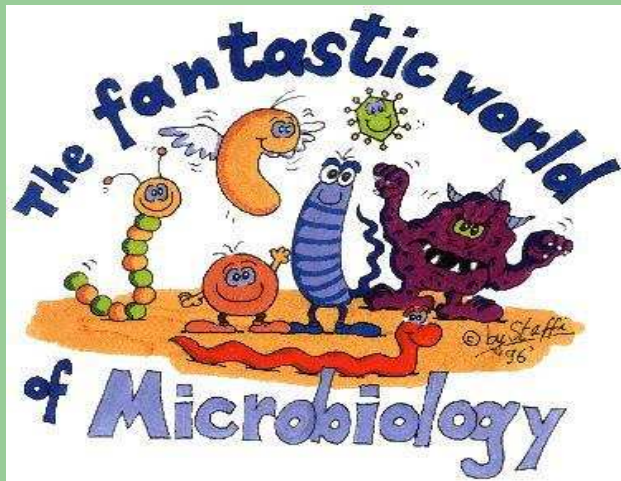
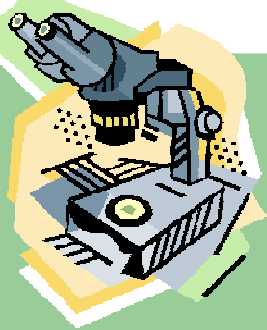


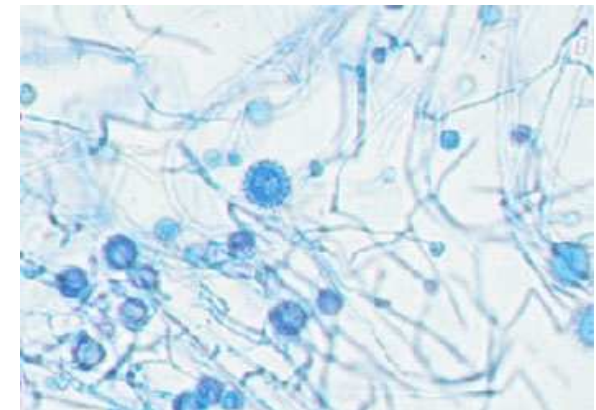
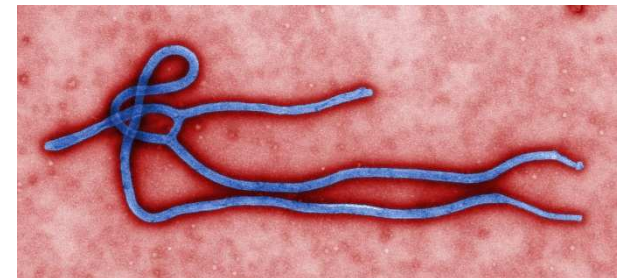
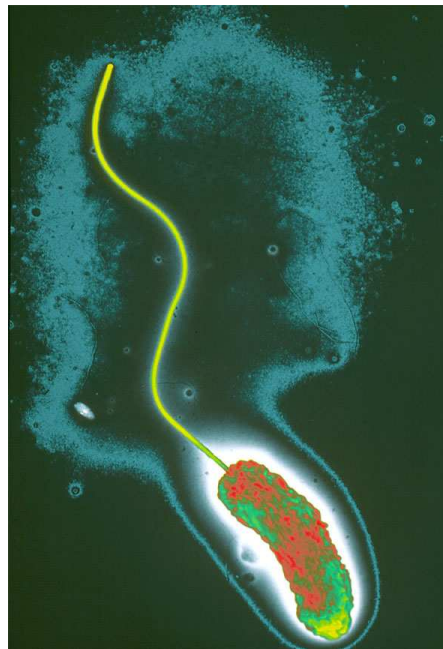
El laboratorio de Microbiología y Parasitología en el diagnóstico de las enfermedades tropicales importadas



Juan Carlos Rodríguez
S. Microbiología
Hospital General Universitario de Alicante
Universidad Miguel Hernández
E-mail: rodriguez_juadia@gva.es
<http://microbiologia-alicante.umh.es>

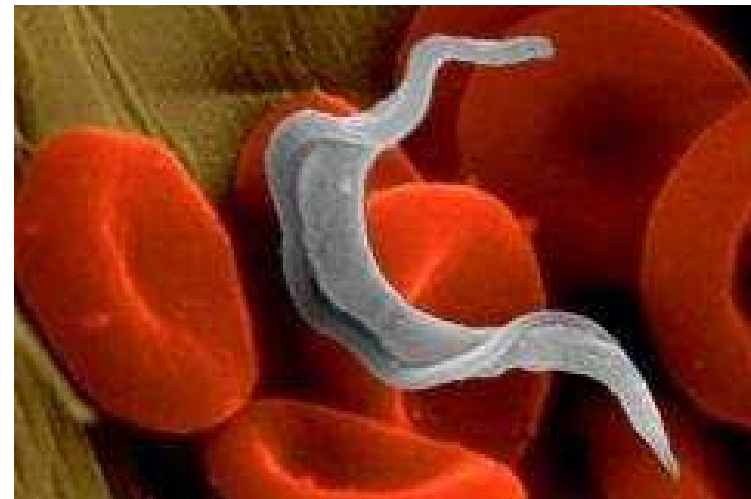
MICROORGANISMOS

- **Bacterias**
 - *Vibrio cholerae*
- **Protozoos:**
 - *Plasmodium*
- **Helmintos**
 - Filarias
- **Hongos:**
 - *Histoplasma*
- **Virus**
 - Ébola

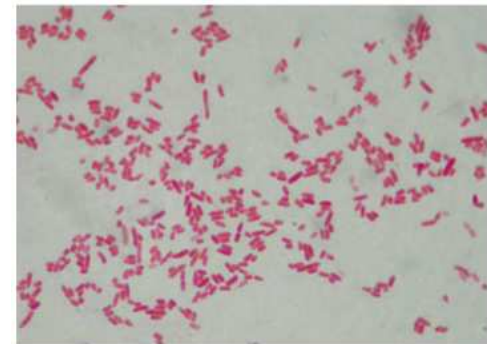
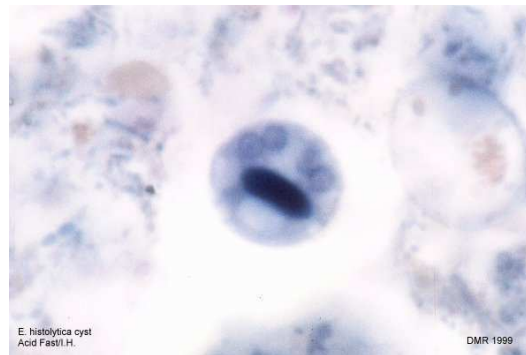
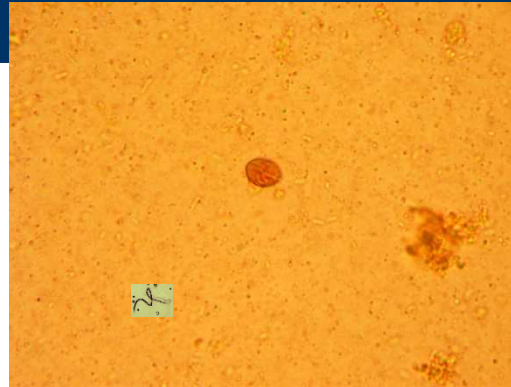


HERRAMIENTAS

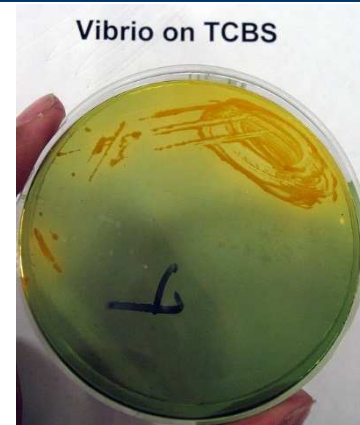
- Tinción
- Cultivo
- Detección de antígenos
- Detección de anticuerpos
- Detección del genoma
- Otros:
 - Secuenciación
 - MALDITOF
 - Cultivos celulares
 - Microscopía electrónica
 - Secuenciación masiva
 -



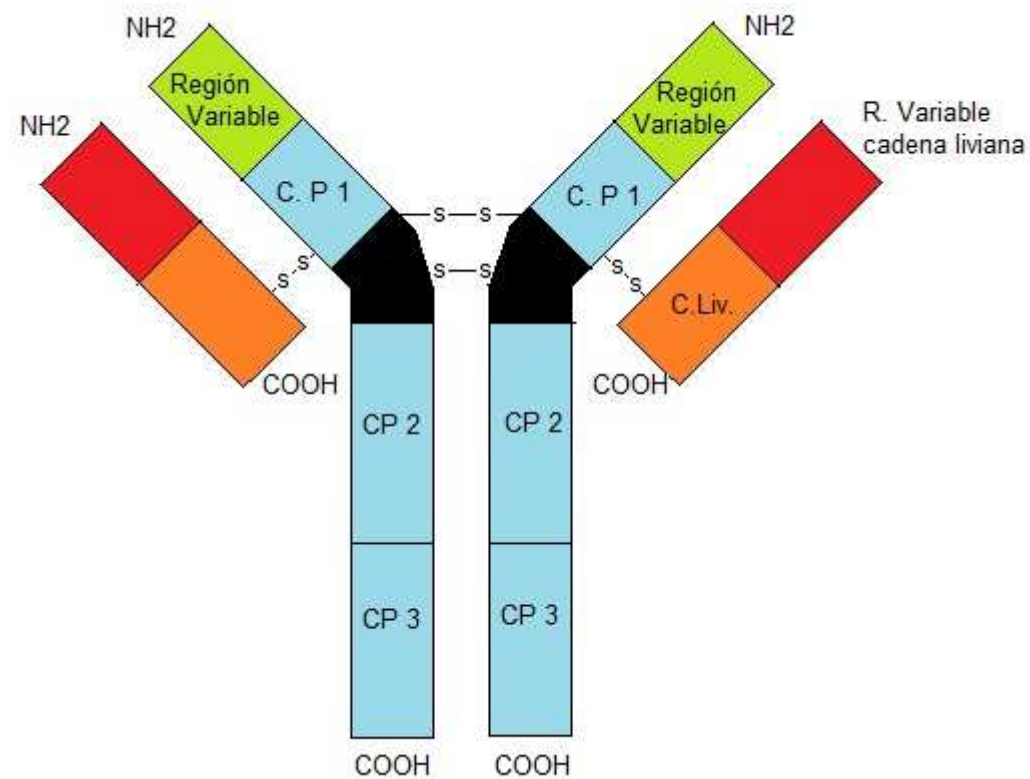
TINCIONES



CULTIVOS



FUNDAMENTOS BASICOS DE SEROLOGIA INFECCIOSA



Métodos serológicos

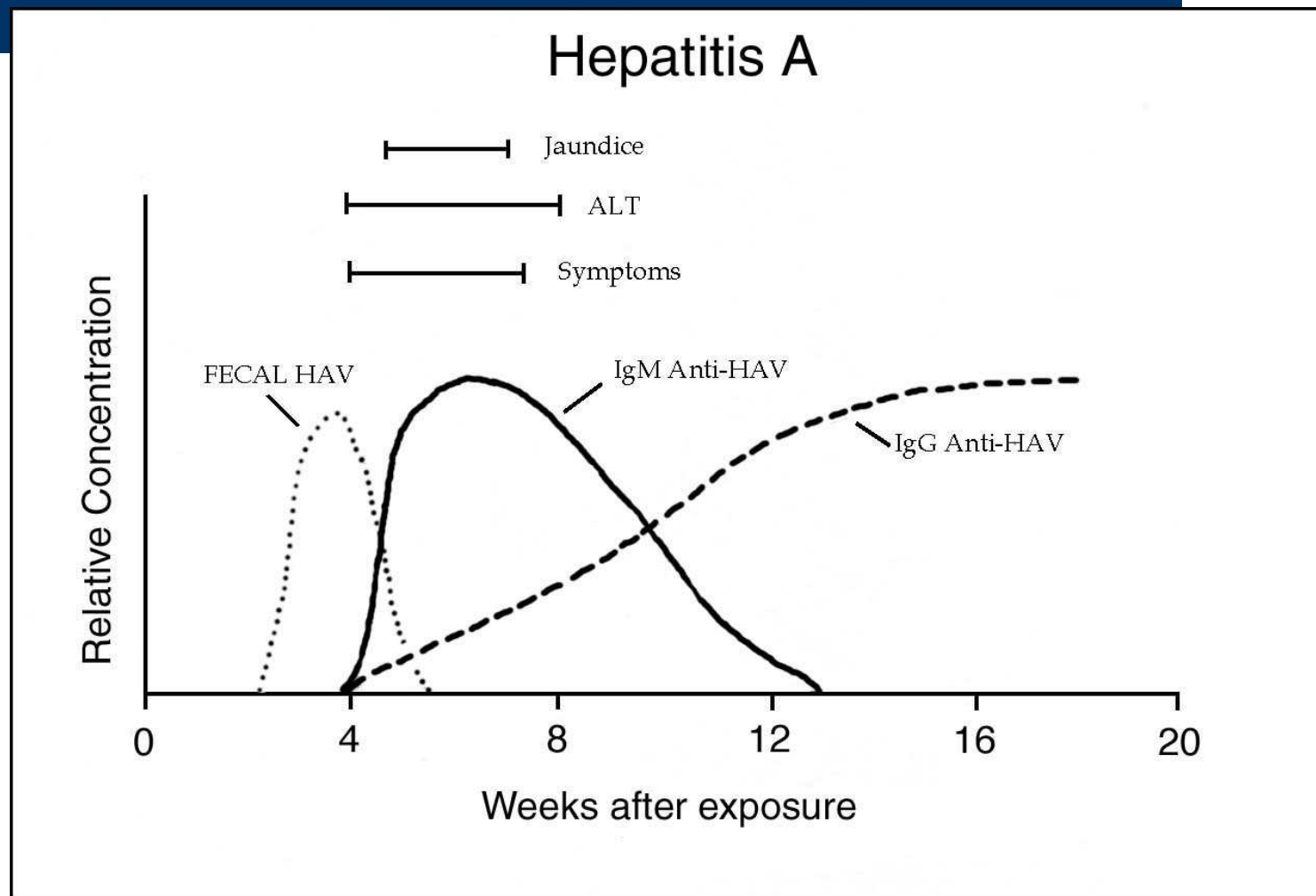
– Serología

- Se basa en la detección de anticuerpos del paciente mediante ensayos in vitro
- **Métodos:**
 - Aglutinación
 - IFI: Inmunofluorescencia indirecta
 - EIA: Enzimoinmunoensayo
 - Western Blot

– Tipos de inmunoglobulinas

- Ig G: Se mantiene positiva toda la vida del paciente (puede cuantificarse)
- IgM. Sólo se mantiene positiva en la fase aguda de la enfermedad (semanas o meses)

Métodos diagnósticos



Seroconversión

1º SUERO	2º SUERO
1/8	1/256
N	1/256

3-4 semanas de intervalo

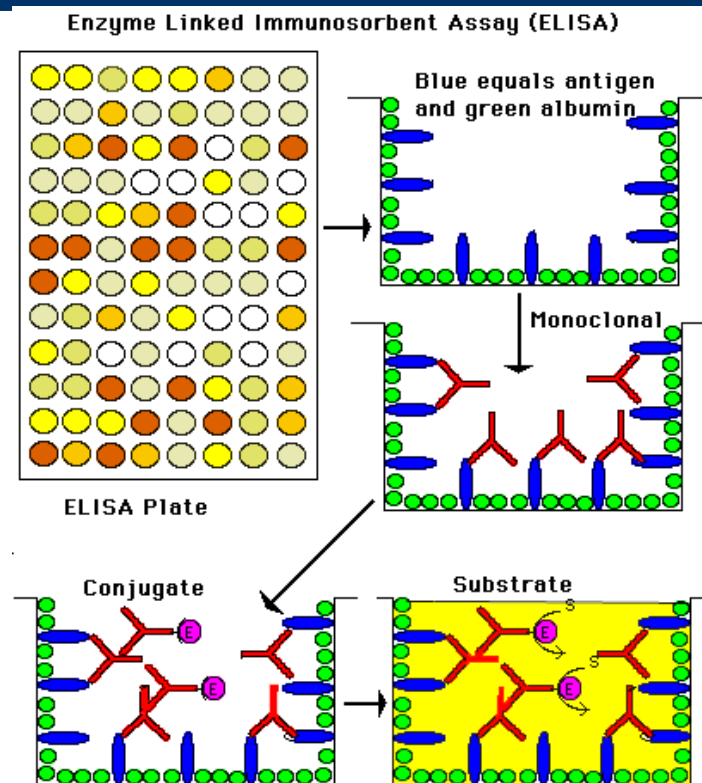
Infección aguda

- PRESENCIA DE IgM
- DEMOSTRACION DE SEROCONVERSIÓN

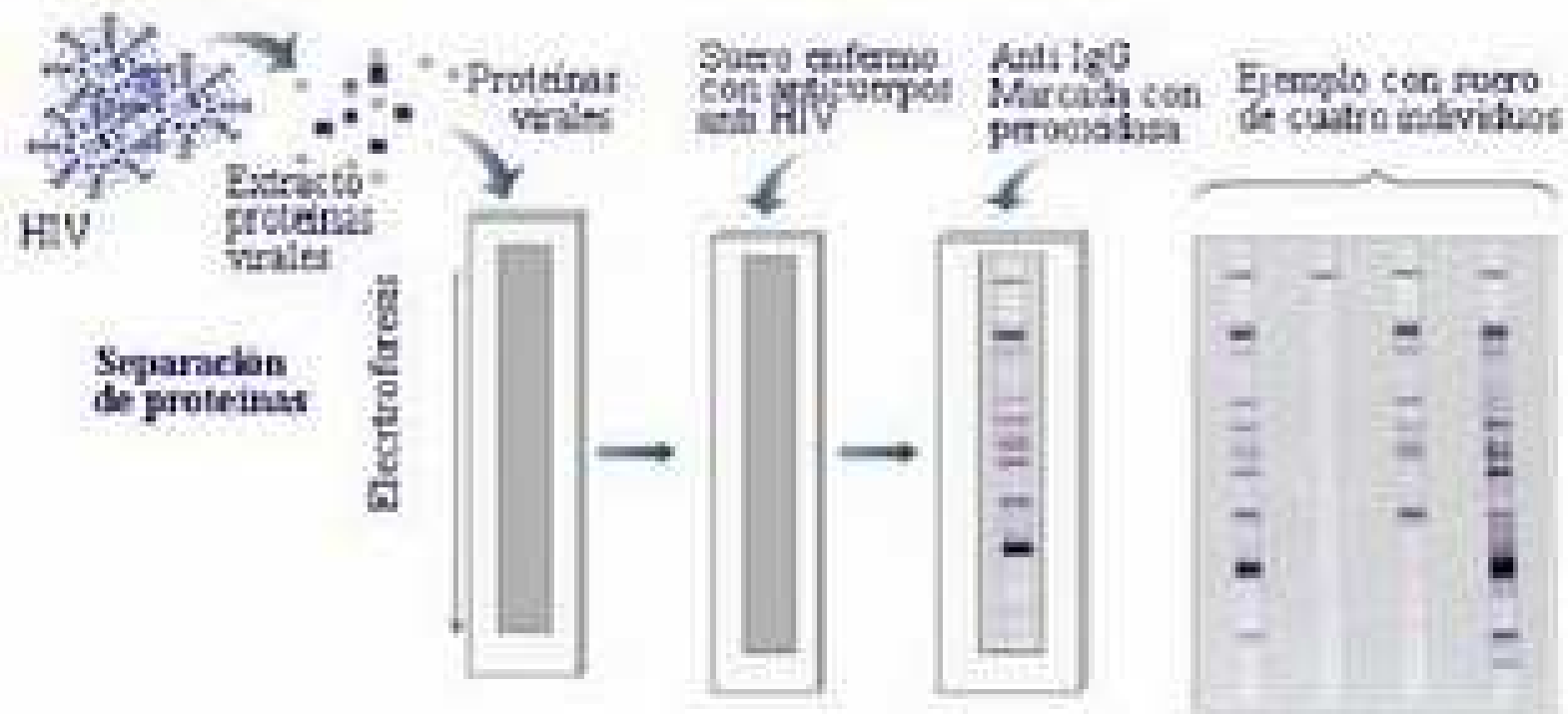
Infección antigua

- PRESENCIA DE IgG

Métodos diagnósticos: ELISA

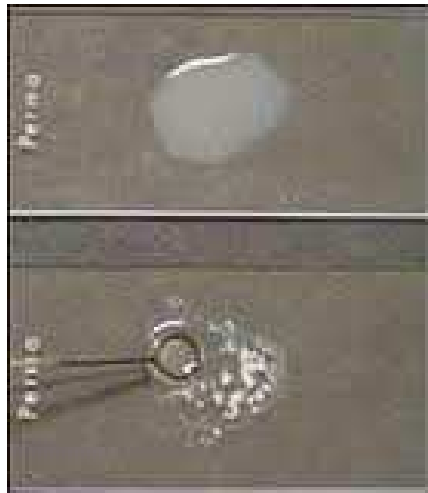
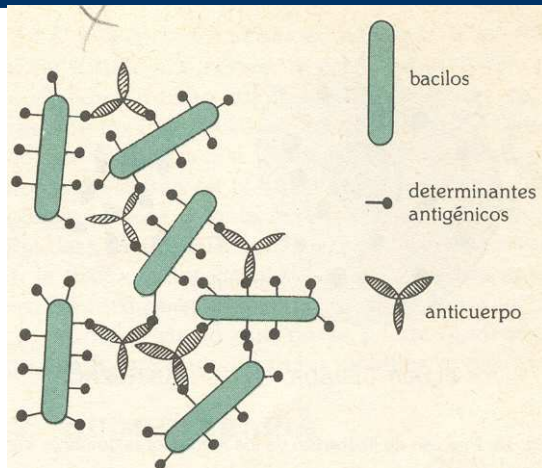


Métodos diagnósticos: Western Blot

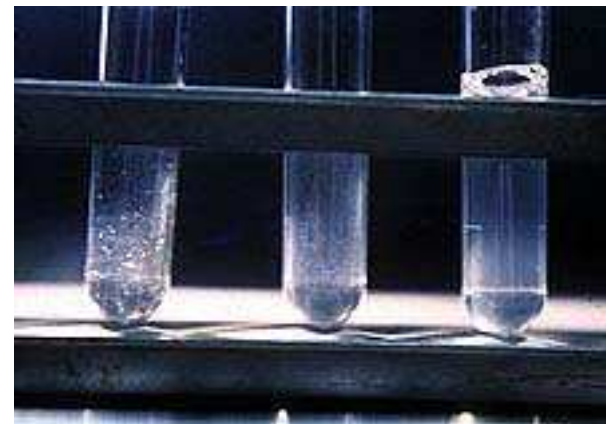
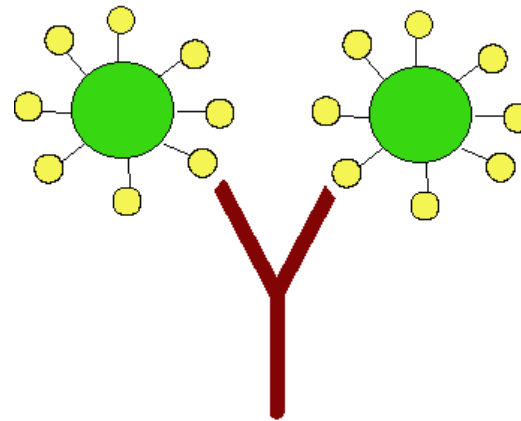


Técnica de inmunoblotting. Consiste en la separación electroforética de proteínas virales, y posterior revelado con anti-IgG marcada con peroxidasa.

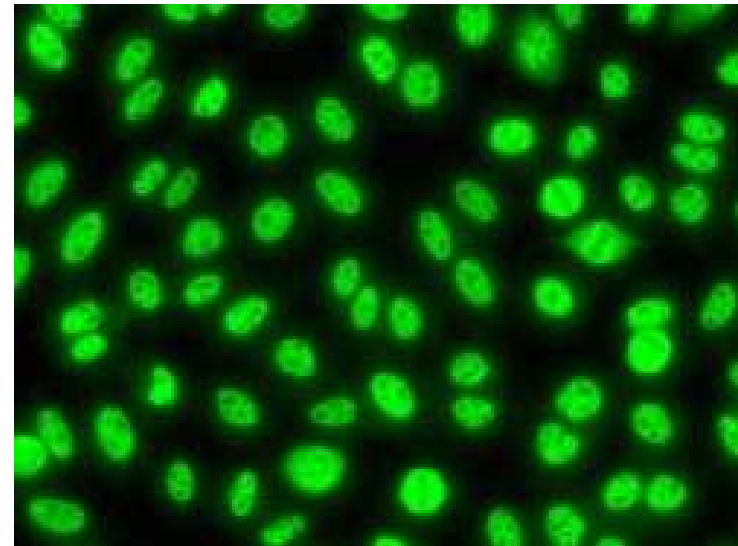
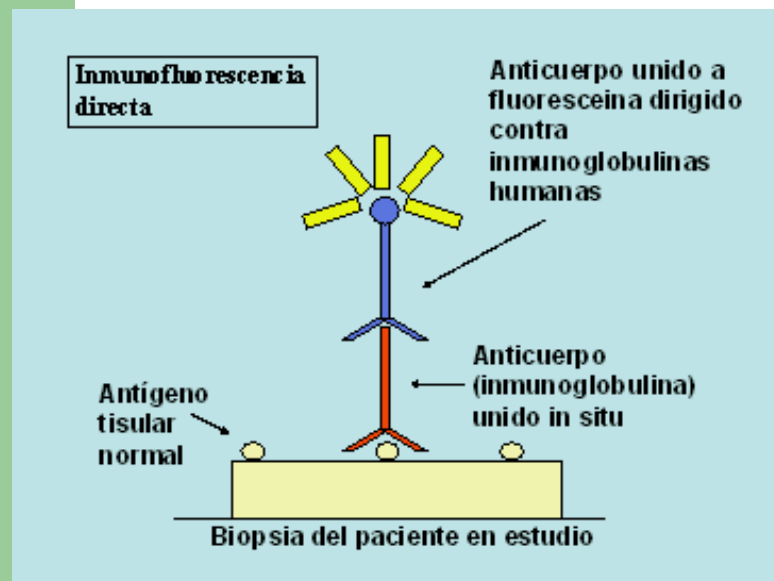
Métodos diagnósticos: Aglutinación



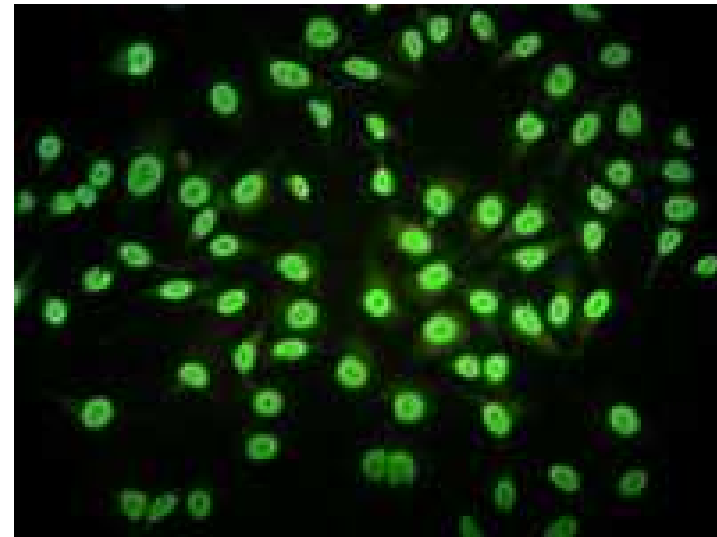
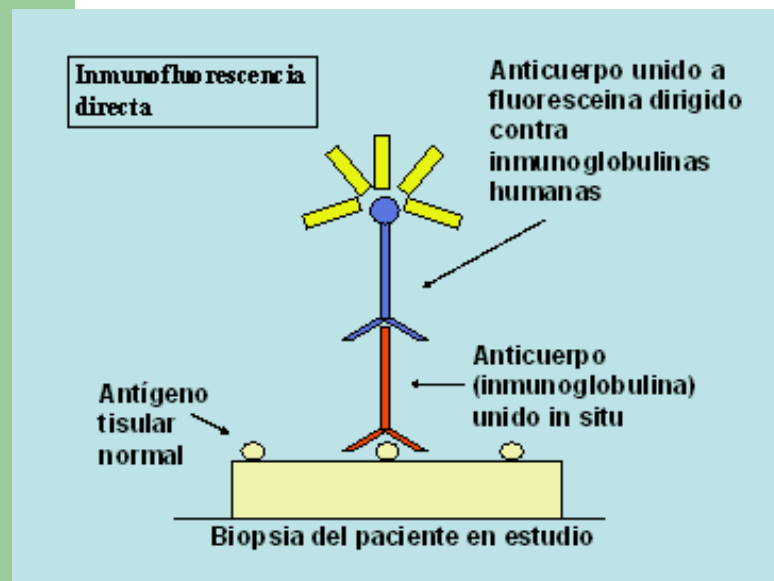
REACCIÓN DE AGLUTINACIÓN



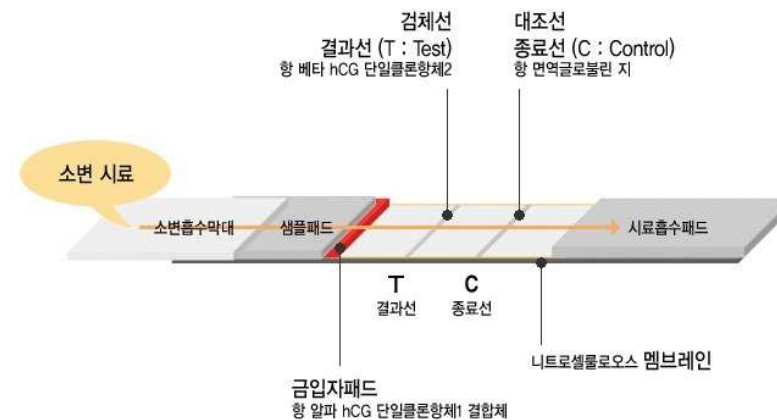
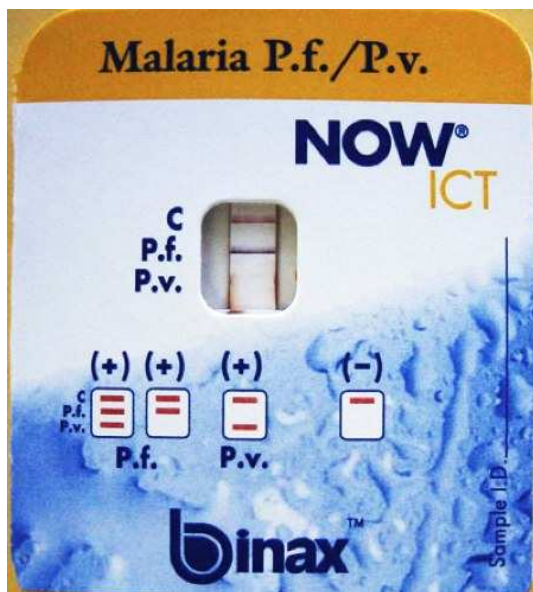
Métodos diagnósticos: IFI



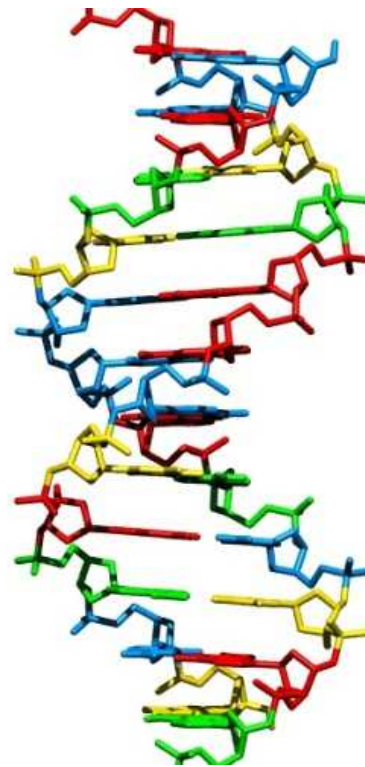
Métodos diagnósticos: IFD



Métodos diagnósticos: Inmunocromatografía

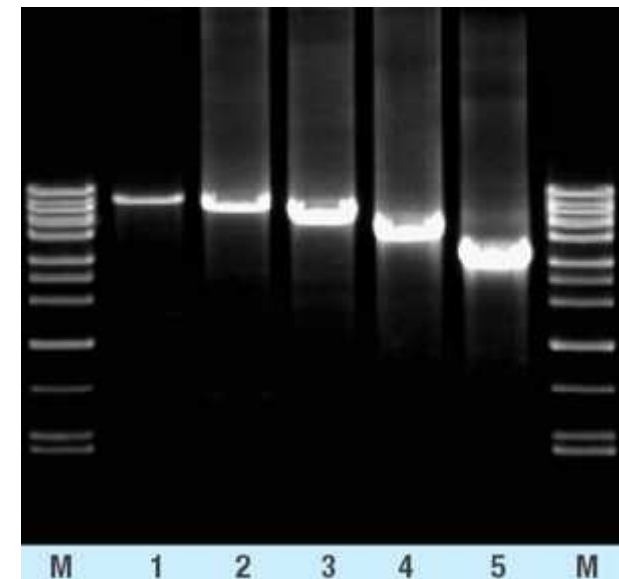


FUNDAMENTOS BASICOS DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR



FUNDAMENTOS TEORICOS

- Las técnicas llamadas de microbiología molecular tratan de estudiar el genoma mediante varias metodologías:
 - PCR convencional
 - PCR a tiempo real (real time PCR)
 - Secuenciación
 - Análisis de fragmentos genómicos



FUNDAMENTOS TEORICOS

- La secuencia de bases (adenina, guanina, citosina y timina) codifican la información genética
- Cuando el gen se expresa, se sintetiza RNA y a partir de él se sintetizan las proteínas
- Todos los organismos secuenciados están recogidos en una base de datos de acceso público llamada GenBank (pubmed)
- El programa que está instalado en esa base de datos tiene instalada diversas aplicaciones que son muy interesantes en este tipo de estudios.
- Otros programas interesantes son:
 - ✦ Chromas: analiza secuencias
 - ✦ Primer express: Diseña sistemas de PCR a tiempo real
 - ✦ Primer 3: Diseña sistemas de PCR convencional

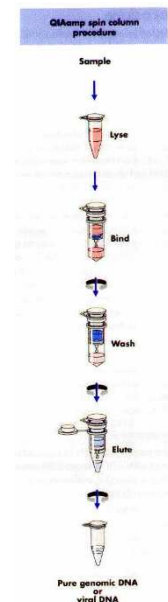
EXTRACCION DE DNA

○ OBJETIVO

- ✦ Romper la bacteria y separar el DNA del resto de sus componentes
- ✦ En función de la cantidad de DNA que dispongamos se utilizan diferentes métodos

○ METODOS

- ✦ Mucha cantidad de DNA (cultivo bacteriano):
 - Chelex
- ✦ Poca cantidad de DNA (muestra clínica):
 - Columnas (Quiagen)
 - TNAI (Roche)



PCR convencional

○ REACTIVOS

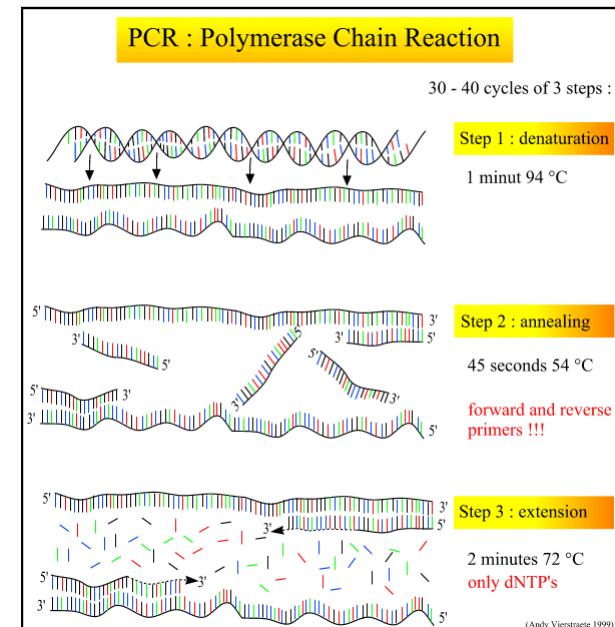
- ✦ Buffer
- ✦ Cloruro de magnesio: Entre 1,5 y 3 mM
- ✦ dNTP: A, G, C, T
- ✦ Cebadores o primers
- ✦ Taq polimerasa
- ✦ Agua
- ✦ DNA diana



PCR convencional

○ PARAMETROS DEL TERMOCICLADOR

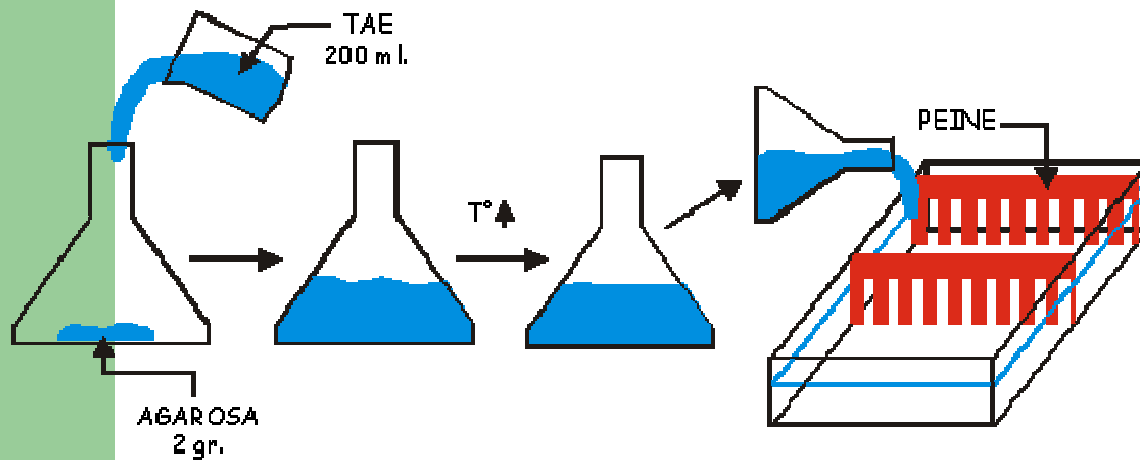
- ✦ Apertura de las hebras de DNA: 94°C
- ✦ Hibridación de los cebadores: Temperatura variable
- ✦ Elongación de las cadenas: 72°C
- ✦ Número de ciclos: Entre 30 y 40



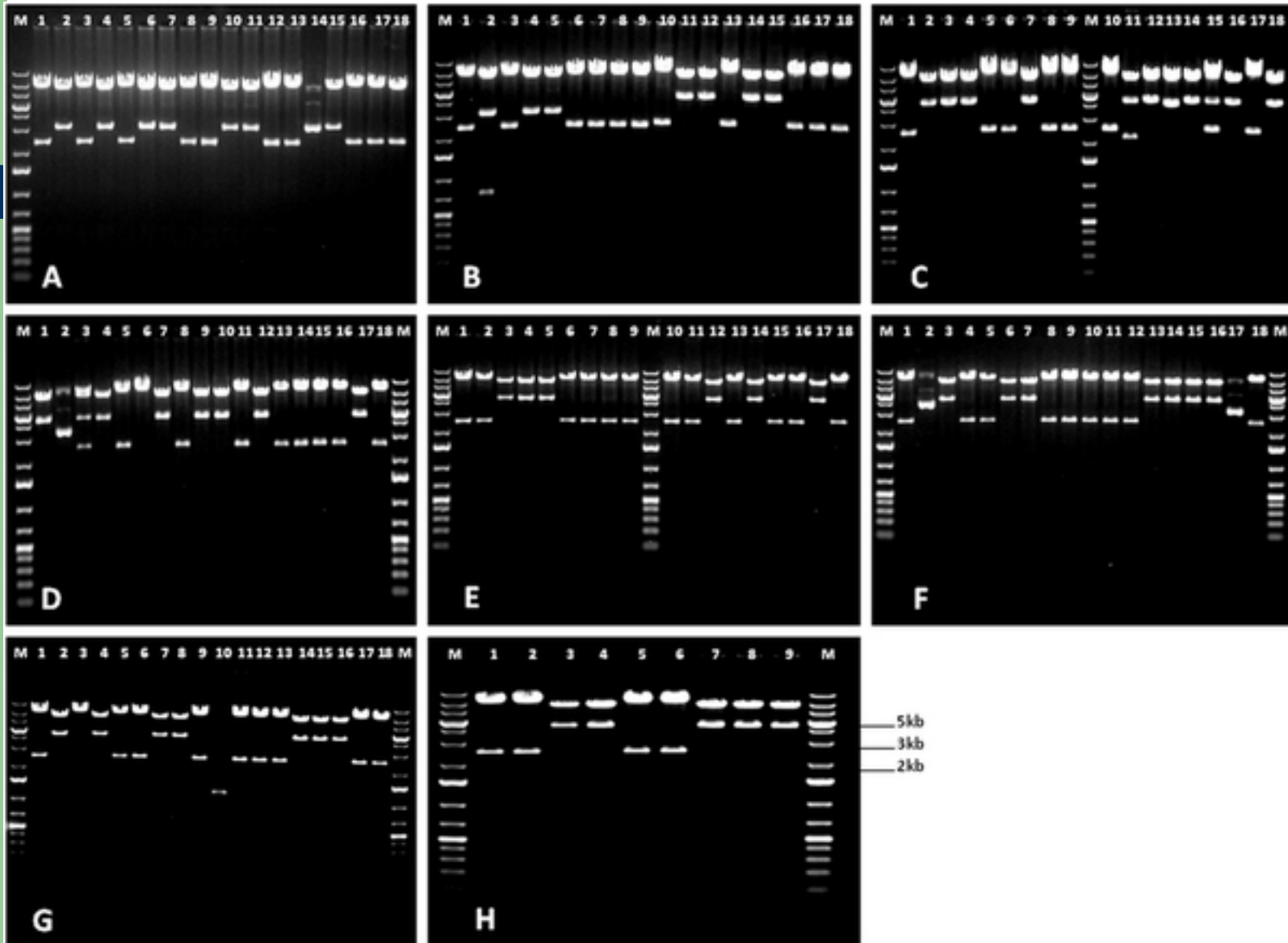
PCR convencional

○ DETECCION DE LA AMPLIFICACION

- ✦ Preparación del gel de agarosa
- ✦ Electroforesis a 100 V
- ✦ Visualización con bromuro de etidio ¡¡¡¡¡ojo, es cancerígeno!!!!

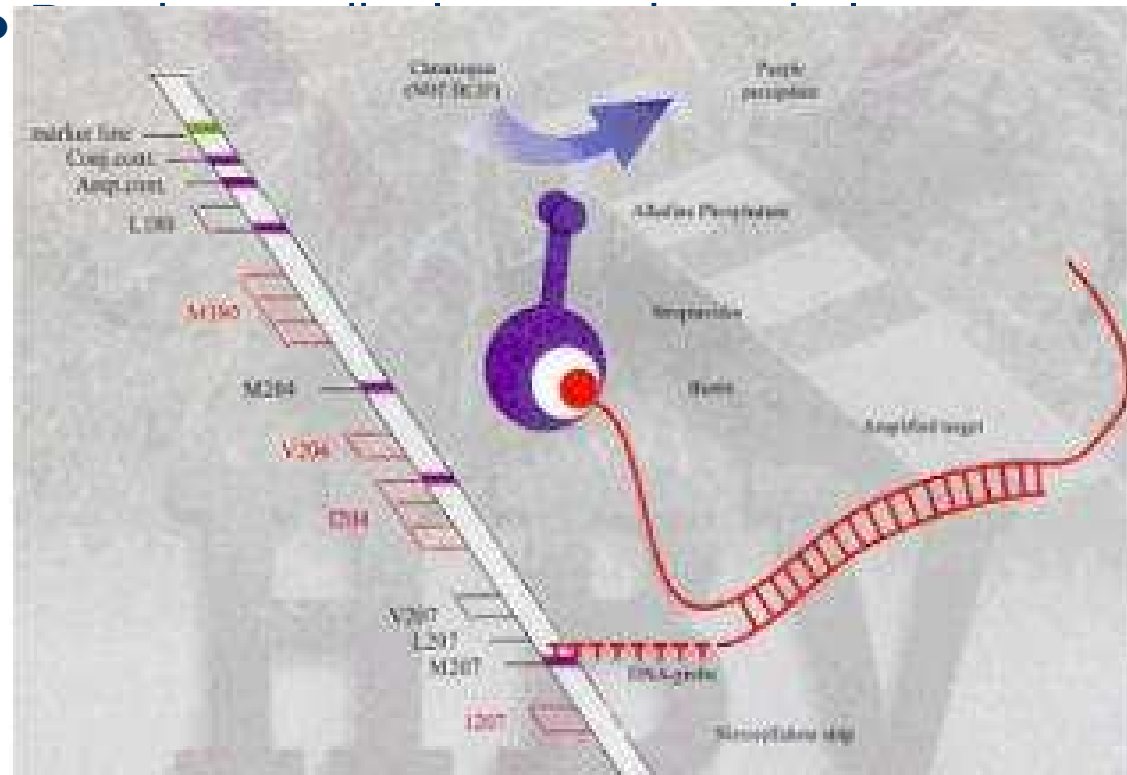


PCR convencional



LIPA

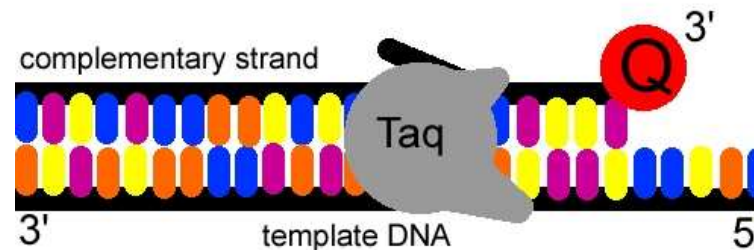
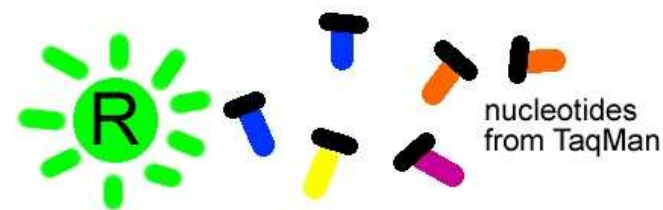
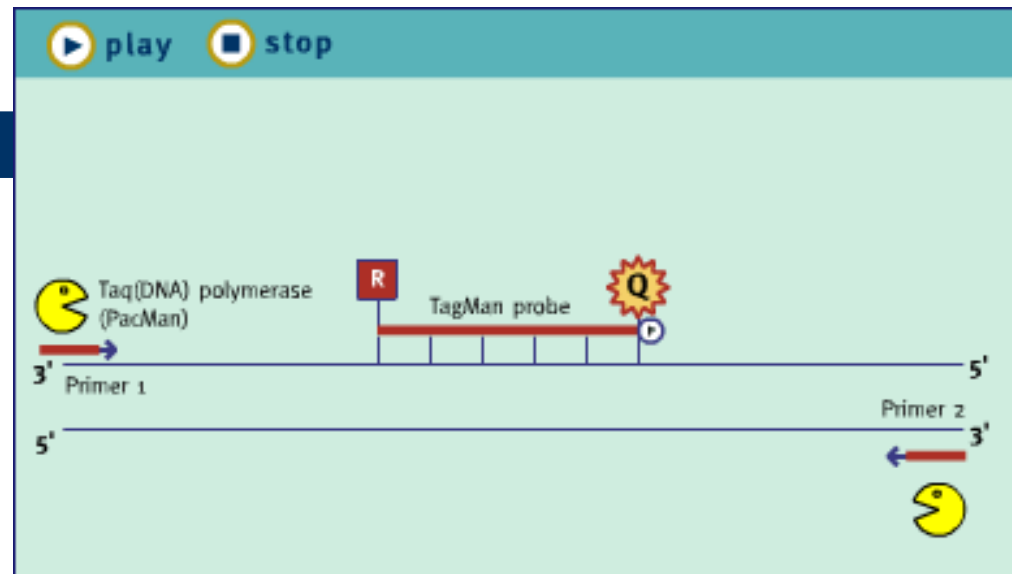
- Hibridación con sondas específicas



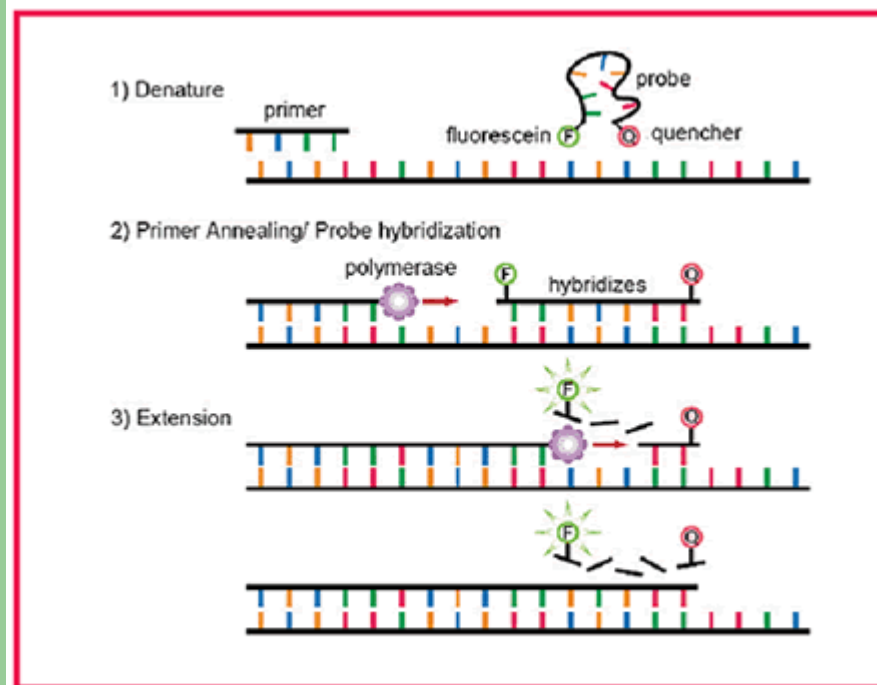
PCR a tiempo real

REACTIVOS

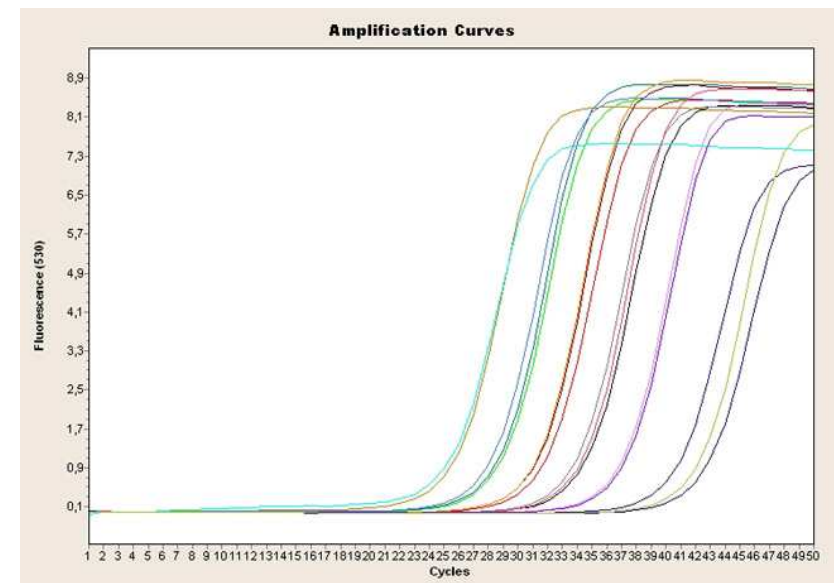
- ✦ Master mix
- ✦ Cebadores o primers
- ✦ Sonda
- ✦ Agua
- ✦ DNA diana



PCR a tiempo real

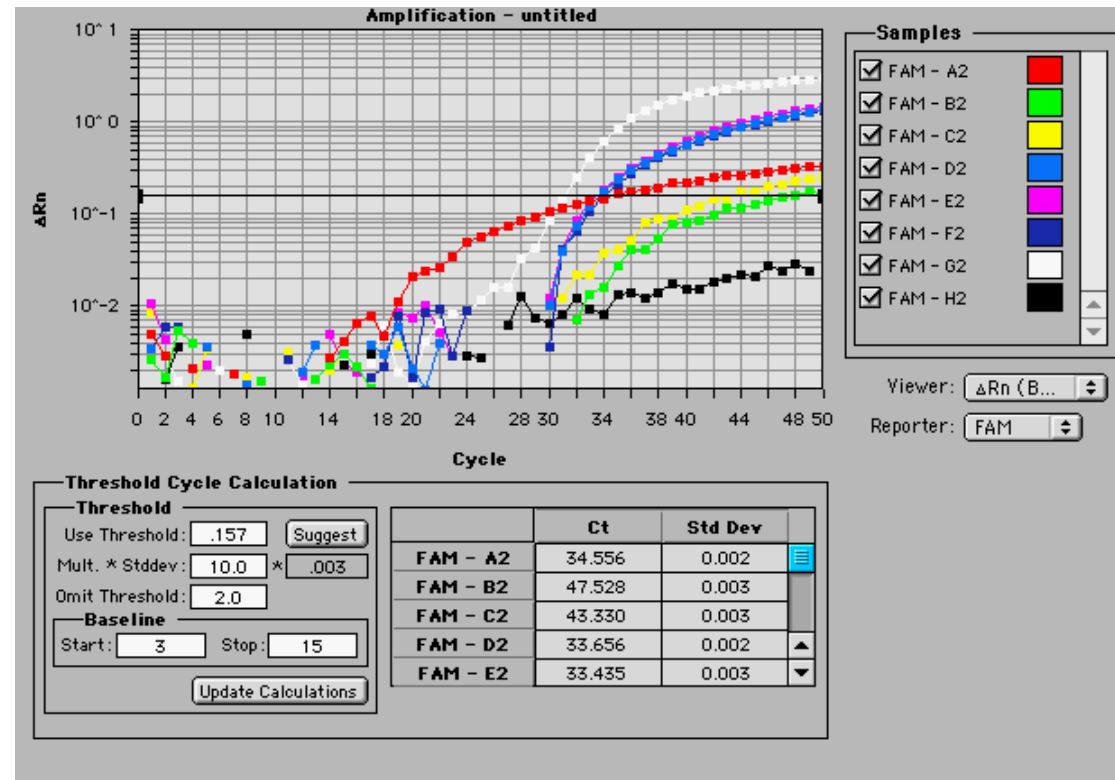


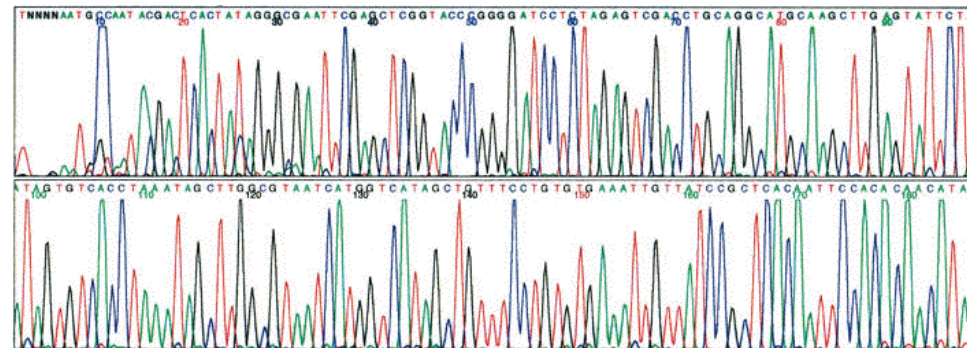
TaqMan® Probe Method



PCR a tiempo real

○ DETECCION DE LA AMPLIFICACION

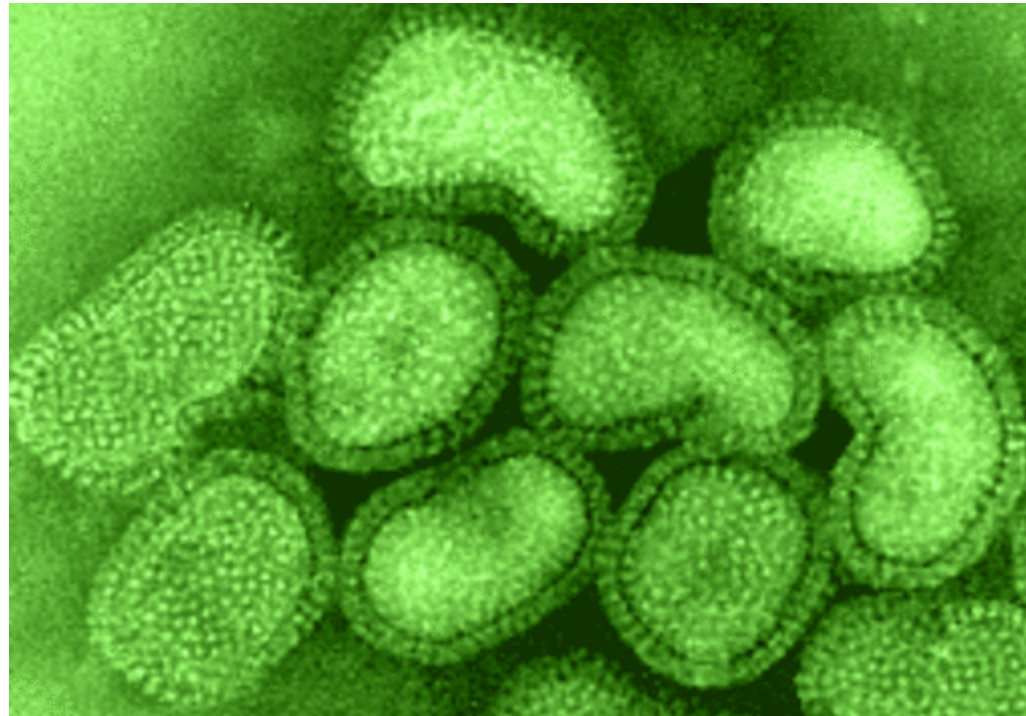




SECUENCIACION



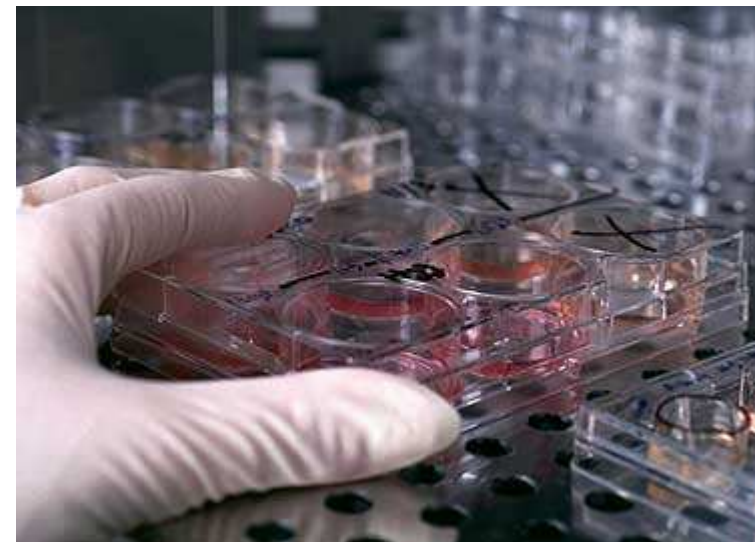
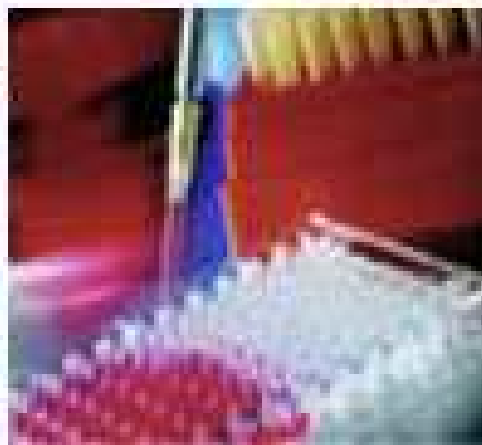
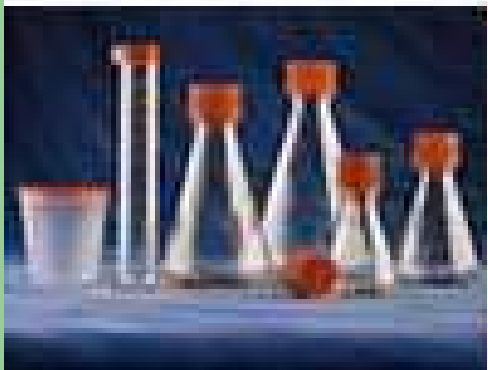
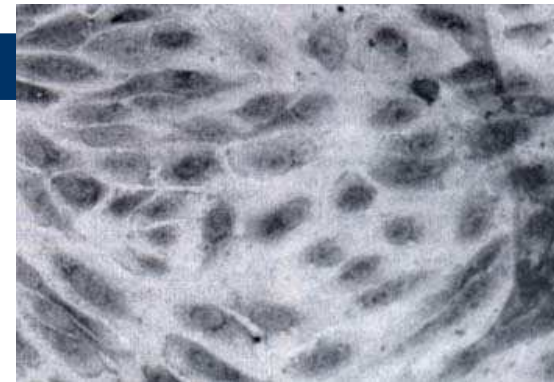
FUNDAMENTOS BASICOS DEL CULTIVO CELULAR



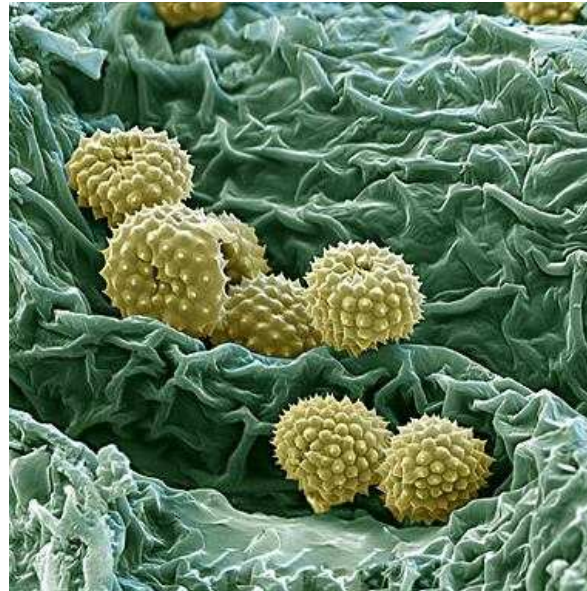
Cultivo celular

- **Cultivos celulares**
 - Células animales mantenidas indefinidamente in vitro
 - Hay muchas líneas, específicas de cada virus:
 - Fibroblastos
 - HELA
 - Vero
 - Hep-2
 - Sólo crecen algunos virus
 - Método complejo
 - Permite estudiar la sensibilidad a fármacos antivíricos
 - En desuso

Métodos diagnósticos

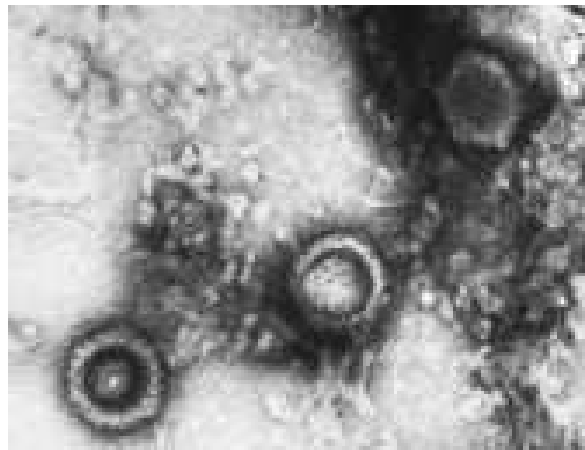


FUNDAMENTOS BASICOS DE LA MICROSCOPIA ELECTRONICA



MICROSCOPIA ELECTRONICA

- Utilidad de la Microscopia electrónica
 - Permite la identificación morfológica de algunos virus
 - Completo y requiere tecnología costosa y personal muy experto
 - En desuso

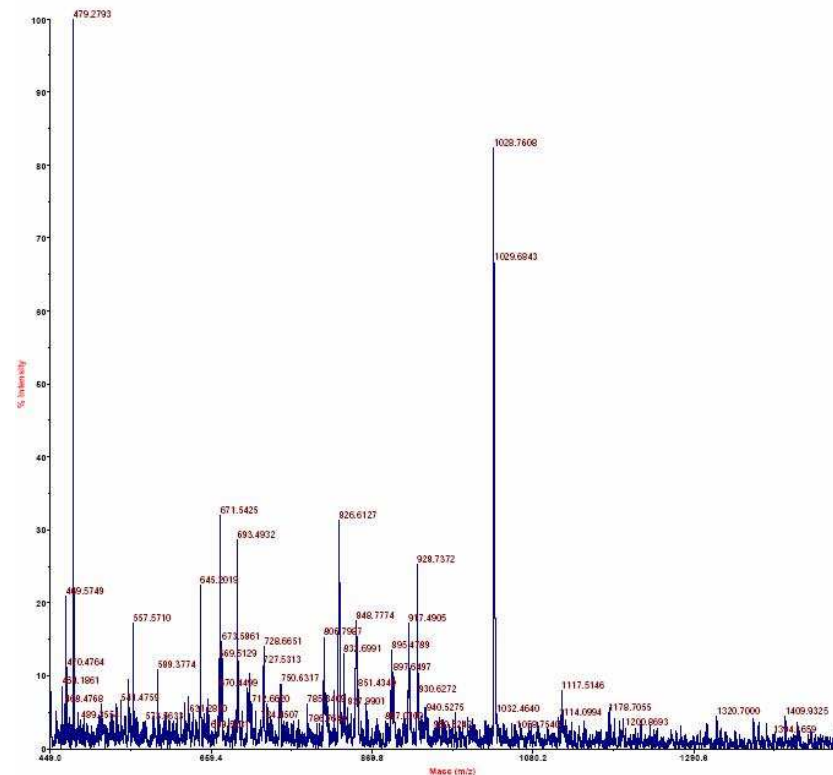


Electron micrograph of herpes simplex. Source: Centers for Disease Control & Prevention

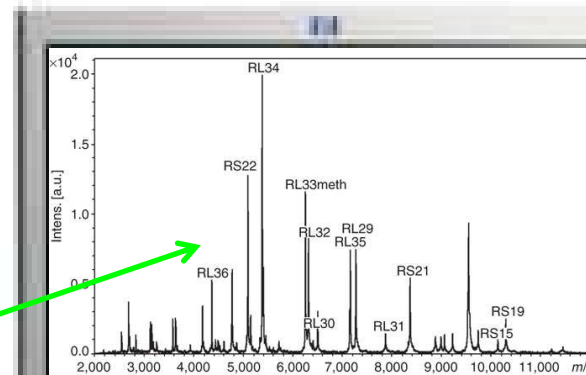
MICROSCOPIA ELETTRONICA



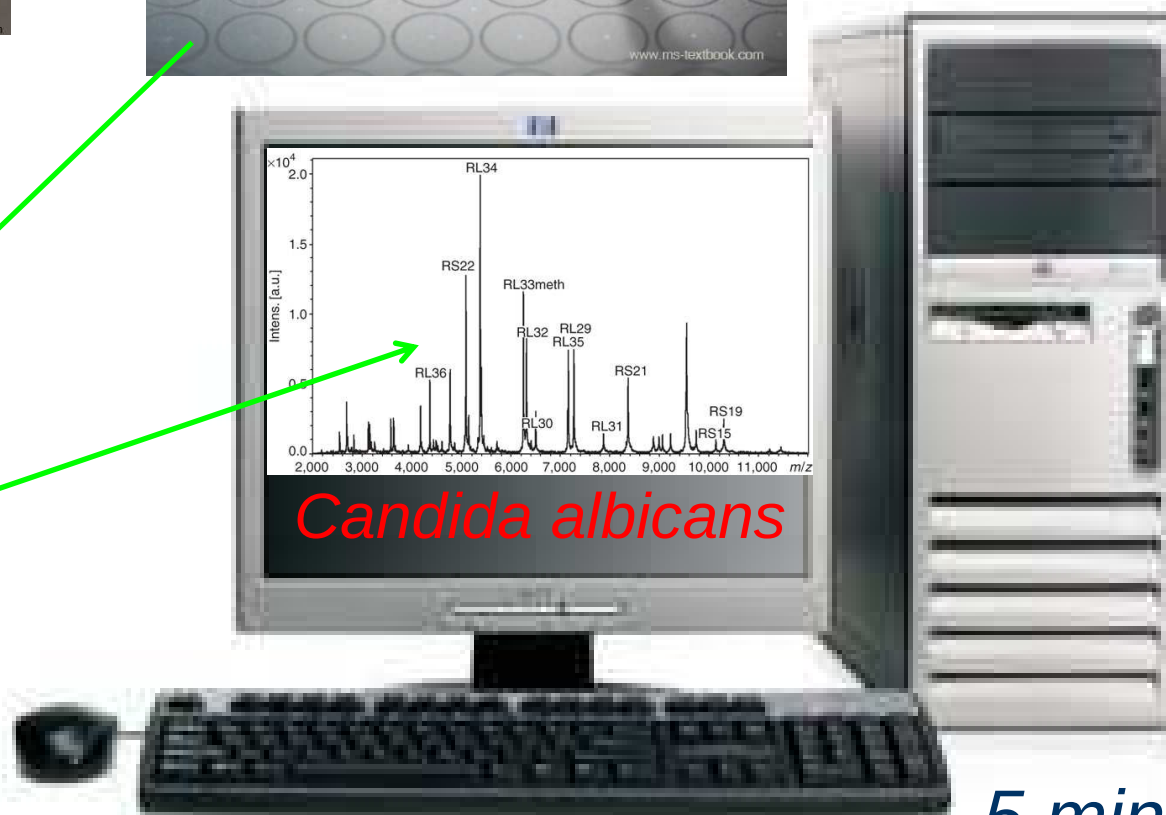
FUNDAMENTOS BASICOS DE LA ESPECTROMETRIA DE MASAS



MALDI-TOF



Candida albicans



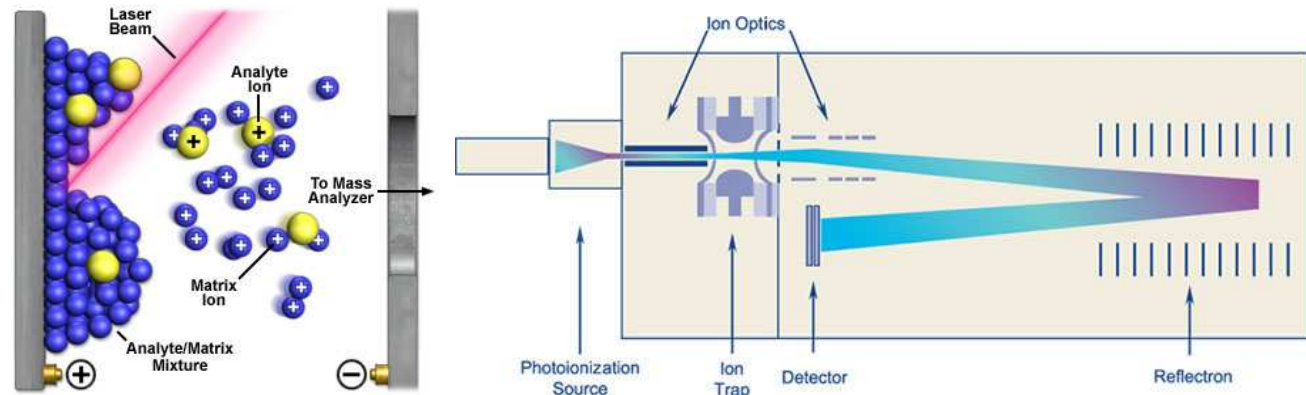
5 minutos

Fundamento teórico

- **MALDI-TOF**
- (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time-Of-Flight*)
 - Desorción/ionización de láser asistida por matriz con tiempo de vuelo)
 - Espectrometría de masas para medir la huella dactilar exclusiva de un organismo (proteínas).
 - Los patrones característicos de las proteínas ribosomales (entre 2000 y 20000 D) se comparan con un patrón (base de datos)

COMPONENTES

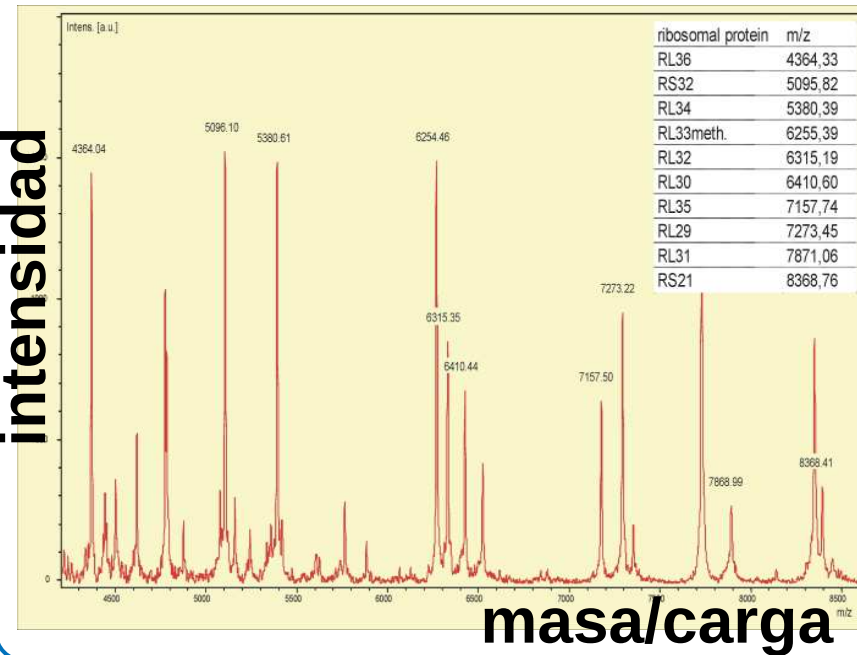
- Fuente de ionización
- Analizador de masas
- Detector



Fundamento teórico



intensidad



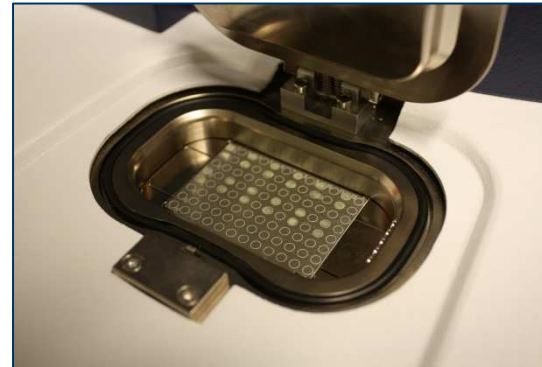
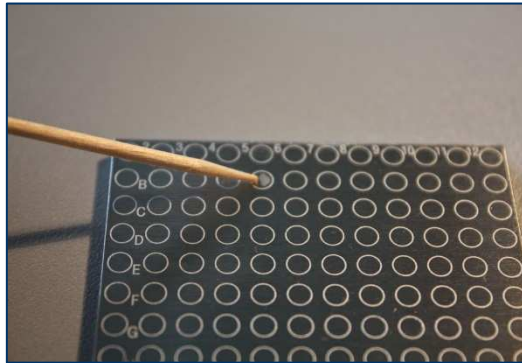
masa/carga

relación masa/carga (m/z)

"*huella química*": representación gráfica de los fragmentos obtenidos, por orden creciente de masa

Fundamento teórico

- MATRIZ (ácido orgánico): amortigua la energía
- Se produce desorción: paso de sólido a gas
- Poco calentamiento → Proteínas intactas

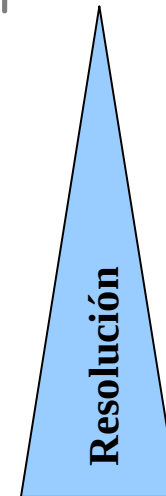
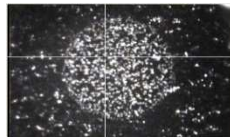
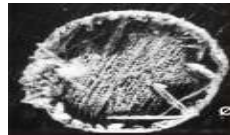


- Directamente de la colonia con acetonitrilo
- Procesamiento previo con etanol/ácido fórmico

Fundamento teórico

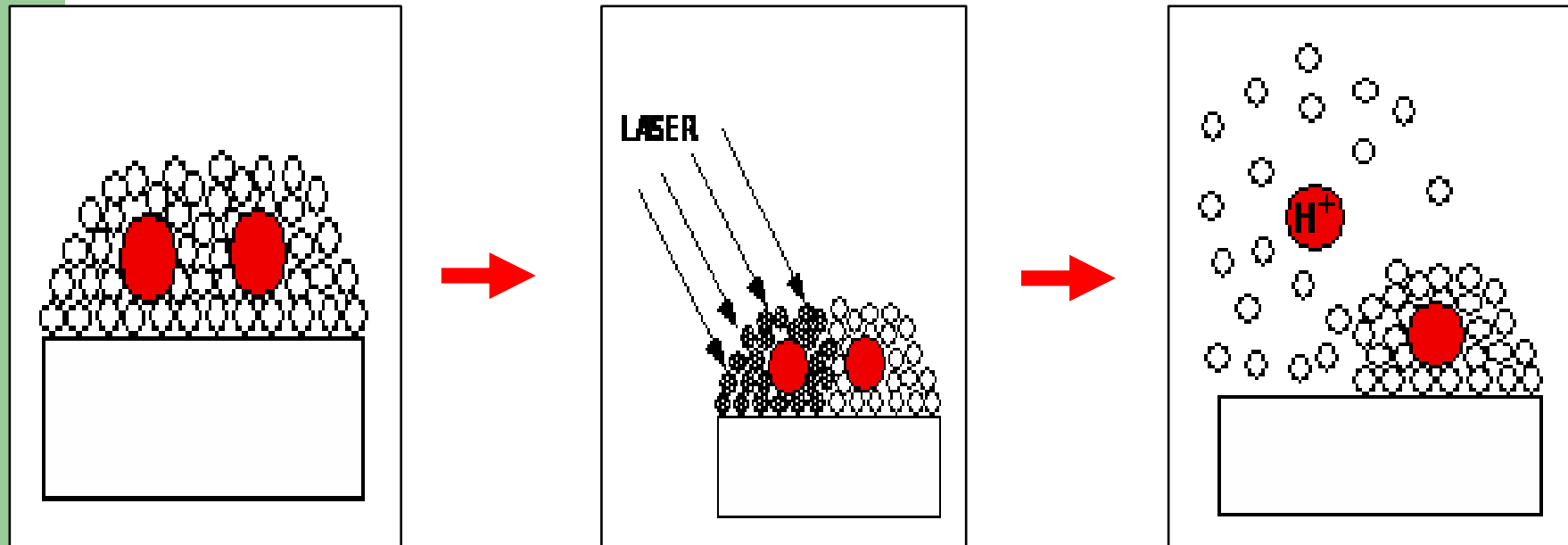
- MATRIZ**

- La matriz funciona como un transmisor transfiriendo la energía necesaria para la ionización del láser a las moléculas de la muestra
- La mezcla muestra-matriz debe cristalizar de forma homogénea para garantizar una resolución óptima del espectro



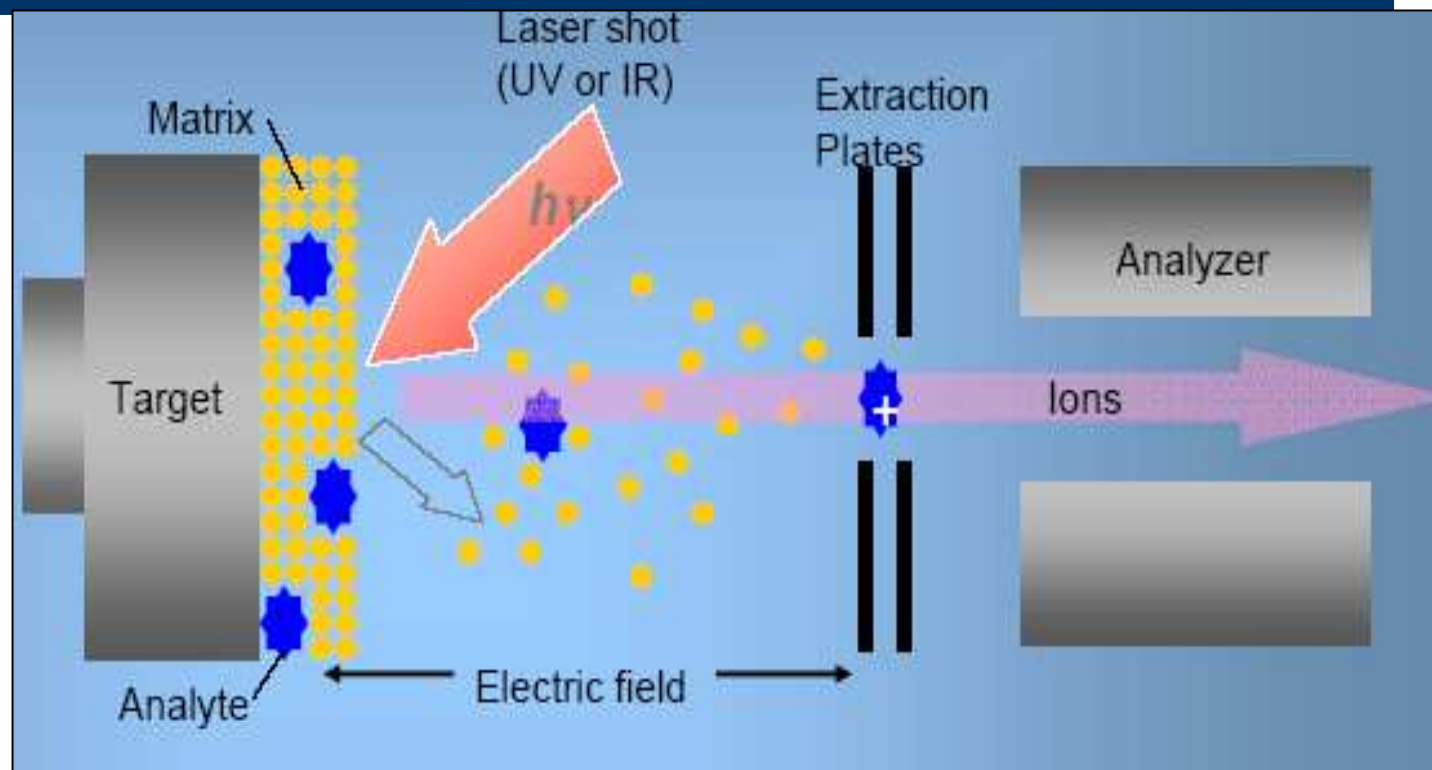
Fundamento teórico

- IONIZACION

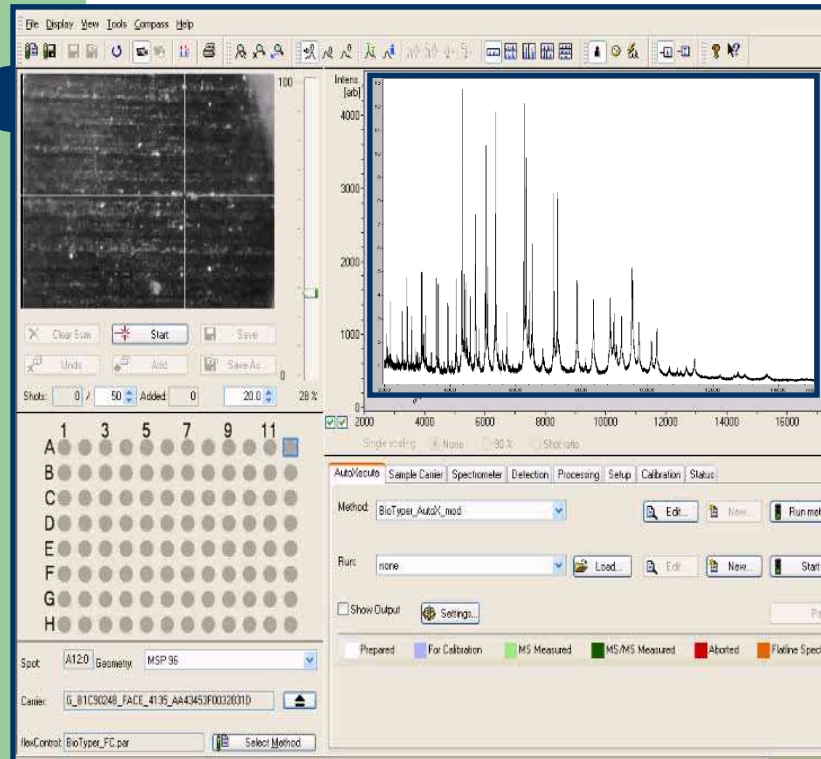


Fundamento teórico

- VUELO DE LOS IONES



Fundamento teórico



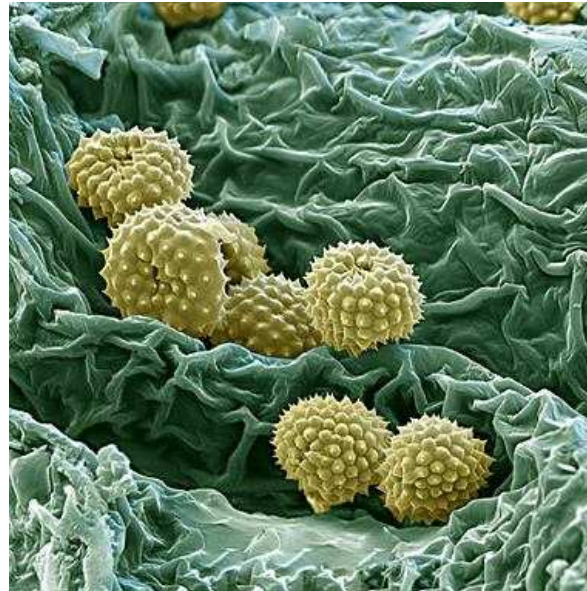
07 D1 (+++)	va20591-1	Escherichia coli	2.337	Escherichia coli	2.262
07 E1 (+++)	va20591-1	Escherichia coli	2.319	Escherichia coli	2.318
08 E3 (+++)	va20591-2	Klebsiella pneumoniae	2.479	Klebsiella pneumoniae	2.349
08 D3 (+++)	va20591-2	Klebsiella pneumoniae	2.483	Klebsiella pneumoniae	2.41
09 D5 (+++)	va20616	Klebsiella oxytoca	2.407	Klebsiella oxytoca	2.263
09 E5 (+++)	va20616	Klebsiella oxytoca	2.486	Klebsiella oxytoca	2.276
10 E7 (+++)	va20649	Citrobacter freundii	2.559	Citrobacter freundii	2.484
10 D7 (+++)	va20649	Citrobacter freundii	2.577	Citrobacter freundii	2.507
11 D9 (+++)	va20662	Staphylococcus aureus	2.41	Staphylococcus aureus	2.398
11 E9 (+++)	va20662	Staphylococcus aureus	2.41	Staphylococcus aureus	2.408
12 D11 (+++)	va20675	Escherichia coli	2.327	Escherichia coli	2.232
12 E11 (++)	va20675	Escherichia coli	2.276	Escherichia coli	2.165
13 G1 (+++)	va20680	Escherichia coli	2.451	Escherichia coli	2.426
13 H1 (+++)	va20680	Escherichia coli	2.386	Escherichia coli	2.319
14 G3 (+++)	va20572-2	Proteus mirabilis	2.65	Proteus mirabilis	2.511
14 H3 (+++)	va20572-2	Proteus mirabilis	2.613	Proteus mirabilis	2.484
15 H5 (+)	va20551	Streptococcus constellatus	1.962	Streptococcus anginosus	1.778
15 G5 (+)	va20551	Streptococcus constellatus	1.987	Streptococcus anginosus	1.837

Fundamento teórico

-

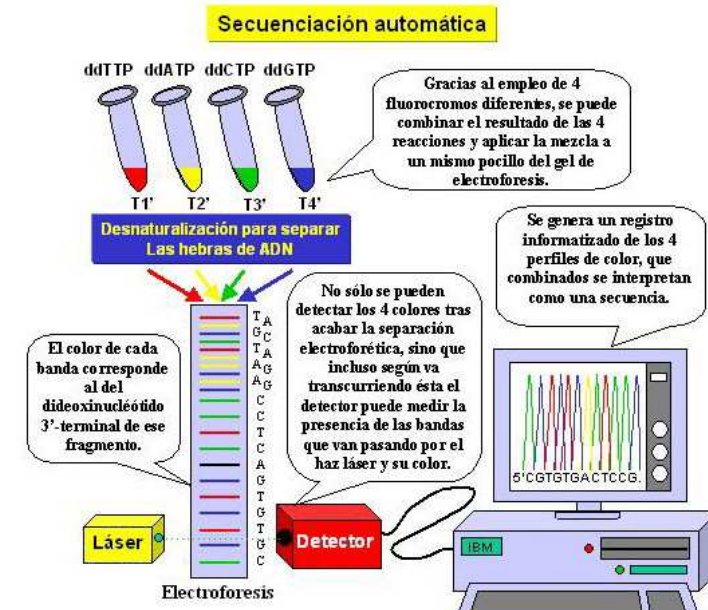
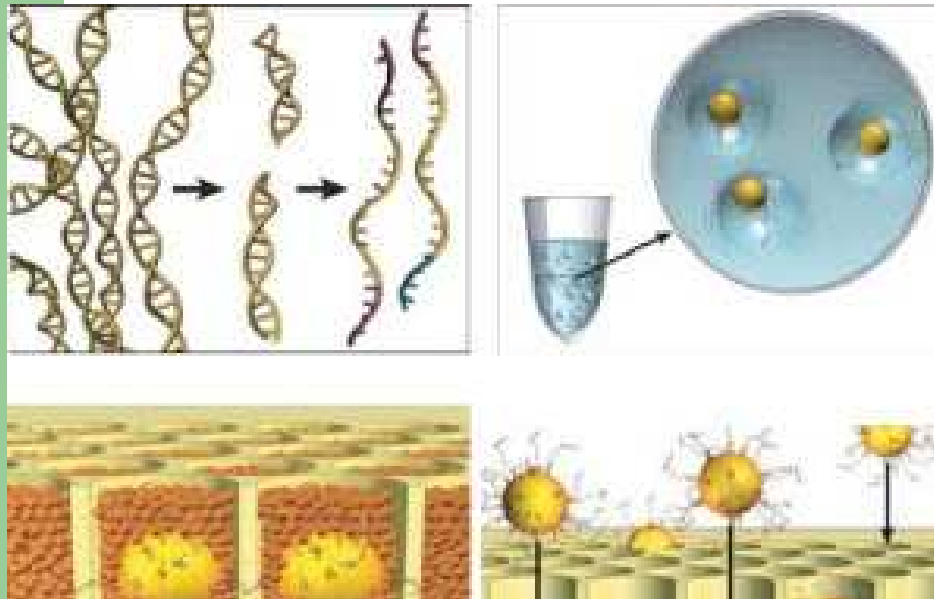
Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	no reliable identification	(-)	red

FUNDAMENTOS BASICOS DE LA SECUENCIACIÓN MASIVA



¿Qué es la secuenciación masiva?

- Es un sistema de secuenciación que permite:
 - Secuenciar 500 millones de bases en menos de 12 horas
 - La secuenciación tradicional (tipo Sanger) tiene un rendimiento de 500-1000 bases en el mismo tiempo



Fundamento



Roche 454 FLX System
GS Junior System



Pirosecuenciación

Etapas de la pirosecuenciación

- **emPCR (PCR en emulsión):**

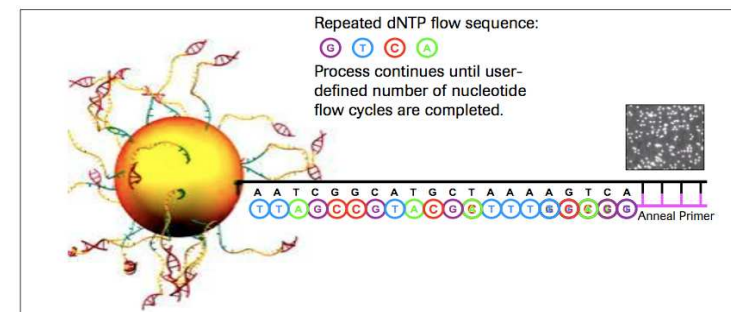
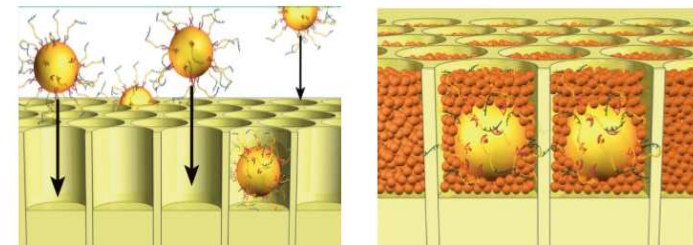
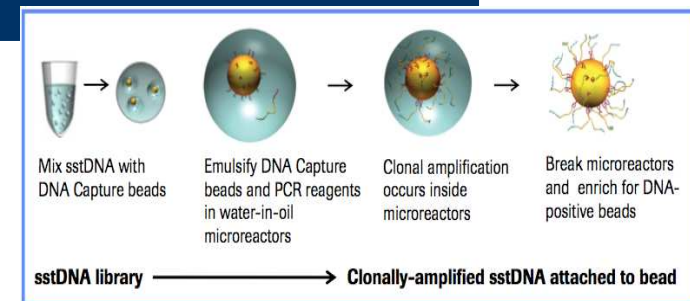
- Los amplificadores se unen a bolas con secuencias complementarias del adaptador A. Una única molécula se une a cada bola

- **Secuenciación**

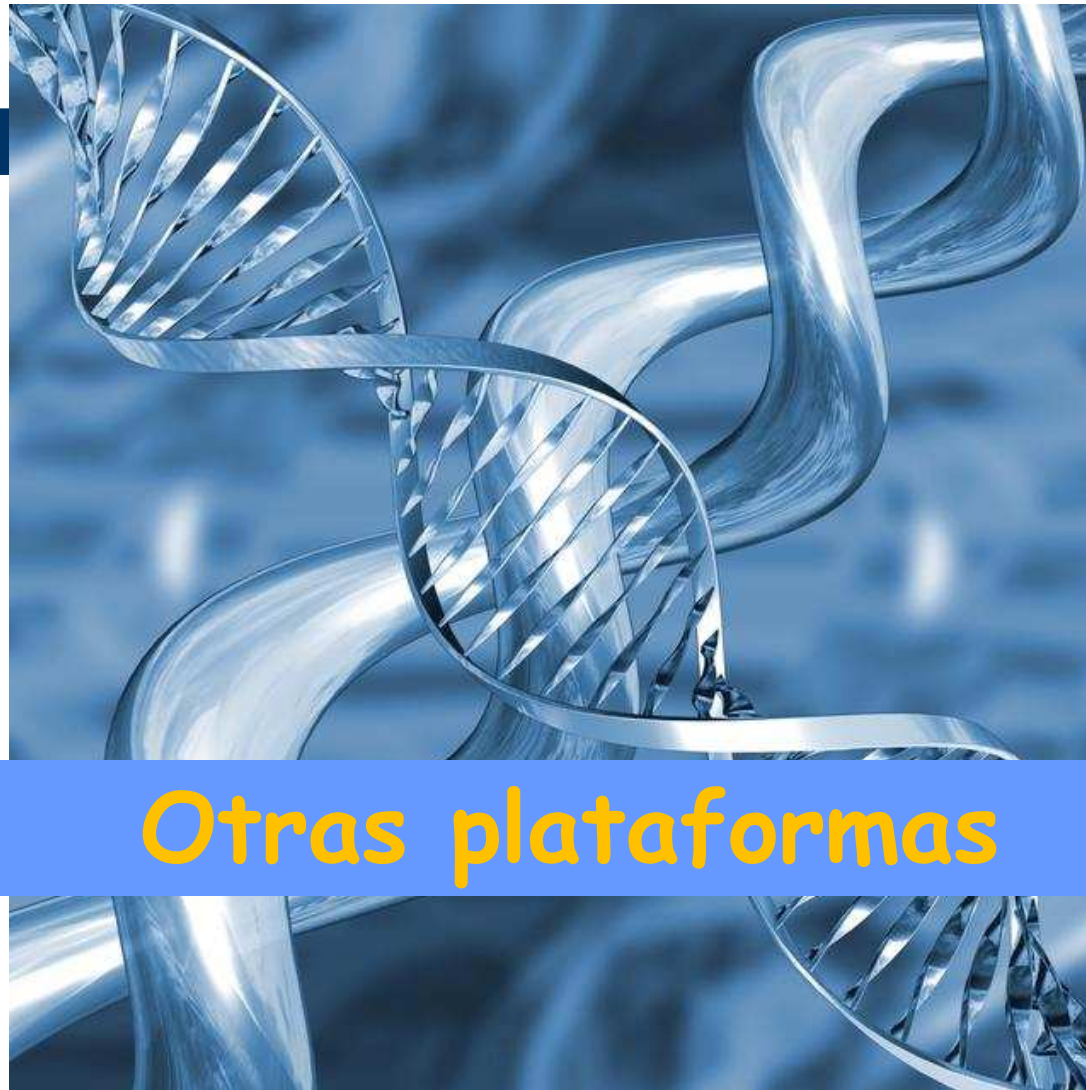
- La placa consta de más de un millón de pocillos de forma que sólo cabe una bola por pocillo
- Los cientos de miles de bolas con millones de copias de ADN se secuencian en paralelo

- **Análisis bioinformático:**

- Se separan las secuencias por muestra en base a los códigos de barras genéticos utilizados en sus primers correspondientes
- Se realizará una comparación con la base de datos del "Ribosomal database project" (RDP: <http://rdp.cme.msu.edu/>) y genBank



Secuenciadores masivos

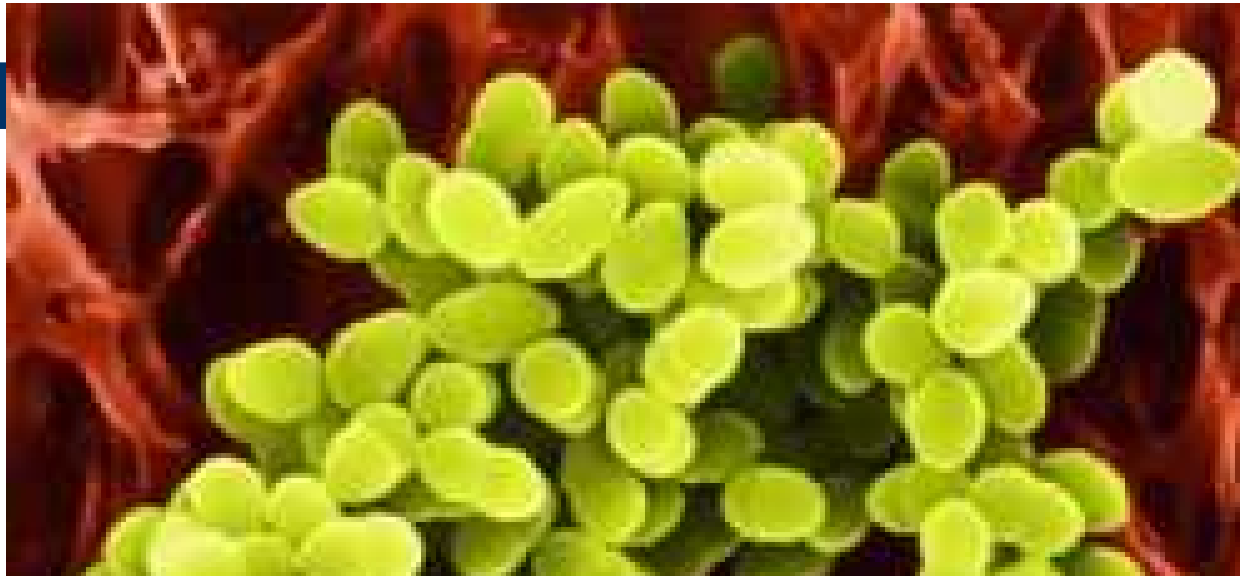


Otras plataformas

Comparación de secuenciadores masivos

	Roche 454	Ion Torrent	Illumina
Tecnología Secuenciación	Pirosecuenciación	Semiconductores	SBS (Seq. By Synthesis)
Enriquecimiento muestra	Emulsion PCR	Emulsion PCR	Amplificación puente
Mb por run	100	100	600.000
Tiempo por run	7 h	1.5 h	9 dias
Tamaño lectura	400-500 bp	200 bp	2x100 bp
Cost por run	\$ 8,438 USD	\$ 350 USD	\$ 20,000 USD
Cost por Mb	\$ 84.39 USD	\$ 5.00 USD	\$ 0.03 USD
Cost por instrumento	\$ 500,000 USD	\$ 50,000 USD	\$ 600,000 USD

Aplicaciones

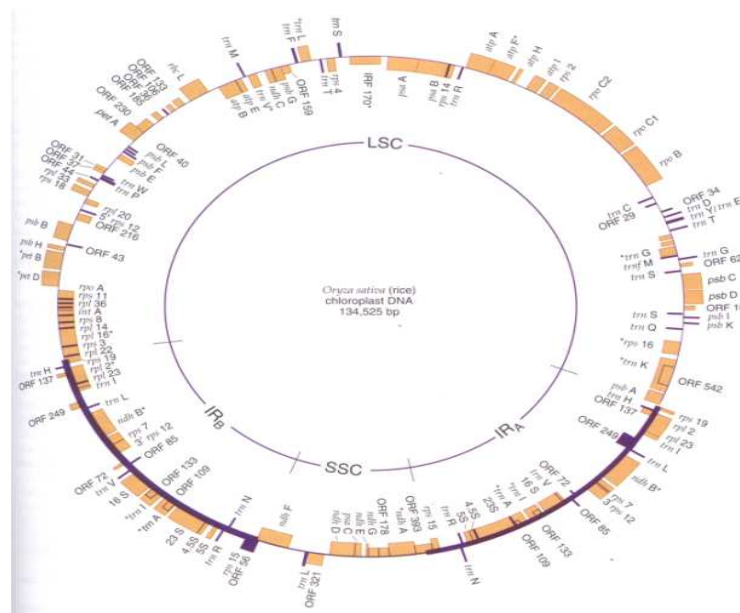


Identificación bacteriana
y fúngica de microbioma

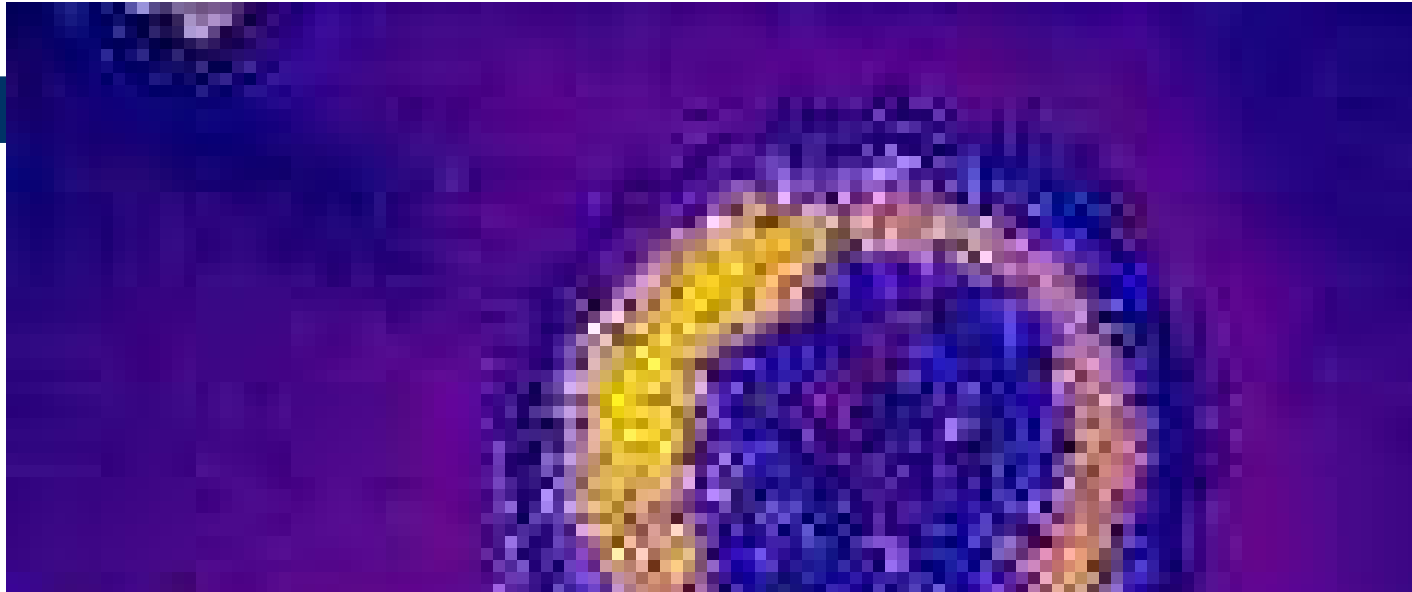
Copyright © 2007 Dennis Kunkel Microscopy, Inc. / Dennis Kunkel

Secuenciación completa del genoma

- Permite conocer todos los genes asociados a:
 - Resistencia antibiótica
 - Patogenicidad
 - Virulencia
 - Epidemiología molecular aplicada a la detección de brotes



Aplicaciones prácticas



Subpoblaciones minoritarias virales

Futuro

- Supone un cambio sustancial en la Microbiología clínica
- Permite:
 - Identificar poblaciones microbianas, víricas o fúngicas
 - Detectar genes de resistencia, virulencia y patogenicidad de microorganismos o de ecosistemas microbianos complejos
 - Estudios de epidemiología molecular o de sensibilidad antibiótica por secuenciación completa del genoma de un microorganismo

