



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE MEDICINA**

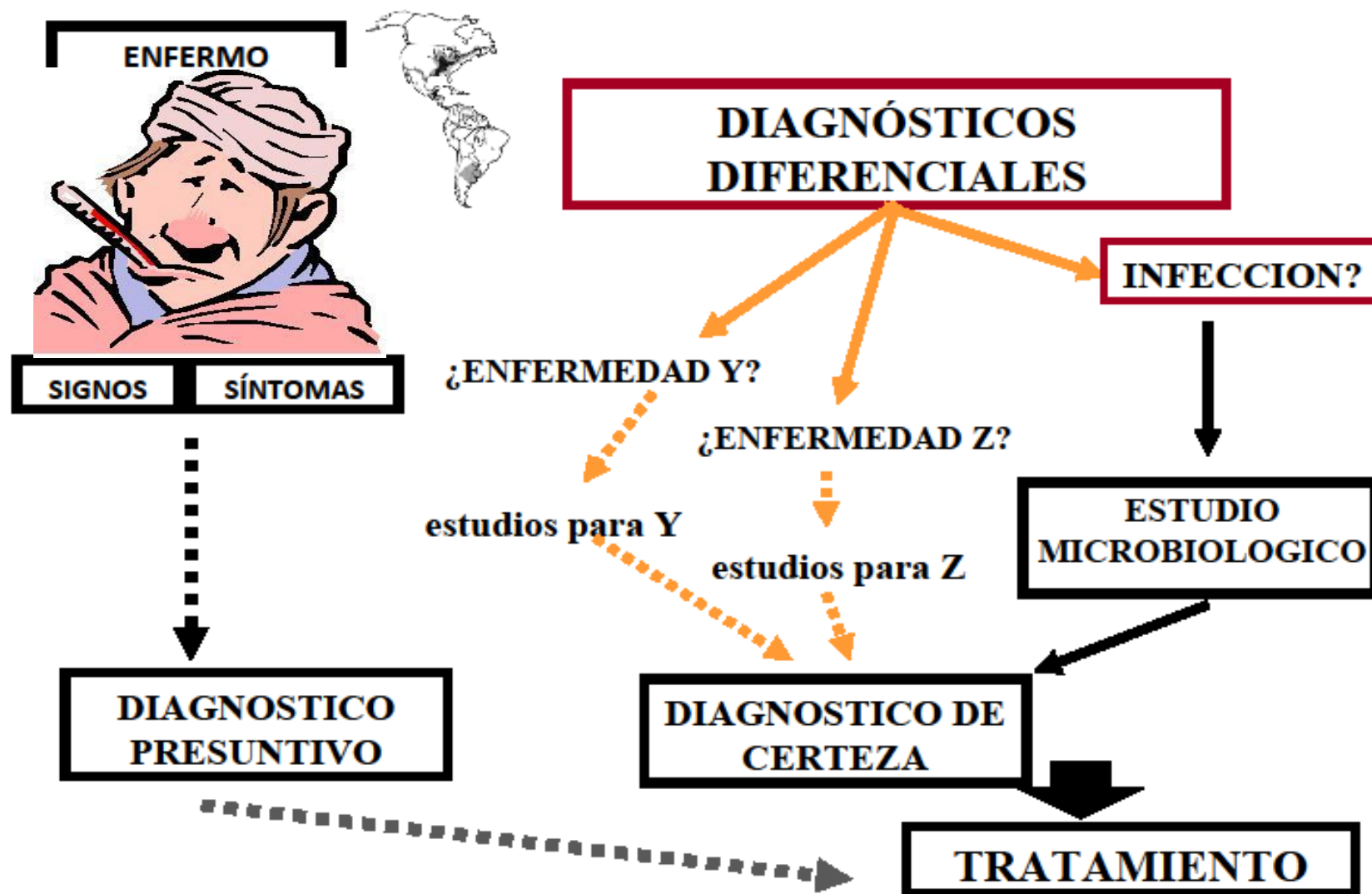
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA, PARASITOLOGÍA E
INMUNOLOGÍA**

MICROBIOLOGÍA II

SEMINARIO 1

**DIAGNÓSTICO
MICROBIOLOGICO**

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO



TOMA DE MUESTRA

Preparación del paciente

Recolección

Transporte

Conservación

CONCEPTOS BASICOS PARA LA TOMA DE MUESTRA

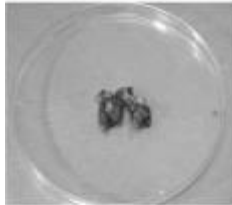
- ❖ Elegir el material que mejor represente el proceso infeccioso.**
- ❖ Tomar la muestra en el momento adecuado y en lo posible antes de que el paciente reciba antimicrobianos.**
- ❖ Obtener la muestra evitando contaminarla con la flora normal del paciente.**
- ❖ Tamaño de la muestra adecuado.**
- ❖ Evitar el agregado de ATB 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.**

Diagnóstico Microbiológico

Toma de muestras clínicas representativas



**Sitios no contaminados
con Flora Normal**



**Biopsia
de tejidos**



Sangre/LCR



**Orina
(punción suprapúbica)**

**Sitios contaminados
con Flora Normal**



**Orina
(micción espontánea o
al acecho)**



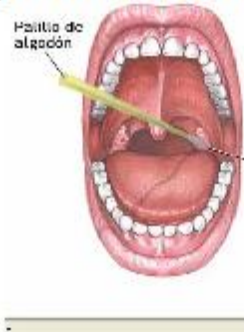
Espuito



Material fecal

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

Diagnóstico microbiológico

Muestra clínica



Medio

Medio semisólido: Medio Stuart
Medio Amies
Medio Cary & Blair

Medio líquido: Agua peptonada (*Vibrio cholerae*)
PRAS/TAB (anaerobios)

Material necesario

Frasco estéril: orina, materia fecal.

Hisopo en medio semisólido: fauces, recto, endocervix, uretra.

Frasco con medio para anaerobios: anaerobios

Frasco de hemocultivo: sangre

TRANSPORTE



Diagnóstico microbiológico

Conservación de las muestras

TIPO DE MUESTRA	TEMPERATURA AMBIENTE	HELADERA (4°C)
SANGRE	X	
ORINA		X
EXUDADOS FARINGEOS	X	
ESPUTO Y MUESTRAS RESPIRATORIAS		X
EXUDADOS GENITALES	X (hisopo en medio Amies o Stuart para <i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	
LCR	X	
Punciones o biopsias de PIEL Y TEJ. BLANDOS	X	
EXUDADOS OCULARES	X	
MUESTRAS PARA ANAEROBIOS	X	
MATERIA FECAL	X	

CONDICIONES QUE PROVOCAN EL RECHAZO DE UNA MUESTRA

Inadecuada/o { Identificación de la muestra..
Tubos de recolección.
Transporte.

- Sustancias interferentes.

**Volumen
adecuado**



Falla en la recuperación del
patógeno

Diagnóstico Microbiológico

↓
**Observación
microscópica**



↓
Cultivo



Medios Selectivos

**Medios
diferenciales**

**Medios de
enriquecimiento**

→
Pruebas Bioquímicas

↓
**Detección de
antígenos
bacterianos**



↓
**Métodos
moleculares**



↓
Identificación

↓
Sensibilidad antibiótica



Diagnóstico microbiológico

Procesamiento de la muestra



Microscopia

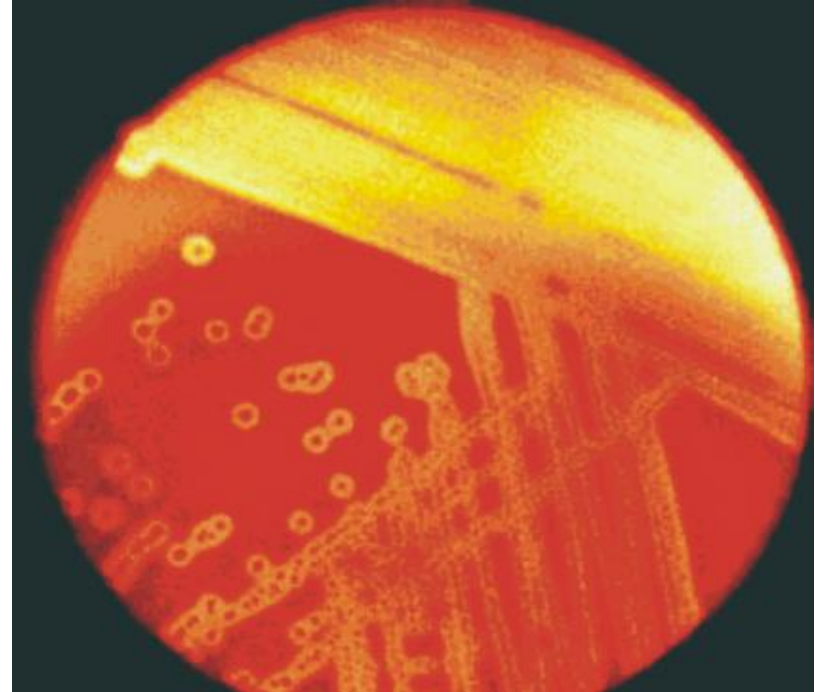
Fresco

- Presencia o no de bacterias
 - Morfología
 - Movilidad
- Células epiteliales
 - Leucocitos
 - Hematíes
- Candidas (hongo)

Tinción

- GRAM
- ZIEHL NIELSEN
- GIEMSA
- OTROS

Cultivo



✓ Aislar

✓ Identificar

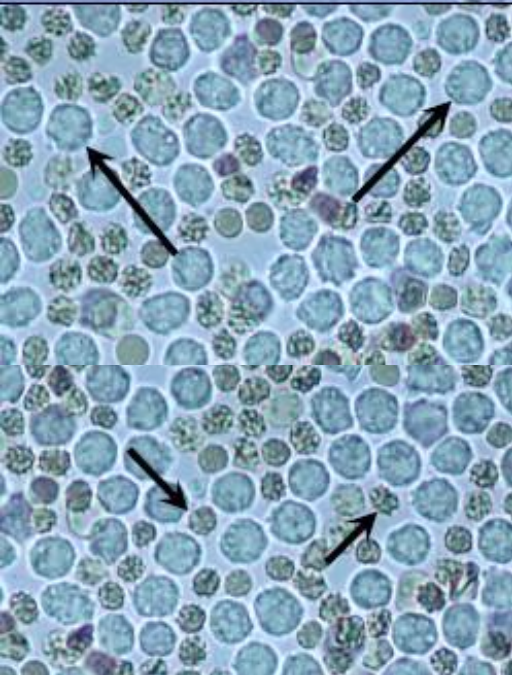
✓ Conocer el patrón
de susceptibilidad antibiótica

Diagnóstico microbiológico

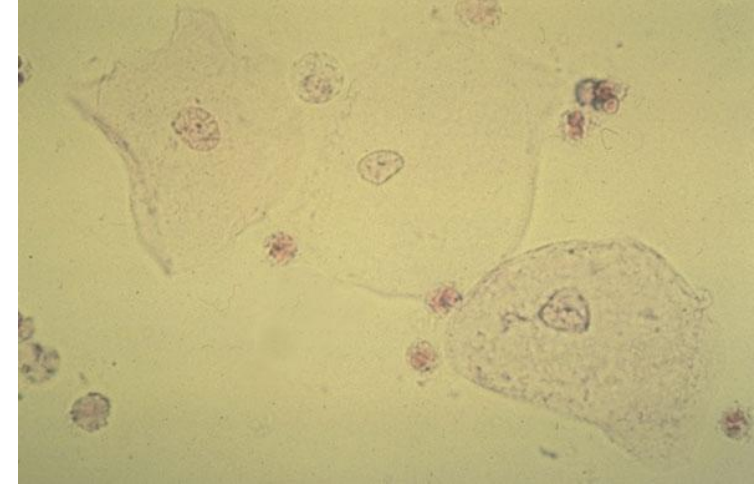
Exámen en fresco



Hematíes



Leucocitos



Células epiteliales



Candida spp.
(hongo)

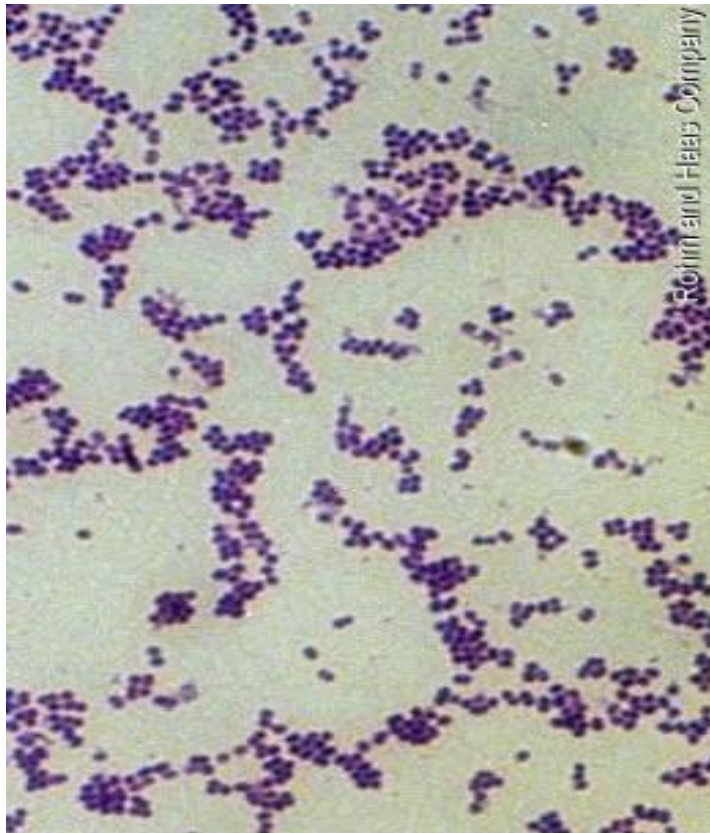


Diagnóstico microbiológico

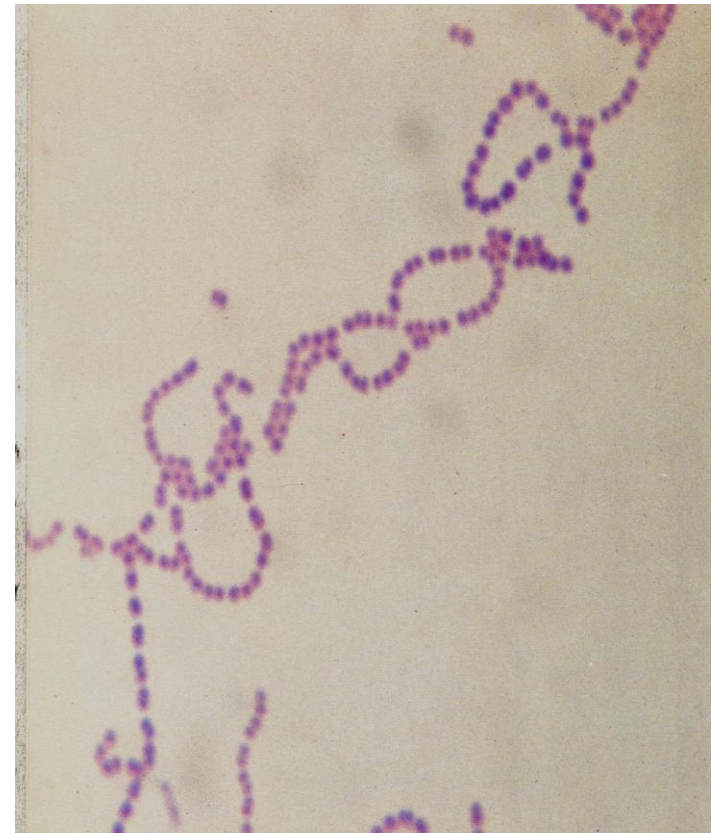
Microscopio óptico

Tinción de Gram

Cocos Gram positivos



En racimo Ej: *Staphylococcus aureus*



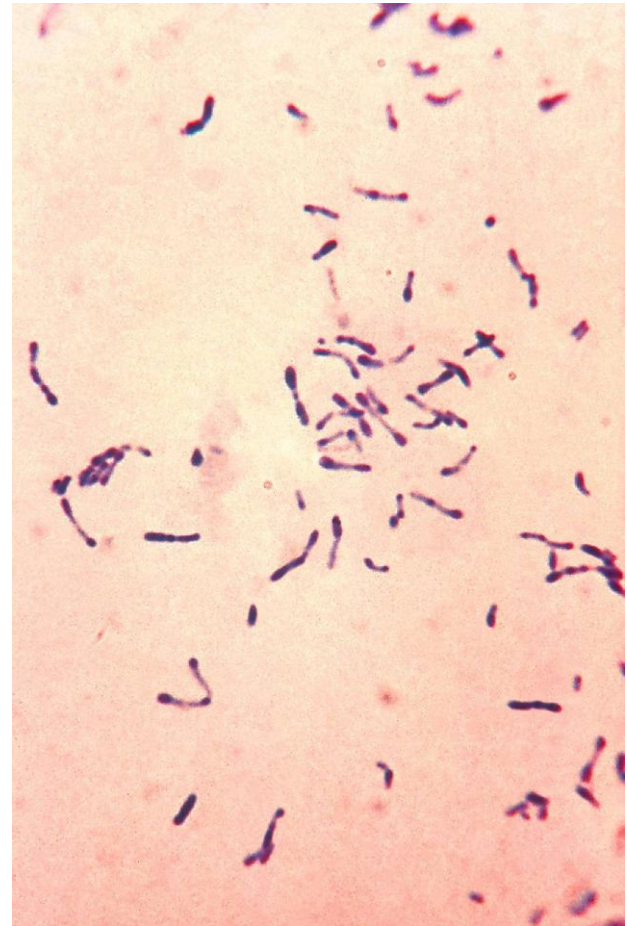
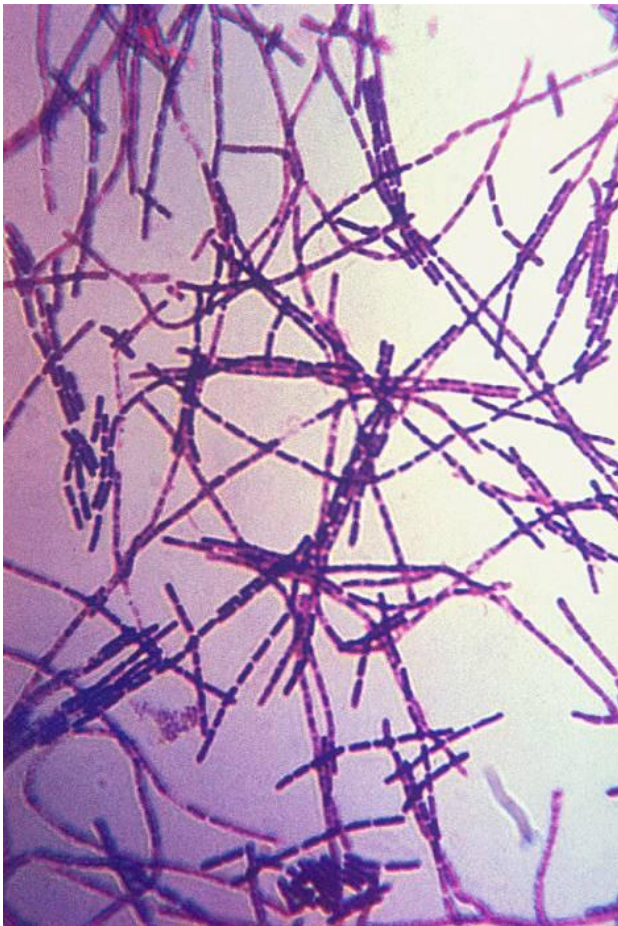
En cadena Ej: *Streptococcus spp*

Diagnóstico microbiológico

Microscopio óptico

Bacilos gram-positivos

Corynebacterium diphtheriae
(agrupamiento como letras chinas)



Gram: Sensibilidad

- **10^5 UFC/ml de muestra**

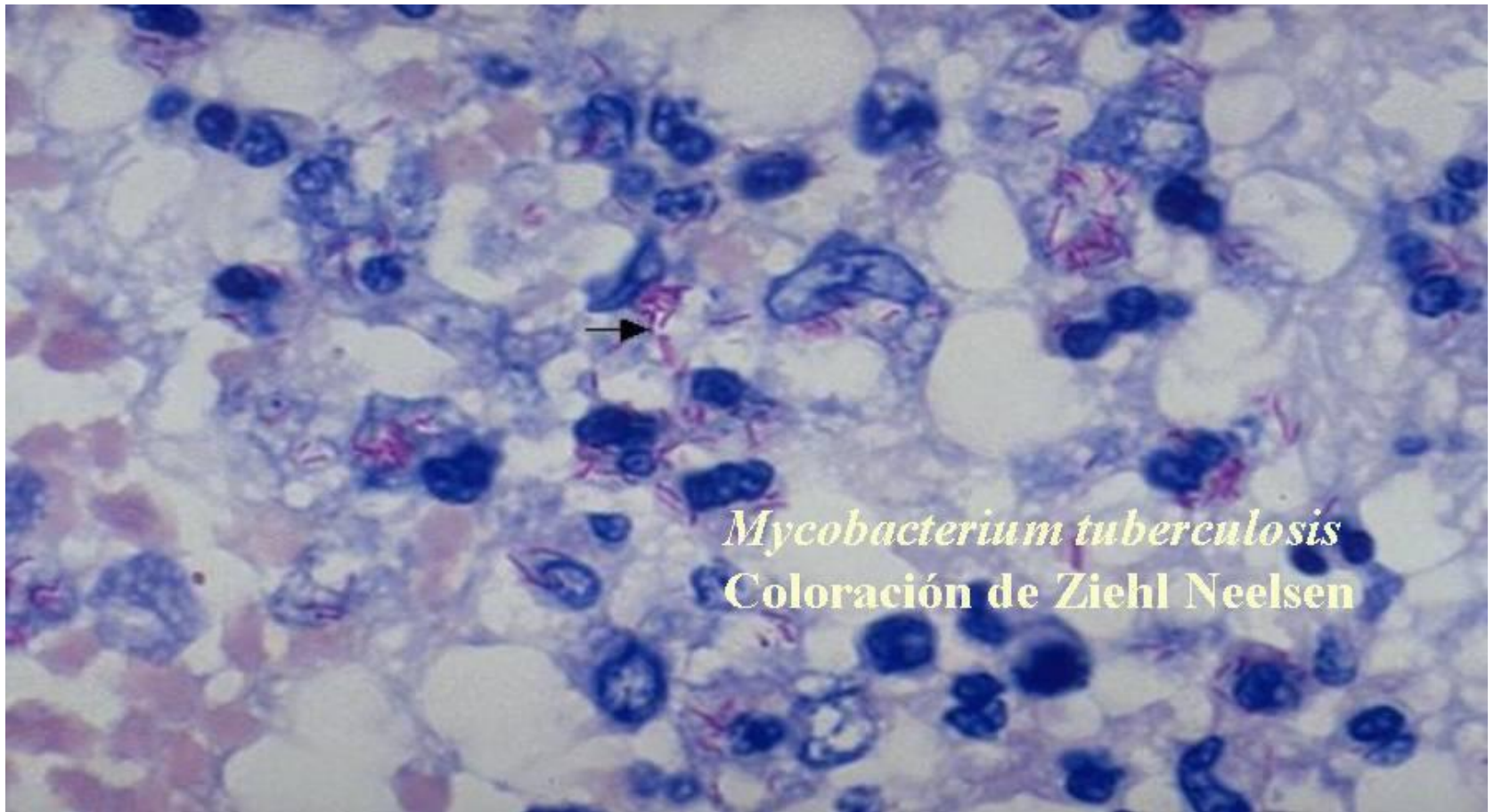
Ojo!!! No todas las bacterias se tiñen

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

Diagnóstico microbiológico

Microscopio óptico

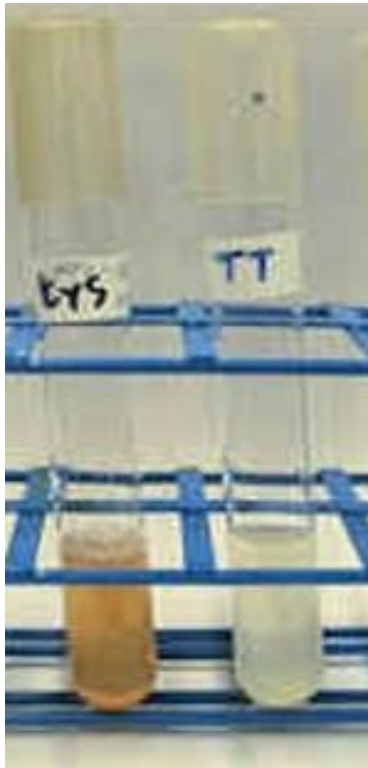
Tinción de Ziehl-Neelsen



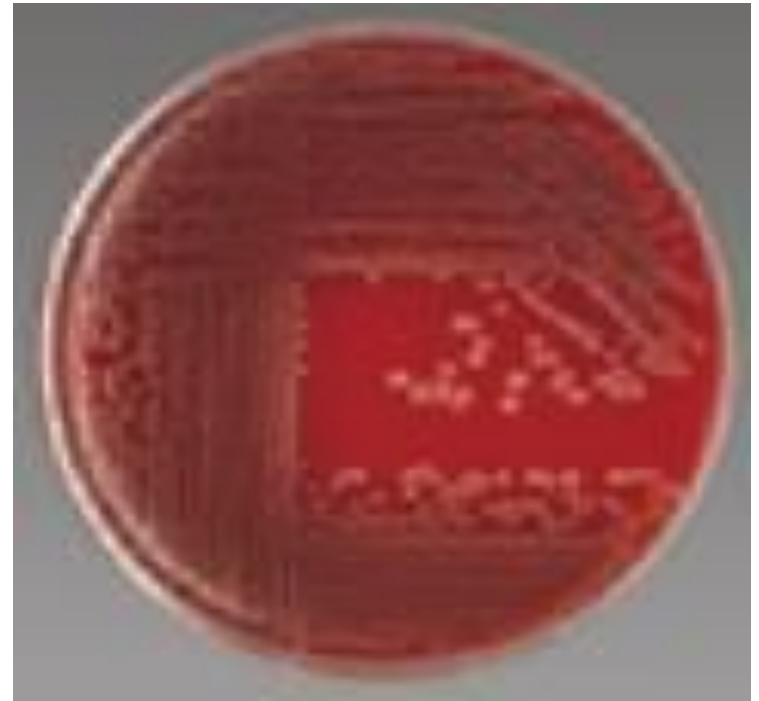
Diagnóstico microbiológico

Cultivo

Medio líquido
(enriquecer)



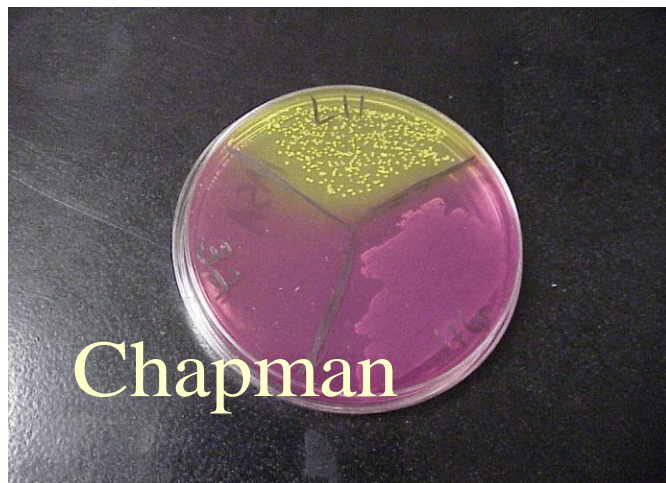
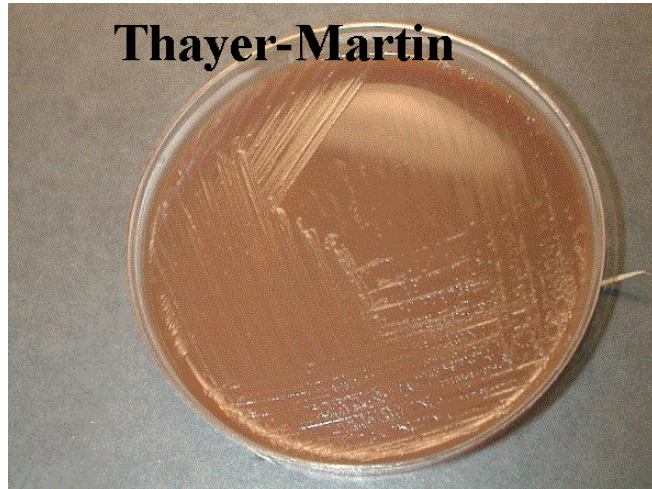
Medio sólido
(aislar)



Diagnóstico microbiológico

Cultivo

Medios Selectivos y Diferenciales



Diagnóstico microbiológico

Identificación bacteriana



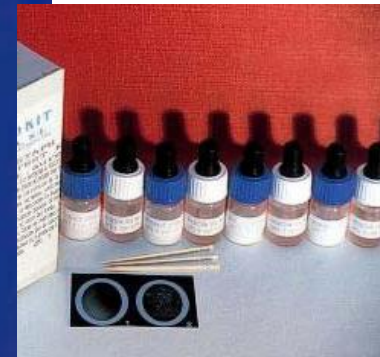
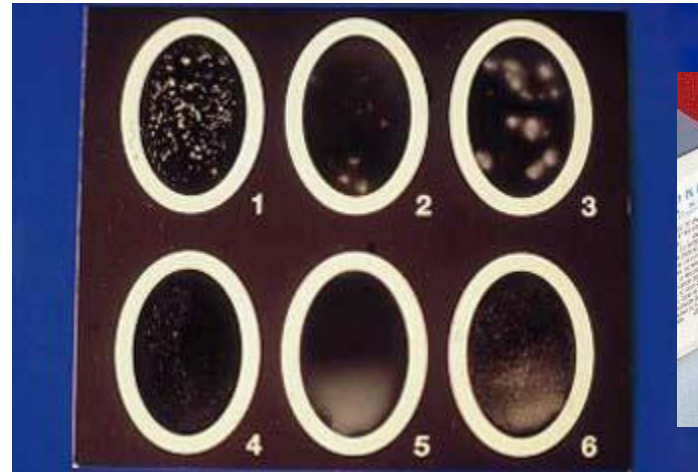
Pruebas bioquímicas



API E



Identificación de antígenos bacterianos



Serotipificación

Diagnóstico microbiológico

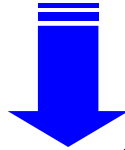
Serotipificación

Se utilizan anticuerpos específicos para detectar antígenos en la superficie de la envoltura bacteriana

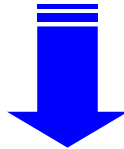


Diagnóstico microbiológico

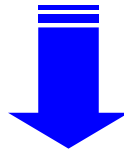
Repaso
Cultivo



Aislamiento
- identificación-

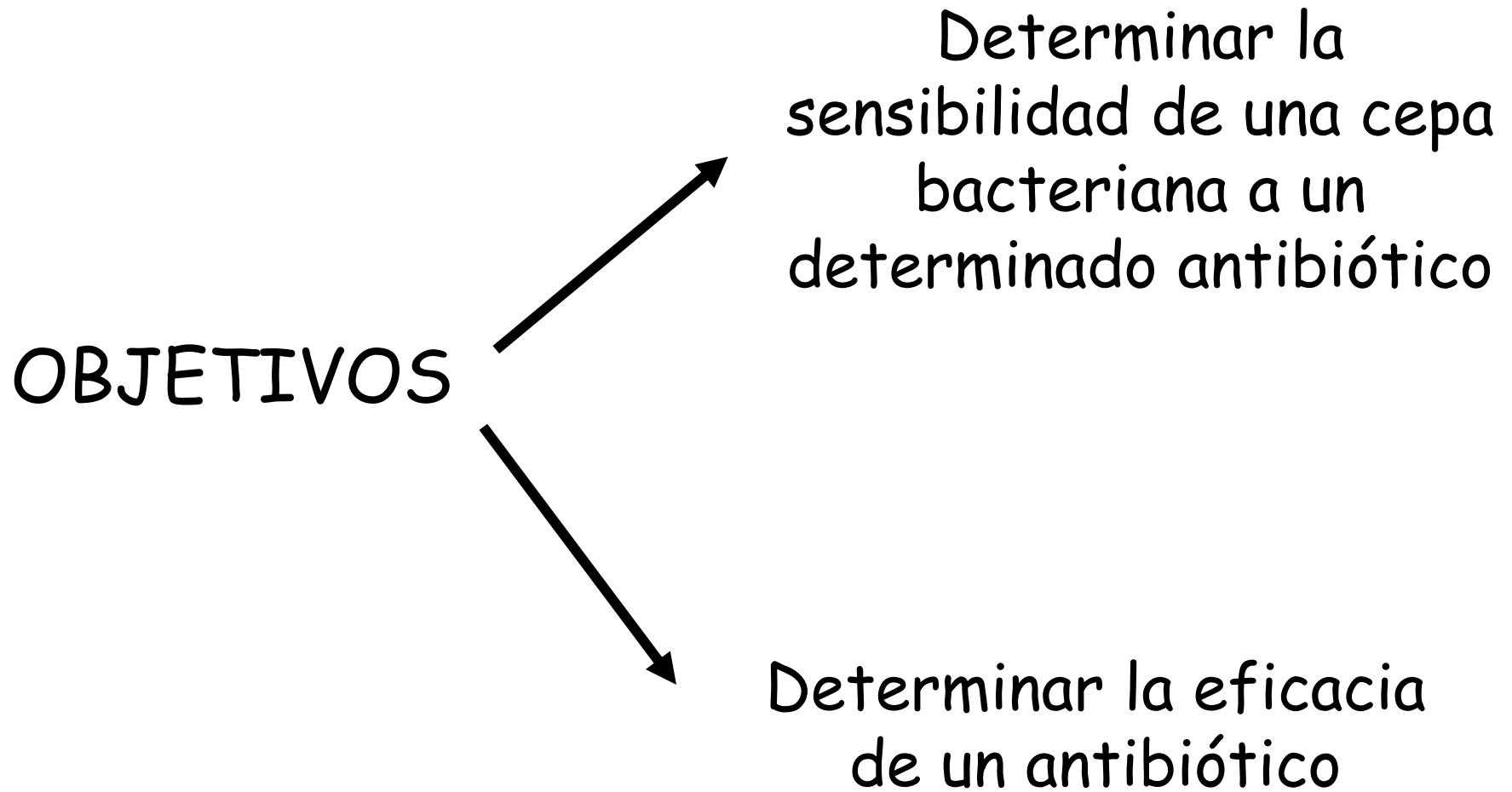


Microorganismo patógeno

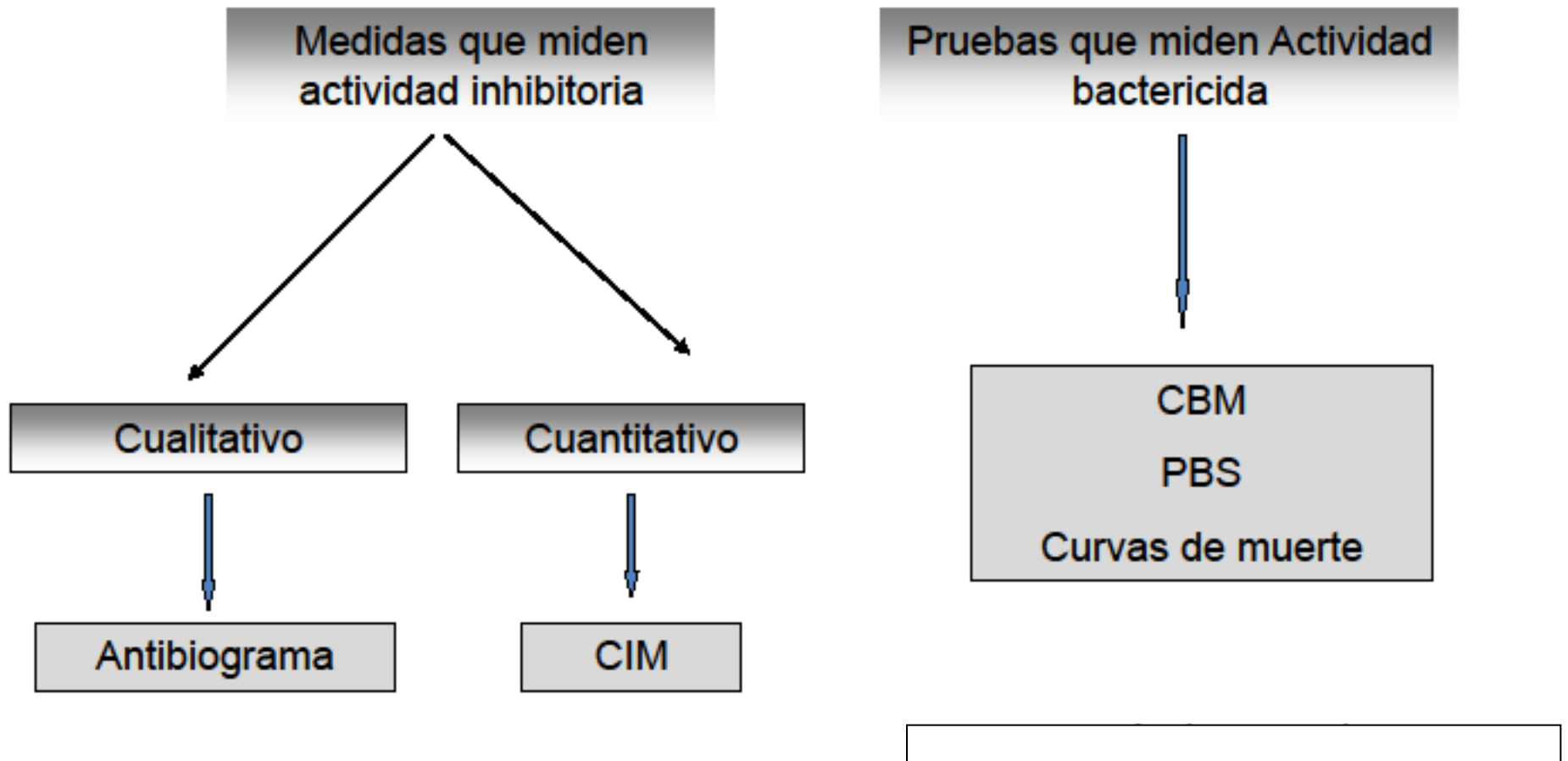


Pruebas de susceptibilidad antibiótica

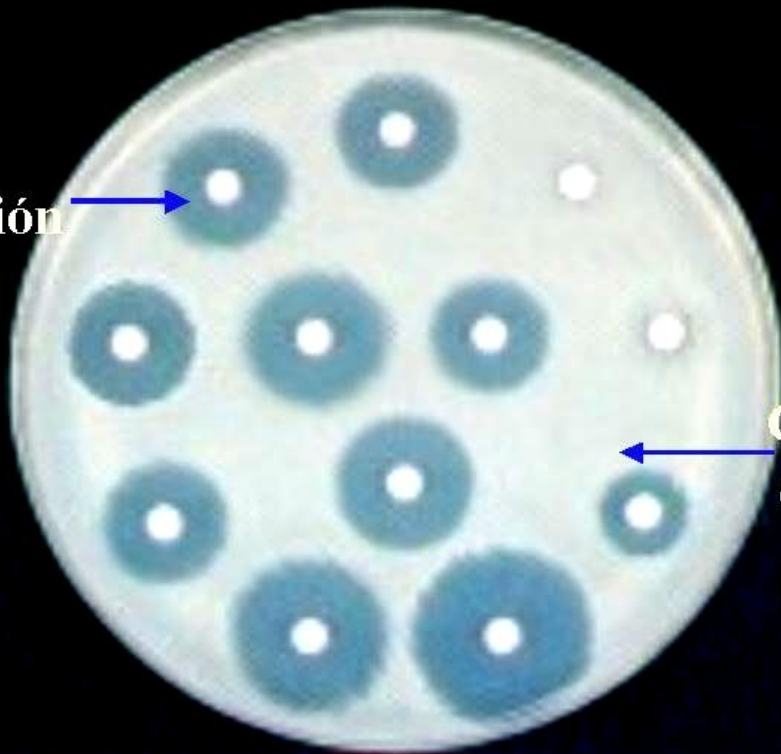
Pruebas de susceptibilidad antibiótica



Medida de la farmacodinamia de los antimicrobianos



**Halo
de Inhibición**

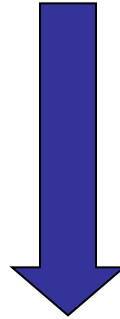


**Crecimiento
confluyente**

**Antibiograma de
difusión o método de
Kirby & Bauer**



Significado clínico de la prueba de Kirby & Bauer



- Bacterias sensibles
- Bacterias de susceptibilidad intermedia
- Bacterias resistentes

Pruebas bactericidas

PRUEBAS QUE ENFRENTAN BACTERIA-ANTIBIOTICO

De punto
final

CBM

Dinámico

Curvas
de muerte

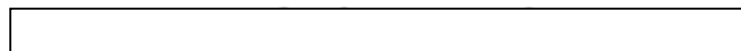
PRUEBAS QUE ENFRENTAN BACTERIA-SUERO PACIENTE

De punto
final

Poder
bactericida
del suero

Dinámico

Velocidad
Bactericida del
suero



CIM

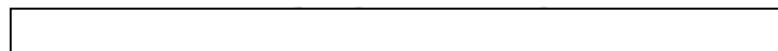
Concentración Inhibitoria Mínima

Mínima concentración de antibiótico necesaria para inhibir a $\geq 99,9\%$ de las bacterias del inóculo inicial

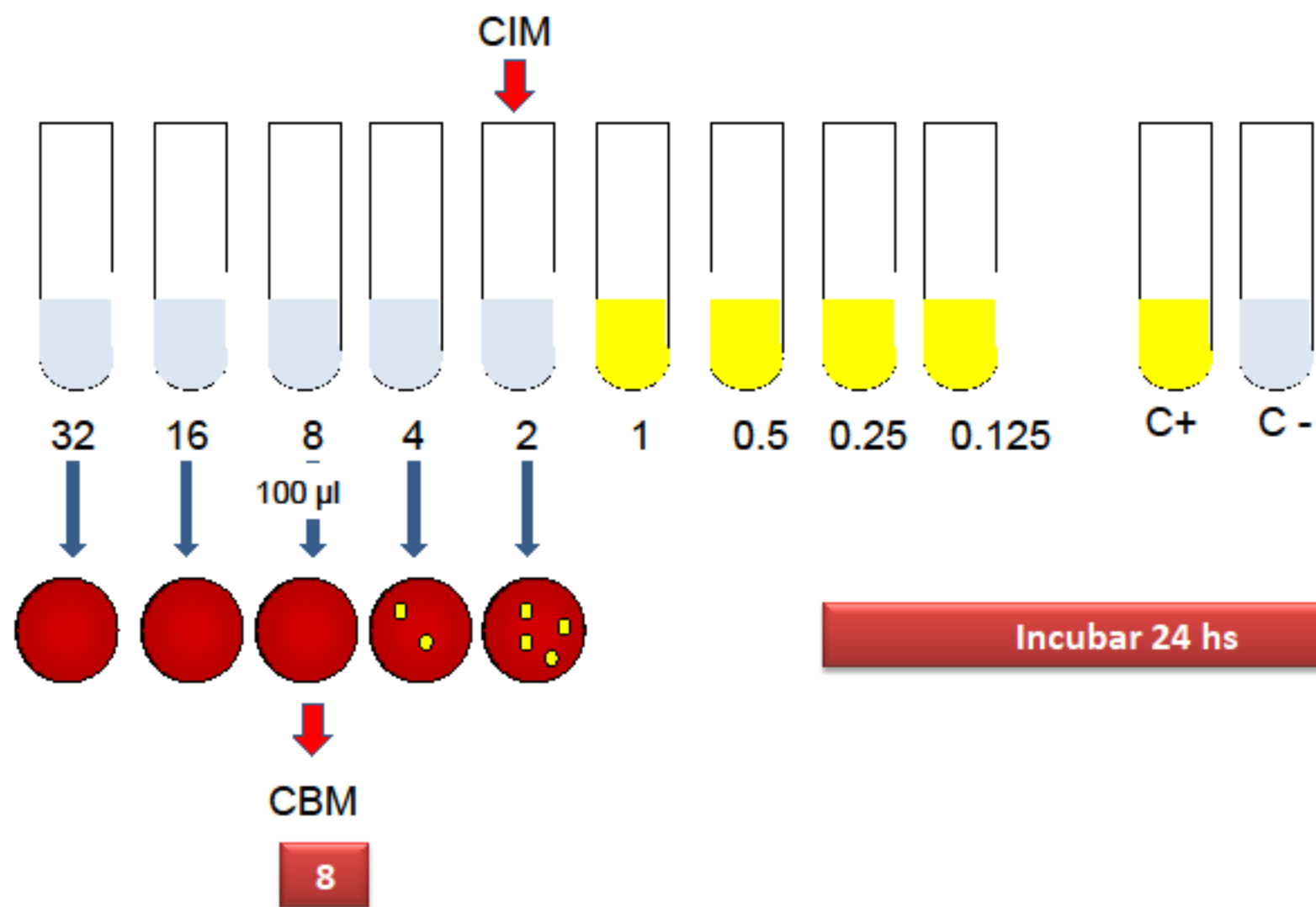
CBM

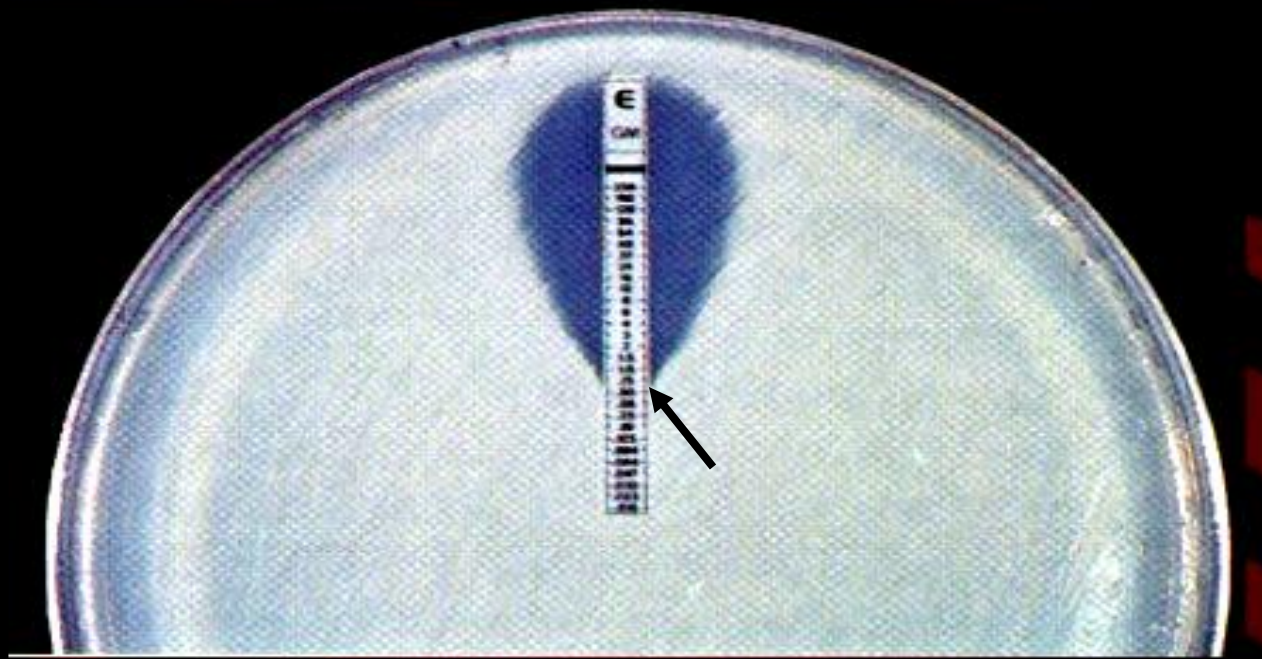
Concentración bactericida Mínima

Mínima Concentración de antibiótico necesaria para matar a $\geq 99,9\%$ de las bacterias del inóculo inicial



Determinación de CBM por macrodilución en caldo





Gradiente
de concentraciones
en la tira ($\mu\text{g/ml}$)

E-Test

La diferencia con el disco, es que el disco contiene una única concentración del antibiótico

Pruebas bactericidas

PRUEBAS QUE ENFRENTAN BACTERIA-ANTIBIOTICO

De punto
final

CBM

Dinámico

Curvas
de muerte

PRUEBAS QUE ENFRENTAN BACTERIA-SUERO PACIENTE

De punto
final

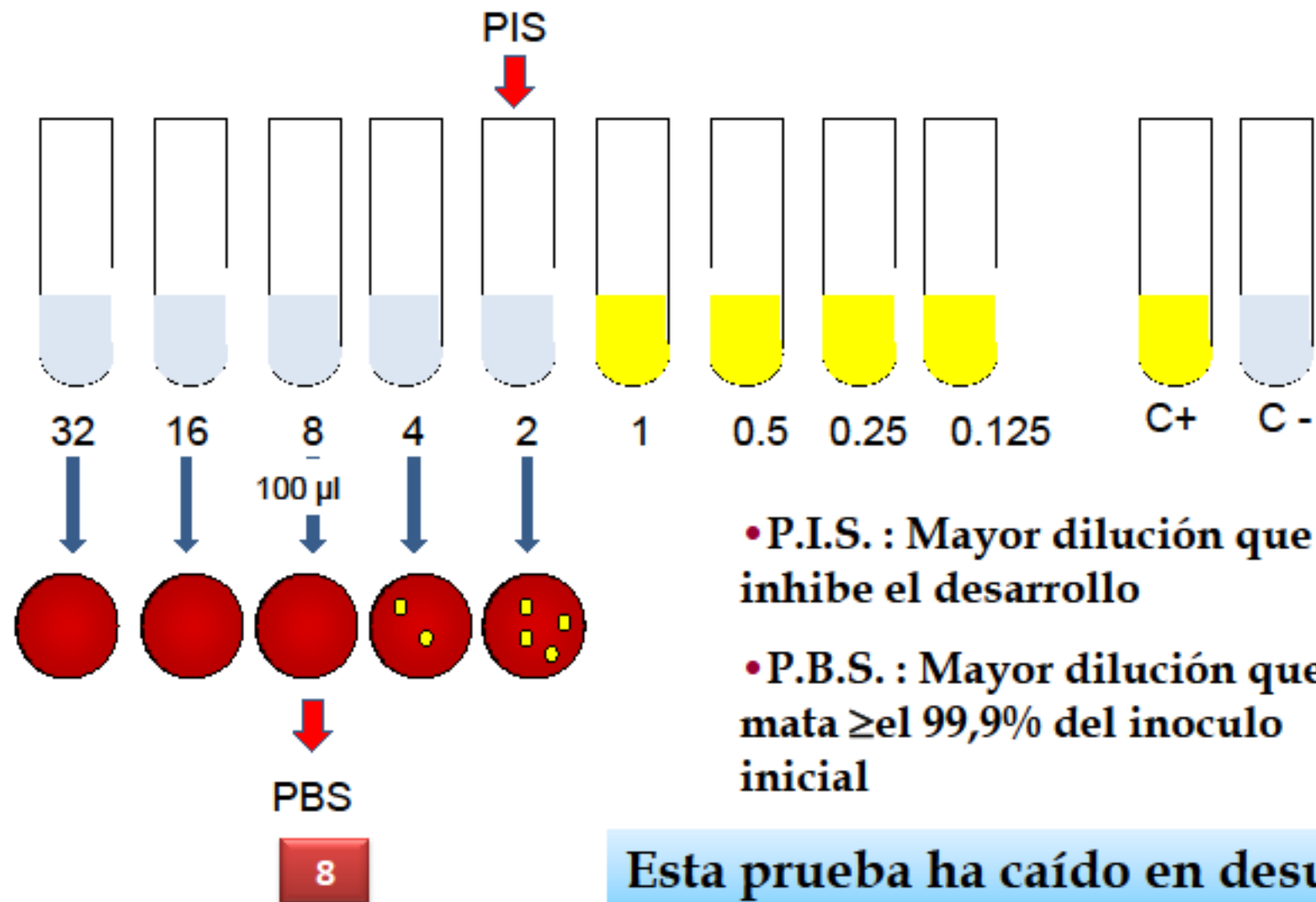
Poder
bactericida
del suero

Dinámico

Velocidad
Bactericida del
suero



Determinación de PBS por macrodilución en caldo



Pruebas bactericidas

PRUEBAS QUE ENFRENTAN BACTERIA-ANTIBIOTICO

De punto
final

CBM

Dinámico

Curvas
de muerte

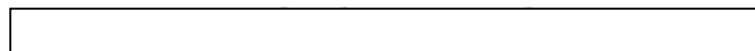
PRUEBAS QUE ENFRENTAN BACTERIA-SUERO PACIENTE

De punto
final

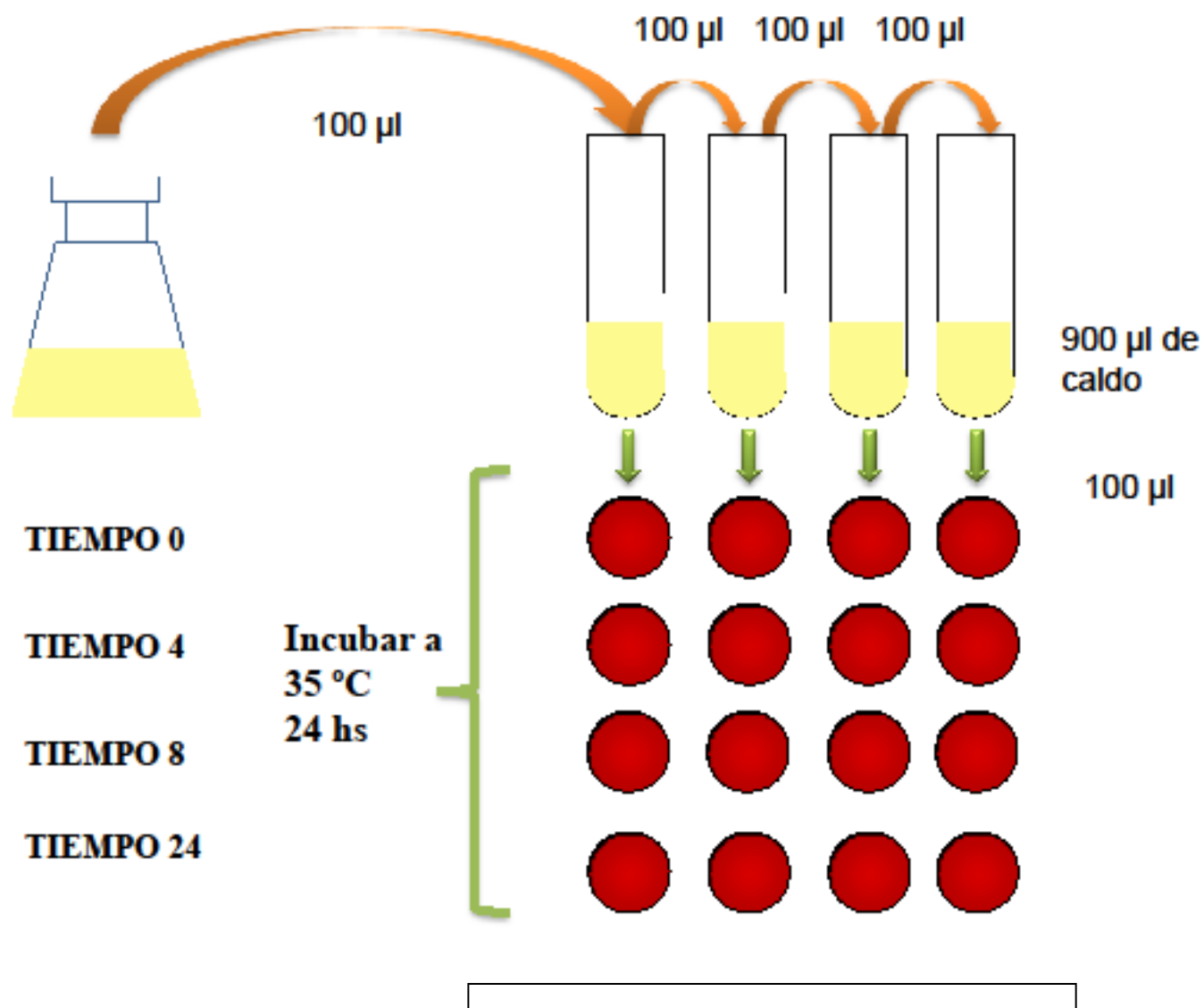
Poder
bactericida
del suero

Dinámico

Velocidad
Bactericida del
suero



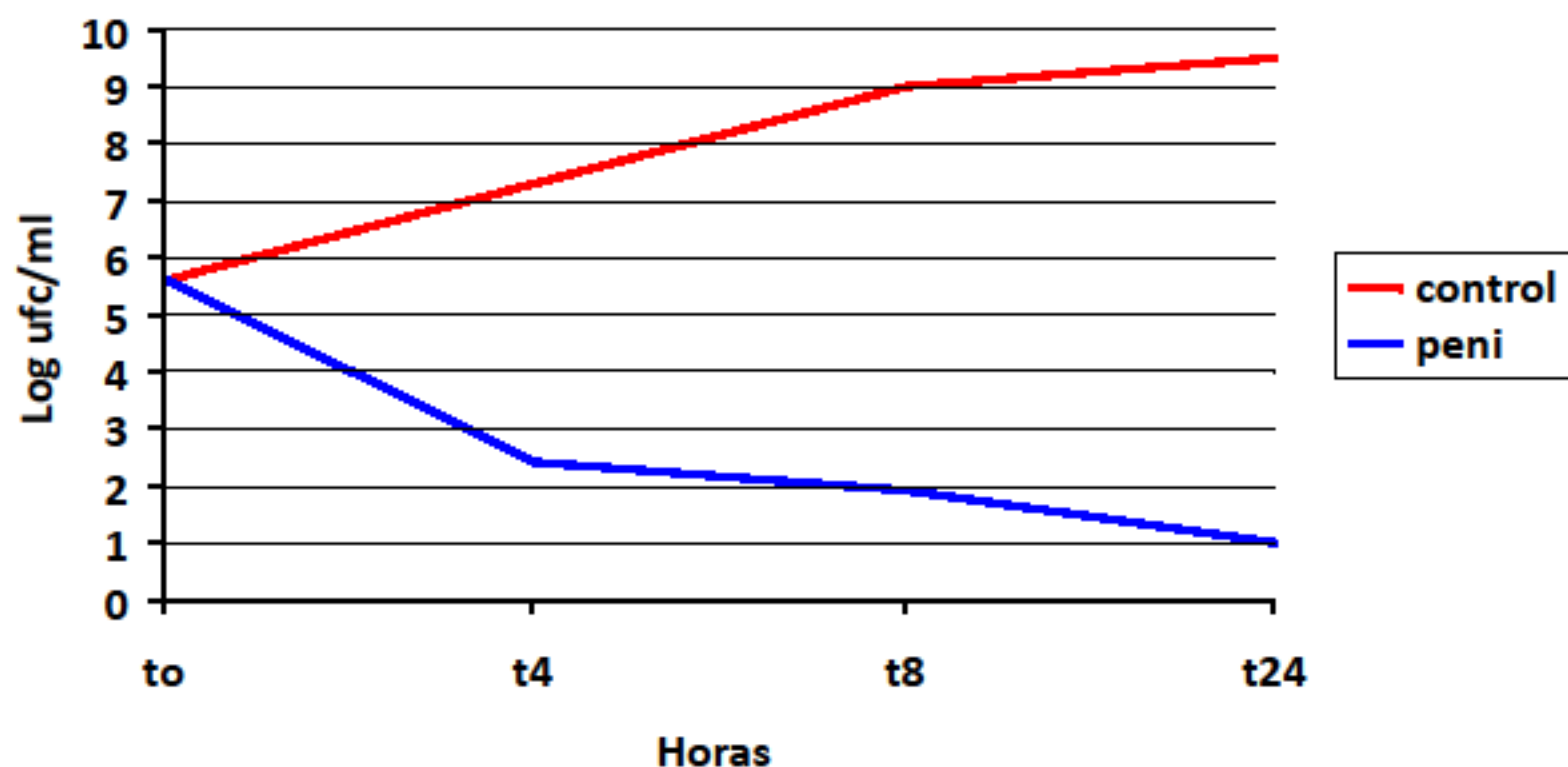
CURVA DE MUERTE



Bactericidia

Disminución de 3 unidades log en ufc/ml con respecto al inóculo inicial (se evalúan primeras 4-8 hs.)

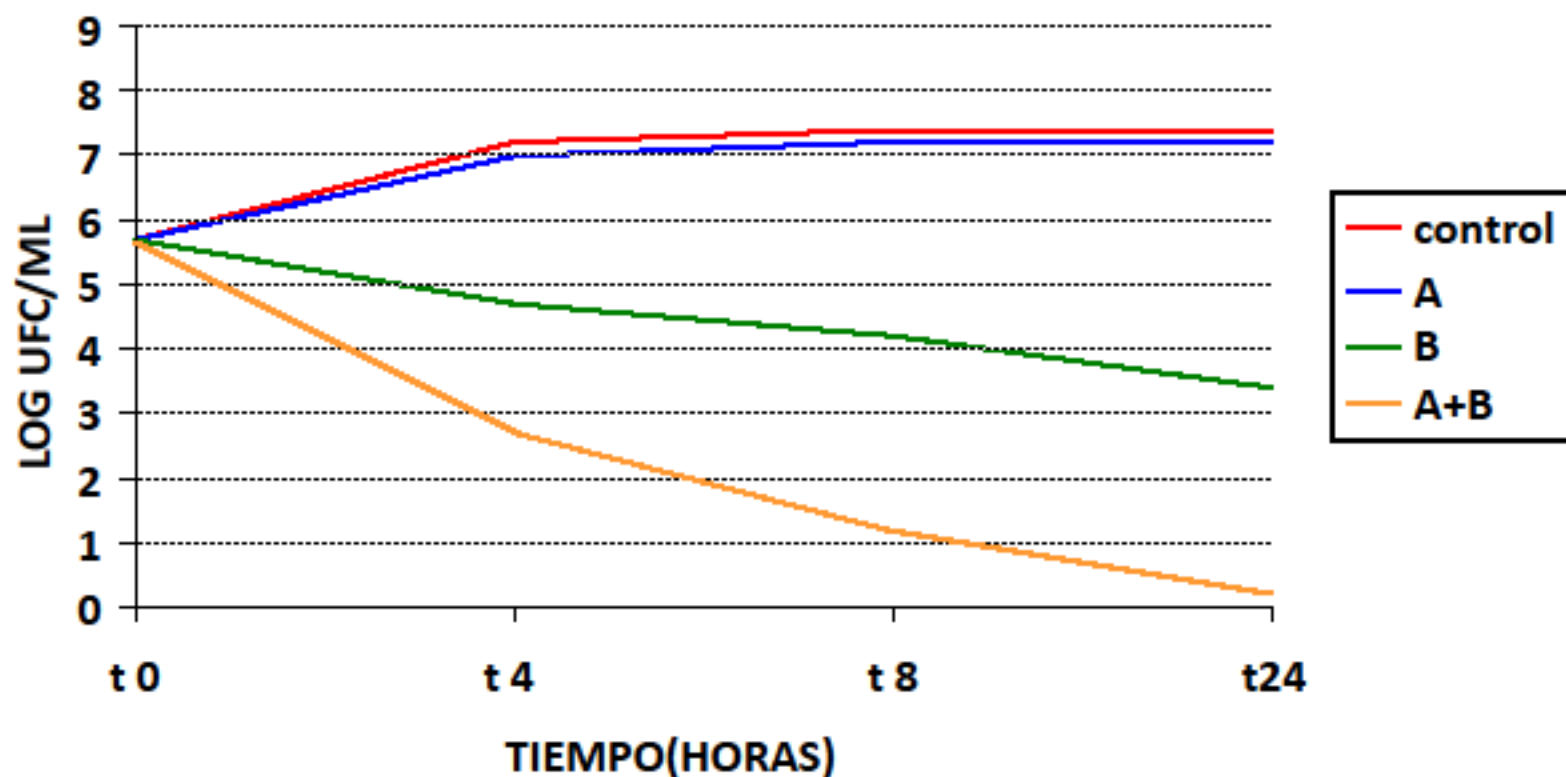
Una curva de muerte que muestra muerte rápida tiene buen valor predictivo de evolución favorable.



Sinergia

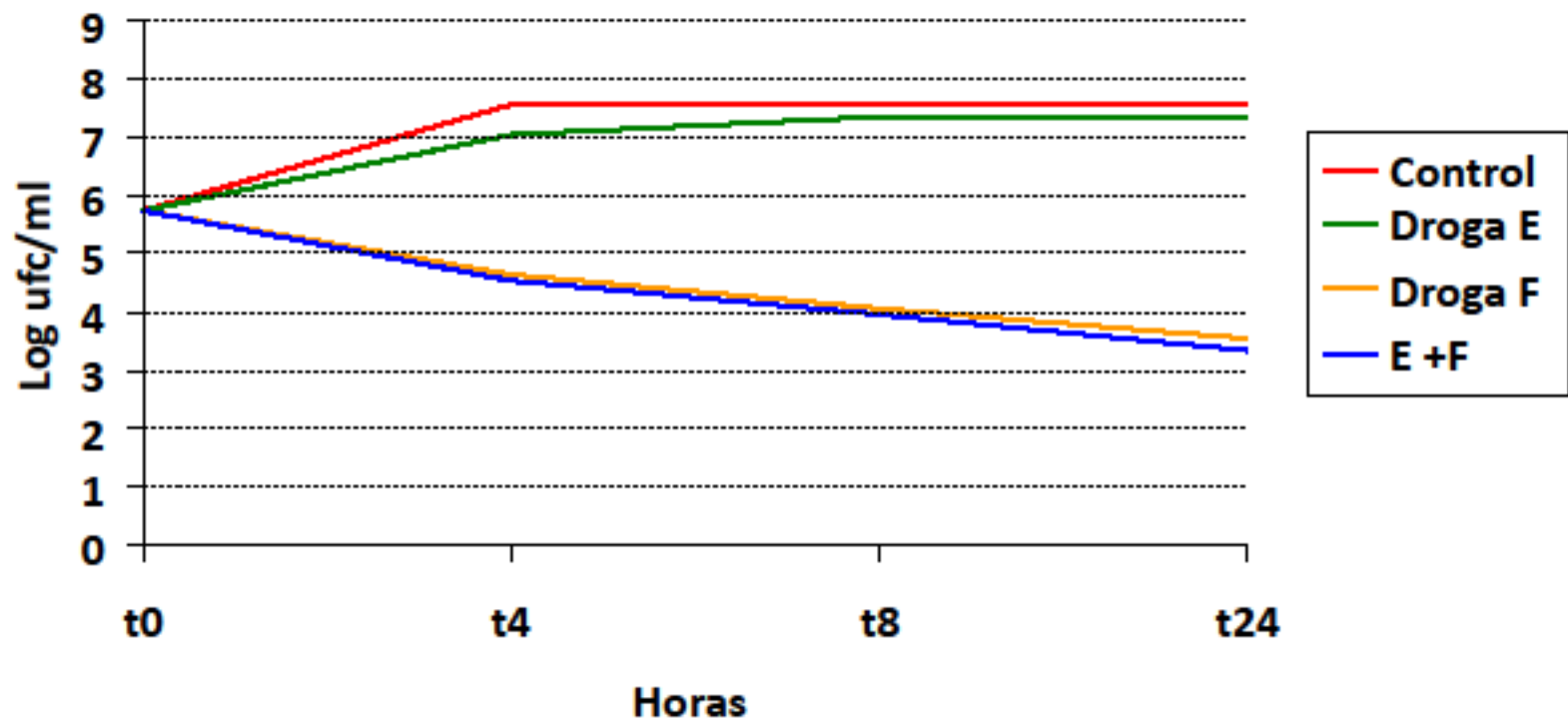
Disminución ≥ 2 unidades log en UFC/ml entre la combinación y su componente más activo.

La demostración de sinergia tiene buen valor predictivo de evolución favorable.



Indiferencia

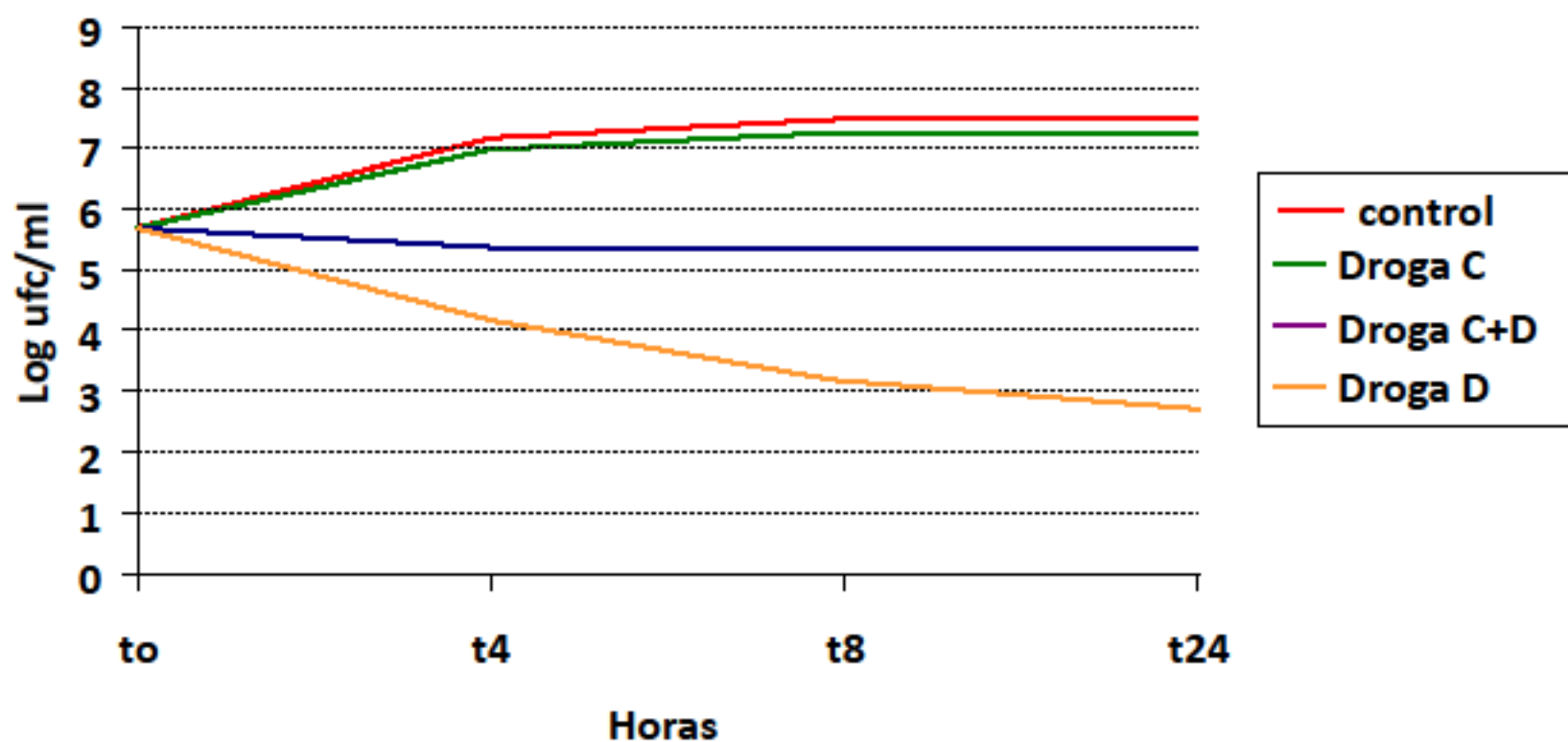
Aumento o disminución < 1 unidad log en UFC/ml del recuento entre la combinación y su componente más activo. La demostración de indiferencia tiene buen valor predictivo de evolución desfavorable.



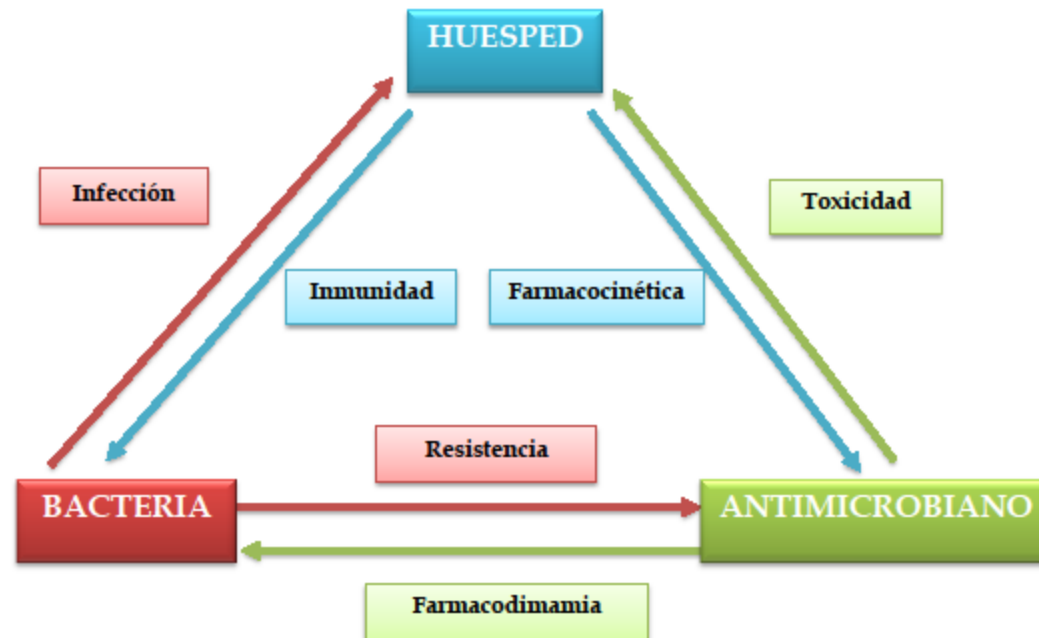
Antagonismo

Aumento ≥ 2 unidades log en UFC/ml entre la combinación y su componente más activo.

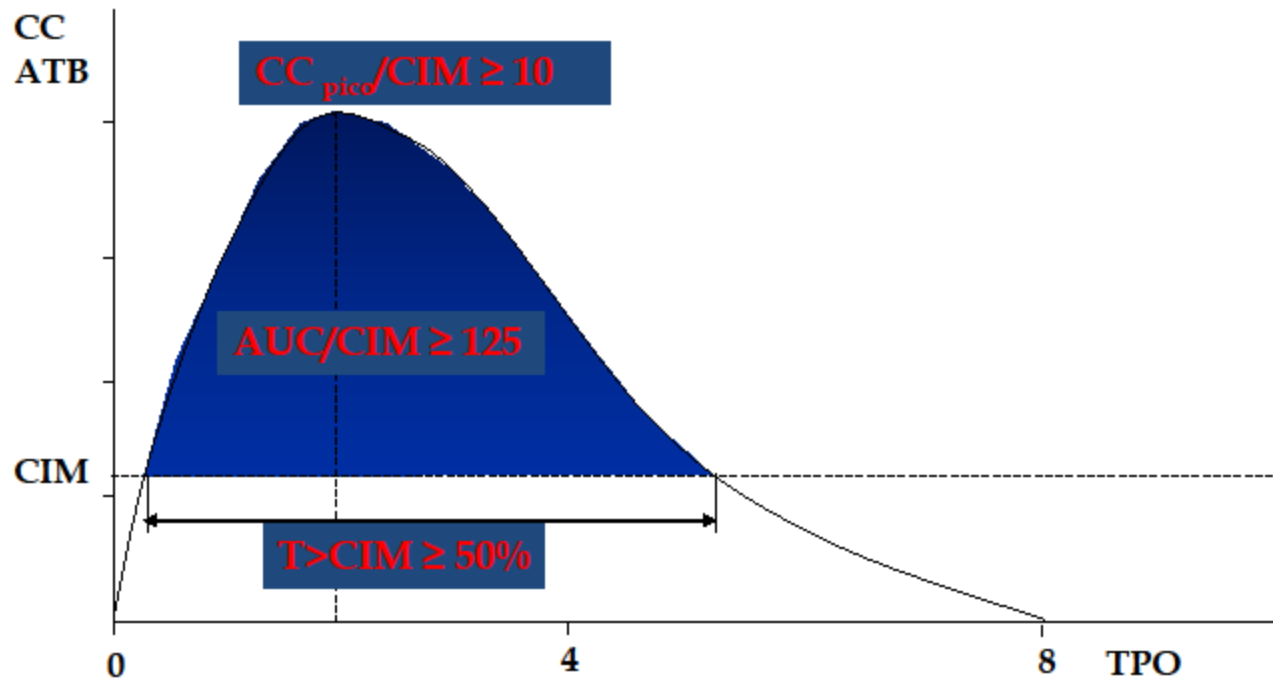
La demostración de antagonismo tiene excelente valor predictivo de evolución desfavorable



Interrelación HUESPED-ATB-BACTERIA



Parámetros PK/PD



Propiedades Farmacodinámicas de los antimicrobianos

Antibiótico	Tipo de bactericidia	Efecto	Parámetro
B-Lactámicos	Tiempo dependiente	Medio a moderado	T > CIM
Macrólidos			
Cotrimoxazol			
Clindamicina			
Oxazolidinonas	Tiempo dependiente	Prolongado	AUC₂₄/ CIM
Azálidos			
Estrptograminas			
Tetreciclina			
Vancomicina			
Fluorquinolonas	Concentración dependiente	Prolongado	AUC₂₄/ CIM Cp_{max}/CIM
Aminoglucósidos			
Metronidazol			
Cetólidos			

Sección Microbiología. Htal. Santojanni

Diagnóstico Microbiológico Indirecto:

detección de anticuerpos séricos

Agente etiológico	Método diagnóstico serológico
<i>Treponema pallidum</i>	IF (FTA-abs)/ HA (MHA- <i>Tp</i>) VDRL
<i>Brucella</i> spp.	Aglutinación/ ELISA
<i>Chlamydia trachomatis</i>	IFD/ELISA
<i>Leptospira interrogans</i>	Aglutinación
<i>Coxiella burnetti</i>	IFI

FC: Fijación de complemento IF: inmunofluorescencia HA: hemoaglutinación

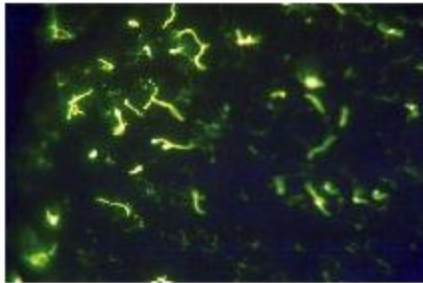
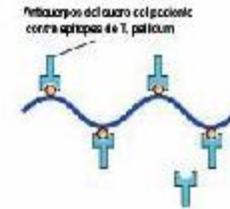
FTA-abs: Fluorescent Treponemal Antibody with absorption.

MHA- *Tp*: Microhemaglutinación del *Treponema pallidum*

Métodos Indirectos: Dx Sifilis

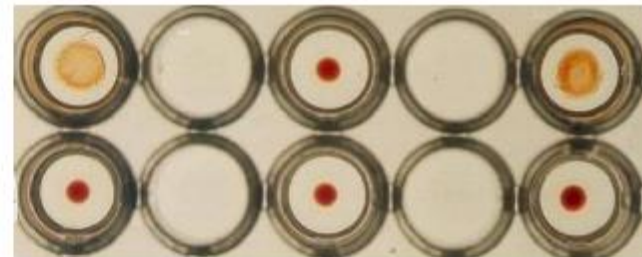
Por ello requiere de confirmación!!!!

- Detección de anticuerpos treponémicos



FTA-Abs (Fluorescence treponemal antibody absorption)

MHA-Tp (Micro hemagglutination assay for antibodies to *T. pallidum*)



EJEMPLO

NIÑO DE 3 AÑOS LLEGA A LA GUARDIA
CON LOS SIGUIENTES SINTOMAS:



VOMITOS

FIEBRE
ALTA (38 a
40°C)

FUERTE DOLOR DE
CABEZA

RIGIDEZ
DE NUCA

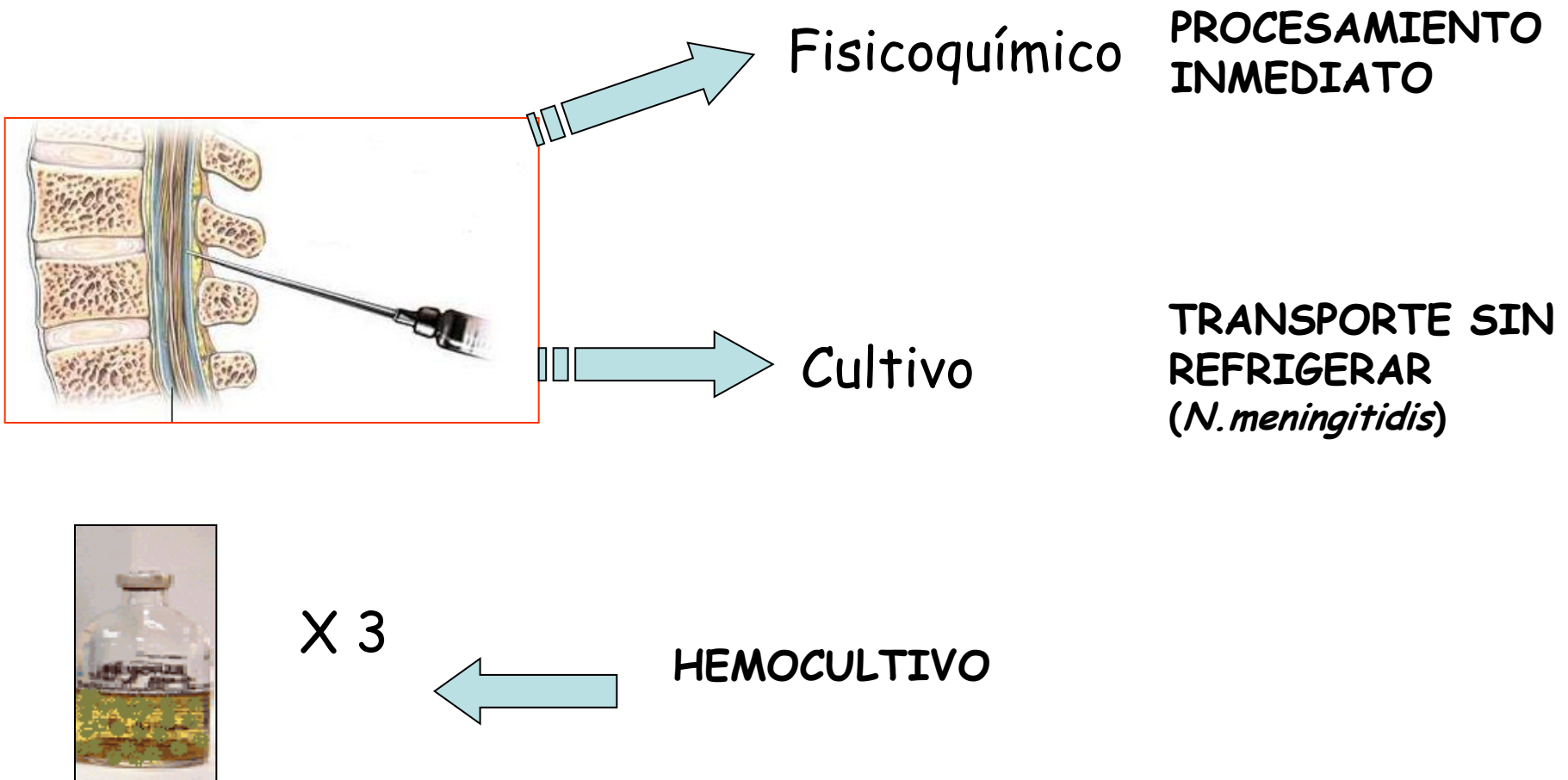
Y FOTOFOBIA



AL DIA CON EL CALENDARIO DE VACUNACION

Diagnóstico microbiológico de meningitis

Líquido cefalorraquídeo (2 tubos de ensayo)





SUBCULTIVOS



**Detección Visual: Turbidez ,
Formación de gas, de películas,
coágulos o pequeñas colonias en
los frasco**

**Resiembra a ciegas
menos de 24 h de incubación
y a intervalos hasta 7 días de incubación, sin
esperar la observación del desarrollo en el
frasco**

HEMOCULTIVOS AUTOMATIZADOS

INOCULACION DE LA MUESTRA

BOTELLA CON MEDIO DE CULTIVO
(aeróbico-anaeróbico-micobacterias-resinas)

DETECCION DEL DESARROLLO MICROBIANO (CO₂) CONTINUO
(radiométrico-espectrofotométrico-colorimétrico-fluorimétrico)

COMPUTADOR: Índice de crecimiento
Gráfico de crecimiento

Descarga de botellas
Tinción de Gram-resiembra

Eliminación de botellas
(sin subcultivo)



**SUBCULTIVO sólo
de hemocultvos positivos**

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

