

NOVEDADES EN MÉTODOS RÁPIDOS DE DIAGNÓSTICO



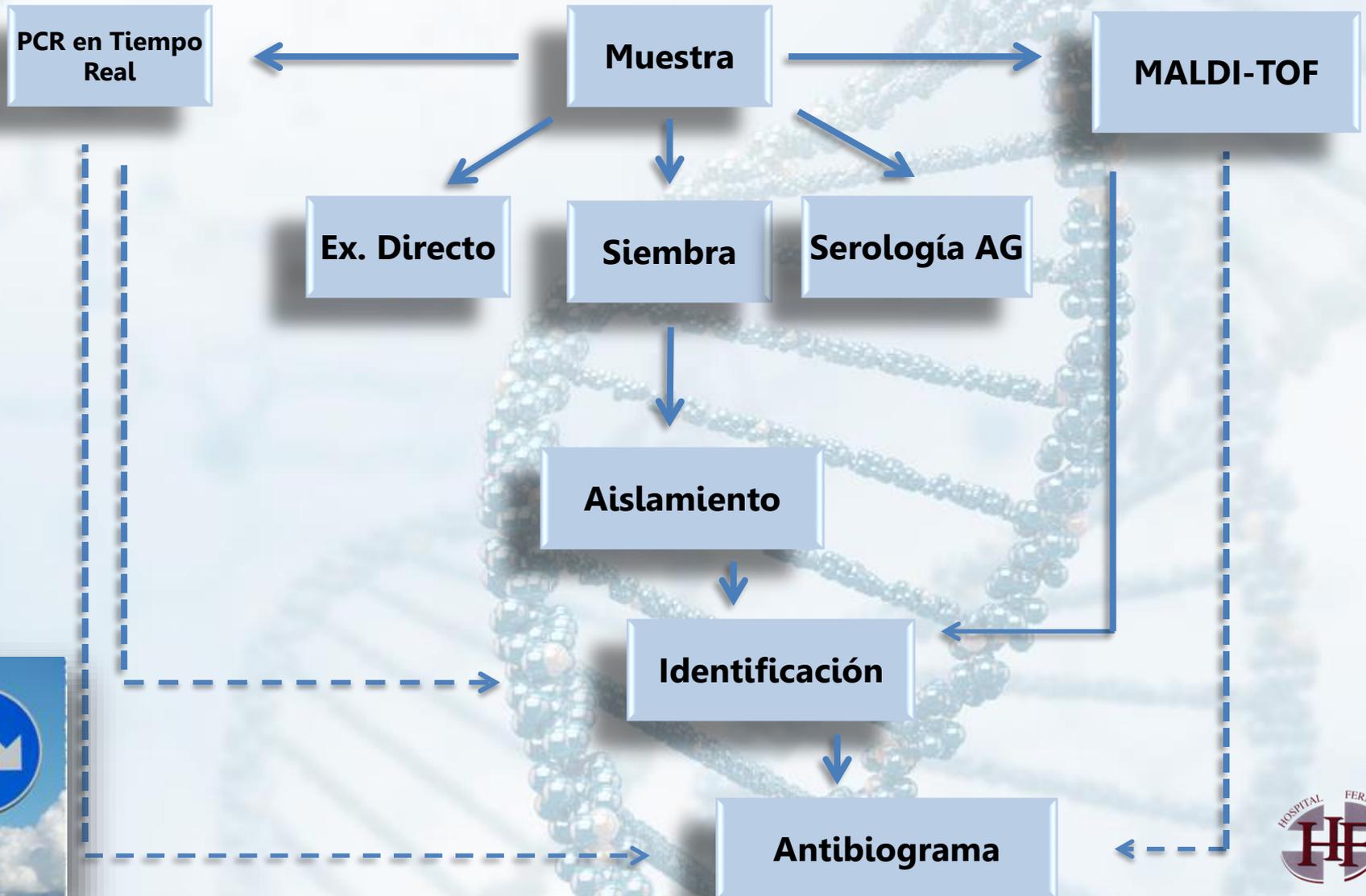
Dra. Sara Celia Kaufman
Hospital Juan A. Fernández
Jefe de Sección Microbiología Clínica

sarackaufman@gmail.com

NO EXISTEN CONFLICTOS DE INTERESES



ALGORITMO MICROBIOLÓGICO



- ✓ La metodología de biología molecular tradicional es un proceso de trabajo intensivo que requieren mucha experiencia y mucho cuidado para prevenir las contaminaciones.
- ✓ La actualidad y el futuro próximo de la Biología molecular es muy diferente. Los procesos manuales estan siendo reemplazados por procesos totalmente automatizados y consolidados en un sistema simple.
- ✓ Las Nuevas técnicas de Secuenciación Masiva del ADN, van a producir una revolución en los análisis microbiológicos similar al que tuvo en su momento la misma reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- ✓ La posibilidad de obtener el genoma de un microorganismo en un breve período de tiempo, inimaginable hace pocos años, va a cambiar nuestra manera de entender la propia microbiología por las múltiples aplicaciones que se derivan.

XPERT® PCR EN TIEMPO REAL CERRADA Y AUTOMATIZADA

INFECCIONES ASOCIADAS AL CUIDADO DE LA SALUD

Xpert MRSA
Xpert C. difficile
Xpert Carba-R
Xpert vanA/vanB
Xpert Norovirus

INFECCIONES CRÍTICAS

Xpert Xpress Flu/RSV
Xpert Flu
Xpert Mtb/Rif
Xpert Ebola
Xpert EV

VIROLOGIA

Xpert HCV Viral Load
Xpert HIV-1 Viral Load

INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL

Xpert TV
Xpert HPV Xpert CT/NG
Xpert GBS

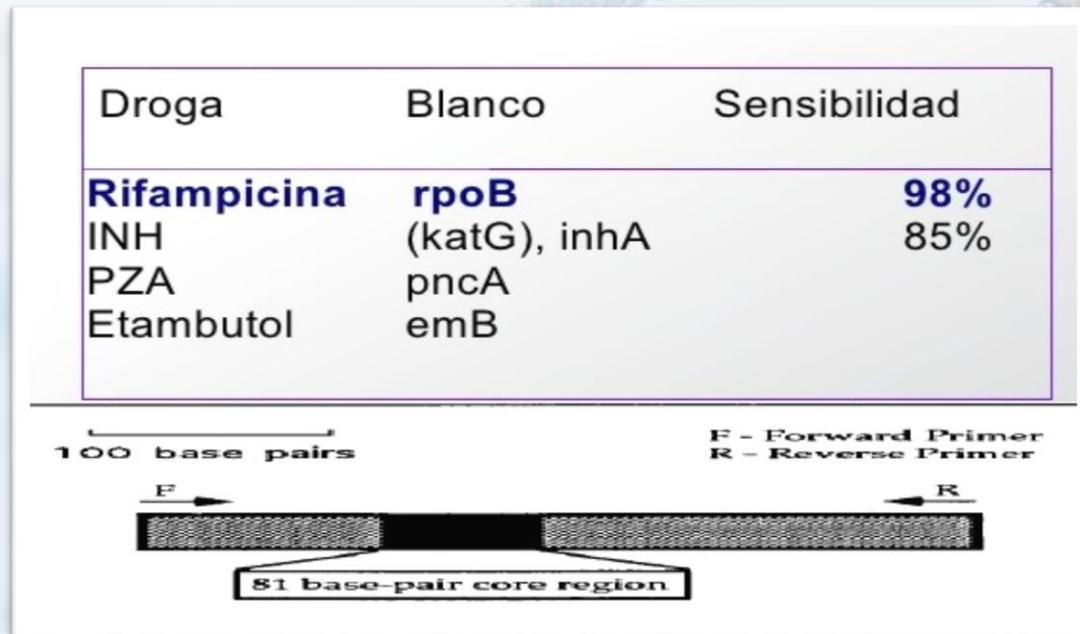


Xpert MTB/RIF ULTRA!!

GeneXpert MTB/RIF

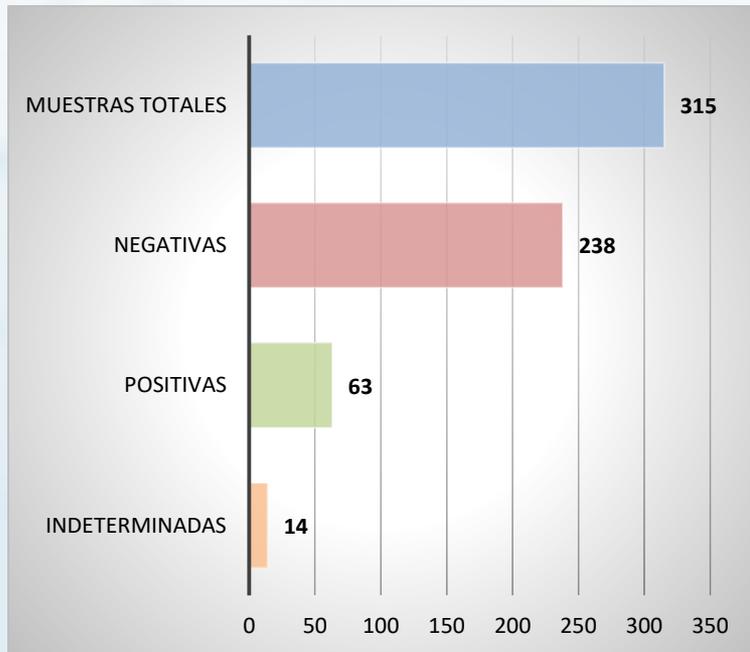
- ✓ Prueba molecular completamente automatizada.
- ✓ Simultáneamente detecta a *Mycobacterium tuberculosis* y mutaciones del gen *rpoB* asociadas a resistencia a rifampicina .
- ✓ Provee resultados en menos de dos horas desde la recepción de la muestra,(diagnóstico precoz) facilitando al personal de salud la prescripción de un esquema adecuado el mismo día, cortando La cadena de transmisión
- ✓ Requiere mínima bioseguridad, así como de capacitación al personal de laboratorios.

Tiene una sensibilidad analítica de 131 ufc/ml.
Resistencia a rifampicina puede usarse como marcador indirecto de MDR (VPP 95 %)

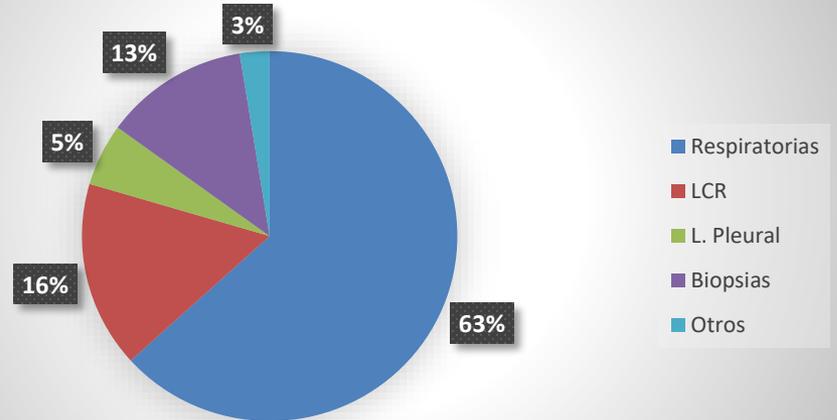


Hospital Fernández entre marzo 2015-septiembre 2016

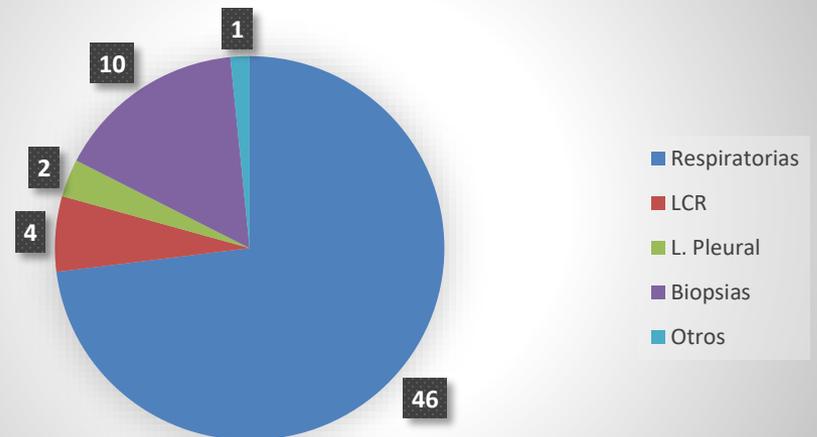
GenXpert Realizados



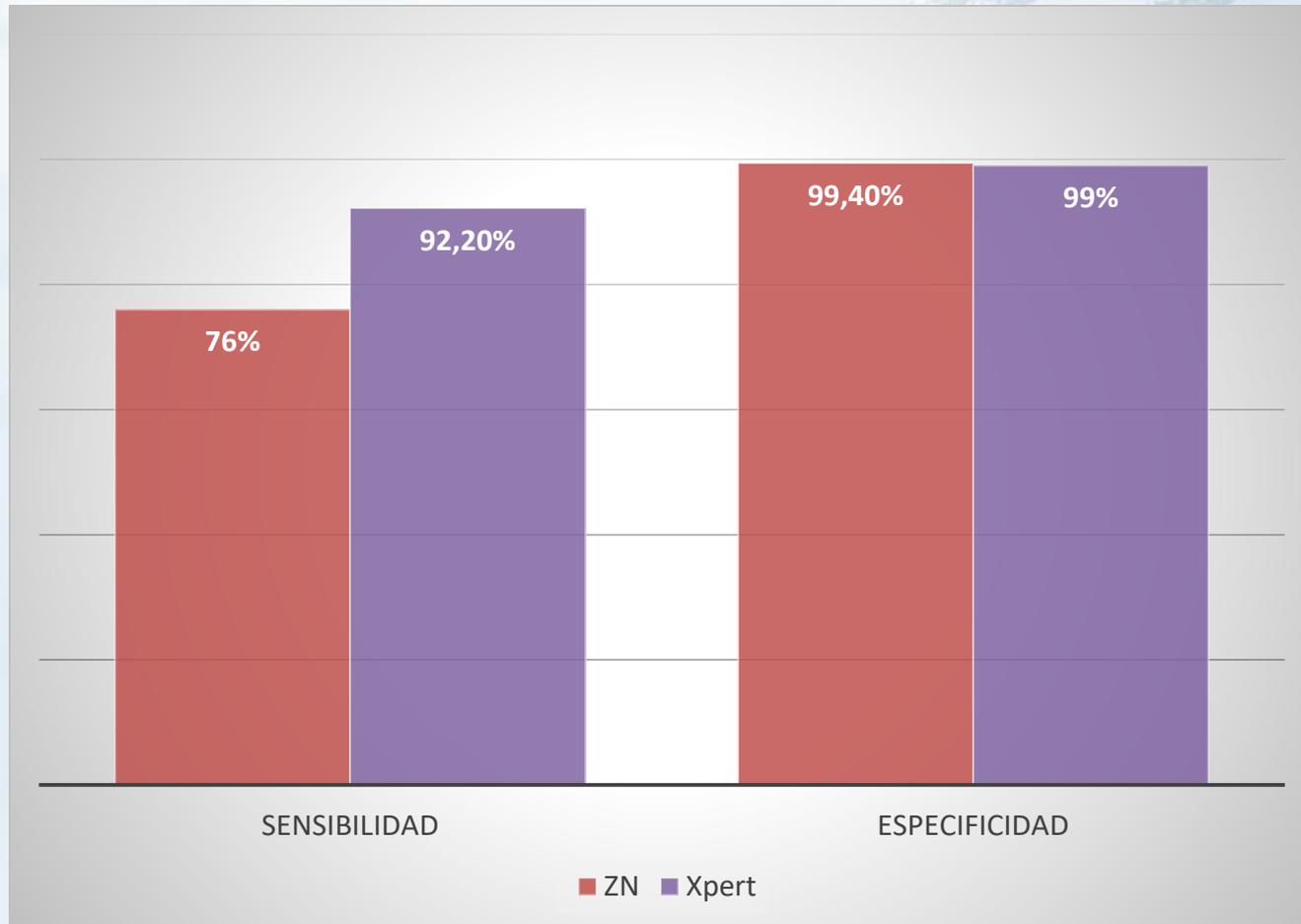
Tipo de Muestras Totales: 315



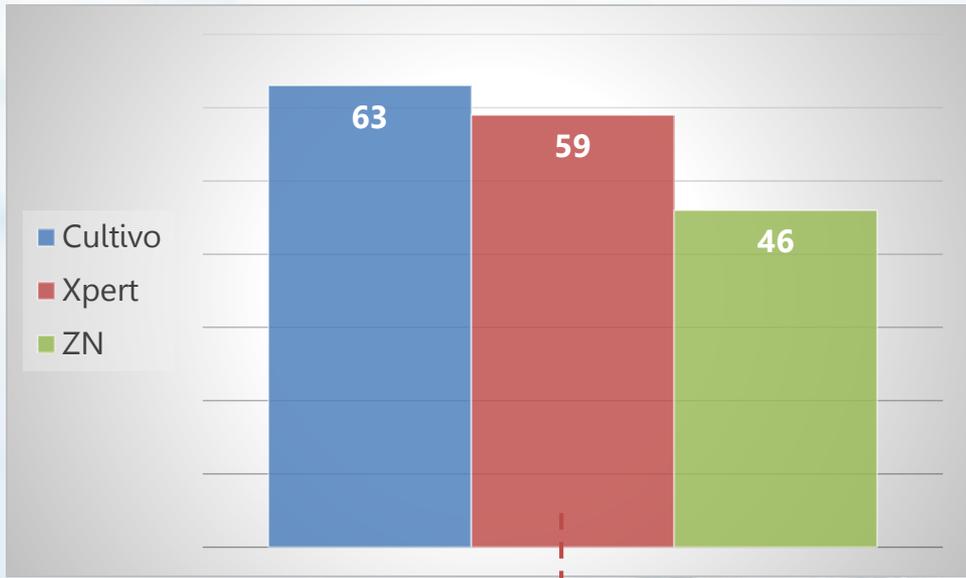
GenXpert Positivas



Sensibilidad y especificidad de ZN y Xpert sobre todas las muestras analizadas



VERDADERO POSITIVO ESTRATIFICADO POR MÉTODO DIAGNÓSTICO



Sensibilidad : 92,3%
Especificidad : 98%

12 Rifampicina Resistente

En pacientes con baciloscopía negativa aumento el rédito diagnóstico en un 64%.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

PCR Multiplex

- **FilmArray** es un Sistema PCR multiplex automatizado que integra la preparación de muestras, amplificación, detección y análisis.
- **Simple:** 2 minutos de mano de obra.
- **Fácil:** No se requiere medición precisa
- **Rápido:** El tiempo de espera de alrededor de una hora.
- **Integrales:** Pruebas de una variedad de patógenos que causan infecciones respiratorias, del torrente sanguíneo, y gastrointestinales, genes de resistencia a los antimicrobianos



BD MAX

- PCR en tiempo real cerradas y abiertas
- Totalmente automatizadas
- Paneles únicos y algunos multiplex

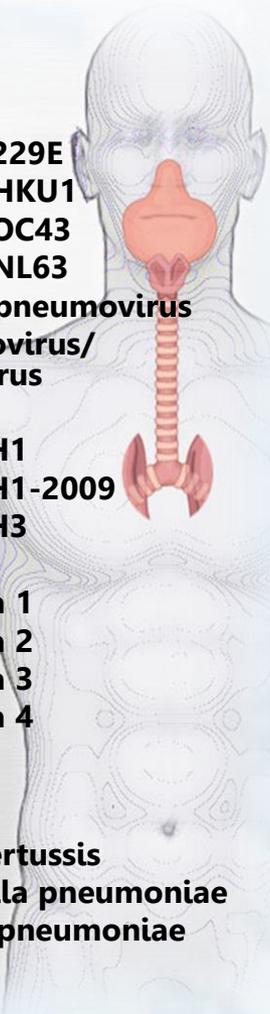


FilmArray BioMerieux

Panel RESPIRATORIO

Muestra : Hisopado Nasofaringeo

Virus



Adenovirus
Coronavirus 229E
Coronavirus HKU1
Coronavirus OC43
Coronavirus NL63
Human Metapneumovirus
Human Rhinovirus/
Enterovirus
Influenza A
Influenza A/H1
Influenza A/H1-2009
Influenza A/H3
Influenza B
Parainfluenza 1
Parainfluenza 2
Parainfluenza 3
Parainfluenza 4
RSV

Bacterias

Bordetella pertussis
Chlamydomphila pneumoniae
Mycoplasma pneumoniae

Panel GASTROINTESTINAL

Muestra: Materia Fecal

Protozoos:

Cryptosporidium
Cyclospora cayetanensis
Entamoeba histolytica
Giardia lamblia

Virus:

Adenovirus F 40/41
Astrovirus
Norovirus GI/GII
Rotavirus A
Sapovirus

Bacterias:



Campylobacter
Clostridium difficile (Toxin A/B)
Plesiomonas shigelloides
Salmonella
Vibrio
Vibrio cholerae
Yersinia enterocolitica

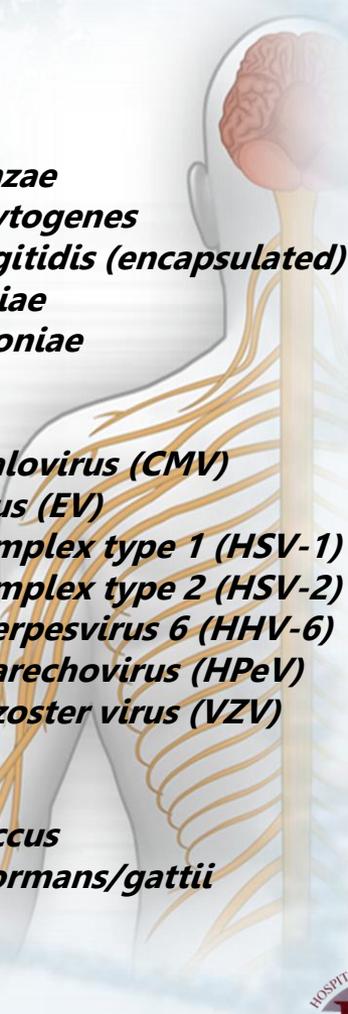
E. coli / *Shigella* diarreogénicas

E. coli O157
Enteroaggregative *E. coli* (EAEC)
Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)
Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)
Shiga-like toxin-producing *E. coli* (STEC)
Shigella/Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

Panel MENINGITIS/ENCEFALITIS

Muestra: Líquido Cefalorraquideo

Bacterias:



E. coli K1
H. influenzae
L. monocytogenes
N. meningitidis (encapsulated)
S. agalactiae
S. pneumoniae

Virus:

Cytomegalovirus (CMV)
Enterovirus (EV)
Herpes simplex type 1 (HSV-1)
Herpes simplex type 2 (HSV-2)
Human herpesvirus 6 (HHV-6)
Human Parechovirus (HPeV)
Varicella zoster virus (VZV)

Hongos:

Cryptococcus
neoformans/gattii

BACTEREMIAS Y OTRAS INFECCIONES GRAVES

- ✓ La detección de bacteremia y funguemia es uno de los roles mas importantes de los laboratorios de Microbiología Clínica.
- ✓ A pesar del desarrollo de nuevas tecnologías, los hemocultivos continúan siendo la única técnica mas recomendable para el hallazgo del agente etiológico
- ✓ Las metodologias moleculares , todavia no logran igualar la sensibilidad de los hemocultivos (excepto para algunos pocos patógenos), son un promesa futura, además solo nos dan una limitada informacion sobre la sensibilidad antimicrobiana y sin los aislamientos no nos proporcionan datos para la investigación epidemiológica.
- ✓ Tampoco son efectivos para aislamientos polimicrobianos y son mas caros que los procedimientos de rutina.

MALDI-TOF: IDENTIFICACIÓN DESDE EL HEMOCULTIVO





REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

www.elsevier.es/ram



ARTÍCULO ORIGINAL

Identificación rápida de microorganismos de frascos de hemocultivos por espectrometría de masas. Comparación de 2 procedimientos diagnósticos



María E. Cattani, Tamara Posse, Ricardo L. Hermes y Sara C. Kaufman*

Sección Microbiología Clínica, División Laboratorio, Hospital Juan A. Fernández, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Tabla 1 Desempeño comparativo en la identificación de agentes causales de bacteriemia a partir de frascos de hemocultivos positivos con un procedimiento artesanal (HF) y con un kit comercial para análisis por espectrometría de masas MALDI TOF (MS)

Microorganismos estudiados (grupo/especie)	HF			MS			p
	N.º hmcv + ^a estudiados	ID. positiva	%	N.º hmcv + ^a estudiados	ID positiva	%	
Total	840	670	79,76	542	391	72,14	0,0013
Cocos gram positivos	543	439	80,84	359	266	74,09	0,0203
<i>Staphylococcus aureus</i>	105	102	97,14	66	62	93,94	0,5568
ECN	358	277	77,37	244	174	71,31	0,1121
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	216	165	76,38	148	105	70,94	
<i>Staphylococcus hominis</i>	67	57	85,07	47	35	74,47	
<i>Saphylococcus haemolyticus</i>	29	24	82,76	21	16	76,19	
Otros ECN	46	31	67,39	28	18	64,28	
<i>Enterococcus</i> spp.	36	35	97,22	23	20	86,96	0,3179
<i>Enterococcus faecalis</i>	21	20	95,24	12	10	83,33	
<i>Enterococcus faecium</i>	15	15	100	11	10	90,91	
Grupo estreptococos viridans	29	14	48,27	17	7	41,17	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	15	11	73,33	9	3	33,33	
Bacilos gram negativos	218	171	78,44	128	101	78,90	0,9731
Enterobacterias	173	162	93,64	108	97	89,81	0,3506
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	85	82	96,47	48	43	89,58	
<i>Escherichia coli</i>	48	45	93,75	40	36	90,00	
<i>Enterobacter cloacae</i>	13	12	92,31	10	9	90,00	
Otras enterobacterias	27	23	85,18	10	9	90,00	
Bacilos gram negativos no fermentadores	45	37	82,22	25	16	64,00	0,1577
<i>Acinetobacter baumannii</i>	17	16	94,12	8	5	62,50	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	6	75,00	6	5	83,33	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3	3	100	2	1	50,00	
Otros no fermentadores	17	12	70,58	9	5	55,55	
Anaerobios	29	17	58,62	18	6	33,34	
Hongos levaduriformes	22	7	31,81	12	3	25,00	
<i>Candida albicans</i>	4	3	75	3	2	66,66	
<i>Candida tropicalis</i>	4	1	25	2	1	50,00	
<i>Candida glabrata</i>	2	0	0	2	0	0	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	7	1	14,28	2	0	0	
Otras levaduras	5	2	40,00	3	0	0	
Otros	28	8	28,57	20	4	20,00	
<i>Helicobacter cinaedi</i>	1	1	100	0	0	0	
<i>Campylobacter jejuni</i>	2	2	100	0	0	0	
<i>Mycobacterium mageritense</i>	1	1	100	1	0	0	

Staphylococcus aureus



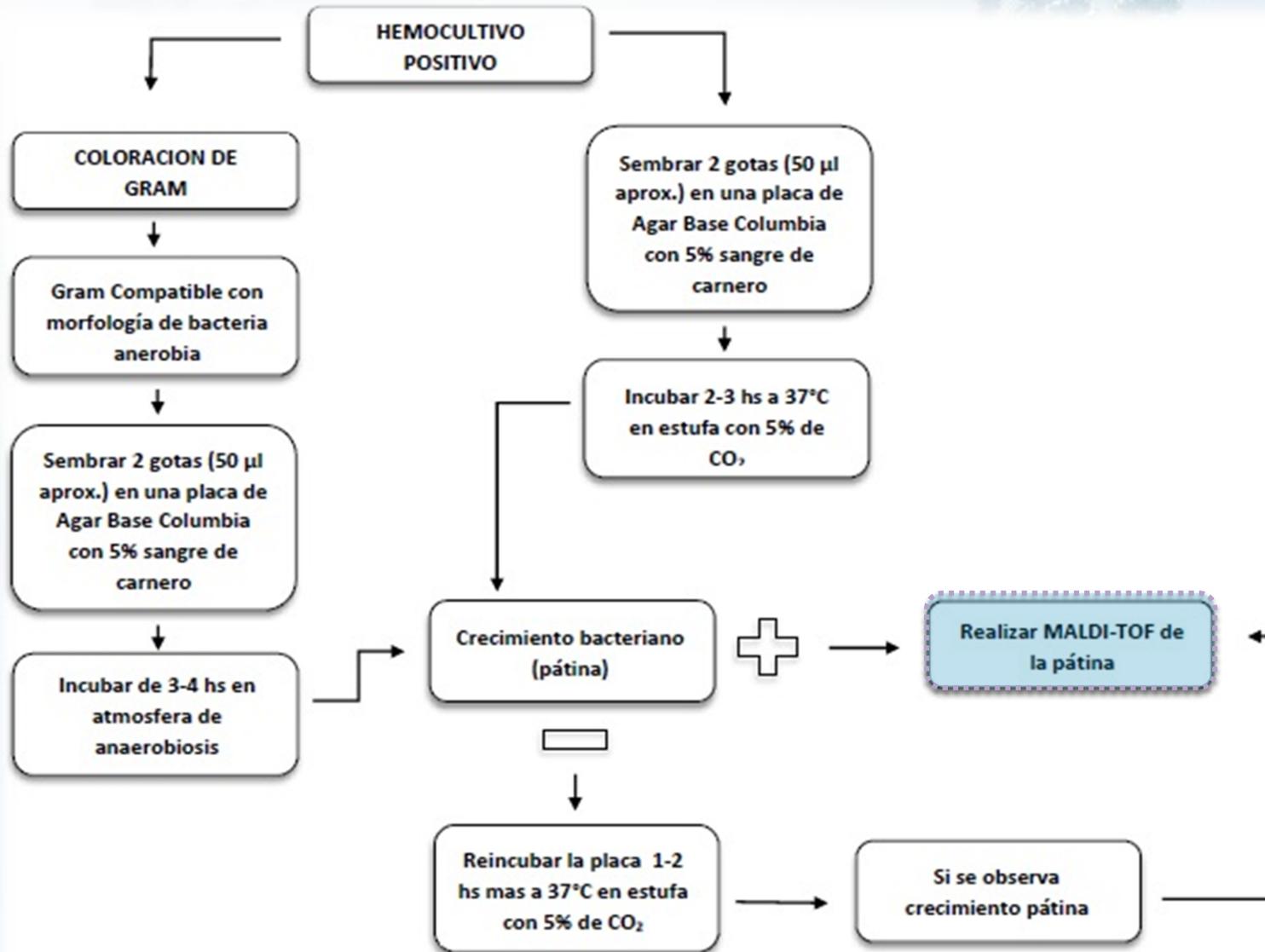
Streptococcus pneumoniae



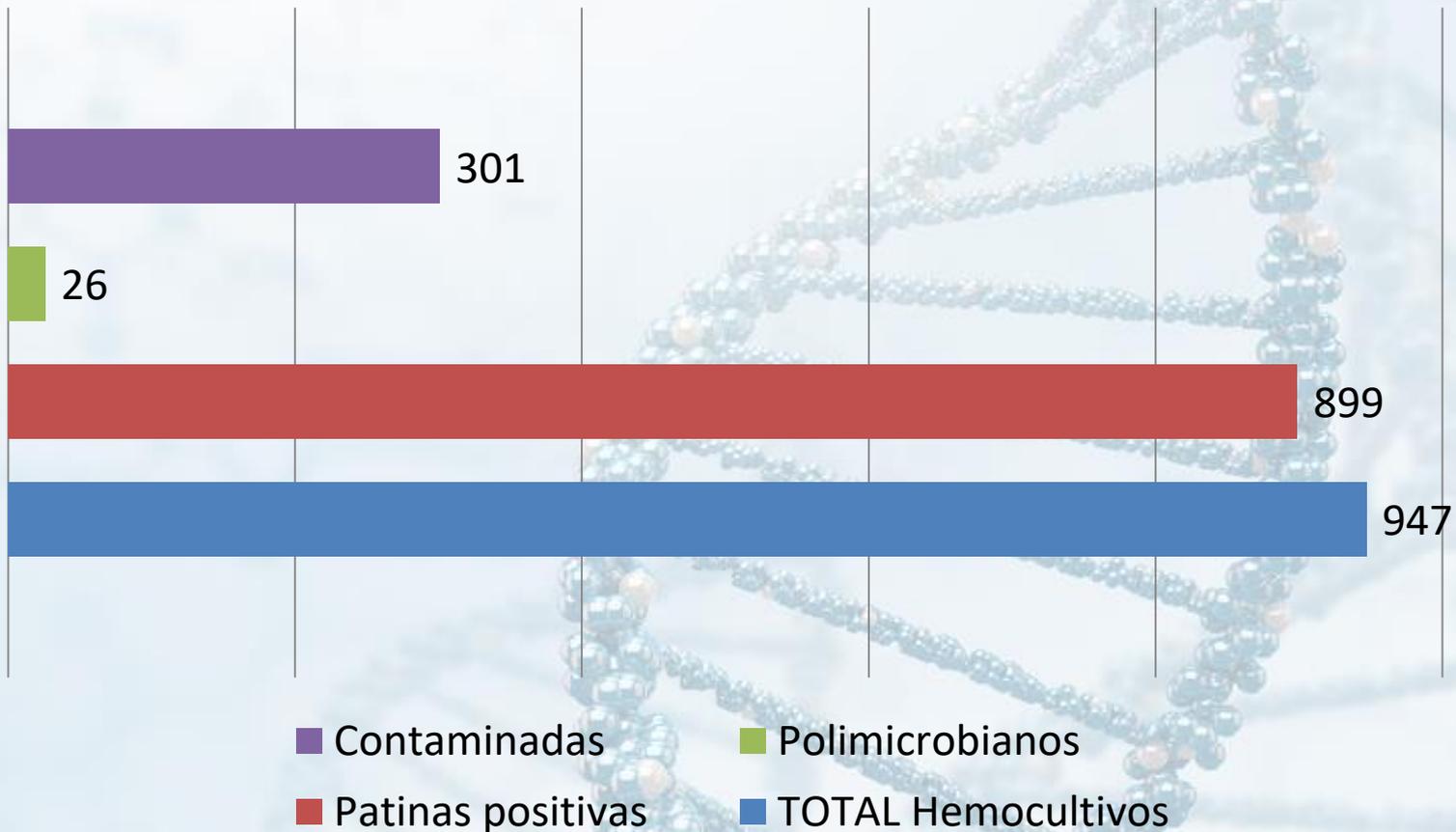
Klebsiella pneumoniae

CULTIVOS CORTOS (Pátinas)

ALGORITMO PARA CULTIVOS



IDENTIFICACIÓN DESDE CULTIVOS DE 3-4 H (1/6/2014 al 1/8/2016)



RESULTADOS

MICROORGANISMO	Nº	POSITIVO	NEGATIVO	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	166	162	4	98.79%
Staphylococo coagulasa negativos (SCN)	281	250	31	88.97%
Enterococos	39	38	1	97.43%
Estreptococos Grupo Viridans y neumococo	48	46	2	95.83%
Streptococcus beta hemoliticos	6	6	0	
Bacilos Gram Negativos Fermentadores	313	308	5	98.40%
Bacilos Gram Negativos No Fermentadores	60	60	0	100%
Bacilos Gram Positivos	22	21	1	95.45%
Anaerobios	12	11	1	
Cocobacilos Gram Negativos	6	6	0	

Antibiograma automatizado de Pátinas

Panel Phoenix de pátina vs Phoenix de cultivo de 24 h

Antibiótico	N° combinaciones antibiótico-microorganismo	N° de aislamientos			N° (%) de errores			Concordancia de categoría (%)	Concordancia esencial (%)
		R	I	S	Muy mayores	Menores	Mayores		
Total (bacilos gram neg N: 59)	1075	343	45	687	2 (0,58)	27 (2,5)	6 (0,87)	96,7	98,8

	N° combinaciones antibiótico-microorganismo	N° de aislamientos			N° (%) de errores			Concordancia de categoría (%)	Concordancia esencial (%)
		R	I	S	Muy mayores	Menores	Mayores		
Staphylococcus spp (N: 31)	493	98	4	391	1	6		98,6	99,3
Enterococcus spp (N: 6)	66	28	1	37	1	2			100
Streptococcus pneumoniae (N: 4)	56	3	0	53					100
Total (N: 41)	615	129	5	481	2 (1,5)	8 (1,3)			99,4

Poster CAM-ALAM 2016

CONCLUSIONES AUTOMATIZADO DE PÁTINAS

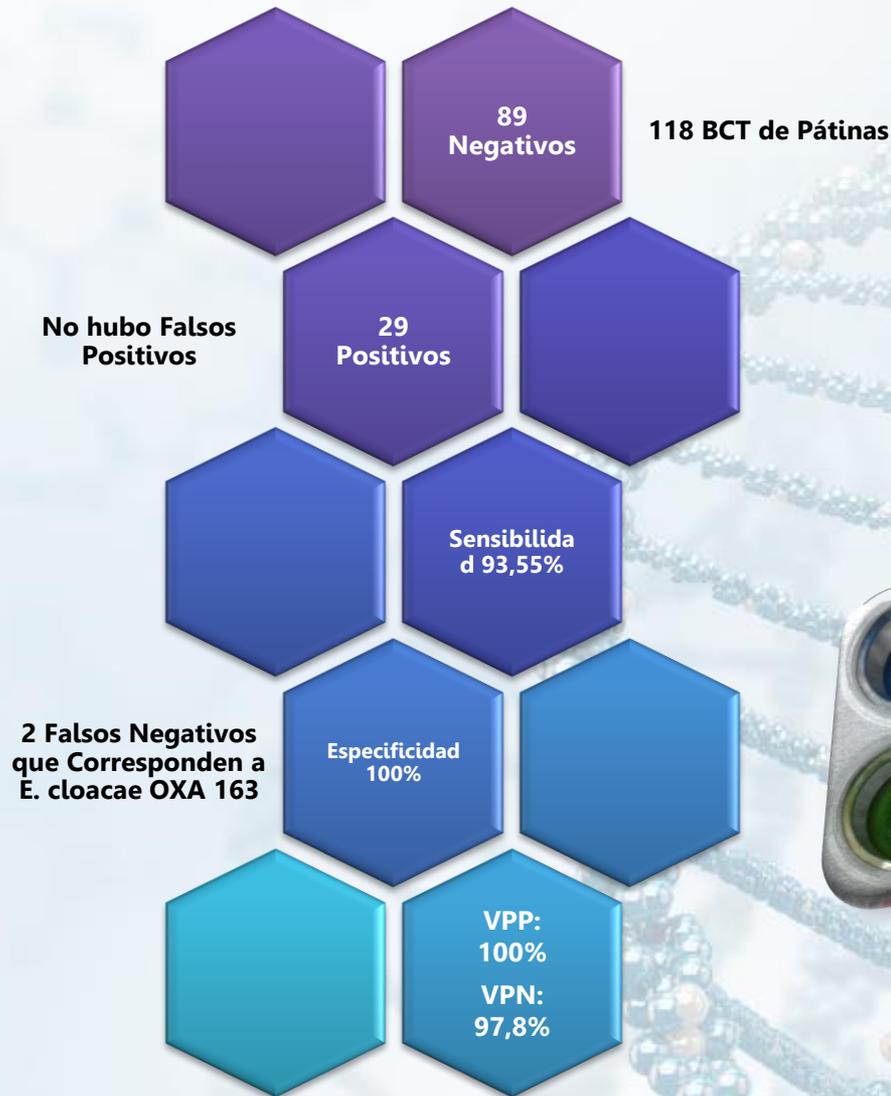
- ✓ Los resultados obtenidos cumplen con los parámetros establecidos por la FDA para validación de métodos de sensibilidad, por lo tanto, la realización del antibiograma a partir de pátinas con sistema automatizado Phoenix es un método válido y no requiere la repetición a las 24 horas para confirmar resultados.
- ✓ Además se logra una disminución importante en el tiempo de obtención del resultado

Poster CAM-ALAM 2016

DESEMPEÑO DEL ENSAYO COLORIMÉTRICO BLUE CARBA

TEST EN PÁTINAS DE 3-4 H

21/8/14 al 22/3/16 (118)



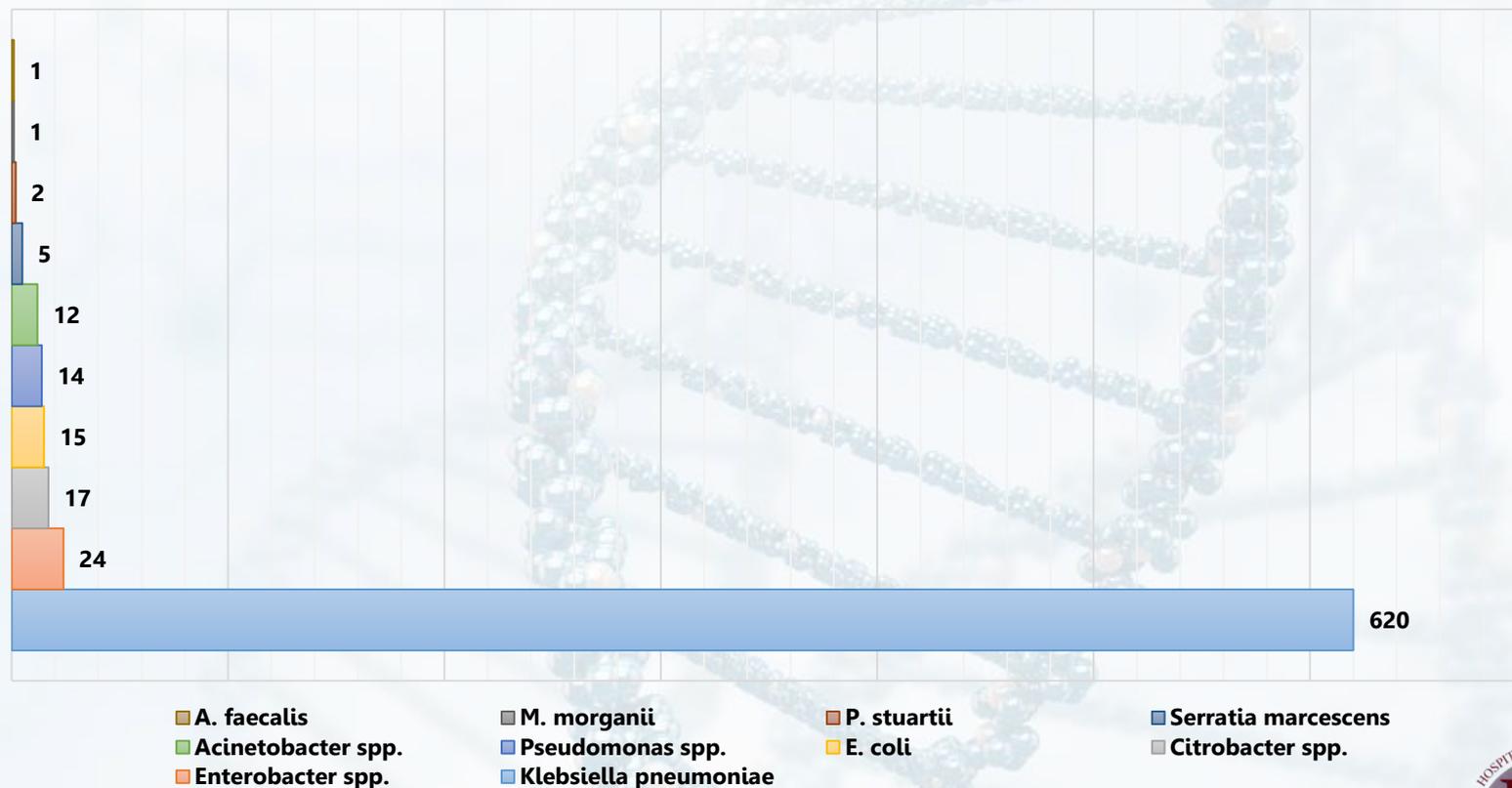
De las 118 pátinas:
109 hemocultivos, 4
LCR, 4 Líquidos
abdominales,
1 Líquido pleural.



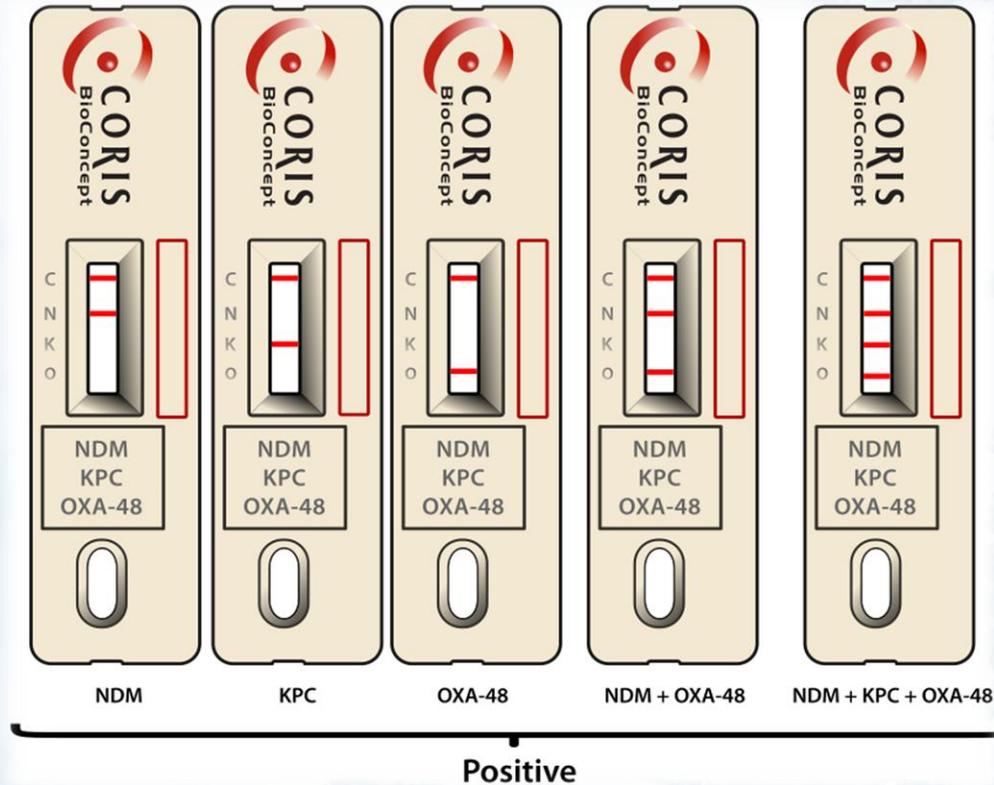
Desempeño del ensayo colorimétrico Blue Carba Test en la detección de bacterias portadoras de carbapenemasas

Tiempo promedio de positivización BCT
KPC 5/10'
MBL 90'

711/836 BGN productores de CBP



MÉTODOS RÁPIDOS DE DETECCIÓN DE RESISTENCIA DESDE MATERIALES O PÁTINAS POR INMUNOCROMATOGRAFÍA



Lo que viene.....

Nuevo software

✓ EPIDEMIOLOGIA

✓ MECANISMOS DE RESISTENCIA
ANTIBIÓTICA

Lo que viene.....



CONCLUSIONES

- ✓ La genómica y la proteómica aplicadas a la microbiología están cambiando nuestra forma de trabajo.
- ✓ Podemos identificar un microorganismo de manera directa o a partir de una muestra clínica en un breve lapso de tiempo, con el consiguiente impacto en la gestión del proceso infeccioso.
- ✓ Los métodos basados en espectrometría de masas, así como la genómica o la biología molecular, los métodos rápidos, algunos no basados en crecimiento bacteriano que se están implementando para inferir el antibiograma o perfil de sensibilidad a los antimicrobianos en sus múltiples variantes tecnológicas y/o metodológicas aplicadas a la microbiología clínica, permiten identificar el agente infeccioso y establecer pautas apropiadas en relación al antimicrobiano a administrar.
- ✓ La automatización en todos estos procesos añade, además, un componente de eficacia y eficiencia al laboratorio de microbiología.

CONCLUSIONES

- ✓ El futuro a corto y medio plazo de la microbiología clínica anticipa un período alucinante.
- ✓ La microbiología está inmersa en una revolución tecnológica que permitirá un notable avance en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas.
- ✓ Diagnosticaremos antes y mejor; y en consecuencia se podrá administrar el tratamiento antimicrobiano adecuado con más celeridad y anticipación ante un cuadro infeccioso.

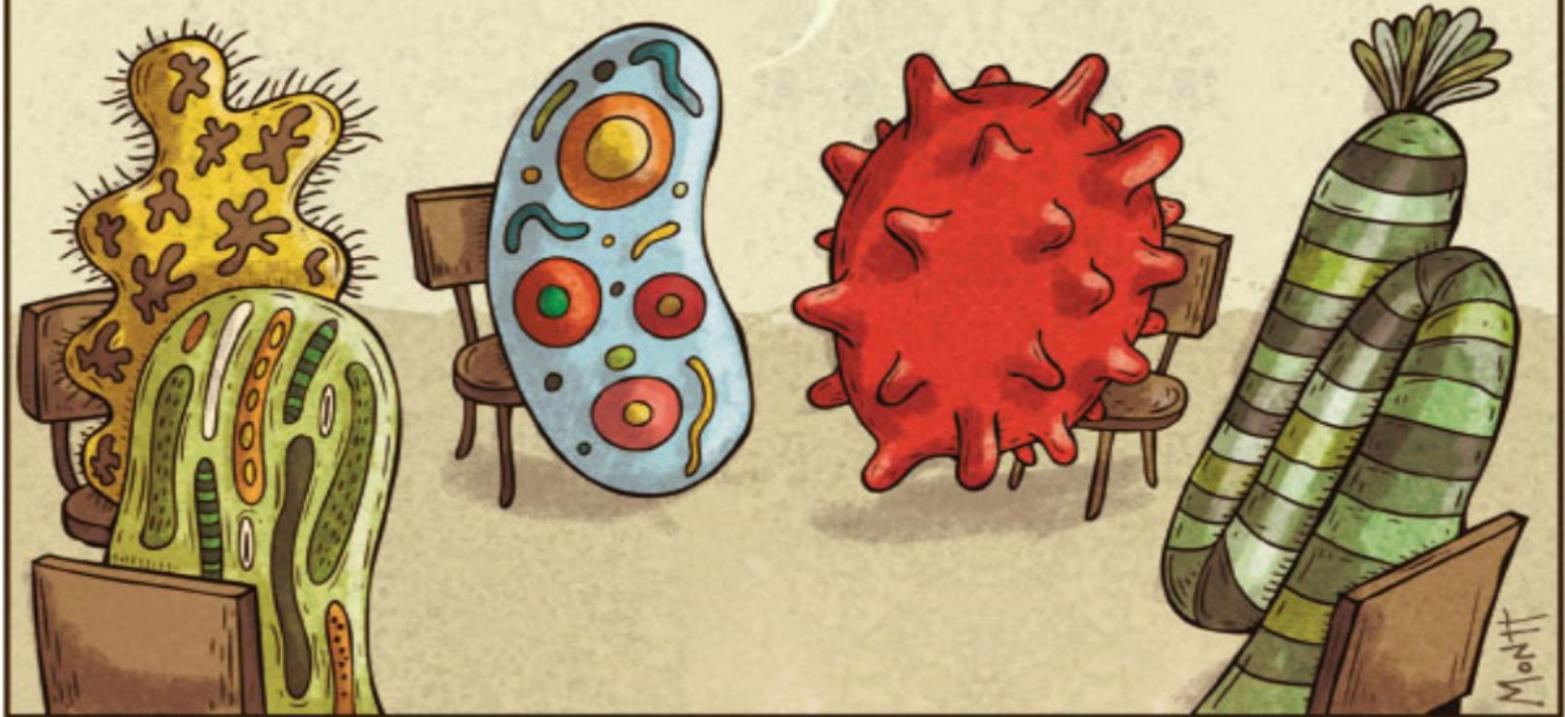


- ✓ Los nuevos avances tecnológicos nos hacen pensar en el rediseño de los laboratorios de Microbiología.
- ✓ El modelo tradicional va a dejar de existir en un futuro cercano.
- ✓ Los procesos manuales se van a transformar en automatizados y digitales.
- ✓ **El ojo del microbiólogo no va a ser reemplazado**



EN UN GRUPO DE APOYO PARA MICROBIOS Y BACTERIAS.

...TODA MI FAMILIA MURIÓ
POR CAUSA DEL ALCOHOL.



33
ACEITE DE OLIVA

ACEITE DE OLIVA
EXTRA VIRGEN
www.elfinanciero.es

“ SI PASANDO
ALCOHOL EN LAS
MANOS USTED
QUEDA INMUNE A
VARIAS BACTERIAS
BEBIENDO... ”
ES CASI INMORTAL

AGRADECIMIENTOS

**Laura Errecalde
Mariana Erbin
Silvia Montibello
Silvia Tützer
Olga Rodriguez
Sandra Cogut
Mónica Janeiro
Eugenia Cattani
Liliana Guelfand
Tamara Posse
Virginia Figueroa
Maria Marta Isola
Claudia Bozzano
Nancy Sanchez
Luis Aquino
Ruth Escobar**