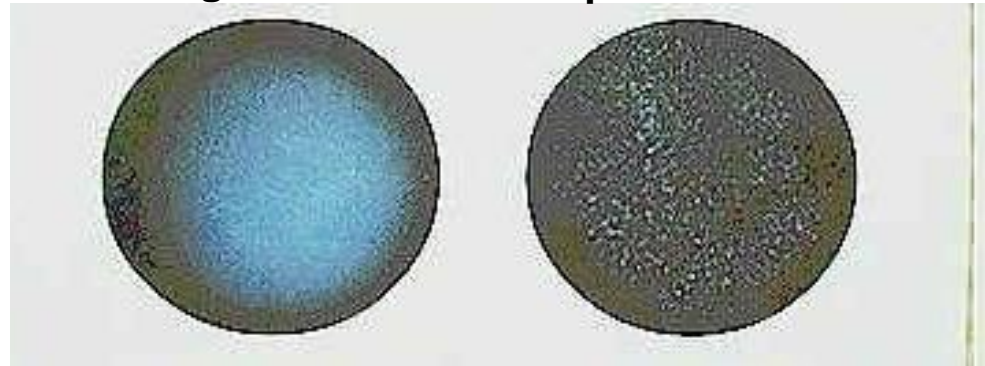


En LCR,
suero,
orina

GXM (glucuronosilomanano) y
GalXM (galactoxilomanano)

negativo

positivo



Aglutinación de partículas látex

Componentes de la pared

PANFUNGICO

β (1–3) glucano (suero) ELISA.



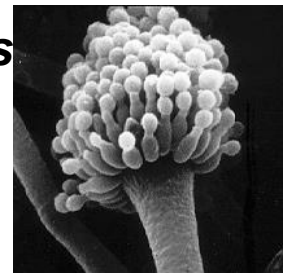
Infección fúngica invasora

TEST CROMOGENICO

Galactomanano (suero y LBA)

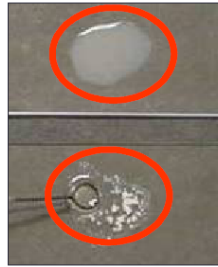
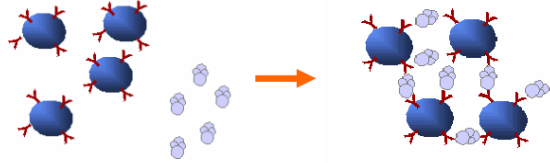


Infección fúngica
invasora por *Aspergillus*

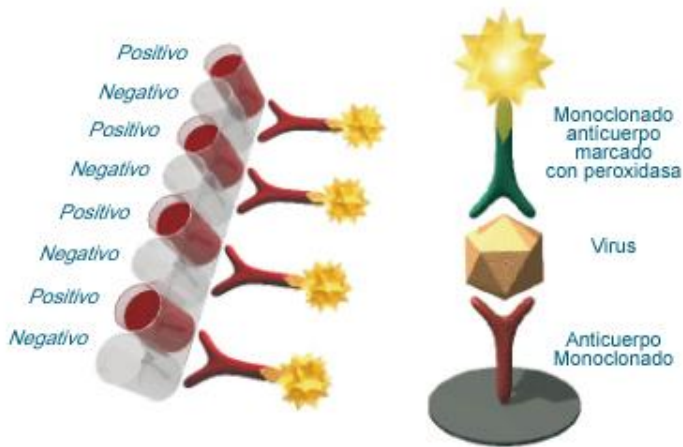


Métodos Directos

Detección de componentes del microorganismos



**Aglutinación:
Detección de
Antígenos de
rotavirus.**



**ELISA: Rotavirus , adenovirus
calicivirus , astrovirus
HIV, VSR, HBV**

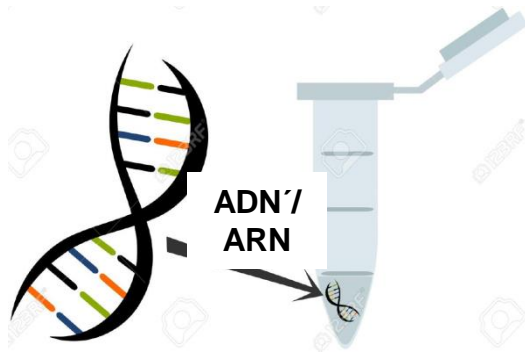


**Detección de antígenos
intracelulares por
inmunohistoquímica**

Métodos Directos

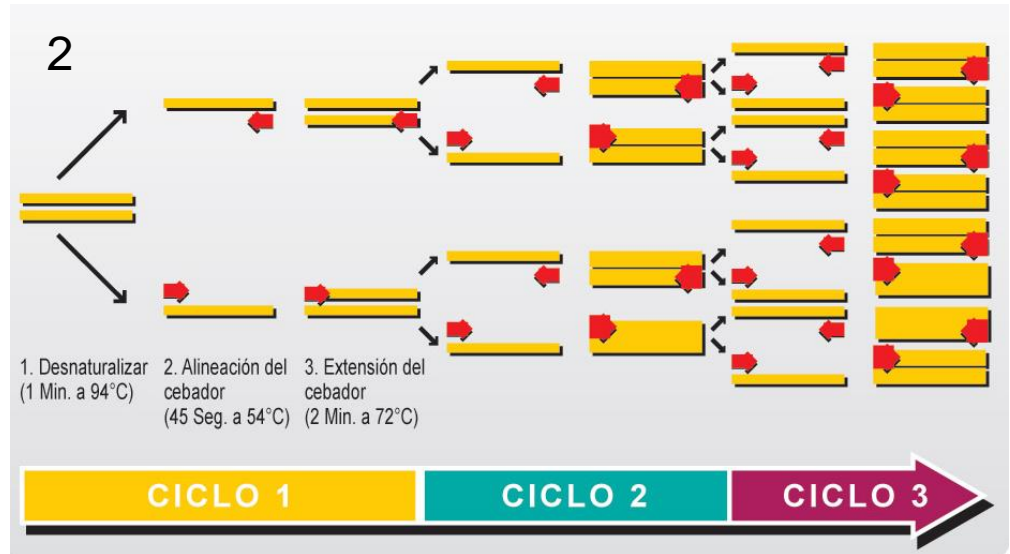
Detección del genoma o secuencias nucleótídicas específicas

1



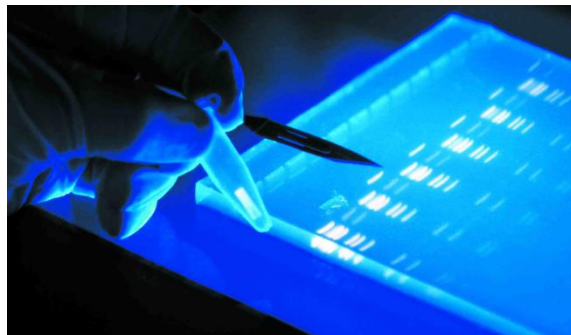
Extracción de ADN
de la muestra clínica

2



Amplificación de ácidos nucleicos por técnica de PCR

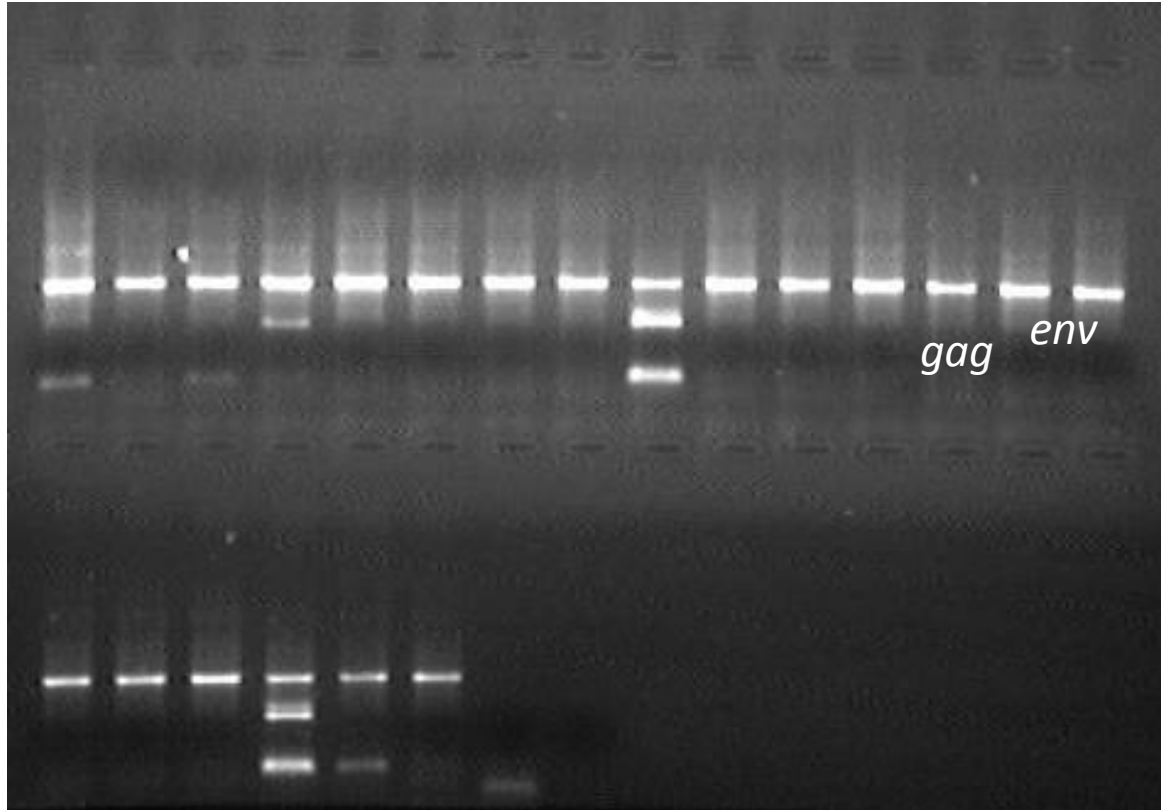
3



Visualización del
producto esperado (gen)
en geles de agarosa con
tinciones para ácidos nucleicos

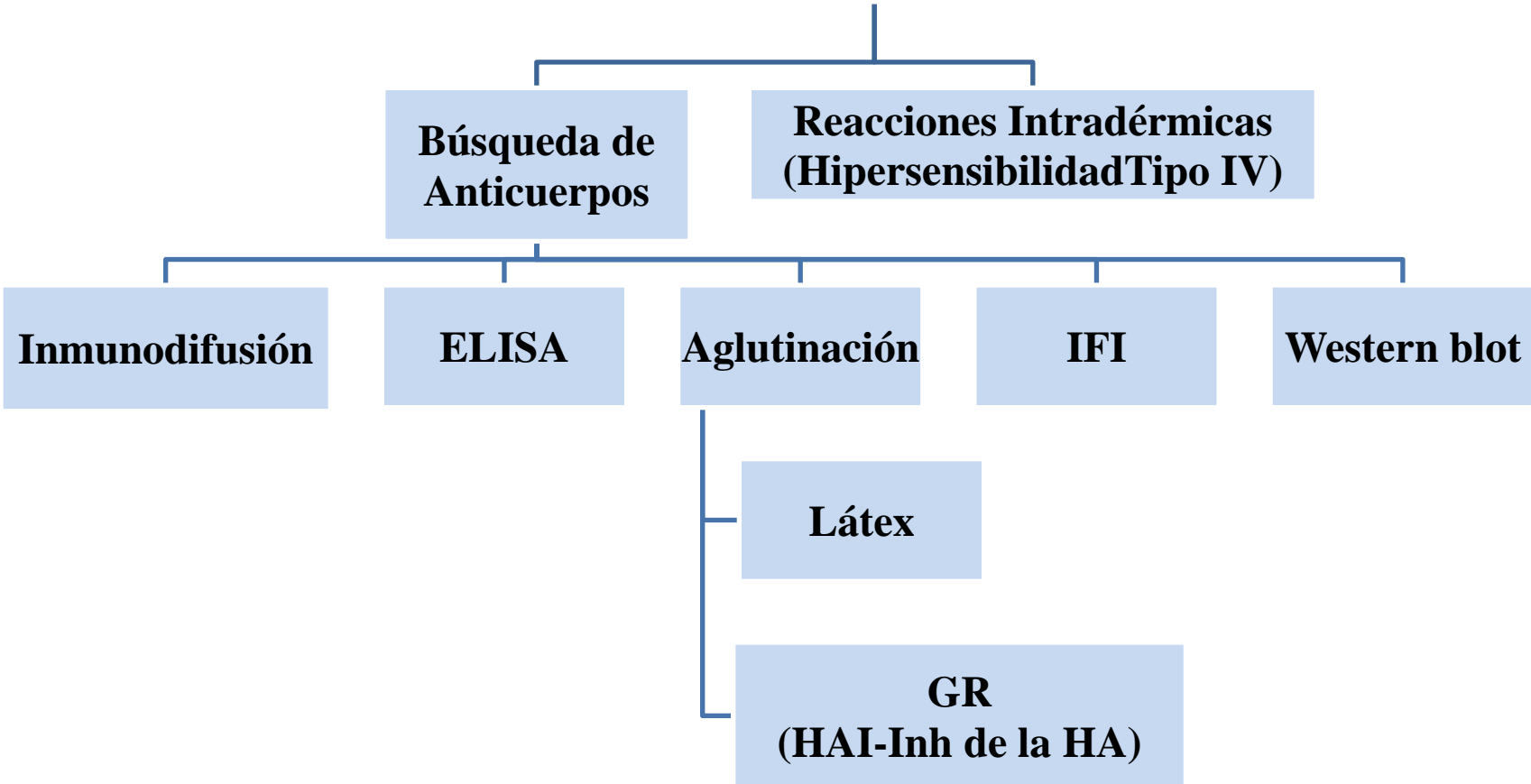
Métodos Directos

PCR para detección de los genes *env* y *gag* de HIV en linfomononucleares en diagnóstico pediátrico



Beta actina

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO INDIRECTO



Métodos Indirectos

Utilidad de las pruebas inmunológicas

¿Para que emplearlas?

- Detectan la respuesta inmune del hospedero frente a diferentes microorganismos.
- Permiten el diagnóstico de infecciones agudas y crónicas.
- Realizar encuestas epidemiológicas. HAV, *T. cruzi*, HBV, HCV.

¿Que información proveen ?

- Etapa de la infección.
- Evolución de la infección .
- Estado del sistema inmune en relación con la infección.
- Respuesta al tratamiento.

Pruebas serológicas:

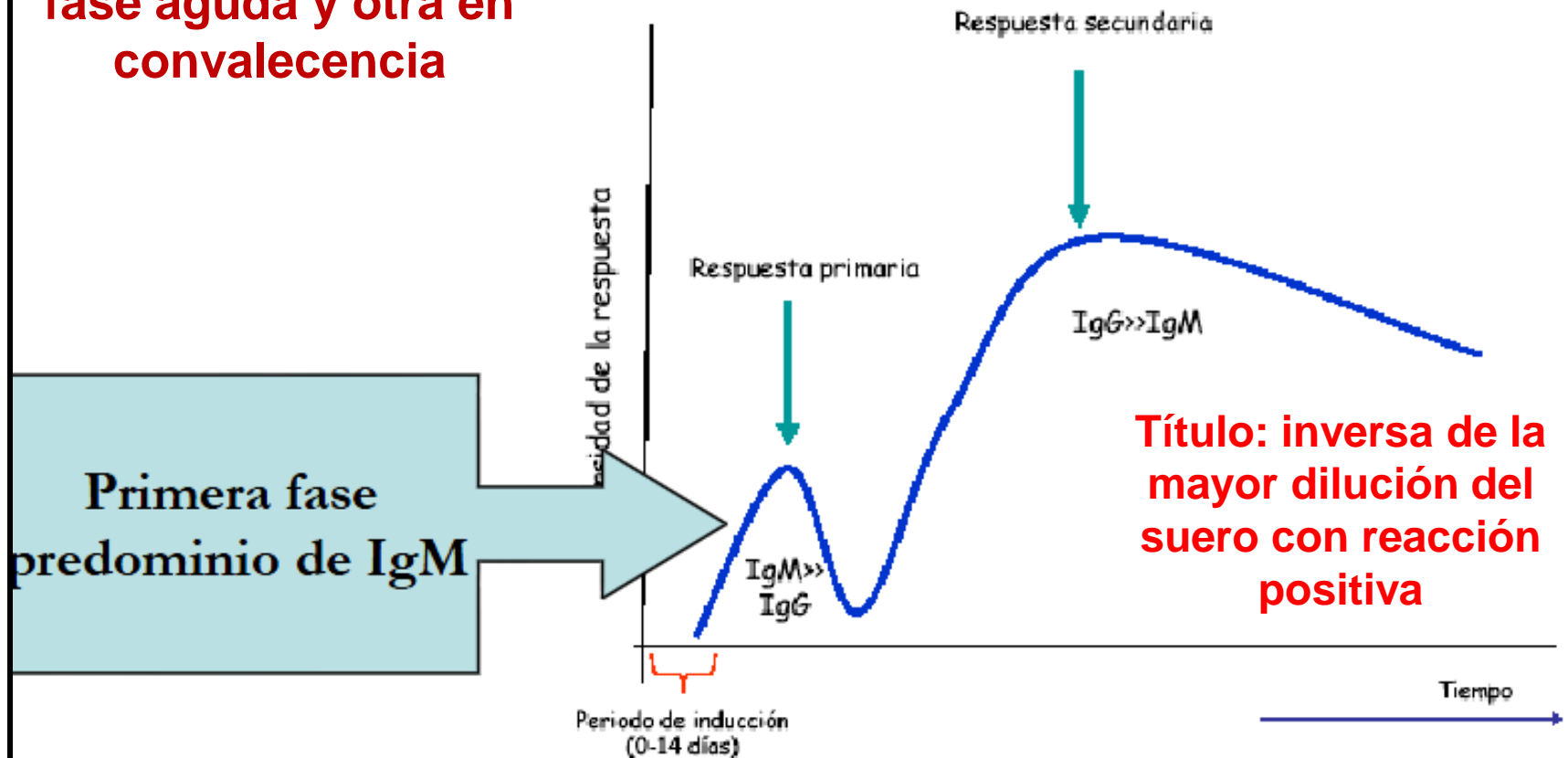
Detección rápida: IGM y IGG específicas.

Detección clásica: Detección de la seroconversión.

Métodos Indirectos

Seroconversión

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

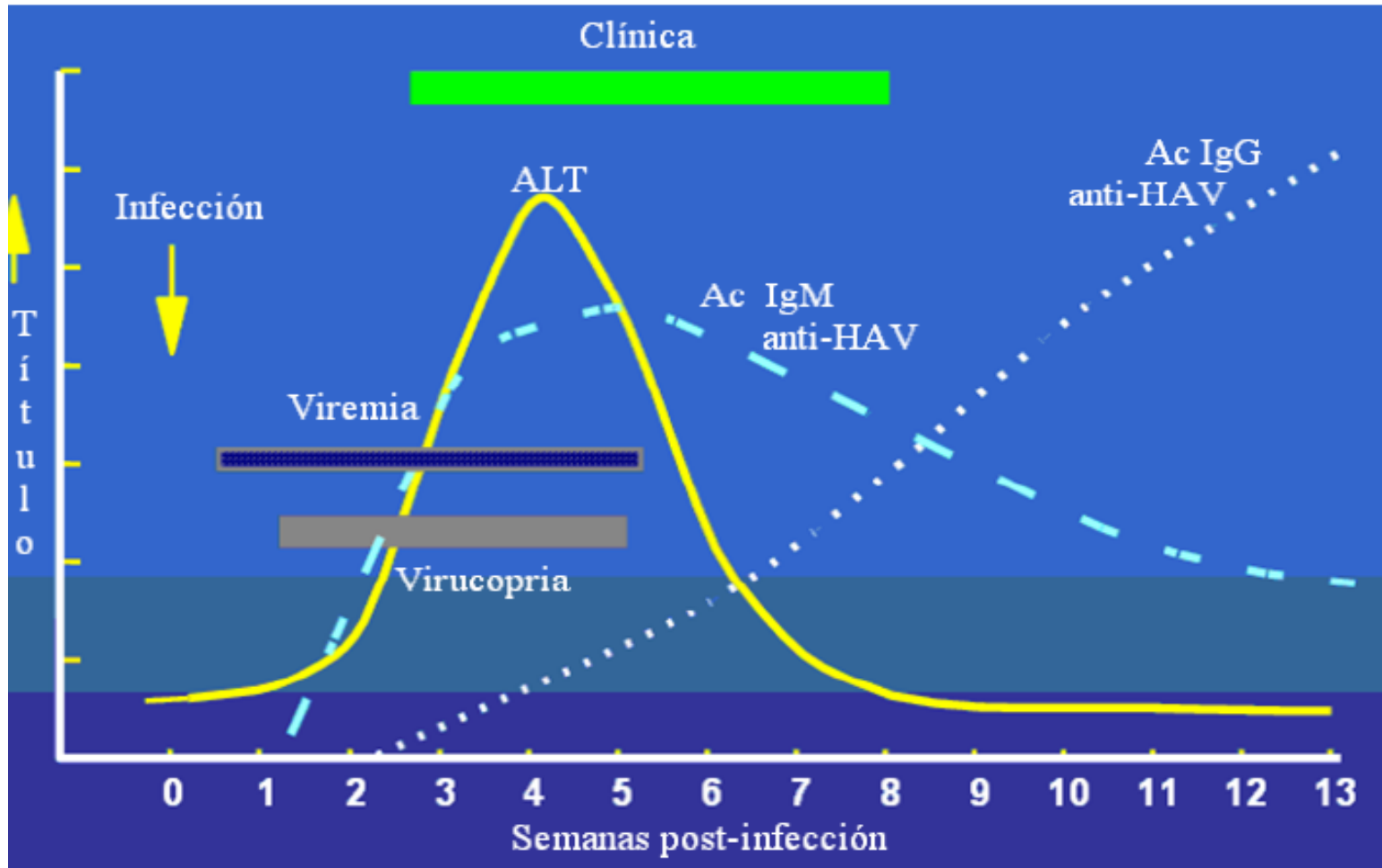


Establece un diagnostico retrospectivo

Métodos Indirectos

❖ Etapa de la infección I.

Infección aguda IgM HAV

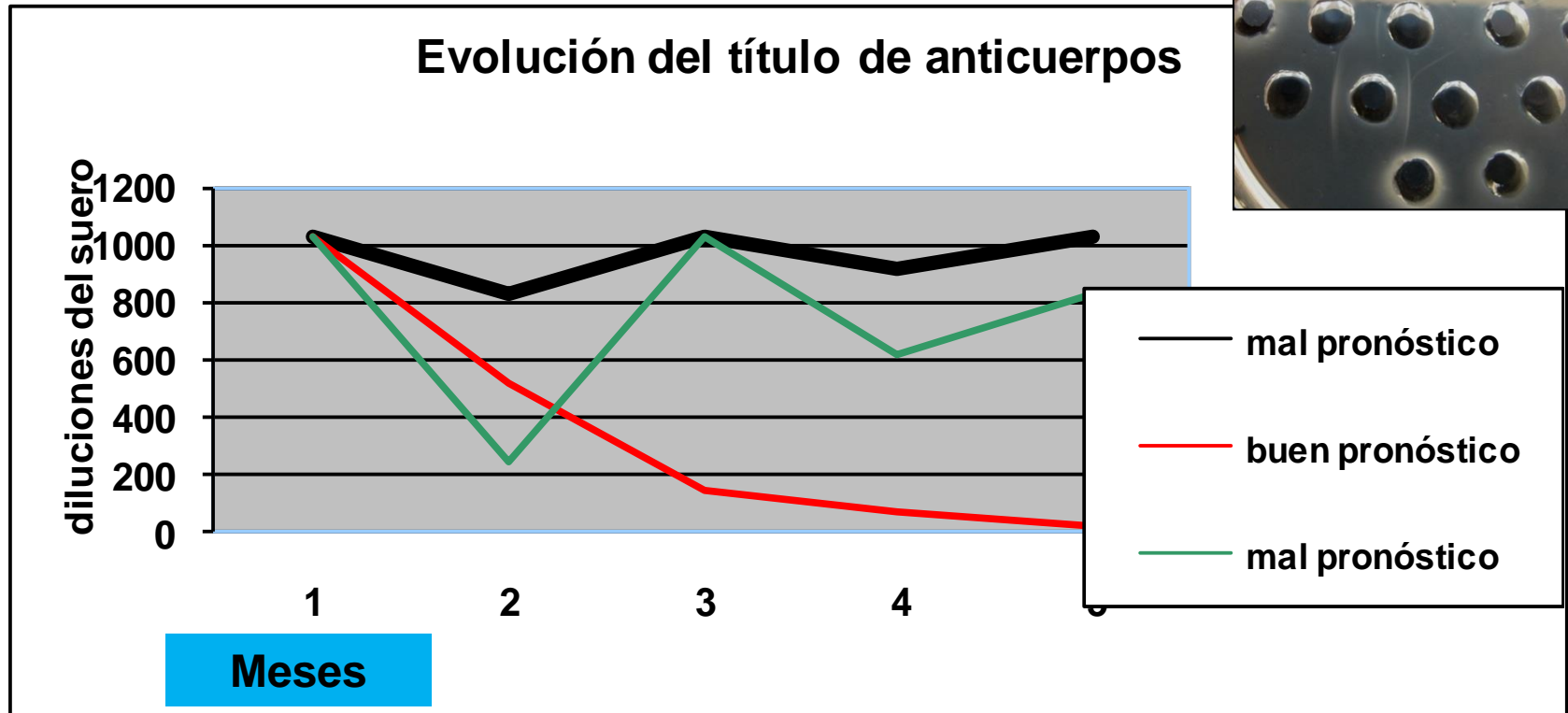
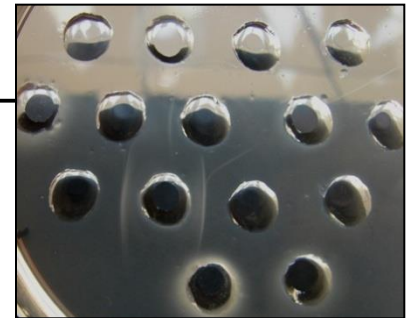


Métodos Indirectos

Evolución de la enfermedad y diagnóstico.

MICOSIS ENFERMEDAD en Histoplasmosis,
Paracoccidioidomycosis, Coccidioidomycosis. Aspergilosis cavitaria.

Inmunodifusión positiva



TIEMPO EN EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

-El diagnóstico precoz es fundamental en las enfermedades infecciosas.

-El diagnóstico rápido posibilitará:

- Indicar el tratamiento antimicrobiano específico.
- Disminución de la mortalidad del paciente.
- Evita los tratamientos antibióticos empíricos prolongados y el uso racional de los mismos (reduce la resistencia a antibióticos).
- Establecer medidas preventivas.

TIEMPO EN EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DIRECTO

- **Observación microscópica.**

**Resultado: en horas.
Dx. presuntivo /certeza**

- **Detección de componentes
del microorganismo.**

**Rapidez y especificidad.
Dx. de certeza.**

TIEMPO EN EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DIRECTO

BACTERIOLOGÍA

- **Hemocultivos, material quirúrgico, respiratorio, urocultivo para gérmenes comunes (no micobacterias):** Resultado definitivo dentro de las 24-48hs hs, a excepción de los métodos automatizados.
- ***M. tuberculosis*:** Baciloscopía (Tinción de Ziehl-Neelsen) 2 horas y el cultivo 8 semanas.
- Los métodos automatizados y moleculares acortan el tiempo del diagnóstico.

MICOLOGÍA

- **Levaduras:** 24 a 48hs
- **Hongos no tabicados (*Mucor* spp., *Rhizopus* spp.):** 30 días.
- **Hongos dimórficos (*Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*):** 3 a 4 semanas.

TIEMPO EN EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DIRECTO

PARASITOLOGÍA

- **Observación microscópica:** 2-3 horas.
- **Cultivo (nematodos, amebas):** 24-48hs.
- Los métodos moleculares y de inmunomarcación permiten realizar un diagnóstico precoz

VIROLOGIA

- **Cultivo:** es un procedimiento de laboratorio lento que demora hasta tres semanas, ya que es necesario realizar 3 pasajes en cultivo celulares para descartar el material.
- **Identificación viral por inmunofluorescencia:** 2- 4- hs.
- Los métodos moleculares permiten un diagnóstico precoz.

Conclusiones

- El diagnóstico microbiológico debe realizarse en todas las enfermedades infecciosas.
- Permite conocer el agente etológico.
- Orienta al tratamiento específico
- Puede ser directo o indirecto, clásico (días) o rápido (horas).