

# METODOS-DE-DIAGNOSTICO-TEMA-9.pdf



botitas



**Métodos de Diagnóstico en el Laboratorio de Microbiología, Bioquímica, Hematología y Parasitología**



**4º Grado en Farmacia**



**Facultad de Farmacia  
Universidad de Alcalá**

antes



**Descarga sin publi  
con 1 coin**



Después

**WUOLAH**



Importante

Puedo eliminar la publi de este documento con 1 coin

¿Cómo consigo coins? → Plan Turbo: barato  
→ Planes pro: más coins

## TEMA 9 – DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. ANÁLISIS DE MUESTRAS CLÍNICAS

### GENERALIDADES DEL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

En laboratorio se pueden estudiar muestras de diferentes elementos: aguas, alimentos, aire, superficies y otros.

Además, se pueden tomar **muestras clínicas**, que van a ser competencia de laboratorios de microbiología y parasitología clínica. Estas muestras suelen tener una concentración de microorganismos patógenos mucho más elevadas ya que por lo general se van a tomar cuando se sospecha de una enfermedad.

Ambos tipos de muestras van a permitir la **prevención de enfermedades infecciosas**, determinar y controlar la **epidemiología**. Sin embargo, solo las muestras clínicas van a permitir determinar un **diagnóstico clínico**.

La epidemiología permite la prevención de epidemias tanto a nivel de la comunidad (adquisición de la enfermedad en la sociedad) como hospitalario (infecciones nosocomiales).

El diagnóstico microbiológico se lleva a cabo cuando el paciente presenta un **cuadro clínico**, presenta una serie de **síntomas** (subjetivos y sujetos a la percepción del paciente) y **signos** (manifestaciones objetivas). Se deben determinar las características del proceso, entre las que se encuentran el inicio del cuadro y la duración, ya que pueden ayudar a determinar el patógeno causal.

También se deben tener en cuenta una serie de **datos epidemiológicos** como son la edad, el trabajo, los hábitos, antecedentes (viajes, alimentos, contactos con enfermos o animales), enfermedades previas, la estacionalidad y la posible existencia de brotes.

El conocer el cuadro clínico que presenta el paciente y los datos epidemiológicos permite hacer la determinación de los **presuntos agentes etiológicos** que podrían causar la enfermedad.

Esta información es complementaria a la que se obtendrá después a raíz de la realización de un **diagnóstico microbiológico** mediante pruebas, técnicas y métodos de laboratorio a partir de diferentes muestras tomadas del paciente. Dependerá de:

- Posibilidades técnicas y económicas del laboratorio.
- Tipos de microorganismos que puedan estar implicados.
- Tipo de muestra.
- Momento del proceso infeccioso en el que se tome la muestra.

### TIPOS DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO:

#### DIRECTO:

##### Detección del microorganismo:

- Visualización: técnicas de **microscopía**.
- Aislamiento: **cultivo e identificación**.
- Detección de componentes:
  - o **Genoma**: PCR, hibridación.
  - o **Determinaciones antigénicas**: métodos inmunológicos.
  - o **Perfil proteico**: espectrofotometría de masas.
  - o Otros: determinación de **toxinas** (test de citotoxicidad o métodos inmunológicos) y de **ácidos grasos** (cromatografía).

#### INDIRECTO:

Detección de la respuesta inmunitaria del paciente, de los anticuerpos producidos, mediante **métodos inmunológicos**.

### PASOS DEL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO:

#### TOMA DE LA MUESTRA.

- **Lugar**: variable.
- **Momento**: evolución del momento del proceso infeccioso, dependiente del ciclo biológico del parásito. Se debe conocer si el paciente toma de antimicrobianos.
- **Calidad**: debe ser representativa, aséptica y se debe tener en cuenta la flora saprofita.
- **Recipientes**: en función de las necesidades del microorganismo que se va a recoger.

- **Cantidad:** variable en función del tipo de muestra.
- **Identificación:** muestra acompañada del etiquetado y volante correspondiente; así como los datos que se tengan del diagnóstico y del tratamiento.

Las muestras pueden ser estériles o contaminadas en función de la naturaleza y de la zona del organismo de la que provenga.

### TRANSPORTE DE LA MUESTRA.

Debe ser rápido, efectivo y realizarse en los recipientes o medios de transporte adecuados. Cuanto más tiempo pase desde la toma de la muestra hasta su llegada al laboratorio donde va a ser analizada, menor cantidad de microorganismos patógenos quedaran y mayor número de saprofitos aparecerán.

#### Medios de transporte:

- **Stuart:** contiene sales minerales, buffer y gelatina. Se emplea en el transporte de muestras tomadas con hisopo (nasales, exudados faríngeos o genitales) y de otras muestras ambientales. Este medio no favorece el crecimiento de MO a diferencia de otros, solo ayuda a mantenerlos viables.
- **Cary Blair:** contiene agua destilada, NaCl, fosfatos y gelatina. Se usa en el transporte de muestras fecales principalmente para el mantenimiento de las enterobacterias. Tampoco favorece el crecimiento de las bacterias.  
No requiere de refrigeración, por lo que es útil en el trabajo de campo.
- **Aimies:** es menos común, también usado en el transporte de las muestras fecales principalmente.

### RECEPCIÓN DE LA MUESTRA.

Se revisa si la recogida de la muestra ha sido eficaz y si es viable su estudio. Se inspecciona la muestra para determinar si la información recogida en el volante coincide con la misma. Si la información recogida en el volante o la muestra no se encuentra en condiciones óptimas para su estudio, la muestra se rechaza.

### PROCESAMIENTO.

Es dependiente de la muestra, del microorganismo y de la metodología propia de cada laboratorio.

Dentro de un laboratorio existen diferentes secciones:

- **Bacteriología:**
  - o Hemocultivo.
  - o Exudados.
  - o Orinas.
  - o Micobacterias.
- **Micología:** requiere aislamiento por la fácil diseminación de las esporas.
- **Virología.**
- **Serología.**
- **Parasitología.**

### EMISIÓN DE LOS RESULTADOS.

Se proporciona un diagnóstico definitivo y una recomendación terapéutica fundamentada en la resistencia a antibióticos del MO

### PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA





























1. Examen microscópico directo.
2. Cultivo:
  - o Medios.
  - o Inoculación.
  - o Incubación.
  - o Identificación.
3. Estudios de susceptibilidad.

#### EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO:

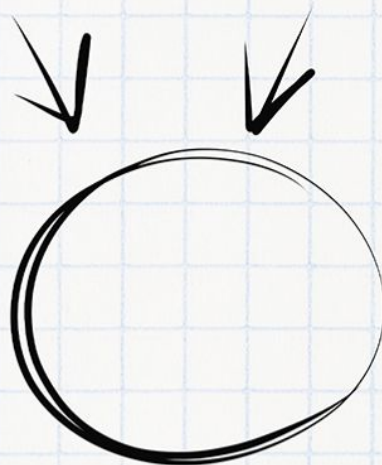
- **Aplicaciones:** el EMD permite la determinación de la calidad de la muestra e incluso en algunas ocasiones del MO causal. Además, se recurre a EMD para la identificación de los cultivos que permita determinar qué ha crecido en ellos.
- **Tipos de técnicas:** frescos y tinciones.

# Imagínate aprobando el examen

## Necesitas tiempo y concentración

Planes	 PLAN TURBO	 PLAN PRO	 PLAN PRO+
 Descargas sin publi al mes	10 	40 	80 
 Elimina el video entre descargas			
 Descarga carpetas			
 Descarga archivos grandes			
 Visualiza apuntes online sin publi			
 Elimina toda la publi web			
 Precios <span>Anual <input type="checkbox"/></span>	0,99 € / mes	3,99 € / mes	7,99 € / mes

Ahora que puedes conseguirlo,  
¿Qué nota vas a sacar?

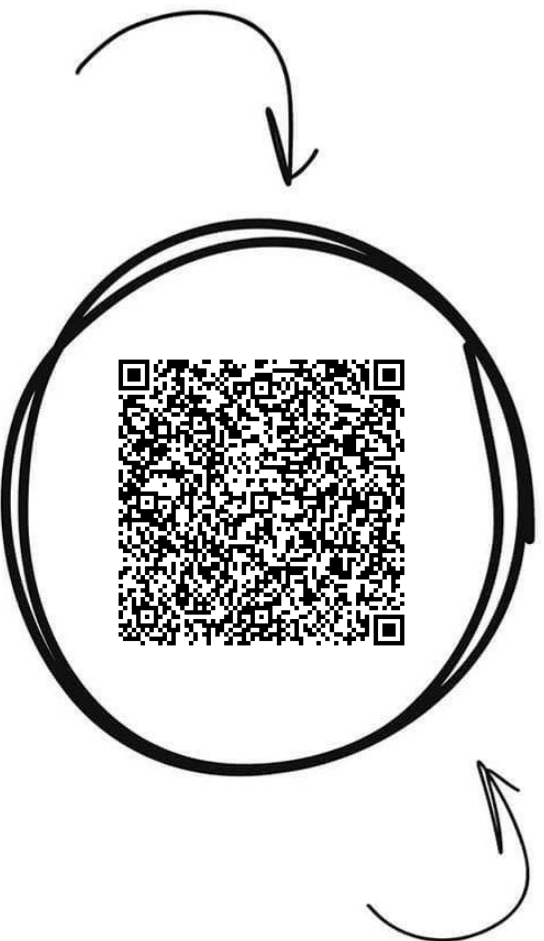


# WUOLAH

## Métodos de Diagnóstico en el...



**Comparte estos flyers en tu clase y consigue más dinero y recompensas**



**Banco de apuntes de la**

**WUOLAH**

**1** Imprime esta hoja

**2** Recorta por la mitad

**3** Coloca en un lugar visible para que tus compis puedan escanar y acceder a apuntes

**4** Llévate dinero por cada descarga de los documentos descargados a través de tu QR



- **Ventajas:** es rápida (técnicas de diagnóstico rápido) y económica.
- **Limitaciones:** no se pueden obtener conclusiones determinantes en muchos casos, sino que se obtiene un diagnóstico presuntivo. Hay ocasiones en las que ni siquiera se consiguen distinguir los MO de la muestra, es una técnica de baja sensibilidad. Además, se puede encontrar flora mixta que englobe los patógenos, por lo que la especificidad también es baja.

## TIPOS DE TÉCNICAS MICROSCÓPICAS:

### EXAMEN EN FRESCO:

Evaluación de microorganismos grandes eucariotas, por lo que se emplea un **aumento x40**. En las preparaciones en fresco se puede apreciar el **movimiento** propio de los MO, que si es peculiar y determinante, puede dar lugar incluso a un diagnóstico.

#### Microscopio de luz:

- **Montaje salino:** huevos, quistes y formas vegetativas de parásitos.
- **Montaje salino con KOH 10%:** ejemplo de tratamiento de muestras de piel en las que se sospecha de un hongo. KOH permite la destrucción de las células epiteliales para una mejor observación.
- **Montaje con tinta china:** ejemplo de observación de levaduras capsuladas en LCR, agentes causales de meningitis por *Cryptococcus neoformans*.
- **Montaje en solución de yodo de Lugol:** huevos y quistes de parásitos.
- **Montaje con azul de algodón-lactofenol:** ejemplo de observación de hongos en placas de cultivo.

#### Microscopio de campo oscuro:

- **Montaje salino:** ejemplo de observación de *Treponema pallidum*, agente causal de la sífilis. Se busca observar el movimiento de la espiroqueta, es de los pocos casos en los que se puede realizar un diagnóstico bastante preciso con la microscopía.

### TINCIONES:

La muestra se encuentra fijada, los microorganismos no son viables y por tanto no se observa movimiento. Las bacterias se van a observar con **microscopio de inmersión x100**.

Se consigue un diagnóstico presuntivo en función de la calidad de la muestra.

#### Microscopio de luz:

- **Tinción de Gram:** permite la distinción entre bacterias grampositivas (morado, cristal violeta) como *Staphylococcus aureus* y gramnegativas (rosado, safranina) como *Escherichia coli* o *Salmonella spp*.
- **Tinción de Ziehl-Neelsen:** observación de micobacterias, como por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis*. son bacterias ácido-alcohol resistentes por su pared celular rica en lípidos. El resto de MO se observan de azul o verde, mientras que las micobacterias se observan de color rojo.
- **Tinción Giemsa y Wright:** identificación de bacterias intracelulares como *Chlamydia* y estudio de análisis de sangre
- **Tinción PAS:** emplea ácido periódico y reactivo de Schiff, que permite la identificación de hongos como *Candida albicans* que se tiñen de rojo.
- **Tinción con azul de toluidina:** detección de algunos hongos y levaduras, también *Candida albicans* por ejemplo.
- **Tinción con plata:** identificación de diferentes estructuras en función del procedimiento seguido, por ejemplo se emplea en la identificación de *Helicobacter pylori*, que se observa teñido de color negro mientras que el fondo queda claro.

#### Microscopio de fluorescencia:

- **Tinción con naranja de acridina:** permite la visualización de ADN y ARN, por lo que es usada también en la detección de infecciones víricas.
- **Tinción con Auramina-rodamina:** complementaria a la tinción Ziehl-Neelsen. Se une a las bacterias ácido alcohol resistentes igualmente, pero va a permitir un procesamiento más rápido (de 30 min a 10 min).
- **Tinción con blanco de Calcoflúor:** identificación de hongos.
- **Tinción con isocianato de fluoresceína (FICT) unido a Ac monoclonales:** similar a las técnicas ELISA, es una técnica de inmunofluorescencia. Realmente no es una tinción. Se van a observar los MO de color verde.
-

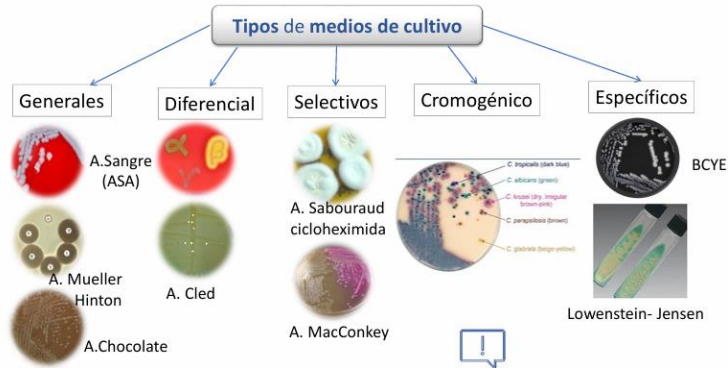
Importante

Puedo eliminar la publi de este documento con 1 coin

¿Cómo consigo coins? → Plan Turbo: barato  
→ Planes pro: más coins

## CULTIVOS

### TIPOS DE MEDIOS DE CULTIVO:



Se debe conseguir el crecimiento del mayor número posible de MO con el mínimo número de medios. Con la ayuda del diagnóstico presuntivo se determinan los MO más comunes o probables.

Medios generales: no hay especificidad, crece cualquier MO

- **Agar sangre:** actúa como medio diferencial ya que permite la clasificación de los MO en función de la capacidad de hemólisis.
  - o Beta: capacidad alta de hidrólisis de los hematíes. Se consideran hemolíticos.
  - o Alfa: degradación intermedia.
  - o Gamma: no causan degradación.
- **Agar Cled:** actúa como medio diferencial porque permite distinguir entre MO que fermentan o no la lactosa, lactosa + o lactosa -. Es usado principalmente en el cultivo de muestras de orina.
- **Agar Mueller Hinton:** usado en realización de antibiogramas.
- **Agar chocolate:** similar al agar sangre, pero se produce la lisis de los eritrocitos y salen al exterior. Se emplea en el cultivo de *Haemophilus spp*, *Neisseria spp*, o *Streptococcus pneumoniae*. Contiene factores de crecimiento de distintos tipos (factor hemo, factor V o NAD y factor X o hemina) y los GR se encuentran lisados en este medio.

Medios selectivos: permiten el crecimiento de algunos MO e impiden el de otros.

- **Agar Sabouraud:** permite el crecimiento de hongos e inhibe el de bacterias (contiene antibióticos). Si se combina con Clorhexidina, solo se va a permitir el crecimiento de hongos dermatofitos, causantes de tiñas.
- **Agar MacConkey:** es selectivo para bacterias Gram -, principalmente enterobacterias. Además distingue entre lactosa + y -.
- **Agar manitol salado y Chapman:** el primero de ellos es selectivo para estafilococos y el segundo diferencial para *Staphylococcus aureus*.
- **XLD:** selectivo y diferencial, se emplea en el crecimiento de enterobacterias, principalmente *Salmonella spp*, y *Shigella spp*.

Medios específicos: diseñados específicamente para el crecimiento de un tipo o género de MO. A pesar de que puedan crecer otros MO, cuenta con los nutrientes y características específicas que requiere uno en concreto. Hay que tratar la muestra previamente para eliminar la flora saprofita.

- **BYCE:** crecimiento de *Legionella spp*. por su contenido en carbón activo. Se añaden también inhibidores de la flora saprofita.
- **Lowenstein-Jensen:** crecimiento de micobacterias (*Mycobacterium tuberculosis*). No se trata la muestra previamente en este cultivo, por lo que podrá crecer también la flora presente en la muestra.

Medios enriquecidos: permiten el crecimiento de MO en poca cantidad en muestras contaminadas. Por ejemplo son usados para el crecimiento de *Salmonella spp*. en muestras fecales con alto contenido de *E. coli*.

Medios cromogénicos: mediante la adición de sustratos cromógenos que reaccionan con enzimas específicas producidas por ciertas bacterias, se da un cambio de color en las colonias que puede ayudar a distinguir entre diferentes especies bacterianas de manera rápida y sencilla. Puede usarse por ejemplo en la distinción del crecimiento de colonias de *Candida spp*.

### INOCULACIÓN:

WUOLAH

Va a depender de varios factores:

- Consistencia de la muestra: líquida, semilíquida o sólida.
- Origen de la muestra: se valora si se requiere de la realización de un recuento o aislamiento, así como un tratamiento previo de la muestra anterior a la siembra.
  - o **Estéril**: sangre, LCR, orina o líquido articular.
  - o **No estéril**: piel, heces, mucosas respiratorias o exudados. Requieren pretratamiento de la muestra en ocasiones.
- Tipo de medio de cultivo: si se realiza sobre un cultivo **líquido, semisólido o sólido**, en el último caso requiere de extensión.
- Tipo de siembra:
  - o **En césped**: en antibiogramas. El organismo crece en toda la superficie menos en el halo de inhibición en caso de que presente sensibilidad al antibiótico que se estudia.
  - o **Por picadura**: como ejemplo, en el medio KIA.
  - o **Por agotamiento**: con el objetivo de conseguir colonias aisladas.
  - o **Siembra con asa calibrada**: en orina ya que la muestra se puede contaminar con flora del paciente al estar en contacto con la uretra, por lo que se debe hacer un recuento para valorar su calidad.
  - o **Siembras semicuantitativas**.

## INCUBACIÓN:

### Temperatura:

Dependiendo de los MO de los que se sospechen, la incubación se llevará a cabo, generalmente:

- 35-37 °C: mayoría de los MO.
- 25°C: hongos y *Listeria spp.*
- 40°C: *Campilobacter spp.*

### Atmósfera:

La atmosfera variará en función de las necesidades del MO:

- Aerobiosis (CO<sub>2</sub>): mayoría de los MO.
- Anaerobiosis.
- Microaerobiosis.

### Tiempo:

Los distintos MO son variables en el tiempo de crecimiento:

- 24 horas.
- 48-72 horas.
- 1 semana.
- 15-30 días. Es el caso de *Mycobacterium tuberculosis*.

## IDENTIFICACIÓN:

1. Observaciones macroscópicas y microscópicas de las colonias: por ejemplo, en el caso del cultivo en agar sangre se observa si hay alfa hemólisis, beta hemólisis o ningún efecto (gamma hemólisis), todos ellos observables macroscópicamente. La observación microscópica consiste en realizar una tinción de Gram para tratar de determinar la bacteria.
2. Pruebas bioquímicas: permiten una lectura inmediata o tras un proceso de incubación que distingue entre grandes grupos de bacterias.

### **LECTURA INMEDIATA:**

- o **Oxidasa**: identificación de la enzima citol oxidasa, si la bacteria la produce el reactivo se oxida y torna a un color morado o azul oscuro.
  - Son oxidasa +: *Pseudomonas* y *Neisseria*.
  - Son oxidasa -: enterobacterias como *Salmonella spp* o *E. coli*. Se usa principalmente esta prueba para la diferenciación de enterobacterias de otros MO Gram -.
- o **Catalasa**: se realiza añadiendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, si la bacteria es capaz de descomponerlo, aparecerán burbujas.
  - Los MO Gram + forman burbujas, como es el caso de *Staphylococcus* o *Pseudomonas*, prueba catalasa +.

- Los MO Gram – no forman burbujas, como es el caso de *Streptococcus* y *Enterococcus*, prueba catalasa -.

- **Agarasa:** capacidad de hidrólisis del agar.

#### NECESITAN INCUBACIÓN:

- **Serie cortas:** distinguen los MO más frecuentes rápidamente. Se usan por ejemplo coagulasa (plasma de conejo) para identificación de *Staphylococcus aureus* (Gram +).
- **Serie largas:** APIS cartones con pocillos en los que en el fondo se tiene el sustrato enzimático y se inocula una suspensión bacteriana para determinar si es positiva para determinadas pruebas. Permite la realización de unas 20 pruebas simultáneas.
- **Lectura automatizada:** lectura automatizada de series largas, la incubación de las bacterias en los cartones se observa en un ordenador.
- **Sensibilidad a antibióticos:** aparición de halos de inhibición del crecimiento de las bacterias sensibles a determinados antibióticos. También pueden realizarse pruebas de factores hemáticos. Permiten la diferenciación de grandes grupos de bacterias:
  - Bacitracina: es sensible a el *Streptococcus pyogenes*. En agar sangre.
  - Factores hemáticos V y X: *Haemophilus influenzae*, sin estos factores no puede crecer en agar sangre

3. **Pruebas inmunológicas:** detección de determinantes antigénicos del MO crecido o búsqueda de características concretas del genoma. Se pone la bacteria frente a un Ac monoclonal determinado para el Ag que se busca.

- **Aglutinación de látex:** Se une el reactivo (Ac específico) a la bacteria (Ag) y si hay aglutinación en un minuto se considera positiva. Un ejemplo sería la determinación de *Staphylococcus aureus* con Ac específicos contra la proteína A.
- **Immunofluorescencia:** determinación con Ac monoclonales marcados con un fluorocromo o con una enzima.
- **Enzimoimmunoanálisis.**

4. **Pruebas moleculares:**

- **Detección de una secuencia del genoma** mediante sondas de hibridación.
- **Secuenciación del genoma o un gen** determinado específico del MO (ARNr)
- **Identificación de los fragmentos de restricción:** se extrae el genoma y se identifican fragmentos de restricción en un gel de agarosa (RPLF).

5. **Pruebas proteómicas: Maldi Tof.**

Permiten la identificación de MO. Se comenzó usando para identificar bacterias y hongos, pero actualmente también es eficaz para la identificación de virus.

En una placa se colocan todas las que se quieren identificar y se colocan en una matriz, en minutos se obtiene la identificación de todas. Por esta técnica también se trata de identificar en las muestras directamente.

La muestra se ioniza con un láser y los iones suben o bajan dando lugar a un diagrama que se pasa a una base de datos para determinar las posibles bacterias. Las primeras que se identifican son las especies de menor masa y los últimos los de mayor masa, se obtienen picos más o menos altos dependiendo de la cantidad que hay de esa especie iónica y se compara el perfil proteico con las bases de datos.

Si se aísla una bacteria que no se encuentra en la base de datos de las cepas modelo, no se va a poder determinar el MO. También hay bacterias muy similares en su huella proteómica, por lo que hay identificaciones que no son muy sensibles, es el caso de *Shigella* y *E.coli*.

#### Caso 1:

En las tres últimas 3 semanas en una planta de Cirugía General han aparecido 5 casos de infección de herida quirúrgica. En todos los casos se ha aislado el exudado y/o del hemocultivo:

- Cocos grampositivos, crecen en ASA, colonias betahemolíticas y en agar Chapman fermentando el manitol (selectivo para *Staphylococcus*.). Son catalasa y coagulasa positivos.
- Resistentes a metilina (betalactámico)

#### Identificación del agente causal:

- Catalasa positivo: *Staphylococcus spp.*
- Coagulasa positivo: *Staphylococcus aureus*
- Resistente a la metilina: *Staphylococcus aureus*

Importante

Puedo eliminar la publi de este documento con 1 coin

¿Cómo consigo coins? → Plan Turbo: barato  
→ Planes pro: más coins

Cómo actuar con los pacientes: aislamiento total para no trasladar la bacteria, no generar más infecciones por contacto.

Cómo estudiar el brote:

Hay que buscar a los portadores. No tiene por qué tratarse una única cepa de *Staphylococcus aureus* metilina resistentes, se deben tipificar por pruebas genómicas. Se identifican las bacterias aisladas a nivel de cepa para conocer el origen del brote.

Análisis de los fragmentos de restricción del genoma de las posibles cepas de cada paciente. En el gel de agarosa se observa:

- Carriles 1 y 10: marcadores de pesos moleculares. Control.
- Carril 2: es un paciente con una infección pasada que tuvo lugar el año pasado por *S. aureus* metilina resistente. Se estudia un paciente del año anterior para comprobar si las cepas que han podido quedar con flora autóctona del hospital.
- Carriles del 3 al 7: casos actuales
- Carriles 8 y 9: personal que trata a los enfermos aislados, se determinan ambos portadores.

La sonda de la muestra del año pasado tiene una raya más, por lo que no es una cepa que haya quedado en el hospital, sino que es una nueva.

Las de las infecciones actuales son la misma cepa, pero no son la misma que la del año pasado.

En el 8 (portador), no se observa una de las bandas, por lo que no es el origen del brote; pero 9 si tiene las mismas bandas que el resto, por lo que ha podido ser el origen de este brote.

Se deben tratar a los pacientes enfermos y aislar a los sanitarios portadores para que no estén en contacto con los pacientes.

ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD O SUSCEPTIBILIDAD:

Antibiograma de difusión en agar (Kirby Bauer): semicuantitativo.

Se siembra en césped y se colocan discos de antibióticos con una concentración conocida que difiere dependiendo del MO. Se incuba y el antibiótico difunde, cuando la concentración del antibiótico no puede inhibir el crecimiento del MO, se corresponde con el límite del **halo de inhibición**. Se mide el halo y se compara en tablas para determinar si el MO es sensible, intermedio o resistente al antibiótico.

El halo también depende de la capacidad de difusión del antibiótico a parte de la resistencia del MO.

Antibiograma de dilución:

Se realiza macrodilución (tubos) o microdilución (placas). Se realiza una dilución del antibiótico y se añade una concentración conocida del MO en todos los tubos o placas. En el control crecerá y probablemente también las concentraciones más bajas del antibiótico, se determina hasta en qué concentración crece.

Se obtiene la **concentración mínima inhibidora (CMI)** en mg/ml, se conoce si es sensible o resistente, así como si se puede acabar con el MO sin que sea tóxico en el lugar de acción en el organismo del paciente.

Es un método usado en casos de miocarditis ya que se tienen que apurar las concentraciones. Se cuenta con métodos automatizados ya que es bastante tedioso y no muy usado por este motivo.

E-test:

Auna los métodos. Se ponen tiras de antibiótico que van disminuyendo de concentración desde fuera hacia dentro de la placa. Se siembra y se colocan las tiras, se forma una **elipse de inhibición** tras la incubación. La base de la elipse coincide con una concentración concreta de la tira que será la CMI, en mg/ml.

Métodos moleculares: búsqueda de genes de resistencia.

Puede ser insuficiente, solo se hacen con respecto a un grupo de fármacos, por lo que pueden presentar resistencias a otros fármacos no estudiados. No es muy usado. Se usa en casos específicos como *Mycobacterium* metilina resistentes o en casos en los que ha crecido una bacteria en un hemocultivo y hay que determinar si es resistente a algo en concreto.

Procedimientos	Bacteriología	Micología
1. Examen microscópico directo	24h	48h*
2. Cultivo		
3. Identificación	24h	24h *
4. Pruebas de susceptibilidad		
5. Análisis de los resultados y emisión de los resultados		
Tiempo total	48h *	3 días

\*Tiempo estimado para bacterias de crecimiento rápido. Puede llegar a 72 h - >15días

\*Tiempo estimado para levaduras y hongos ambientales. Puede llegar a 30 en hongos dermatofitos

En el mejor de los casos, se tardarán 48h en tener un diagnóstico, pero se pueden prolongar hasta un mes (*Mycobacterium*).

En hongos, puede retrasarse incluso más (hongos dermatofitos, causantes de las tiñas como pie de atleta).

## VIROLOGÍA

Técnicas muy caras que necesitan personal especializado, no se encuentran en todos los hospitales.

1. Examen microscópico directo: solo en microscópico electrónico.
2. Cultivo. Condiciones aún más estrictas que las de las bacterias. Los cultivos celulares se contaminan mucho más fácilmente por lo que se debe trabajar en campanas asépticas.
3. Estudios de sensibilidad.

### CULTIVO:

Los medios de cultivo son siempre medios celulares.

### CULTIVOS CELULARES:

- Células diploides (fibroblastos): 60-80 pases, se separan las células en fases para mantener los cultivos celulares, soportan la infección de pocos virus.
- Líneas continuas (a partir de tumores de pulmón, cancer de mama o selección de laboratorio): pases infinitos si se conservan bien, los receptores de los órganos diana de diferentes virus son específicos, por lo que se necesitan distintos tipos de líneas celulares.

### MUESTRAS:

Requieren un tratamiento previo. Por ejemplo con LCR, no se puede inocular directamente en la línea celular debido a que podrían crecer cualquiera de los otros elementos viables en la muestra, sobre todo ocurre esto en heces. Para evitar la proliferación de las bacterias y que únicamente se cultiven los virus se usa un filtro de tamaño muy pequeño que retenga las bacterias.

Los virus no se nutren del líquido que se encuentra por encima de las células, sino que es del que obtienen los nutrientes las células.

### INCUBACIÓN:

Tª 35-37 °C, aerobiosis con pequeño % de enriquecimiento de CO<sub>2</sub> y se mantienen los cultivos celulares de 2 a 15 días. Es independiente del virus que se cultive porque las condiciones deben ser las óptimas para las células.

### IDENTIFICACIÓN:

La capa de células se rompe, aparece un efecto citopático. Se realizan métodos de identificación como la hemoaglutinación, métodos inmunológicos y métodos genómicos para asegurar el diagnóstico.

### ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD:

Resistencia a antiviricos

Procedimientos	Virología
1. Examen microscópico directo	48 h -15 días
2. Cultivo	
3. Identificación	24 h a 72h- 15 días
4. Pruebas de susceptibilidad	
5. Análisis de los resultados y emisión de los resultados	
Tiempo total	48h *- 30 días



\*Mínimo tiempo teniendo virus de crecimiento rápido

**Shell-vial:** viales en los que se consigue aislar los virus.

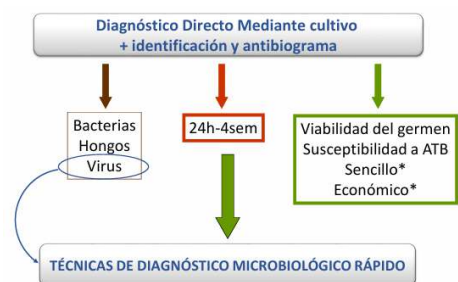
Consiste en tubos de pequeño tamaño, en el fondo hay un cristal similar a un cubre donde se depositan las células. Se inocula la muestra y se absorbe el virus por la centrifugación de los viales para acelerar el proceso. Se añade el medio de cultivo y se busca la producción de las proteínas tempranas reguladoras del ciclo del virus. En este punto se pueden detectar con Ac monoclonales, no hace falta esperar a que crezca el virus. Se acelera la detección.

#### MÉTODOS RÁPIDOS Y COMPARACIÓN CON EL DIAGNÓSTICO DIRECTO:

El diagnóstico directo mediante cultivo tiene como **desventaja el tiempo**, ya que puede prolongarse incluso un mes. Los diagnósticos deben obtenerse lo más rápido posible, por ello se han desarrollado las técnicas con métodos rápidos.

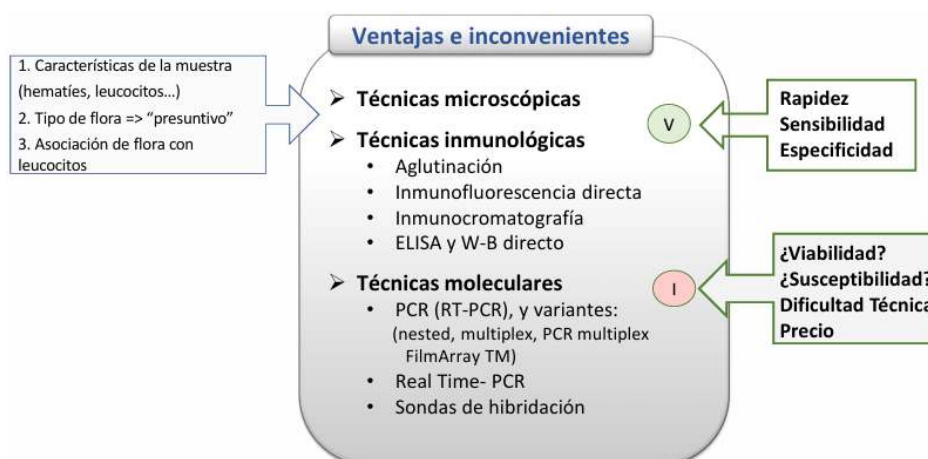
#### Ventajas del diagnóstico directo:

- Informa de la viabilidad del germen.
- Informa de la susceptibilidad a antibióticos.
- Es relativamente sencillo y económico.



#### MÉTODOS RÁPIDOS:

- **Microscopia:** en ocasiones no es lo suficientemente específico como para realizar un diagnóstico fiable.
- **Técnicas moleculares** (genoma): detección de un gen concreto que se amplifica o varios, depende. Hay varias técnicas de PCR distintas.
- **Técnicas inmunológicas** (Ag): detección en diferentes muestras.
  - o Inmunofluorescencia: exudado de chancro para determinar la sífilis.
  - o Inmunocromatografía: diarrea vírica, muestra de heces que determina rápidamente entre los parásitos más probables
  - o Técnicas de aglutinación: detección de meningitis en LCR, *Legionella spp.* en orina o *S. aureus*.



Importante

Puedo eliminar la publi de este documento con 1 coin

¿Cómo consigo coins? → Plan Turbo: barato  
→ Planes pro: más coins

## SEROLOGÍA

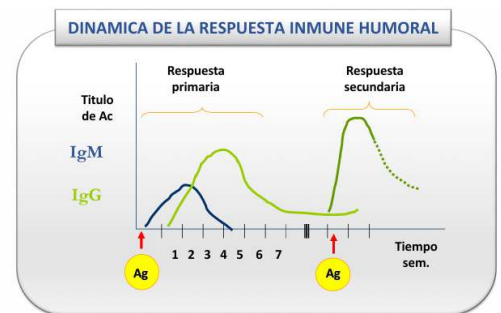
Es un diagnóstico inmunológico indirecto, determinando Ac en muestras de suero principalmente (también LCR).

Engloba las siguientes técnicas:

- ELISA indirecto.
- Inmunofluorescencia.
- Inmunocromatografía.
- Enzimoimmunoensayo.
- Western-blot indirecto.
- Otros: **aglutinación, FC** (fijación de complemento, actualmente no usada).

La metodología (cuantitativa o semicuantitativa) consiste en la generación de Ac frente a un Ag preparado. Se fija el Ag en un soporte sólido como un prota y se añade la muestra. Si el suero añadido contiene Ac específicos para el Ag se revelará la unión con un conjugado anti-IgM o anti-IgG (en función de si se trata de RI primaria o secundaria) que va a estar marcado con fluoresceína, con una enzima u otras sustancias en el caso de la inmunocromatografía.

En el caso de la técnica de aglutinación (cualitativa), el soporte son partículas de látex y la presencia de Ac se confirma por una reacción de aglutinación. Un ejemplo sería la rosa bengala, un reactivo empleado en la detección de *Brucella burgdorferi*.

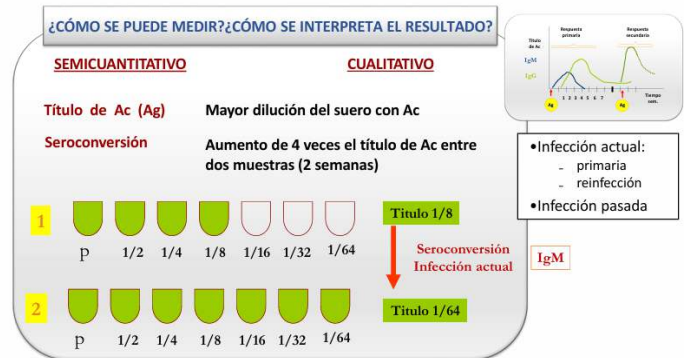


## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

**Cualitativo:** aglutinación, presencia o no de Ac.

**Semicuantitativo:**

- Título de Ac. la máxima dilución de suero en la que se encuentran Ac.
- Seroconversión: aumento de 4 veces el título de Ac entre dos muestras tomadas con 2-3 semanas de diferencia. Permite conocer cuándo se produjo la infección. El paso de un título de 1/8 a 1/64 se considera significativo y por tanto se determina una infección actual.



El problema reside en el tiempo que se debe esperar entre la toma de una muestra y otra, por lo que otra opción sería la determinación de IgM para conocer si se trata de una infección primaria o no.

**Sensibilidad:** % de individuos enfermos con test positivos.

**Especificidad:** % de individuos sanos con test negativos.

Cuando se realizan pruebas de cribado, por ejemplo en bancos de sangre, se deben usar pruebas sensibles para detectar cualquier suero en el que haya patogenicidad. Sin embargo, a la hora de realizar pruebas de confirmación de diagnóstico, deben ser específicas:

- Falsos negativos: por cantidad de Ac mínima, no puede detectarse, error técnico.
- Falsos positivos: reacciones cruzadas, por ejemplo por epitopos muy similares como flagelina y bacterias con flagelos.

## WESTERN BLOT:

Técnica muy específica de confirmación. Tiene muchos determinantes antígenicos. Se realiza una separación de proteínas mediante electroforesis, se transfieren a bandas de PDVF o nitrocelulosa y sobre estas se hace un ELISA indirecto. Se observan los Ac que tenía el paciente frente a determinados Ag.

WUOLAH