

TEMA 10. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS BUCODENTALES

1. Objetivo del diagnóstico microbiológico

2. Toma de muestra

3. Diagnóstico directo

- bacterias
- hongos
- protozoos
- virus

4. Diagnóstico indirecto

1. OBJETIVO DEL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

El diagnóstico microbiológico es el conjunto de procedimientos y técnicas realizadas para establecer la etiología del agente responsable de una enfermedad infecciosa. Esto se debe hacer para:

- poner un tratamiento lo antes posible
- identificar la fuente de infección y evitar su transmisión

En ocasiones es necesario aislar el microorganismo patógeno en cultivo puro para poder investigar otras características como:

- sensibilidad antibiótica
- serotipos
- virulencia
- preparación de vacunas

Para poder realizar un correcto diagnóstico microbiológico es imprescindible partir de muestra adecuada.

2. TOMA DE MUESTRA

En las muestras clínicas de tejidos no estériles, como la cavidad oral, están presentes diferentes microorganismos, por lo que habrá que conocer de

antemano cuáles son esos microorganismos colonizadores y cuáles pueden ser los microorganismos patógenos responsables de la enfermedad infecciosa.

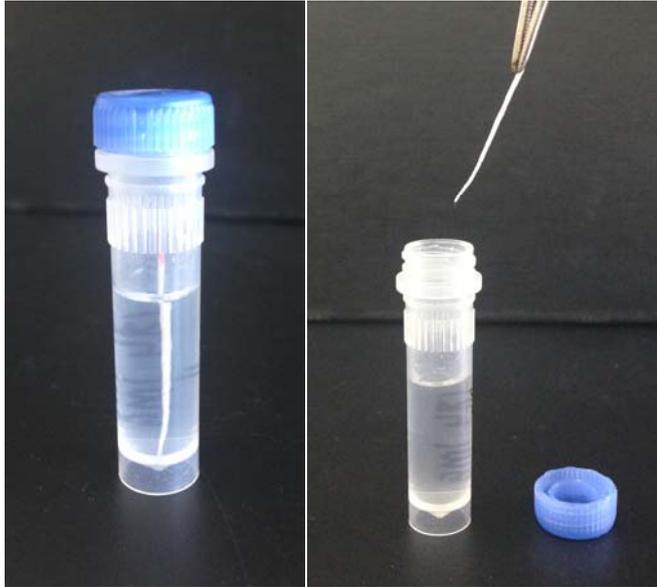
Además, la muestra debe cumplir una serie de requisitos:

- debe ser representativa
- se debe lograr el mayor volumen posible
- hay que evitar en la mayor medida la contaminación por microorganismos comensales de la cavidad oral
- hay que tomarla antes de comenzar con el tratamiento antimicrobiano, de manera que no interfiera en los resultados

La toma de muestra se debe realizar utilizando instrumental estéril. Es frecuente utilizar hisopos estériles para la toma de muestra de la mucosa oral y puntas de papel absorbentes para la toma de muestra de lugares como surco gingival o la bolsa periodontal. Si la muestra tiene que ser transportada al laboratorio, se colocará en un recipiente que contenga una pequeña cantidad de medio de cultivo.



Torundas con medio para toma de muestras



Puntas para toma de muestra de bolsa periodontal

Las muestras de zonas purulentas se pueden obtener mediante punción con jeringa y aguja, intentando obtener la máxima cantidad de muestra posible. Las biopsias de las lesiones constituyen una buena muestra para establecer la etiología de una enfermedad.

Si se sospecha la implicación de microorganismos anaerobios deben tomarse precauciones en el traslado de la muestra al laboratorio, así como en su manipulación; se utilizaran medios de transporte y técnicas de cultivo adecuadas para mantener la viabilidad de los microorganismos.

La saliva no se considera una muestra como tal, salvo que se quiera detectar anticuerpos o que se quiera realizar pruebas para analizar la probabilidad de desarrollar caries.

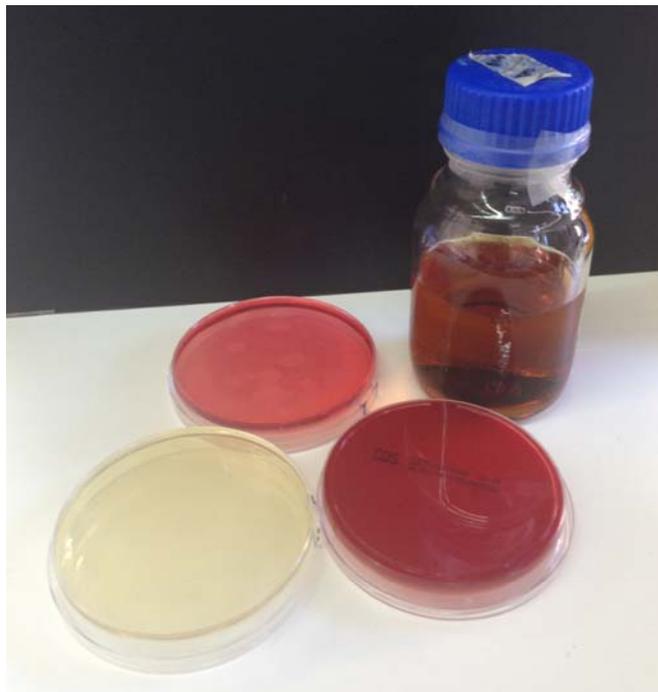
Una vez que se ha tomado la muestra, el diagnóstico microbiológico puede hacerse bien mediante diagnóstico directo, cuando se detecta directamente el microorganismo o sus componentes, o mediante diagnóstico indirecto, cuando lo que se detecta es la respuesta inmune desencadenada frente al microorganismo patógeno, que normalmente se basa en la detección de anticuerpos frente al mismo.

Diagnóstico directo

El diagnóstico directo se basa en la detección del microorganismos causante de la infección o de de sus componentes.

Una vez que se recibe la muestra en el laboratorio de microbiología se pueden realizar frotis directos de la muestra en un portaobjetos, que observaremos directamente al microscopio o tras realizar tinciones. Los resultados obtenidos nos dan idea del tipo de microorganismos que tenemos en la muestra: forma, movilidad (si no se han realizado tinciones) o cantidad.

También se puede realizar una siembra de la muestra en medios de cultivo adecuados para el crecimiento del microorganismo patógeno. En el caso de **bacterias y hongos** es muy frecuente el empleo de medios de cultivo inertes para su crecimiento.



Medios de cultivo

En general, estos medios de cultivo contienen una fuente de carbono, proteínas, oligoelementos, coenzimas, colorantes y otros compuestos

necesarios para el crecimiento microbiano. En función de su composición se distinguen diferentes tipos de medio:

- Medios mínimos: que únicamente presentan una fuente de carbono, y son pocos los microorganismos que van a poder crecer en ellos
- Medios ricos: que además de la fuente de carbono contienen otros nutrientes que los van a hacer muy apropiados para el crecimiento de microorganismos en general.
- Medios selectivos: cuando se les añade alguna sustancia que inhibe el crecimiento de ciertos microorganismos, y permite el de otros.
- Medios diferenciales: que generalmente incluyen colorantes o indicadores de pH, de manera que ciertos microorganismos crecen produciendo un cambio de color, y otros no.

Una vez que hemos sembrado la muestra en el medio de cultivo apropiado, se deja incubar en las condiciones adecuadas y tras la incubación observaremos el crecimiento de microorganismos. Para poder realizar una correcta identificación es necesario obtener cultivos puros.

Posteriormente, se comienza con la identificación observando las características macroscópicas de los microorganismos como el crecimiento en los diferentes tipos de medios de cultivo o la morfología de las colonias. A continuación se realiza la observación microscópica de los microorganismos mediante la ayuda de un microscopio. Generalmente, se realiza una tinción previa de la muestra, siendo la tinción de Gram la más utilizada, ya que nos da información para lograr la identificación del microorganismo.

En función de los resultados obtenidos tras el análisis macroscópico y microscópico se pueden realizar otras pruebas para continuar con la identificación del microorganismo, como pueden ser pruebas bioquímicas, pruebas fisiológicas o pruebas de sensibilidad antibiótica.

Si se sospecha la presencia de **hongos**, se siembra la muestra en un medio selectivo para hongos, como por ejemplo el agar Sabouraud y se observa el

crecimiento tras la incubación. El género más importante responsable de infecciones en la cavidad bucal es *Candida*, que es un hongo dimorfo, que crece formando colonias de aspecto cremoso en dicho agar. Para lograr la identificación a nivel de especie, una prueba sencilla de realizar es un test de filamentación, que consiste en incubar la muestra en suero durante un mínimo de dos horas y posteriormente visualizar al microscopio: Si es la especie *Candida albicans*, se observará la formación del tubo germinal en las levaduras. También puede realizarse la identificación a nivel de especie sembrando la muestra en medios cromógenos, en los que, tras la incubación, se observa el crecimiento de cada especie en colores diferentes, que se pueden identificar mediante comparación con un patrón.



Agar cromógeno para la detección de diversas especies del género *Candida*.

En el caso de tratarse de un hongo filamentoso, la identificación se realiza mediante la observación al microscopio de diferentes estructuras fúngicas y otras pruebas adicionales. La observación microscópica se puede hacer tomando una muestra del micelio, bien directamente con un asa o con cinta adhesiva, y colocándola sobre un portaobjetos con una gota de colorante.

Los **protozoos** que se detectan a nivel de la cavidad bucal son *Trichomonas tenax*, que es un protozoo flagelado y *Entamoeba gingivalis*, que es una ameba. Su identificación se suele realizar mediante la observación en fresco de la

movilidad, tras la tinción con colorantes como Giemsa, o tras la realización de otras pruebas moleculares.

El cultivo de los **virus** es más complicado, ya que debe hacerse sobre células vivas, como cultivos celulares, huevos embrionados o animales. Para su observación directa es necesario el uso del microscopio electrónico, mediante el cual se pueden observar directamente los virus. También se puede observar el efecto citopático en las células infectadas.

En muchos casos la detección directa se suele realizar mediante la **detección de antígenos** de los microorganismos utilizando anticuerpos específicos unidos a algún tipo de marcaje, como por ejemplo fluorescencia. En el caso de que en la muestra se encuentre el microorganismo, se observará fluorescencia.

En los últimos años, la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha supuesto un gran avance para el diagnóstico microbiológico. Esta técnica se basa en la detección de secuencias genéticas correspondientes al microorganismo patógeno en la muestra. Se toma una muestra, se realiza una extracción del ácido nucleico y por medio de la técnica de PCR se lleva a cabo una amplificación de una secuencia génica específica correspondiente a un microorganismo. Posteriormente se carga la muestra en geles de agarosa donde los fragmentos de ADN amplificados se separan en función de su tamaño mediante electroforesis. Si se obtiene un fragmento del tamaño esperado (similar al obtenido con una muestra control), significa que el microorganismo está presente en la muestra. La aplicación de la técnica de PCR al diagnóstico microbiológico en odontología se ha utilizado por ejemplo, para la identificación de *Streptococcus mutans*, especie relacionada con la formación de la caries. También se ha utilizado esta técnica en estudios epidemiológicos de este microorganismo.

Diagnóstico indirecto

Se basa en la detección de la respuesta inmune que se desencadena tras el contacto con el microorganismo. Esta detección de la respuesta inmune se

realiza mediante técnicas serológicas como ELISA o IFI, que tienen como objetivo detectar los anticuerpos específicos frente a un microorganismo patógeno. Esta detección de anticuerpos indica, indirectamente, contacto previo con el microorganismo. En función del isotipo de anticuerpo que se detecte, podremos saber si se trata de fases tempranas de la infección o de una infección aguda, en el caso de detectarse principalmente anticuerpos de tipo IgM e IgA; si se trata de una infección pasada, en el caso de detectarse niveles de anticuerpos IgG altos e IgM bajos, o de una reactivación, en el caso de detectarse niveles de anticuerpos IgG altos e IgM normales.



Técnica ELISA.

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:ELISA.jpg>