

TESTS RÁPIDOS EN MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS

Carmen M. Cabrera
Servicio Microbiología

- Muestras: **respiratorio**
S. pyogenes
Virus respiratorio sincitial

*Técnicas
rápidas de
detección de Ag*

- Muestras: **heces**

Rota/adenovirus

Crypto/Giardia

Helicobacter pylori

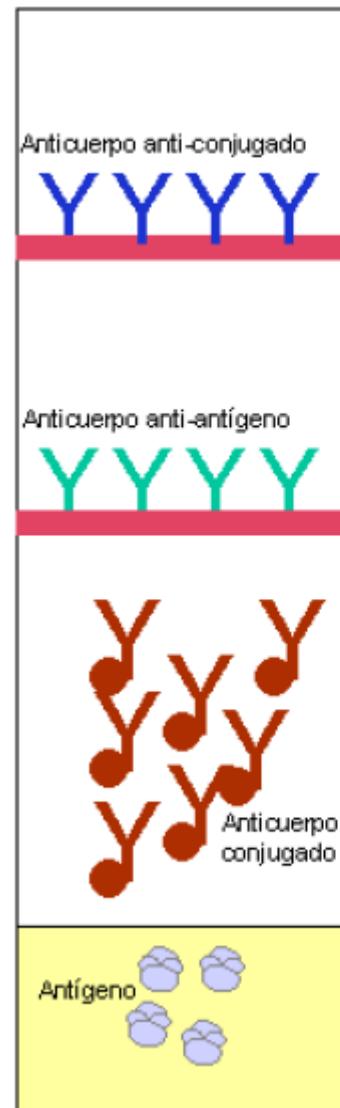
Clostridium difficile

Procedimientos de la SEIMC 2005

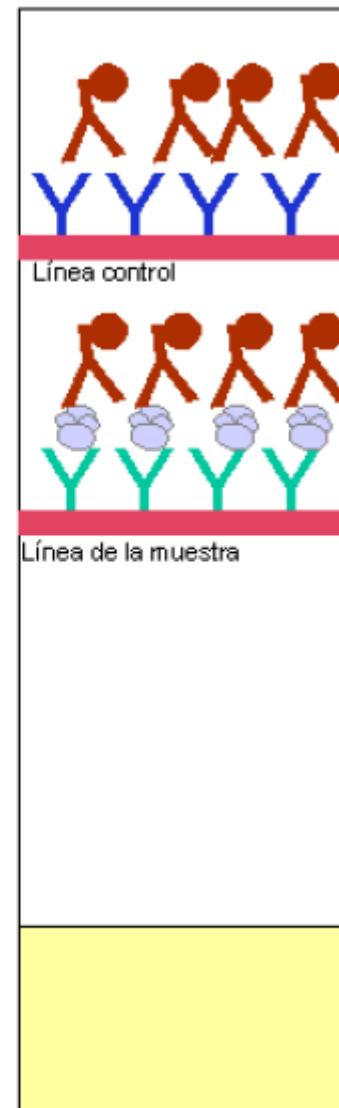
*Sociedad Española de
E. Infecciosas
y M. Clínica*

Inmunocromatografía

Ab-anti conjugado



Ab-anti Ag



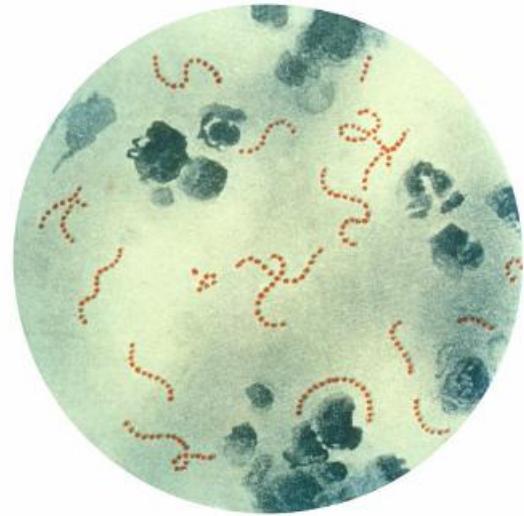
Línea control

Línea de reacción

Ventana de muestra

A.1 EXUDADO FARÍNGEO: Streptococo del grupo A

- ***Streptococcus pyogenes***, bacteria gram + que crece formando cadenas de cocos.
- Pertenece al grupo A de Lancefield (GAS). Presenta hemólisis tipo-β en cultivo de agar sangre.
- Anaerobio facultativo; catalasa negativo; y sensible a **bacitracina** (prueba para su identificación).
- **Produce diversas enfermedades supurativas** (**faringitis**, escarlatina, pioderma, erisipela, celulitis, fascitis necrosante, S. del shock tóxico); y **no supurativas** (fiebre reumática, y glomerulonefritis aguda).
- **Factores de virulencia:** cápsula, proteína M, estreptolisinas S (b-hemólisis) y O (detección de ASLO), estreptoquininas, ADNasas, hialuronidasa, etc.



S. Pyogenes

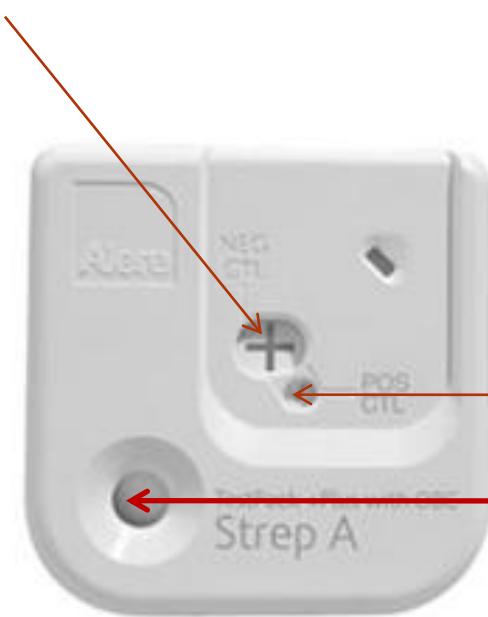


- **FARINGITIS:** *S. pyogenes* es la causa más frecuente de faringitis. Aparece entre 2-4 días después de la exposición con dolor brusco de garganta, fiebre, malestar general y cefalea.
- El diagnóstico de exclusión se hace con las **faringitis víricas** a través de pruebas serológicas y bacteriológicas.
- **Test rápido:**
 - Torunda **SIN medio de transporte**.
 - Toma de muestra de exudado faríngeo.



- Test inmunocromatográfico de detección cualitativa del Ag de grupo A (hidrato de carbono: dímero de **NAG y ramosa**; 10% del peso seco de la célula).

Ventana de resultado



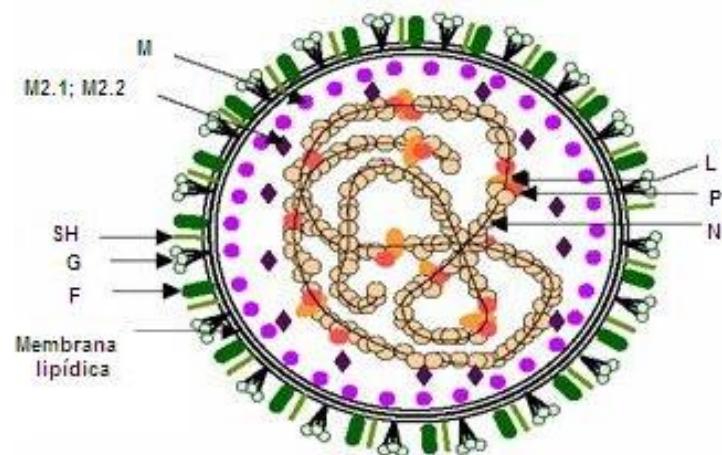
Test de Alere: con 2 reactivos de extracción para el Ag-A en tubo, y un tercer reactivo de neutralización.

Control de extracción

Pocillo de muestras

A.2 Virus respiratorio sincitial (VRS)

- Pertenece a la Familia de los **Paramixovirus** (RNA de cadena sencilla -), Género: **Pneumovirus**; **virus con envoltura**.
- **Envoltura con dos glicoproteínas:** Proteína F (fusión), y proteína G (glicoproteína de función desconocida).
- Produce el **50% de las bronquiolitis, y el 25% de las neumonías en niños menores de 2 años**.
- En España produce de entre 7.000 a 14.000 hospitalizaciones pediátricas; y entre 70-250 fallecimientos al año.



- Son los virus que más precozmente infectan al recién nacido, **y no confieren inmunidad**.
- En el adulto producen infecciones similares a un resfriado común. A excepción de los **cardiópatas con hipertensión pulmonar, inmunodeprimidos** produciendo cuadros de bronquiolitis.
- **Test rápido:**
- **Muestra de lavado nasal:** se recoge en un tubo estéril un mínimo de 1 ml (remitir al laboratorio en menos de 30 minutos).
- **Muestra nasofaríngea:** se hace la toma con torunda de una fosa nasal hasta llegar a la nasofaringe, procurando desprender células epiteliales. La torunda se introduce en el medio de transporte UTM, pueden conservarse refrigeradas hasta 24 horas.

UTM



- Ensayo inmunocromatográfico cualitativo, de detección de la proteína **F (fusión)** del virus.



Se depositan 100 µl de muestra en el dispositivo de prueba

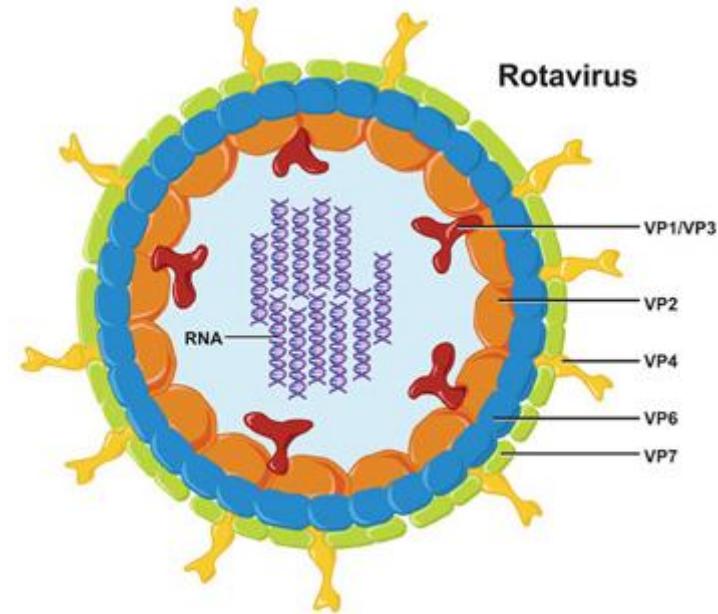


B.1 Rotavirus/Adenovirus

- La infección por rotavirus, y por adenovirus representan la **1^a y 2^a causa más frecuente de gastroenteritis aguda no-bacteriana en niños de 6 meses hasta los 3 años.**
- **Gastroenteritis aguda por Rotavirus:** diarrea líquida con deposiciones abundantes sin sangre; con curso febril; ausencia de leucocitos en el examen microscópico. *Invasión del virus de los enterocitos del epitelio duodenal.*
- **Gastroenteritis aguda por Adenovirus:** *diarrea inflamatoria del colon;* deposiciones frecuentes y poco voluminosas; a menudo con fiebre. La diarrea puede contener sangre o moco.

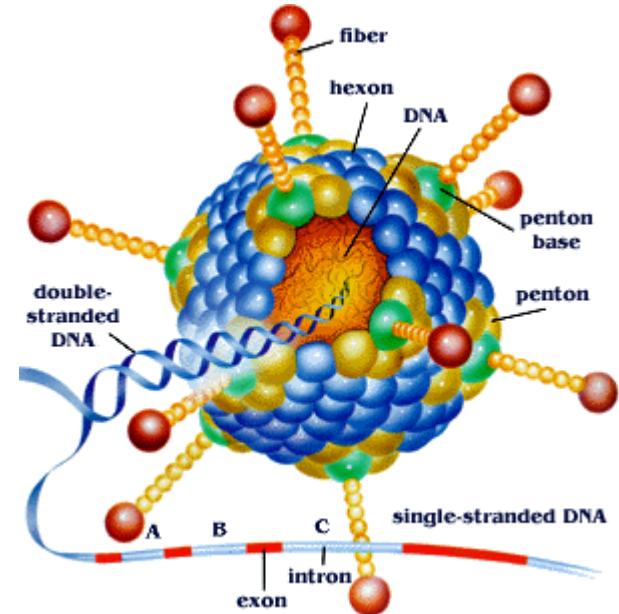
ROTAVIRUS

- **Familia de los Reovirus** (virus no envueltos con doble nucleocápsida, y de 10 a 12 fragmentos de RNAdc).
- **50% de los ingresos hospitalarios por GEA en los niños.**
- En los países en vías de desarrollo es un **grave problema sanitario**, originando un gran número de muertes por deshidratación (1 millón de muertes anuales).
- En los países desarrollados se producen **brotes epidémicos en otoño-invierno**.
- Rotavirus del **tipo A (VP6)** más frecuente afecta a niños y adultos (diarrea leve).



ADENOVIRUS

- Virus de DNA de doble cadena, virus sin envoltura.
- Son responsables del 15% de las gastroenteritis agudas en niños hospitalizados.
- ***Los serotipos entéricos son 40, 41, 42: adenovirus entéricos (grupo F).***



Muestra:

- Recolección de una muestra de heces dentro del **tiempo de excreción máxima de los virus**: entre **3 a 5 días** de comienzo de los síntomas de GEA para el **rotavirus**; entre **3 a 10 días** para el **adenovirus**.
- **Niños menores de 5 años.**
- Resuspender la muestra en tampón fosfato; y transferir unos 80 µl (2 o 3 gotas de suspensión) en el dispositivo.
- Test immunocromatográfico cualitativo.



Recogida en recipiente de boca ancha sin conservantes



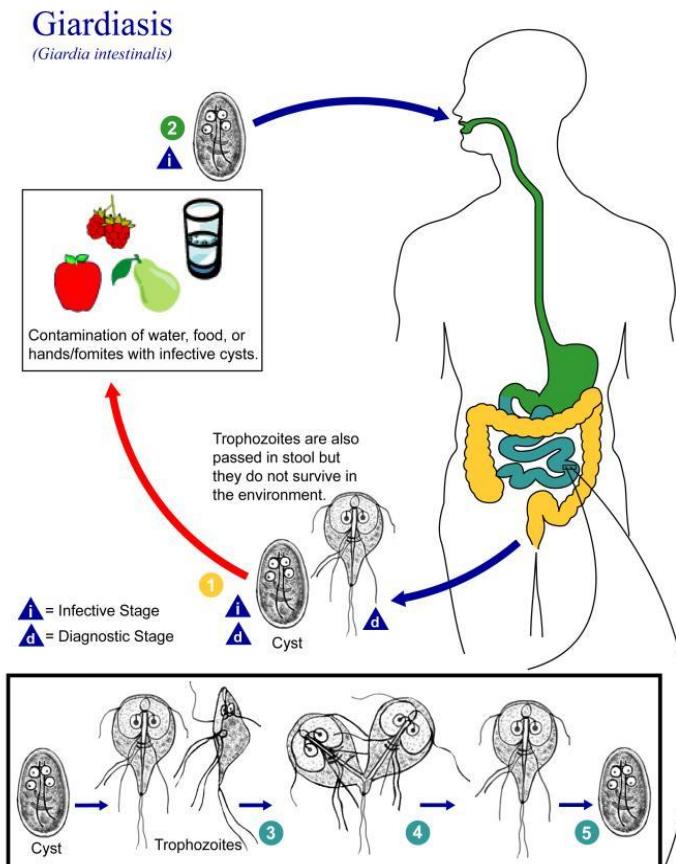
B.2 Crypto/Giardia (*Cryptosporidium spp.*; *Giardia lamblia*)

- **Son los protozoos intestinales más frecuentes productores de gastroenteritis agudas.**
- Cosmopolitas, de amplia distribución mundial. Transmisión oral-fecal de aguas contaminadas.
- Afectación **a nivel del duodeno** con cuadros sintomáticos de diarrea líquida sin sangre.
- ***Giardia lamblia*, *intestinalis*, o *duodenalis*** pertenece al grupo de los Flagelados.
- ***Cryptosporidium spp.*** Pertenece al grupo de los Coccidios.



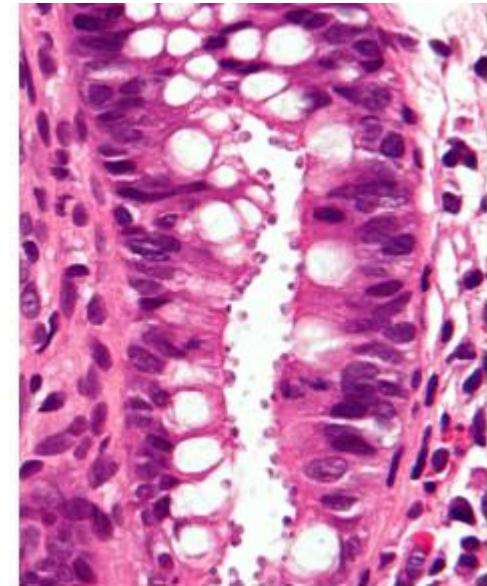
Giardia lamblia

- Tiene dos formas de vida en su ciclo de vida.
- **Trofozoito:** piriforme con 20 μm de longitud y 15 μm de ancho, con 8 flagelos y 2 núcleos. *Forma vegetativa que se alimenta y se reproduce.*
- **Quiste:** *forma infectante y resistente;* sin flagelos, con 4 núcleos.
- **Prevalencia:** 5-50% en países en desarrollo; 1-7% en países industrializados.
- **Sintomatología:** desde portadores asintomáticos (50% de los individuos infectados); hasta formas graves de diarrea con síndrome de malabsorción.
- ***En inmunodeprimidos la enfermedad se hace crónica.***



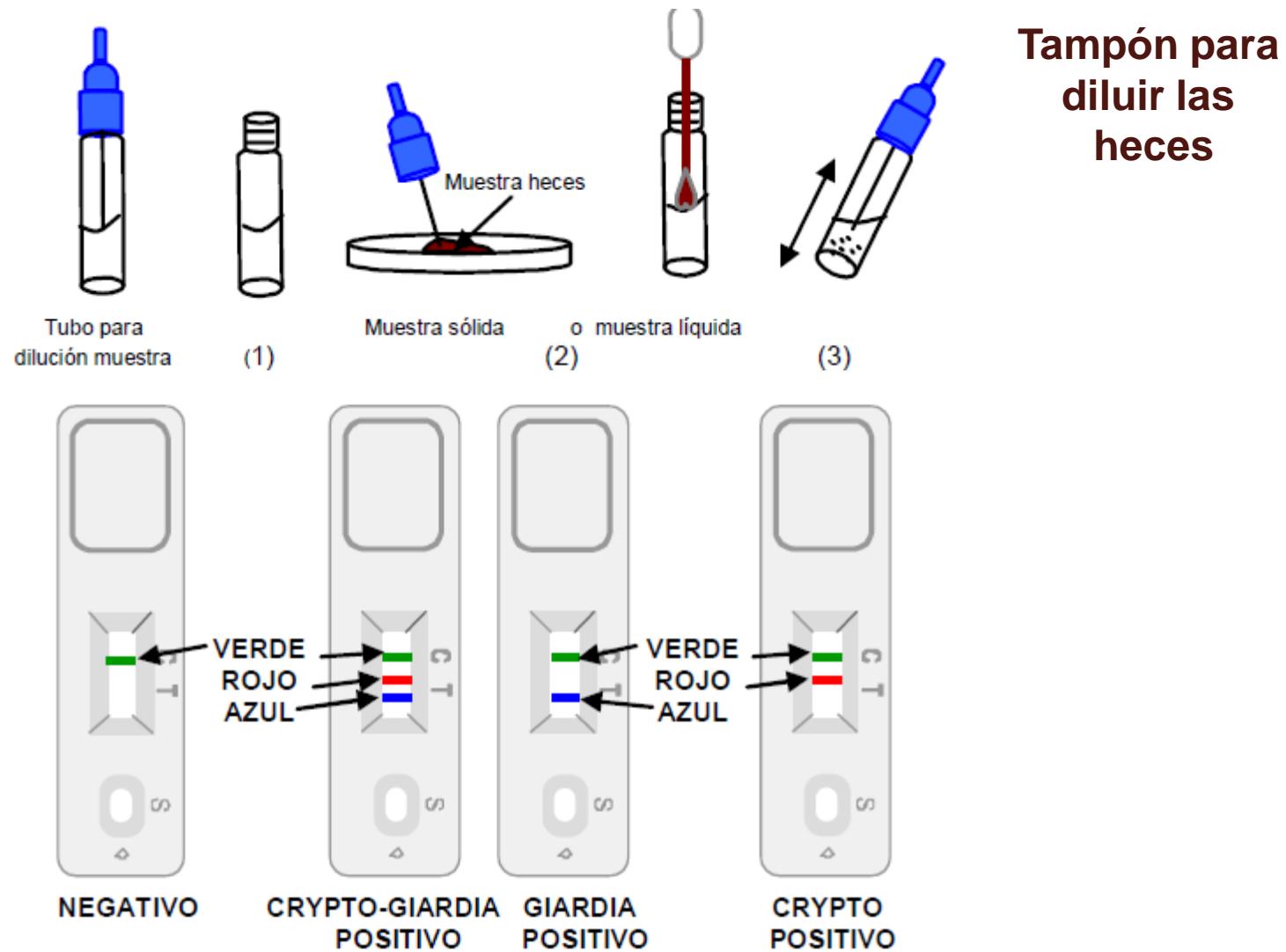
Cryptosporidium spp.

- Patógeno intracelular, existen varias especies que infectan a hombre, siendo ***C. parvum*** el más frecuente. En inmunodeprimidos se han hallado ***C. hominis***, ***C. muris***, etc.
- ***Infeción mediante los ovoquistes*** en aguas o alimentos.
- Produce el 7% de las diarreas infantiles en los países industrializados, y el 12% en los países en vías de desarrollo.
- **Sintomatología:** diarrea acuosa en inmunocompetentes, en algunas ocasiones asintomáticos. En inmunodeprimidos como pacientes con ***SIDA*** produce enfermedad crónica y enfermedad extra-intestinal (a veces formas fulminantes).



Intracelular en el borde de los enterocitos del duodeno (H&E)

• *Test rápido inmunocromatográfico*



B.3 *Helicobacter pylori*

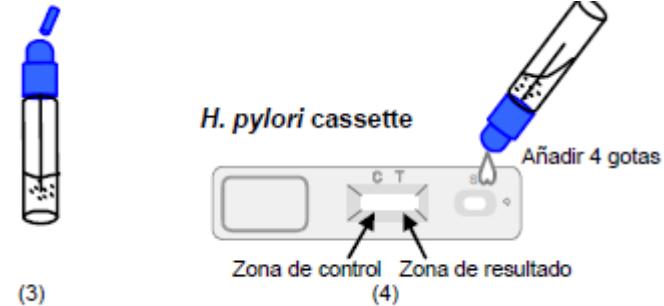
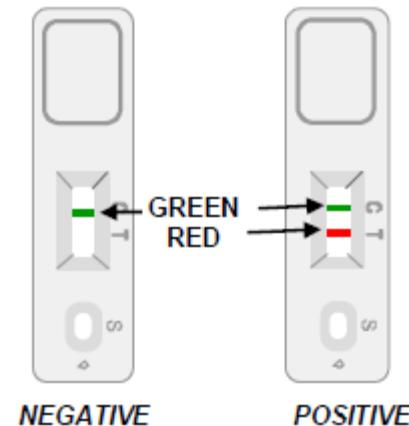
- Bacilio gram-negativos; curvos; microaerófilos; con producción elevada de ureasa. Oxidasa +, y catalasa +.
- Se estima un prevalencia de colonización en España de **55-64%**.
- **La mayoría son asintomáticos.**
- **Relacionado con:** gastritis crónica (B), úlcera duodenal (90%); úlcera gástrica (70%); adenocarcinoma gástrico (3%); y MALT (0,01%).



- Tratamiento combinado con ***tetraciclina*, *metronidazol*, *bismuto*, y *omeprazol*** tiene éxito. En individuos colonizados predispone a adenocarcinomas.

Test rápido inmunocromatográfico

- **Toma de muestra:** el paciente 20 días antes no debe tomar **omeprazol, ni antibióticos.**
Muestras no diarreicas.
- No distingue colonización de infección.
- **Diagnóstico inicial, y tras el tratamiento.**
- Sensibilidad 90% y Especificidad del 95%.



Tampón diluyente
de muestras

B.4 Toxinas de *Clostridium difficile*

- Bacilo gram-positivo, formador de esporas, anaerobio estricto.
- Es parte de la **microbiota intestinal normal del colon en <5% de individuos sanos** y en pacientes con hospitalización de larga estancia.
- Las **esporas contaminantes** se pueden detectar en las habitaciones de pacientes infectados (en las camas y baños).
- ***En pequeño número no producen daño***, pero el uso excesivo de antibióticos de amplio espectro produce un desequilibrio de la flora intestinal con una **sobreproducción de *C. difficile***.
- Cuadros de diarrea asociada a antibióticos; el cuadro grave de colitis pseudomembranosa.

Factores de virulencia.;

- **Enterotoxina (toxina A).** Produce quimiotaxis de PMN; induce la producción de citoquinas con hipersecreción de fluido; produce necrosis hemorrágica.
- **Citotoxina (toxina B).** Induce la despolimerización de los microfilamentos contráctiles de actina del citoesqueleto celular de los enterocitos.
- **Cepas toxigénicas:** A+/B+; A-/B+; ambas producen la patología.
- **Cepas No toxigénicas:** No patológicas
- Tests rápidos basados en la detección de toxinas.

Test rápido: ELFA

- *EIA tipo sandwich con una detección por fluorescencia*
- Detecta toxina A+ B (ambas cepas toxigénicas).
- Los Ag de la muestra de heces se extraen previamente, y se incuban con los **conos recubiertos** de *Ab monoclonal de ratón anti-toxina B*, y *policlonales de conejo anti-toxina A*.
- Los anticuerpos están unidos a **biotina**; los complejos formados se incuban con **estreptavidina unida a fosfatasa alcalina**.
- Detección por fluorescencia a **450 nm** del producto **4-metil-umbelíferona**.

- Resultado: RFV (valor de fluorescencia relativa)

RFV paciente/calibrador RFV

$<0,13$	Negativo
$\geq 0,13$ a $<0,37$	Dudoso
$\geq 0,37$	Positivo

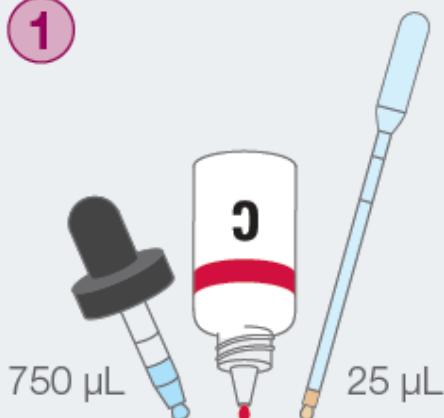


30% de Falsos Negativos (baja Sensibilidad)

TEST RÁPIDO immunocromatográfico: *GDH* + *Toxina A/B* (ALERE)

Ab-anti-GDH
Ab-anti-ToxA
Ab-anti-ToxB
(PEROXIDASA)

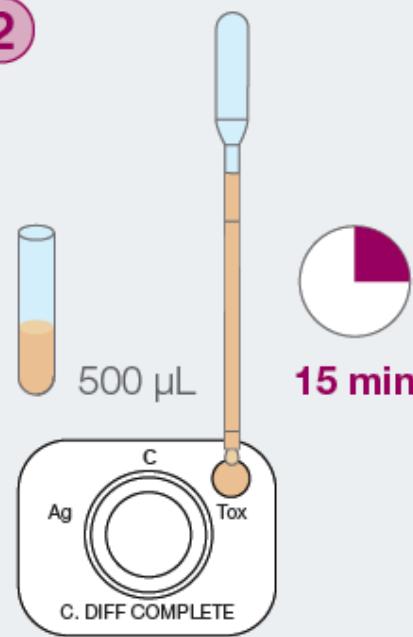
①



Add:

- 750 μ L diluent
- 1 drop conjugate
- 25 μ L sample

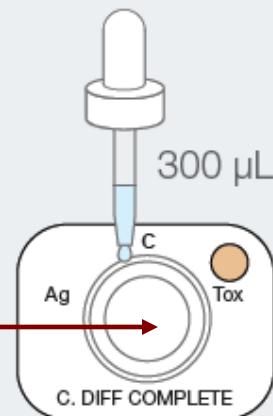
②



Mix & add 500 μ L to cassette, incubate 15 minutes

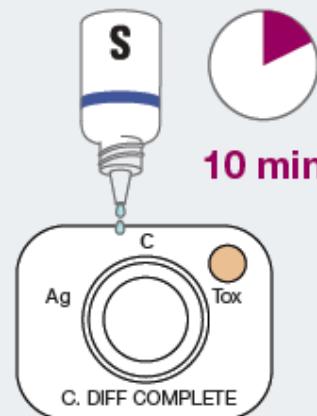
Ventana de reacción

3



Add 300 µL
wash buffer

4



Add 2 drops of
substrate. Read
after 10 minutes

S: TMB

Tiempo total del ensayo: 30 minutos

RESULTADOS POSIBLES

A)



Positive Antigen Result

Cepa No Toxigénica

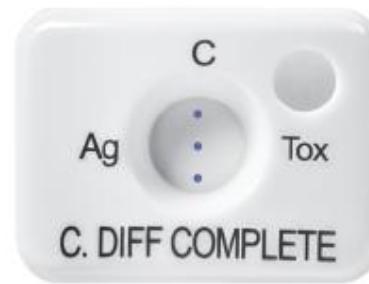
B)



Positive Antigen & Toxin Result

Cepa Toxigénica

C)



Negative Result



Sensibilidad: 87,8%

Especificidad: 99,4%