



Germans Trias i Pujol
Hospital
Servei de Microbiologia

**CURS TEÒRIC-PRÀCTIC SOBRE PREVENCIÓ I CONTROL
DE LES INFECCIONS DE TRANSMISSIÓ SEXUAL**

PRÀCTIQUES EN MICROBIOLOGIA

**Dra. Lurdes Matas Andreu
Dra. Victòria González Soler*
Dra. Gema Fernández Rivas
Dr. Francesc Xavier Vallés***

**Servei de Microbiologia
* CEEISCAT
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol**

Objectius. Obtenir una visió global de les capacitats i limitacions de les tècniques de diagnòstic microbiològic de les Infeccions de transmissió sexual

Contingut.

Diagnòstic indirecta.

Serologia sífilis.

Proves reagíniques. RPR. Titulació d'anticossos reagínics

Proves treponémiques. TPHA.

Serologia VIH

Prova ràpida

Prova confirmatòria. Innolia-HIV

Diagnòstic directa

Observació en fresc

Observació tinció de Gram

Observació de cultius

Observació d'estudis de sensibilitat *in vitro*

1- SEROLOGIA SÍFILIS

Prova reagínica: R.P.R – Rapid protein reagin

Principi analític:

L'antigen R.P.R és una suspensió cardiolipídica que conté micropartícules de carbó. Aquest antigen detecta un anticòs, anomenat **reagina** que es troba present en el sèrum dels pacients afectats de sífilis i, ocasionalment, en altres malalties cròniques o agudes. En el cas de presència de reagines a la mostra, aquestes reaccionaran amb l'antigen formant agregats que s'aglutinaran amb les partícules de carbó.

Material:

- Targes d'un sol ús de fons blanc.
- Palets.
- Vial dispensador d'antigen.
- Agulla dosificadora d'antigen.
- Pipetes serològiques i/o automàtiques.
- Puntetes de pipeta.

Reactius:

REDITEST R.P.R.

Subministrador: BIODATA

Conservació: 6±2°C, fins la data de caducitat del kit.

Control intern.

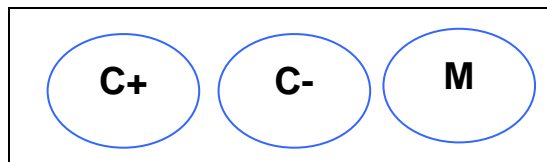
Control positiu . Es processarà cada cop que es realitzi la tècnica.

Control negatiu. Utilitzeu PBS

Procediment operatiu:

Mètode qualitatiu

- Deixeu temperar els reactius durant aproximadament 15 minuts.
- Dosifiqueu 50 microlitres dels sèrums problema, control positiu control negatiu (PBS) en cada cercle de la tarja d'aglutinació. Estendre la gota en tot el cercle.



- Agiteu suaument el vial antigen i poseu una gota (aproximadament 20 microlitres) en cada cercle fent servir l'agulla dosificadora.
- Agiteu durant aproximadament 8 minuts.
- Lectura del resultat sota llum intensa.

Mètode quantitatiu

- Dosifiqueu 50 microlitres de solució salina en cadascun dels cercles 1 a 5 de la tarja.

- Dispenseu amb pipeta automàtica 50 microlitres de la mostra al cercle 1. Barregeu bé i aneu fent passes fins al cercle 5. Els últims 50 microlitres els rebutgeu. Tindrem les dilucions 1/2, 1/4, 1/8, i 1/16 i 1/32.
- Dispenseu una gota del reactiu en cadascun dels cercles.
- Barregeu amb el palet. Si comenceu des de més diluït a menys, podreu utilitzar el mateix palet.
- Agiteu durant aproximadament 8 minuts.
- Lectura sota llum intensa.
- Cas de que la dilució 1/16 sigui positiva s'ha de fer una nova titulació. Per això preparem una dilució 1/16 en tub (1,5 ml de sèrum fisiològic i 0,1 ml de sèrum problema).
- Dosifiqueu 50 microlitres de solució salina en els cercles 1-5 i afegir 50 microlitres de la dilució 1/16 al pou 1. Feu passes de 50 microlitres des del pou 1 fins al 5. Tindrem les dilucions 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 i 1/512.
- Afegiu l'antigen (20 microlitres) i agiteu en agitador rotatori (PE-DA-004) a 100 rpm. durant aproximadament 8 minuts.
- Lectura igual que prova qualitativa.

Resultats

Interpretació de resultats:

Reacció positiva: Aparició de grumolls negres de carbó que es dipositen preferentment a la perifèria del cercle.

Reacció negativa: Suspensió gris homogènia o només lleugera rugositat.

Expressió de resultats: Positiu, negatiu.

En cas d'observar aglutinació (positiu) s'ha de determinar el títol de la mostra (Mètode quantitatiu). Es donarà com a **positiu** l'última dilució en la que s'observa aglutinació.

Es donarà el resultat **positiu sèrum pur (PSP)**, en cas d'observar aglutinació únicament en la tècnica qualitativa.

Prova treponémica: TPHA – *Treponema pallidum* hemaglutination

Principi analític:

Els hematies de pollastre es sensibilitzen amb un extracte antigènic de *Treponema pallidum* (soca Nichols). Aquests hematies aglutinaran amb els anticossos específics presents al sèrum o plasma de pacients que estiguin afectats de sífilis.

Les reaccions no específiques es detecten amb el reactiu control no sensibilitzat.

Els anticossos del grup *Treponema* no específics de la sífilis s'absorbeixen amb un extracte de *treponema* Reiter inclòs a la solució diluent.

Material:

- Plaques de microtitulació amb fons en U (rodó).
- Pipetes automàtiques.
- Puntetes de pipeta.

Reactius:

SYPHAGEN TPHA.

Subministrador: BIOKIT

Conservació i estabilitat: en nevera a 6±2°C, fins data de caducitat del lot.

Control intern: Control positiu i control negatiu. Es processaren cada cop que es realitzi la tècnica.

Procediment operatiu

- Deixeu temperar els reactius uns 15-30minuts.
- Barregeu bé els reactius per assegurar suspensions homogènies.
- Agafeu les plaques de microtitulació. Per cada mostra calen 4 pous, els dos primers es fan servir per fer dilucions.
- Retoleu les plaques amb el número de mostra corresponent i controls.
- Dispenseu diluent a raó de : 25 microlitres al pou 1, 100 microlitres al 2, 25 microlitres al 3 i 25 microlitres al 4.
- Afegiu 25 microlitres del sèrum problema al pou 1. Barregeu i transferiu 25 microlitres al pou 2, barregeu i transferiu 25 microlitres al pou 3, rebutgeu 25 microlitres d'aquesta dilució. Agafeu 25 microlitres del pou 2 i transferiu-los al pou 4, barregeu i rebutgeu els últims 25 microlitres.
- Afegiu 75 microlitres del reactiu control (hematies NO sensibilitzats) al pou 3 de mostres i controls.
- Afegiu 75 microlitres del reactiu antigen (hematies sensibilitzats) al pou 4 de mostres i controls.
- Agiteu la placa durant aproximadament 30 segons.
- Incubeu aproximadament 1 hora a temperatura ambient. Eviteu qualsevol moviment de la placa o temperatures elevades.
- CAL incloure sempre control positiu i negatiu, que com ja venen pre-diluïts es dispensen directament als pous 3 i 4 (sense diluent).
- Lectura dels resultats.

Resultats

Interpretació de resultats:

La prova només és vàlida si en el pou de cèl·lules NO sensibilitzades (pou número 3) no observem reacció.

Reacció positiva: Aglutinació homogènia que tapa tot el fons del pou. Les vores són ocasionalment irregulars.

Reacció negativa: Botó central d'hematies.

En pacients amb malaltia autoimmune, es poden trobar aglutinacions inespecífiques (s'observa també amb cèl·lules no sensibilitzades). Es recomana repetir la determinació fent dilucions dobles progressives d'ambdues cèl·lules. Considerem reacció positiva si el títol d'aglutinació de les cèl·lules positives és 4 vegades major que el de cèl·lules no sensibilitzades.

Expressió de resultats:

POSITIU i/o NEGATIU

2- SEROLOGIA VIH

Prova ràpida. Determine VIH

Principi analític:

Es tracta d'un immunoassaig qualitatiu *in vitro* per a la detecció d'Ac del VIH-1/VIH-2. Els antígens estan fixats a una membrana. Si a la mostra hi ha anticossos VIH, aquests s'uniran als antígens de la membrana. El reactiu colorimètric del kit s'unirà a aquests anticossos creant un indicador que és visualment detectable.

- Són tests de cribratge, com l'ELISA
- Recol·lecció de la mostra per punció digital
- Proporcionen resultats en 15-20 minuts.
- No requereixen cap equipament ni reactius que no vinguin amb el kit.
- De molt fàcil realització.
- La sensibilitat i la especificitat són similars a les dels ELISA

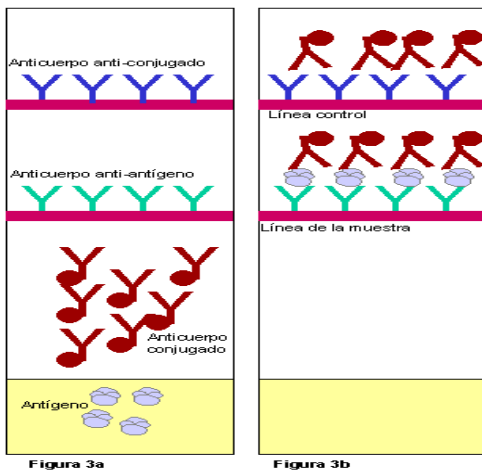
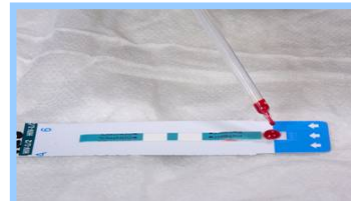


Figura 1. Principi analític del test ràpid

Nom i casa comercial:

Determine HIV 1-2 (Inverness medical)

Procediment operatiu:



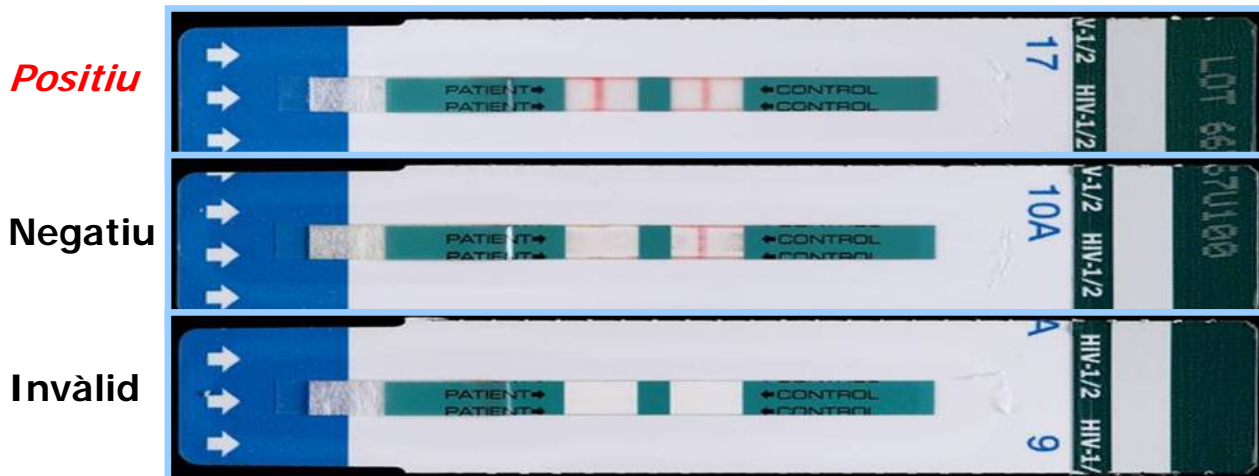
1. Retireu la coberta protectora

2. Recol·lecteu una gota de sang amb una pipeta de Plàstic.

3. Apliqueu la mostra en la superfície absorbent de la tira



Interpretació i expressió dels resultats:



Prova confirmatòria. Innolia VIH-1+2

Principi analític:

El test es basa en el principi del ELISA indirecte sobre una tira de nilons que conté proteïnes recombinants i pèptids sintètics d'HIV-1 i HIV-2, i un pèptid sintètic d'HIV-1 O.

També hi ha 4 línies de control: una anti-streptavidina, un cut-off (IgG humana), un control positiu (1+), i un control positiu fort (3+), que a més és el control d'addició de mostra (anti-Ig humana). La mostra a testar s'incuba amb la tira que porta els antígens enganxats. Si aquesta mostra té anticossos específics contra HIV, aquests s'uniran als antígens individuals d'HIV que hi ha a la tira. Després, s'afegeix una IgG de cabra anti-humana marcada amb fosfatasa alcalina, que s'unirà al complexa preformat d'antigen - anticòs d'HIV. La incubació amb un enzim-substrat (BCIP/NBT) dona un color marró fosc d'una intensitat proporcional a la quantitat d'anticòs específic present a la mostra. El desenvolupament del color s'atura afegint àcid sulfúric.

Reactius:

Nom: INNO-LIA HIV-1/HIV-2 SCORE

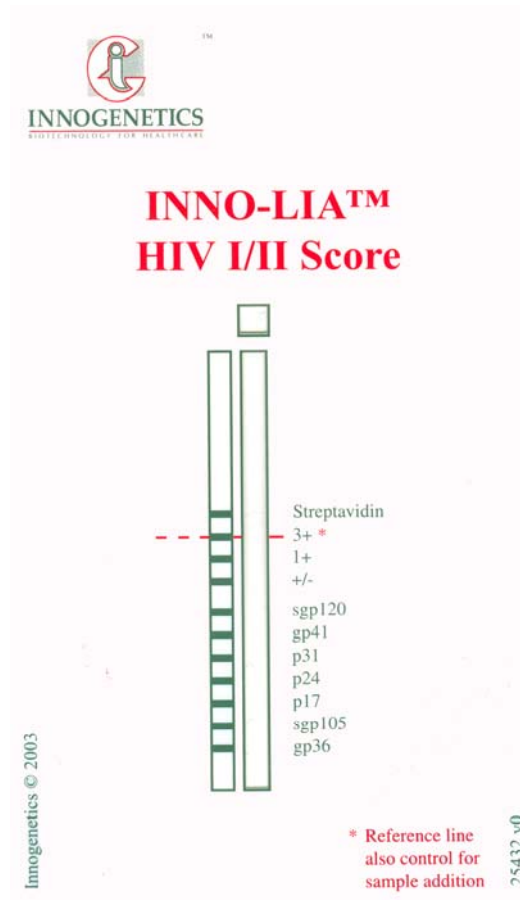
Subministrador: InnoGenetics

Control intern: Control positiu, control negatiu. Es processaran cada cop que es realitzi la tècnica.

Procediment: Es presenten proves ja concloses, atès que aquesta tècnica requereix un temps de realització de 5 hores

Lectura visual dels resultats:

La identitat i localització de les bandes dels antígens i de les línies dels controls a les tires és la següent:



La intensitat de la reacció a les línies de control de cada tira, és la que determinarà el valor de reactivitat (R) de cada antigen d'aquella tira. Així, en una tira, hem de comparar la intensitat de cada antigen amb la intensitat de les línies +/-, +1 i +3. En funció d' a quin rang està, li donarem un valor, segons la taula següent:

Intensitat de la reacció a la línia de l'antigen	Valor
$R < \pm$	-
$R = \pm$	\pm
$\pm < R \leq 1+$	1+
$1+ < R < 3+$	2+
$R = 3+$	3+
$R > 3+$	4+

Per tal de facilitar la lectura visual, s'adjunta una targeta de lectura. Cal alinear la línia corresponent al 3+ de la nostra tira a examinar amb la que figura a la targeta de lectura.

Validació dels resultats:

1- Validació de la tècnica:

- La tira de control positiu ha de ser positiva com a mínim amb un valor de 1+ a gp120, gp41, p31, p24 i gp36. La p17 i la sgp105 poden ser negatives.
- La tira de control negatiu ha de ser negativa per tots els antígens (no tenint cap reacció o, en cas d'existir reacció per algun antigen, que aquesta sigui $<\pm$).

2- Validació de cada tira:

- Les línies de control \pm , 1+ i 3+ s'han de veure a totes les tires.
- La intensitat del control 3+ ha de ser major que la del control 1+.
- La línia de l'estreixin-la ha de ser negativa (si apareix, ha de ser menys intensa que \pm)

Interpretació dels resultats:

una mostra és **NEGATIVA** per a anticossos de l'HIV:

- si totes les bandes de reacció antigen - anticòs són negatives ($<\pm$)
- si una banda té un valor de \pm , i la resta són negatives.

una mostra és **INDETERMINADA** per a anticossos de l'HIV:

- si ≥ 2 bandes tenen un valor de \pm .
- si una banda és positiva $\geq 1+$, i les altres són negatives o \pm .
- si ≥ 2 bandes són positives $\geq 1+$, però les condicions per a que es doni la positivitat per HIV no es compleixen.

una mostra és **POSITIVA** per a anticossos de l'HIV:

- si dues bandes tenen un valor de $\geq 1+$ sempre que es compleixi que siguin:
 - 2 bandes d'antígens d'embolcall del mateix tipus d'HIV:
(gp120 + gp41) o (gp105 + gp36)
 - un antigen d'embolcall (gp120, gp41, gp105, gp36) i la línia de l'antigen p24.
- si ≥ 3 bandes tenen un valor de $\geq 1+$ sempre que una d'elles sigui d'un antigen d'embolcall (gp120, gp41, gp105, gp36).

Quan una mostra és positiva per HIV, caldrà diferenciar:

POSITIVA PER HIV-1:

- si un dels antígens d'HIV-1 (gp120 o gp41) és positiu ($\geq 1+$), es permet una reactivitat màxima de \pm en una de les bandes específiques d'HIV-2 (gp105 o gp36).
- si les bandes de tots dos antígens d'HIV-1 (gp120 i gp41) són positives ($\geq 1+$), es permet una reactivitat de 1+ en una de les bandes específiques d'HIV-2 (gp105 o gp36).

POSITIVA PER HIV-2:

- si un dels antígens d'HIV-2 (gp105 o gp36) és positiu ($\geq 1+$), es permet una reactivitat màxima de \pm en una de les bandes específiques d'HIV-1 (gp120 o gp41).
- si les bandes de tots dos antígens d'HIV-2 (gp105 i gp36) són positives ($\geq 1+$), es permet una reactivitat de 1+ en una de les bandes específiques d'HIV-1 (gp120 o gp41).

*Existeix la possibilitat d'una mostra positiva per HIV sense poder diferenciar si és per HIV-1 o HIV-2; en el cas de que no es compleixin els criteris anteriors.

LIMITACIONS DEL PROCEDIMENT:

-REACTIVITAT AMB LA LÍNIA DE CONTROL DE L'ESTREPTAVIDINA: si una mostra dóna la banda de l'estreptavidina positiva, pot donar reactivitat creuada amb les bandes dels antígens de l'HIV, i per tant, no es pot determinar la seva positivitat.

-EN CAS D'OBTENIR UN RESULTAT INDETERMINAT: es recomana testar una nova mostra del pacient passades unes setmanes.

-SI ES DÓNA UN RESULTAT POSITIU PER HIV BASAT EN LA POSITIVITAT DE NOMÉS 2 BANDES ESPECÍFIQUES: cal fer un seguiment del malalt amb noves mostres.

-MOSTRES DIL·LUIDES: no es recomana l'ús de mostres dil·luides, ja que poden donar resultat erronis.

RESUM DELS CRITERIS D'INTERPRETACIÓ

-Una banda es considera positiva si una reactivitat mínima d'1+

-Anomenem ENV1 a les bandes corresponents als antígens de l'embolcall de l'HIV-1: sgp120 i gp41

-Anomenem ENV2 a les bandes corresponents als antígens de l'embolcall de l'HIV-2: sgp105 i gp36

Absència de bandes positives	Cap banda ± 1 banda ± 2 o més bandes ±	NEG NEG INDET
1 banda positiva (≥1+)		INDET
2 bandes positives (≥1+)	Cap ENV positiu	INDET
	1 ENV1 i p24	HIV-1*
	2 ENV1	HIV-1*
	1 ENV2 i p24	HIV-2**
	2 ENV2	HIV-2**
	altres combinacions	INDET
3 o més bandes positives (≥1+)	Cap ENV positiu	INDET
	1 o 2 ENV1	HIV-1*
	1 o 2 ENV2	HIV-2**
	1 ENV1 i 1 ENV2	HIV

	2 ENV1 i 1 ENV2 si ENV2 = 1+ si ENV2 >1+	HIV-1 HIV
	1 ENV1 i 2 ENV2 si ENV1 = 1+ si ENV1 >1+	HIV-2 HIV
	2 ENV1 i 2 ENV2	HIV

* i **: si s'obté una reactivitat de \pm a ambdues bandes de l'ENV1(*) o a les dues d'ENV2(**), es donarà el resultat com a mostra positiva per HIV, ja que no serà possible tipar-la.

DIAGNÒSTIC DIRECTA

3. Observació en fresc

Objectiu. Visualització de microorganismes en suspensió que permet observar les característiques de forma, grandària i mobilitat

Material

Portaobjectes
Cubreobjectes
Pipeta Pasteur

Microscopi òptic (objectiu de 10x)

Procediment

Col·loqueu una gota de la suspensió a sobre del portaobjectes.
Col·loqueu el cubreobjectes a sobre
Elimineu l'excés de suspensió dels laterals amb un mocador de paper
Dipositeu la preparació a la platina del microscopi
Observeu la preparació amb l'objectiu de 10x i amb el condensador tancat.

Resultat

Descripció del/s microorganismes observats

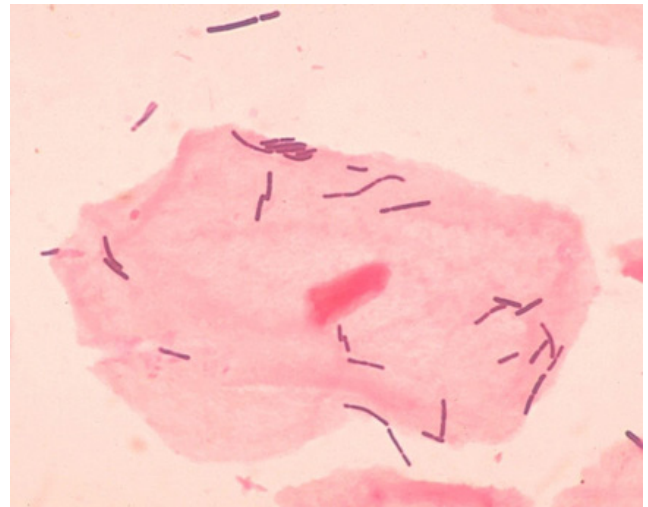
4. Observació de tinció de Gram

Principi analític: els microorganismes grampositius degut al gran contingut d'àcids teicoics i a la poca quantitat de lípids de la seva paret retenen el cristall violeta i són impermeables al decolorant. Els microorganismes gramnegatius tenen un gran contingut de lípids i són molt permeables al decolorant.

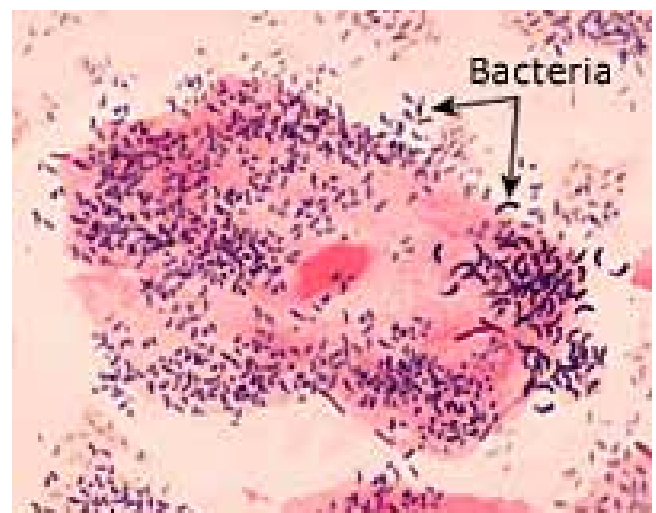
Procediment operatiu (tinció)

- Assequeu la preparació a temperatura ambient o a l'estufa de $36\pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Fixeu amb metanol durant 5' o flamejant.
- Col·loqueu el portaobjectes a la gradeta de tinció
- Cobriu la preparació amb cristall violeta durant 1-2'
- Decanteu el colorant i renteu amb aigua
- Cobriu amb la solució de lugol durant 1-2'
- Decanteu i renteu amb aigua
- Decoleu amb alcohol - acetona fins que no desprengui colorant (aproximadament 15")
- Decanteu i renteu amb aigua
- Cobriu amb fucsina diluïda durant 1'-1':30"
- Decanteu. Renteu. Assequeu a temperatura ambient o a l'estufa de $36\pm 2^{\circ}\text{C}$
- Observeu a 1000X amb oli d'immersió.

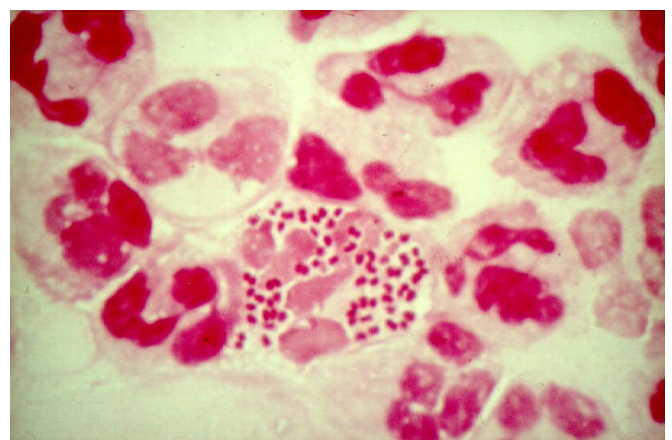
Tinció de Gram: flora vaginal normal



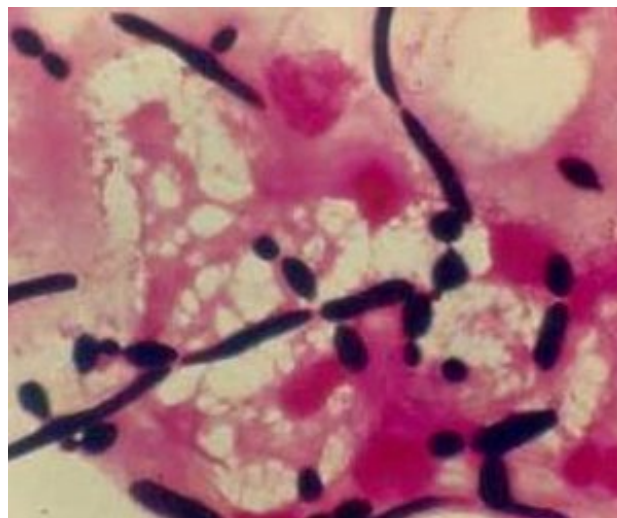
Tinció de Gram: Clue cells



Tinció de Gram: Gonococ



Tinció de Gram: flora amb llevats



Se us faciliten diversos portaobjectes amb tincions de Gram a partir de mostres clíniques (Exsudat vaginal / exsudat uretral)

Resultat

Descripció del/s microorganismes observats

5. Observació de cultius

Medi d'agar Sabouraud (cloramfenicol+ gentamicina):

És un medi selectiu recomanat per l'aïllament de llevats i fongs a partir de mostres polimicrobianes. La gentamicina inhibeix el creixement de bacteries Gram positives i negatives, i el cloramfenicol millora la selectivitat enfront algunes espècies que poden ser resistents a la gentamicina, com estreptococs i *Proteus*. El pH del medi és lleugerament àcid, d'aquesta manera afavoreix el creixement fúngic.

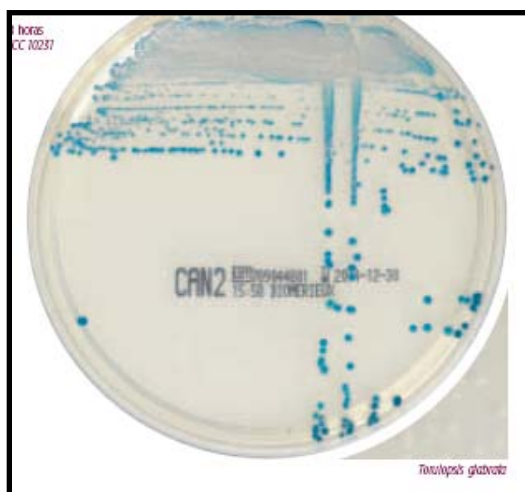
En aquest medi de cultiu observaren colònies del gènere *Candida*. Les colònies són grans, rodones, de color blanc o crema



Aïllament de *Candida albicans*

Medi d'agar cromogènic de llevats:

Medi selectiu per l'aïllament de llevats, en especial del gènere *Candida*. Es pot observar el creixement de *Candida albicans* (colònies de color blau per la hidròlisi d'un substrat cromogènic, com és la hexosiminidasa).



Aïllament de *Candida albicans*

Medi d'agar Gardnerel-ia:

És un medi selectiu per al creixement de *Gardnerella vaginalis*. Està fet amb una base ordinària i s'enriqueix amb sang humana, on Gardnerella creix formant colònies petites, rodones, llises i amb beta-hemolisi



Aïllament de *Gardnerella vaginalis*

Medi d'agar Thayer Martin:

Medi selectiu per l'aïllament de les espècies del gènere *Neisseria*. El medi es prepara a partir de la base d'agar GC addicionant hemoglobina i una barreja d'antibiòtics (vancomicina, colistina, nistatina i trimetoprim).

En el nostre cas, observaren colònies de l'espècie *Neisseria gonorrhoeae*. Són colònies diminutes dintre d'una vorera circumscriu.



Aïllament de *Neisseria gonorrhoeae*

6. Observació d'estudis de sensibilitat *in vitro*

Disc difusió

Principi analític: s'utilitzen discs de paper de filtre impregnats amb una determinada concentració d'antibiòtic. Quan el disc es posa en contacte amb la superfície humida de l'agar, on prèviament s'ha fet la sembra amb una determinada quantitat de suspensió del microorganisme, l'antibiòtic difon al medi que l'envolta. Segons augmenta la distància respecte del disc, es produeix una reducció logarítmica de la concentració d'antibiòtic.

Estudi de la concentració mínima inhibidora mitjançant difusió amb E-test

Principi analític: Les tires de E-test són d'un material plàstic porós i porten per una cara un gradient d'antibiòtic predefinit i per l'altra l'escala de CMIs corresponents. Quan es transfereix a l'agar, el gradient continu d'antibiòtic es manté estable durant un període de temps igual o superior al temps establert com a necessari per l'estudi de la sensibilitat antibiòtica de la major part dels microorganismes.

Procediment operatiu

-Assecat de les plaques. En cas de que siguin mullades, deixeu assecar les plaques a temperatura ambient durant 10-15 minuts abans de fer-les servir.

-Preparació de l'inocula. Realitzeu una suspensió a partir de les colònies seleccionades del medi d'aïllament, en un tub amb aigua destil·lada estèril. Ajusteu la terbolesa equivalent al 0.5 de McFarland.

-Inocul·lació del medi. Impregneu un hisop estèril amb la suspensió i després elimineu l'excés de líquid per rotació contra les parets del tub. Inoculeu la placa refregant suaument l'hisop per la superfície de l'agar en diferents direccions per tal d'obtenir un cultiu homogeni.

-Col·locació dels discs. Dipositeu en cada placa els antibiòtics corresponents mitjançant les pinces. Després deixeu les plaques invertides durant uns 5 minuts per tal de facilitar la difusió dels antibiòtics a l'agar.

- Col·locació de la tira de E-test. Dipositeu al medi la tira d'antibiòtic a estudiar amb l'ajuda d'unes pinces. Col·loqueu sempre la tira amb la escala de CMIs mirant cap a la part oberta de la placa. Una vegada s'ha posat no s'ha de moure. Després, deixeu la placa invertida durant 5 minuts per tal de facilitar la difusió de l'antibiòtic a l'agar.

-Incubació de les plaques. Per a gonococ es fa en estufa de $36\pm 2^{\circ}$ C en atmosfera amb un 6 ± 2 % de CO₂ durant 18-24 hores.

Resultat.

Interpretació dels resultats segons recomanacions de CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)

Disc-difusió

Antibiòtic	Càrrega disc	R	I	S
Penicil·lina	10 UI	≤ 26	27-46	≥ 47
Ciprofloxacina	5 µg	≤ 27	28-40	≥ 41

CMI

Antibiòtic	R	I	S
Cefotaxima	--	--	< 0,5