

**XVI CONGRESO DE MEDICINA Y ENFERMERÍA INTENSIVA
Y UNIDADES CORONARIAS DE CASTILLA LA MANCHA**



**Diagnóstico rápido en microbiología:
aportaciones a los programas de
control de la infección y PROA**

**Rafael Carranza , Microbiología
Hospital General Mancha Centro**

**Alcázar de San Juan
5 de Abril de 2019**

MICROBIOLOGÍA TRADICIONAL

CULTIVOS

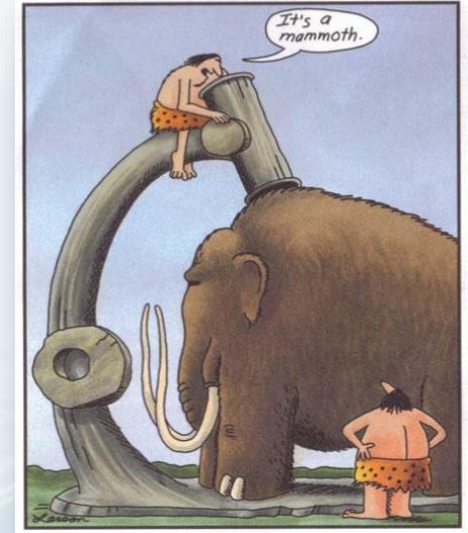
18-24
horas

IDENTIFICACIÓN

6-18
horas

SENSIBILIDAD

12-24
horas



**DEMORA EN LOS
RESULTADOS**



MICROBIOLOGÍA ACTUAL

INFECCIONES GRAVES POR MULTIRRESISTENTES



Enfermedades Infecciosas y
Microbiología Clínica

www.elsevier.es/elmc



Formación médica continuada: Métodos de diagnóstico rápido en Microbiología Clínica

Métodos de diagnóstico rápido en microbiología clínica: necesidades clínicas



Jordi Vila^{a,b,x}, María Dolores Gómez^c, Miguel Salavert^d y Jordi Bosch^{a,b}

2017

^a IISGlobal, Barcelona Cir. Int. Health Res. (CRESH), Hospital Clínic - Universitat de Barcelona, Barcelona, España

^b Servicio de Microbiología, Centro de Diagnóstico Biomédico, Hospital Clínic, Barcelona, España

^c Servicio de Microbiología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, España

^d Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, España

REDUCIR MORBIMORTALIDAD

TRATAMIENTO PRECOZ

RÁPIDO

SENCILLO

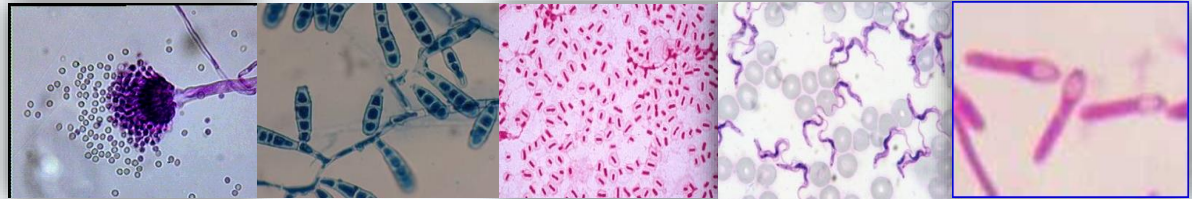
PRECISO

ASEQUIBLE

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

TINCIONES SOBRE MUESTRA

GRAM, BLANCO DE CALCOFLÚOR
BAAR, TINTA CHINA, POTASA,
GIEMSA, AZUL DE TOLUIDINA



VENTAJAS

Sencillas, rápidas, baratas, disponibilidad general
Orientación diagnóstica y terapéutica inicial

.....●

INCONVENIENTES

Escasa sensibilidad, falsos positivos, falsos negativos

.....●

UTILIDAD

Muestras estériles

Infecciones del SNC y otras infecciones invasivas
LCR, otros líquidos biológicos, hemocultivos positivos

.....●

UTILIDAD

Muestras de calidad

Infecciones respiratorias y de piel y tejidos blandos

DETECCIÓN DE ANTÍGENOS

LCR y HEMOCULTIVOS

Aglutinaciones

Buena **S** para **Neumo** y **criptococo** en LCR
Baja **S** para *H. influenzae* y **meningococo B**
S. aureus y **neumococo** en hemocultivos

15'

INF. RESPIRATORIAS

ICT

Neumococo y *Legionella* en orina
S. pyogenes en frotis faríngeo, Gripe A y B, VRS, Adenovirus en asp. nasal

10-20'

I. GASTROINTESTINALES

EIA de membrana e ICT

E. histolytica, *G. lamblia*, *C. parvum*, *H. pylori*, *C. difficile*,
Rotavirus, *Adenovirus*, *Norovirus*, *Astrovirus*

10-20'

RESISTENCIAS

ICT: Carbapenemasas, BLEE, mcr1
Aglutinación: PBP2a
Colorimétricos: carbapenemasas

10-20'

TÉCNICAS RÁPIDAS, SENCILLAS Y ECONÓMICAS PERO ADOLECEN DE SENSIBILIDAD

MEDIOS CROMOGÉNICOS

VENTAJAS

Sencillez
Buena especificidad
Resultados antes de 24 h
Coste-efectivos al reducir tiempo y reactivos de identificación

INCONVENIENTES

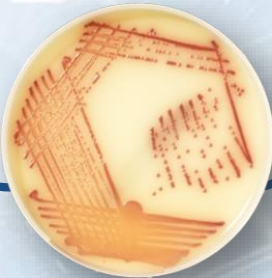
Baja sensibilidad
VPN bajo
Necesidad de confirmación mediante pruebas de identificación en algunos casos



MEDIOS CROMOGÉNICOS

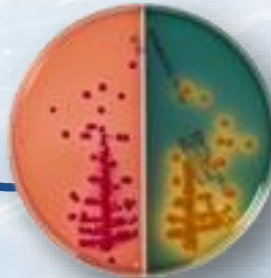
SARM

Variabilidad según tipo de muestra, inóculo, tiempo de incubación



BGN

Uropatógenos más frecuentes y BGN-NF
A. baumannii
P. aeruginosa



BLEE
EPC

Cultivos de vigilancia epidemiológica



LEVADURAS

Identificación rápida de
C. albicans
C. glabrata
C. tropicalis
C. krusei
C. parapsilosis
C. lusitaniae
C. kefyr



BIOLOGÍA MOLECULAR

AMPLIFICACIÓN GENÓMICA

TAAN directa sobre **muestra**: rápidos, muy específicos y con buena sensibilidad. Disponibilidad, sencillez, coste elevado

Microarrays: diagnóstico sindrómico (sepsis, ME, IRVB, IRVA, GEA, ITS) y genes de resistencia con VPP alto (95-100%)

PCR cuantitativa (qPCR): eficacia del tratamiento y pronóstico

LAMP: isotérmica, sin termociclador. Rápida, E y S, económica

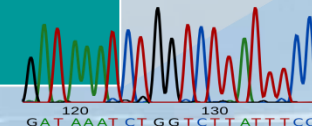


TECNOLOGÍA: PRESENTE Y FUTURO

Nanotecnología y resonancia magnética T2: diagnóstico rápido de candidemia sin crecimiento previo (3-5 h)

Microscopía digital: detección de bacterias en 2 h sobre hemocultivo directo. Caro, aplicaciones futuras

Metagenómica y secuenciación masiva: aplicación en sepsis y vigilancia de resistencias



TECNOLOGÍA MALDI-TOF

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight
Espectrometría de masas



ID CLÁSICA

Fermentación de azúcares,
metabolismo de diversos
sustratos y reacciones
enzimáticas detectables por
métodos químicos

18-72 h
Fastidiosos

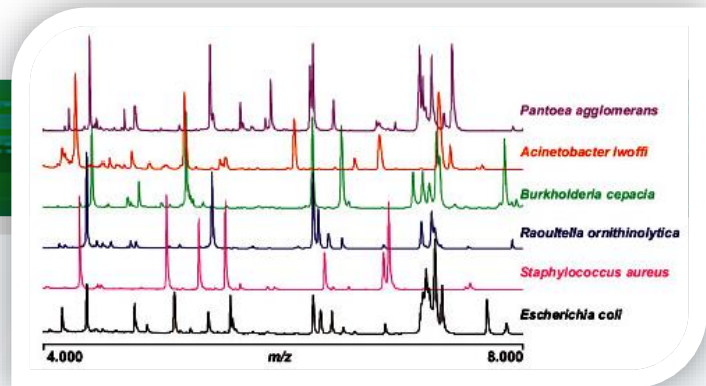
MALDI-TOF

Revolución tecnológica
Análisis estructural de
macromoléculas biológicas
Integración a la rutina de
trabajo del laboratorio

1 minuto
Base datos



MALDI-TOF MS



PEFIL PROTEICO, HUELLA QUÍMICA

VENTAJAS

INCUBACIÓN CORTA: crecimientos escasos permiten la identificación, ahorrando 16-18 h (pruebas bioquímicas)

GRAN FIABILIDAD: detecta proteínas ribosómicas, similar a secuenciación ARNr 16S

BASE DE DATOS AMPLIADA: GP y GN aerobios y anaerobios, levaduras, hongos filamentosos, micobacterias

REEVALUACIÓN DEL PAPEL PATÓGENO de ciertos microorganismos que antes no se identificaban en rutina

POSIBILIDAD DE REALIZAR DE ANTIBIOGRAMAS



MALDI-TOF MS

1

IDENTIFICACIÓN SOBRE CULTIVOS SÓLIDOS

Bacterias, micobacterias, hongos

2

IDENTIFICACIÓN SOBRE CULTIVOS LÍQUIDOS

Hemocultivos, caldos

3

IDENTIFICACIÓN DIRECTA SOBRE MUESTRAS

Orinas, líquidos biológicos, exudados

4

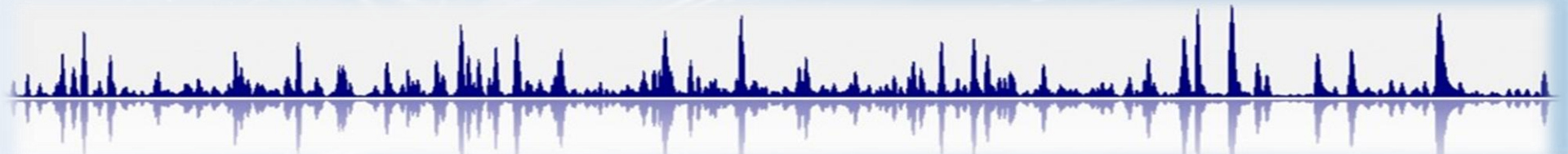
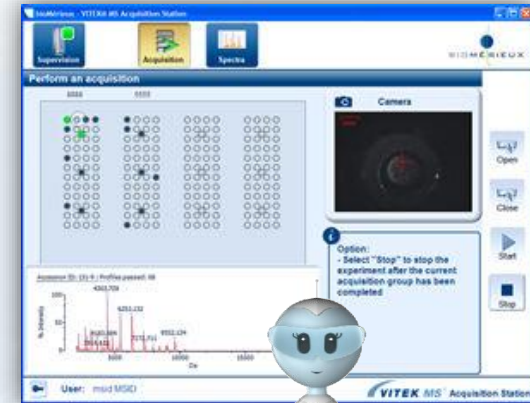
DETECCIÓN RÁPIDA DE RESISTENCIAS

SARM, BLEE, carbapenemasas

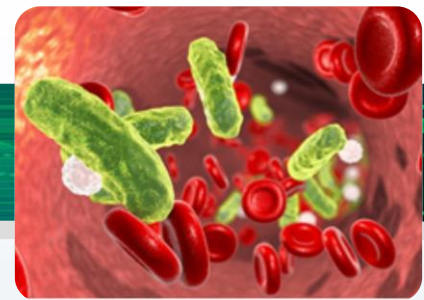
5

EPIDEMIOLOGÍA CLONAL

Utilidad demostrada para *S. aureus* y *E. coli* ST131



IDENTIFICACIÓN SOBRE MUESTRA DIRECTA



1

Gran utilidad en **infecciones graves invasivas** como bacteriemias y fungemias

2

Permite un **tratamiento empírico mas adecuado**, reducir el espectro, las resistencias y los costes

3

Limitaciones: muestras con bajo inóculo, polimicrobianas, con alto contenido proteico o microorganismos intracelulares

4

Muestra ideal: estéril, con altas concentraciones de microorganismo y con suficiente volumen



IDENTIFICACIÓN SOBRE HEMOCULTIVOS

HEMOCULTIVOS

1 ml

MALDI-TOF

Reduce el tiempo de identificación **48 h**

Resultados concordantes en torno al **95%** comparado con el método convencional

Gram-negativos > 90%

Gram-positivos: 50-90%

Hongos > 90% si extracción

S. viridans
ECN

SOLUCIÓN DE LISIS

o
Tubos con gel separador

CENTRIFUGACIÓN

LAVADO

Saponina
Cloruro de amonio
SDS

10^5-10^7
UFC/mL

EXTRACCIÓN

Etanol y fórmico 30%
Etanol y ácido acético 30%

ETANOL 100%

SUBCULTIVO en agar

IDENTIFICACIÓN DIRECTA SOBRE HC

Subcultivo en placa y recogida de colonias 90-240 minutos



IDENTIFICACIÓN SOBRE ORINAS

ORINAS

MALDI-TOF

Concordancias \approx 90% en < 1 h con el 4% de errores mayores

Posibilidad de **ANTIBIOGRAMA directo** con disco placa: excelentes resultados en < 24 h

Gram-negativos: > fiabilidad

Gram-positivos

Hongos

CRIBADO PREVIO

Citometría de flujo

Gram

HB&L

(Alifax)

Inóculo
 $> 3-5 \times 10^5$ UFC/ml

CENTRIFUGACIÓN

LAVADOS

Agua desionizada

SDS

Tween 80

IDENTIFICACIÓN SOBRE OTRAS MUESTRAS

LIMITACIONES

LCR / EXUDADOS

Volumen pequeño
Bajo inóculo

LA / ABSCESOS

Infecciones
polimicrobianas

LP / LS

Proteínas no
bacterianas

**DIAGNÓSTICO
RÁPIDO POR
BIOLOGÍA
MOLECULAR**

MS DIRECTO SOBRE LCR

Comunicación ECCMID 2017: 183 muestras de LCR, 14 fueron positivas por el método convencional, ninguna por EM directa

Clin Microbiol Infect. 2018;24(2):171-4: utilidad en la identificación directa sobre LCR de BGN si la tinción previa de gram era positiva



Cada minuto cuenta

MS EN LÍQUIDO SINOVIAL EN FRASCOS DE HC

Resultados similares a los obtenidos con MS directo sobre hemocultivos positivos
Clin Microbiol Infect. 2010;17:546-551

IMPACTO DE UN CAMBIO METODOLÓGICO

RELEVANCIA CLÍNICA

Beneficio paciente

MALDI-TOF

Identificación rápida
Tratamiento precoz
Infecciones graves

+

PROA

Optimizar el tratamiento empírico
Mejorar morbimortalidad
Reducir resistencias

JCM. 2017;55(5):1437-1445

Ahorro



COSTES

Beneficio paciente y hospital

EVALUACIÓN

Estudios de **coste-efectividad** en EM para el diagnóstico de bacteriemia y uso de antimicrobianos

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015;34:863-76
Enferm Infecc Microbiol Clin. 2016;34(10): 47-52

Técnicas rápidas

Estancia hospitalaria
Gasto farmacéutico
Absentismo laboral

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO RÁPIDO EN SEPSIS

Los métodos rápidos para detección de bacterias-hongos junto a los criterios de Sepsis-3 aumentarían la especificidad de la detección y mejorarían la adecuación del tratamiento antimicrobiano

(Singer M, et al., JAMA 2016, 315:801)

(Singer M, et al., JAMA 2016, 315:801)



S

Shiver,
fever or
very cold



E

Extreme
pain or
general
discomfort



P

Pale or
discolored
skin



S

Sleepy,
difficult
to rouse,
confused



I

"I feel like
I might die"



S

Short of
breath

Propiedades ideales de métodos diagnósticos para sepsis

RAPIDEZ

PATÓGENOS EMERGENTES

DIVERSIDAD DE PATÓGENOS

ALTA SENSIBILIDAD

MÍNIMA INVASIVIDAD

PEQUEÑO VOLUMEN

ALTA ESPECIFICIDAD

SENCILLO

DETECCIÓN DE RESISTENCIAS

FÁCIL INTEGRACIÓN

DIFERENCIA RESPUESTA INFLAMATORIA DE HUÉSPED Y PATÓGENO

SEPTICEMIA

Septicemia, or blood poisoning...
bacterial infection such as a lung u...
hands often, seek medical care fr...
apons that are more absorpt...

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO RÁPIDO EN SEPSIS

Sobre hemocultivos positivos

Microarrays para amplificar ácidos nucleicos

(Verigene®, FilmArray®)

Detectan bacterias y genes de resistencia

Detección de antígenos

Proteínas específicas de *S. aureus*

Espectrometría de masas

(MALDI-TOFF)

Medios cromogénicos

Diferencian géneros bacterianos, levaduras, resistencias, cultivos polimicrobianos

Directos en sangre completa

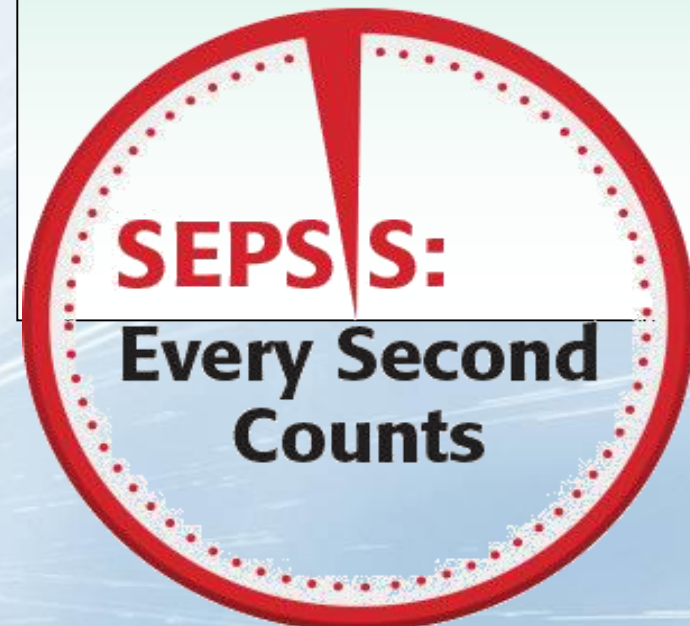
PCR a tiempo real

(SeptiFast®, SeptiTest®, Plex-ID®,...)

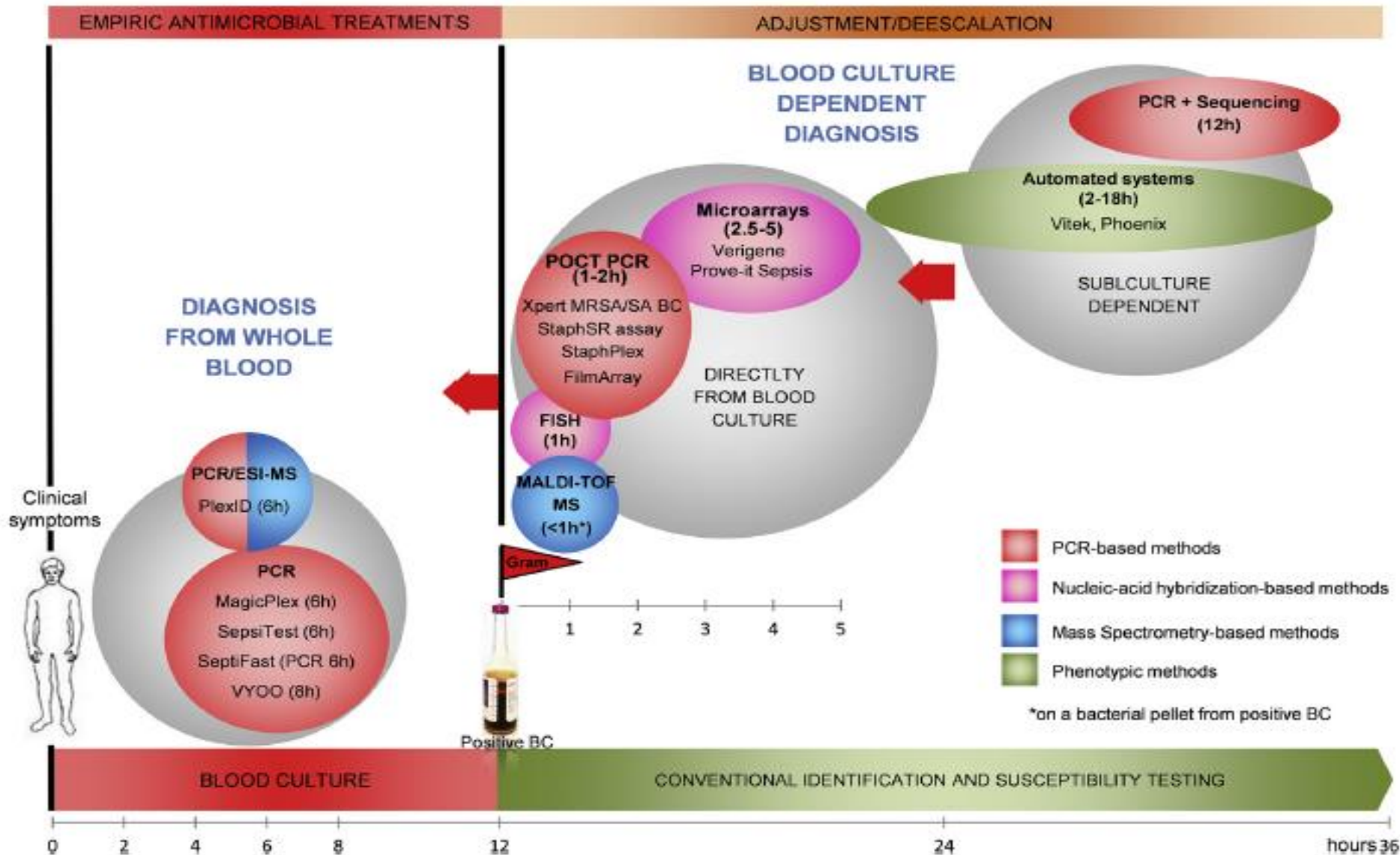
Amplifican bacterias, hongos y genes de resistencia

Resonancia magnética T2

Candida spp.



Métodos diagnósticos para sepsis



Detección molecular de patógenos en sangre completa

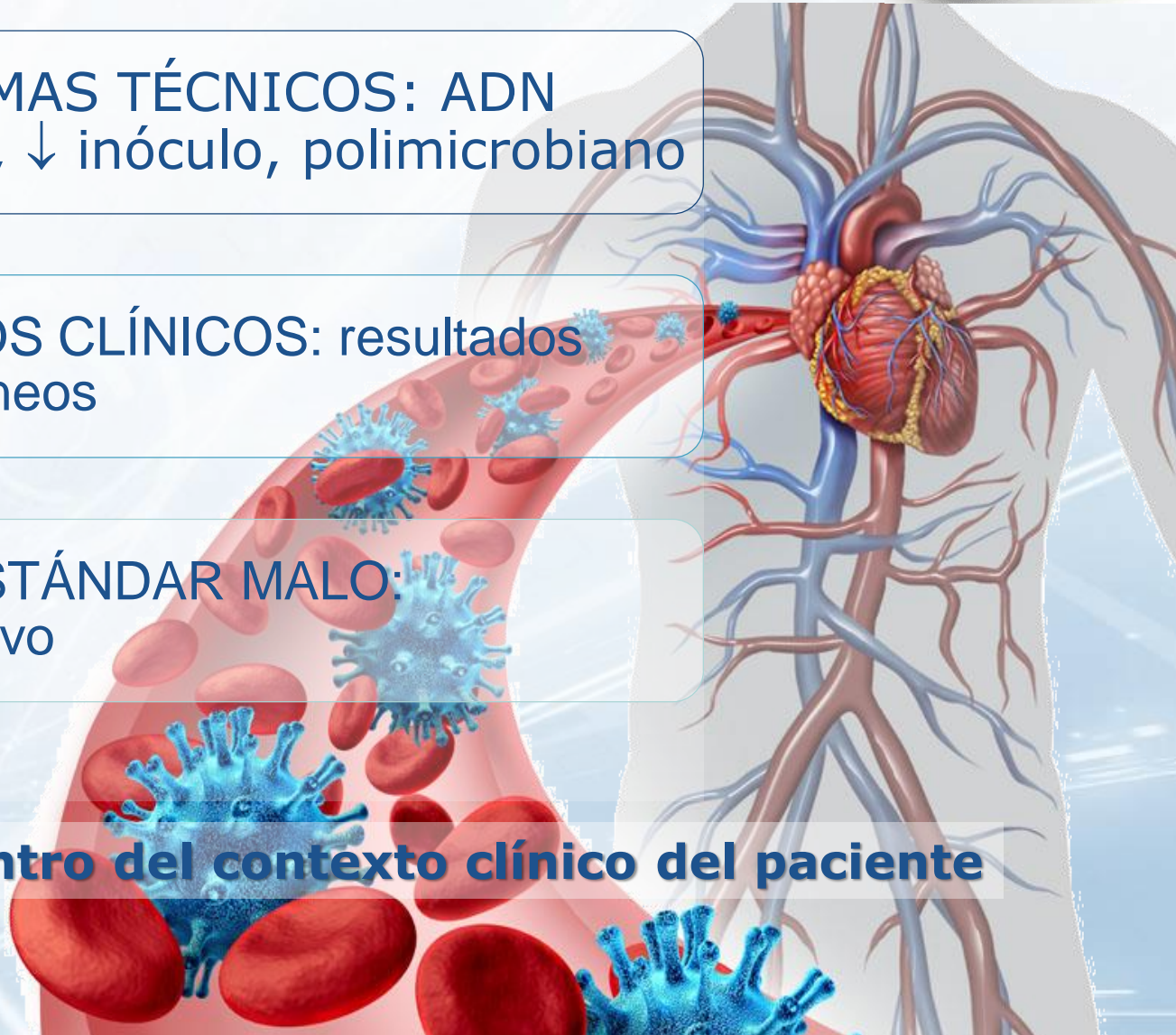
Assay (manufacturer)	Technique	Sample-to-result time (h)	Detection limit	Antimicrobial resistance marker(s)
Iridica Plex ID (Abbott Molecular)	Multiplex broad-range PCR/ESI-MS	6	0.25–128 CFU/ml	<i>mecA</i> , <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , and <i>bla_{KPC}</i>
SeptiFast (Roche Diagnostics)	Multiplex target-specific real-time PCR/ <i>in situ</i> hybridization/melt analysis	4–6	3–100 CFU/ml	<i>mecA</i> (after positive test for <i>Staphylococcus aureus</i>)
SepsiTest (Molzyme)	Universal PCR/sequencing	8–10	10–80 CFU/ml	None
MinION (Oxford Nanopore Technologies)	Nanopore sequencing	4–6	~100 copies/ml	Can be added in the future
U-dHRM	Digital PCR/high-resolution melt	<4	Single cell	Can be added in the future
SeptiCyte (Immunexpress)	RT-qPCR to quantify the host response of 4 RNA biomarkers; machine learning	1–6	NA	None
LAMP technology	Loop-mediated isothermal amplification	1	Single cell	Can detect 1 resistance gene at a time in a separate sample
Integrated comprehensive droplet digital detection technology (IC 3D) (Velox Biosystems)	DNAzyme-based sensor droplet microencapsulation 3D particle counter system	1–4	Single cell	Can be added in the future; limited by no. of fluorescence channels

SITUACIÓN ACTUAL DE TAAN EN SEPSIS



- PROBLEMAS TÉCNICOS: ADN humano, ↓ inóculo, polimicrobiano
- ESTUDIOS CLÍNICOS: resultados heterogéneos
- GOLD ESTÁNDAR MALO: hemocultivo

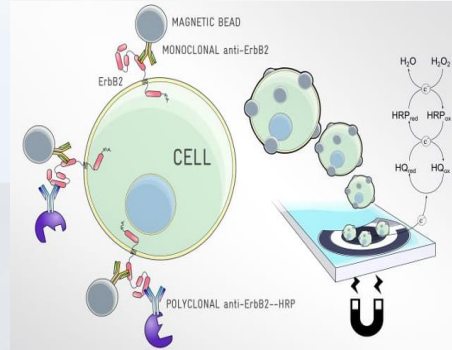
Interpretación dentro del contexto clínico del paciente



OTROS MÉTODOS RÁPIDOS DE DIAGNÓSTICO EN SEPSIS

Detección molecular de la respuesta inmune del huésped SeptiCyte Lab

(RT-qPCR) que cuantifica los niveles en sangre completa de 4 biomarcadores RNA (CEACAM4, LAMP1, PLA2G7 y PLAC8), diferencia pacientes con sepsis de SIRS

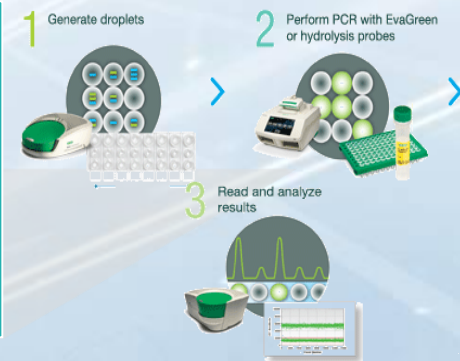


Técnicas de amplificación libre

Detección digital de gotas

Menos interferencias que TAAN en sangre completa, cuantificación, solo una especie bacteriana cada vez.

En investigación



Técnicas basadas en big data

Reglas de decisión clínica computarizadas (machine learning)

La aplicación de algoritmos a grandes series de datos clínicos, permite identificar biomarcadores de sepsis y estratificar los diversos síndromes.



IMPACTO MÉTODOS RÁPIDOS ANTIBIOGRAMA

ATB sobre muestra

Resultados fiables en 7-12 horas

Detección resistencia en minutos

Marcadores de R sobre muestra

PACIENTE

- ↓ morbi-mortalidad
- ↓ estancia hospitalaria

HOSPITAL

- ↓ presión selectiva de antimicrobianos
- ↓ costes sanitarios

Menos pruebas diagnósticas
Evitan uso de antimicrobianos innecesarios
Opción de elegir antimicrobianos más baratos

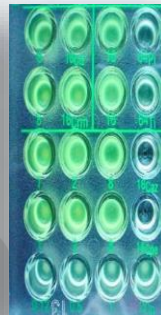
ANTIBIOGRAMAS DIRECTOS SOBRE MUESTRA

E-test

MUESTRAS RESPIRATORIAS

89-96% de concordancia,
con errores mayores del 2-5%

También pueden resultar útiles en
otras muestras: **sangre, orina**



Microdilución en caldo

Identificación bacteriana y ATB
directo del **hemocultivo positivo**.

2-3 h para la **identificación**,
escasa en GP y aceptables en GN.

14 h para el **antibiograma**, con
buenos resultados tanto en GP
como GN

DETECCIÓN DE RESISTENCIAS MALDI TOF

Incubación de los microorganismos con un buffer del antibiótico, se centrifuga y se analiza el sobrenadante

Microorganismo con enzima inactivante del antibiótico: desaparición del pico del antibiótico y aparición de nuevos picos de sus metabolitos

BLEE, Carbapenemasas, Transferasas (AMG, CD)

Incubación de microorganismos con/sin antibiótico y con isótopos

Análisis semicuantitativo. Se incuba una alícuota del HC crecido en medio líquido, tanto en presencia como en ausencia del antibiótico (grupo control)

Detección de resistencias por el perfil proteico bacteriano

Estudios numerosos

Aplicabilidad futura

Detección de **EPC** directamente en orina en 90 min:

91% de concordancia con S y E del 100%

JAC. 2017;72(5):1350-4

Detección de **enterococos-VR**

SASM vs SARM (variabilidad)

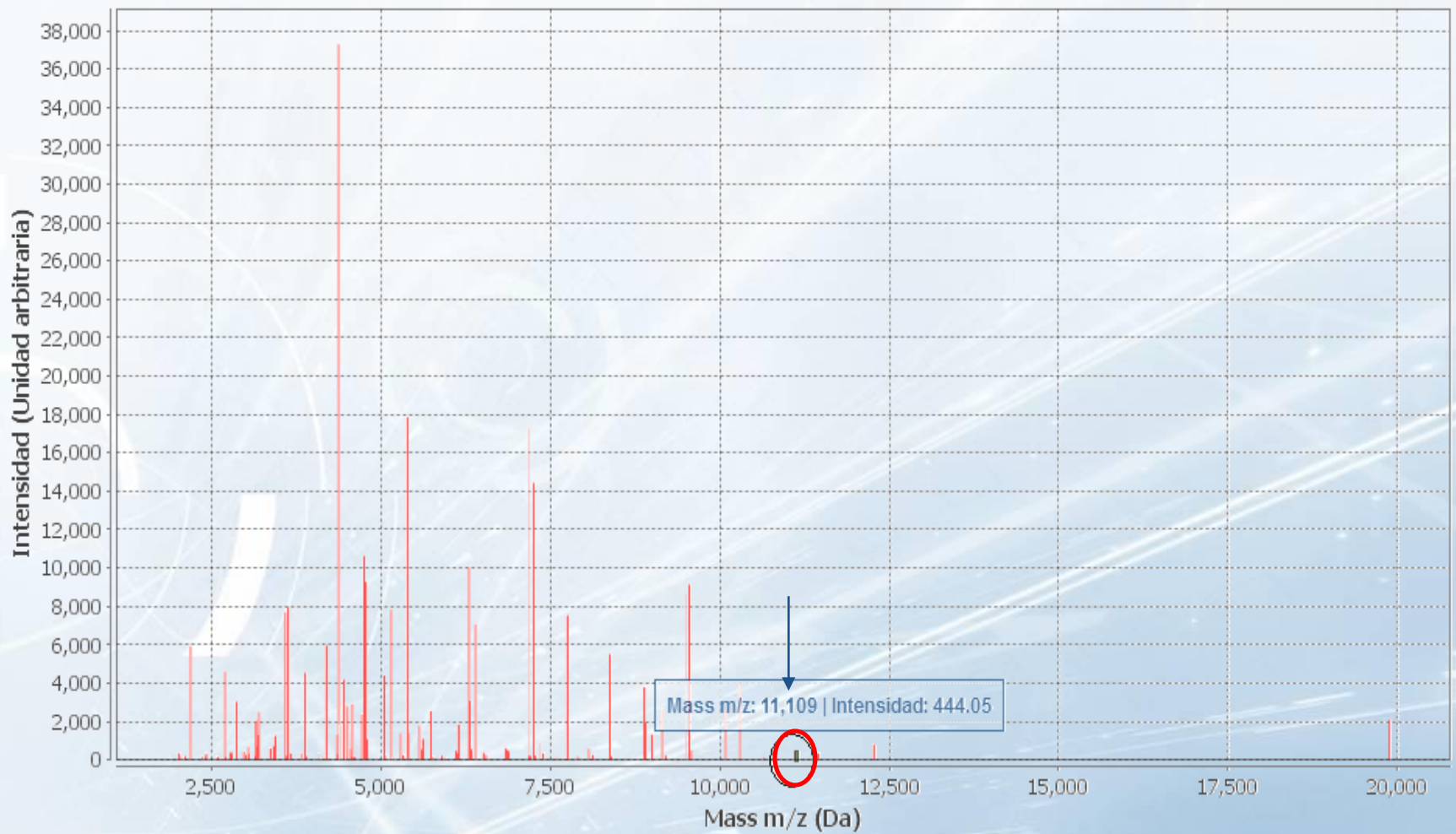
β lactamasas (poca homogeneidad)

S \approx 100%

< 3 horas

CULTIVOS
Y HC

Pico por KPC en *K. pneumoniae*



COLORIMETRÍA - INMUNOCROMATOGRAFÍA

COLORIMETRÍA β -carba test

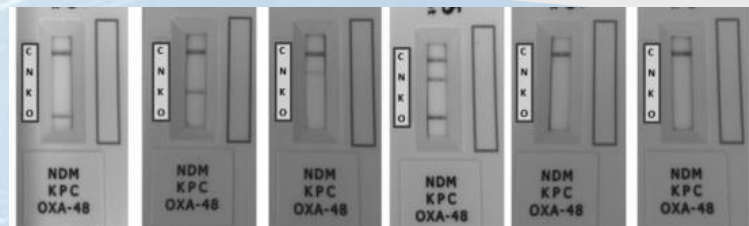
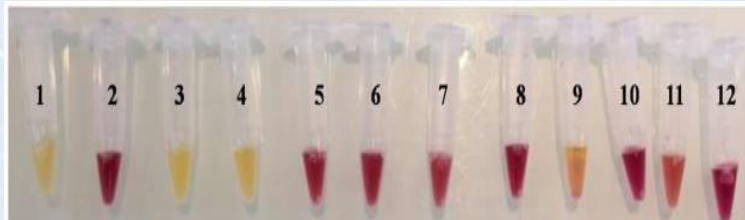
SENCILLO
BUENA SENSIBILIDAD Y
ESPECIFICIDAD: > 95%

30 minutos

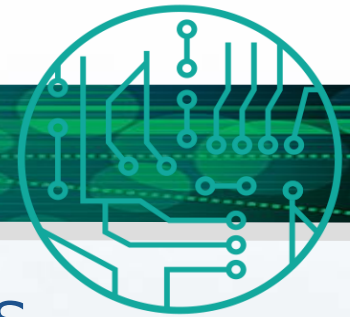
INMUNOCROMATOGRAFÍA OKN K-set

MULTIPLEX (OXA-48 like,
KPC Y NDM)
SENSIBILIDAD Y
ESPECIFICIDAD > 95%

15 minutos



MICROFLUÍDICA



DINÁMICA DE GOTAS CONFINADAS EN MICROCANALES

MICROFLUÍDICA

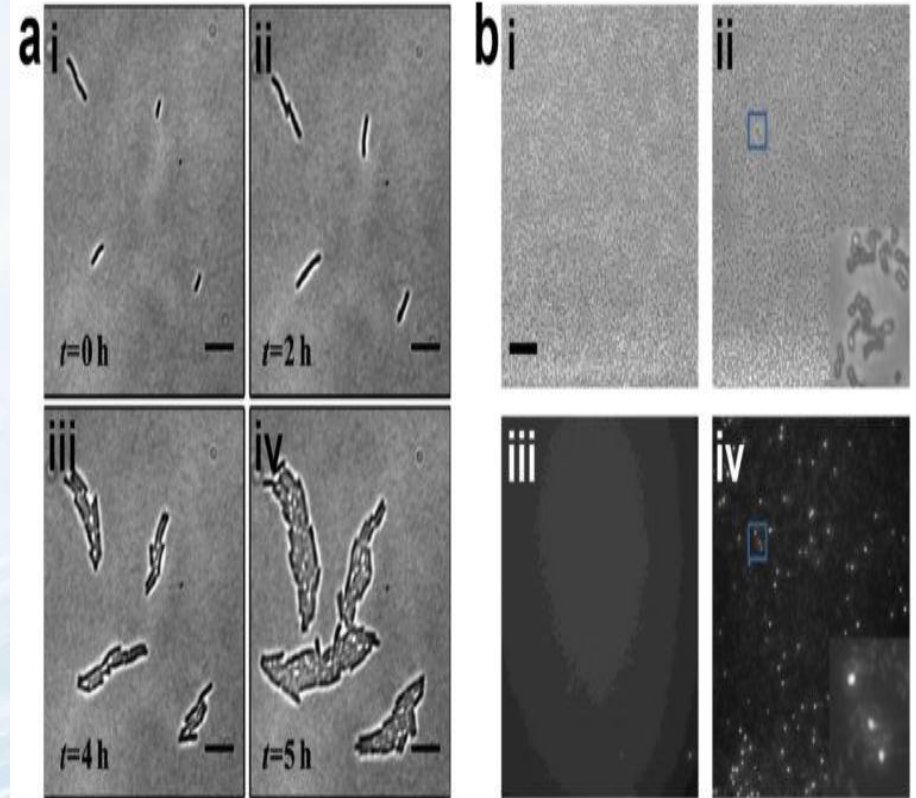
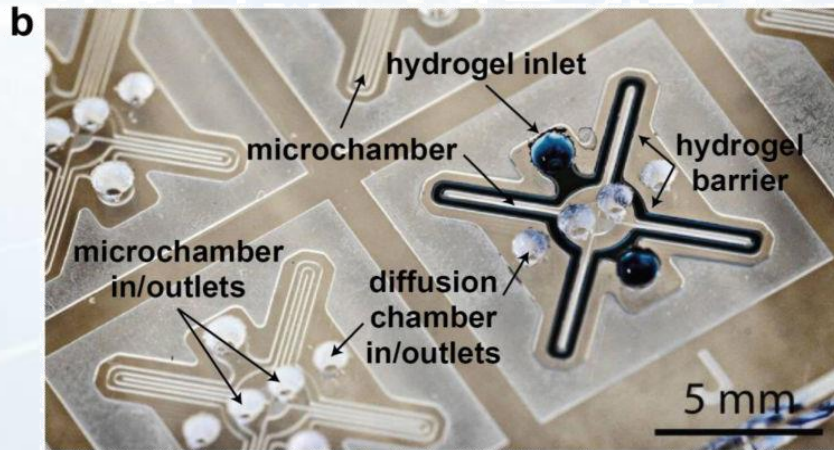
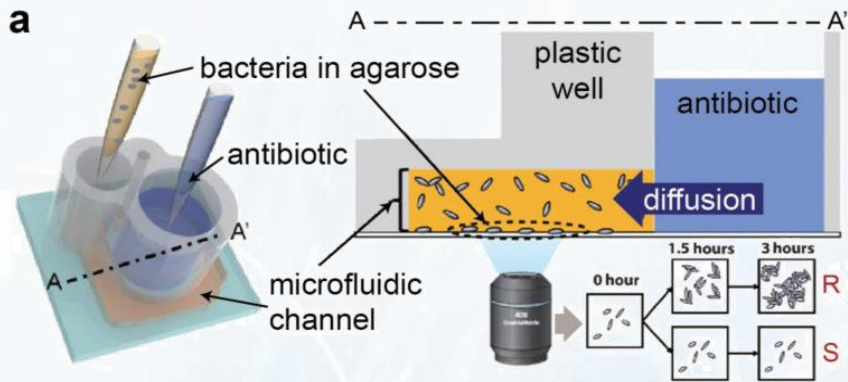
MAS RÁPIDA, MENOR VOLUMEN, MAYOR SENSIBILIDAD

DETECCIÓN:
ELECTROQUÍMICA,
MAGNÉTICA, ÓPTICA

BACTERIAS CONCENTRADAS EN PEQUEÑOS VOLÚMENES (POCILLOS, MICROCÁMARAS), RECUBIERTAS DE AC O ENCAPSULADAS EN AGAROSA → PLATAFORMAS DE MICROFLUIDOS CON ATB PRECARGADOS → INCUBACIÓN 3 HORAS → MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASES → CORRELACIÓN CON ANTIBIOGRAMA TRADICIONAL >90%



MICROFLUÍDICA



Hydrogels in microfluidic ASTs as both an (a) immobilization strategy and (b) as a diffusive barrier

Examples of microscopic monitoring of (a) bacterial growth or (b) death

MICROSCOPIA DIGITAL

Curvas de crecimiento de células bacterianas individualmente controladas por microscopía computarizada → cambios en la masa, morfología y velocidad de división bacterianas → comparar el patrón de cada aislado con los patrones de una base de datos comercial

oCelloScope microscopía digital → escáner de la muestra anterior en cada pocillo → genera una serie de imágenes cada 15 min durante 12 h → sistema de análisis y detección automatizado

Suspensión bacteriana 1×10^5 células/mL + microesferas + Sensititre® microplacas de antibiograma → análisis en sistema oCelloScope

Informes de antibiograma en el mismo día , correlación de >95% con el método tradicional



PC

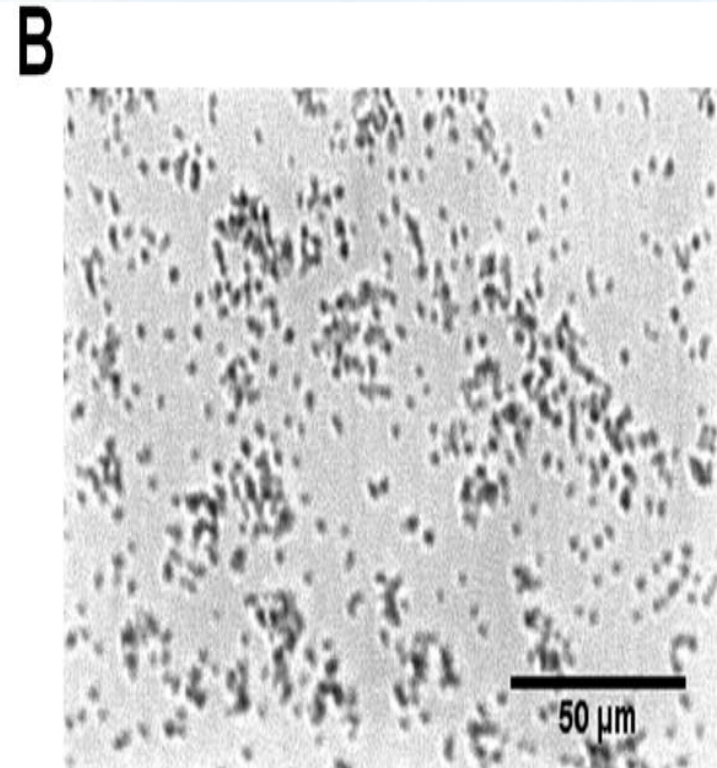
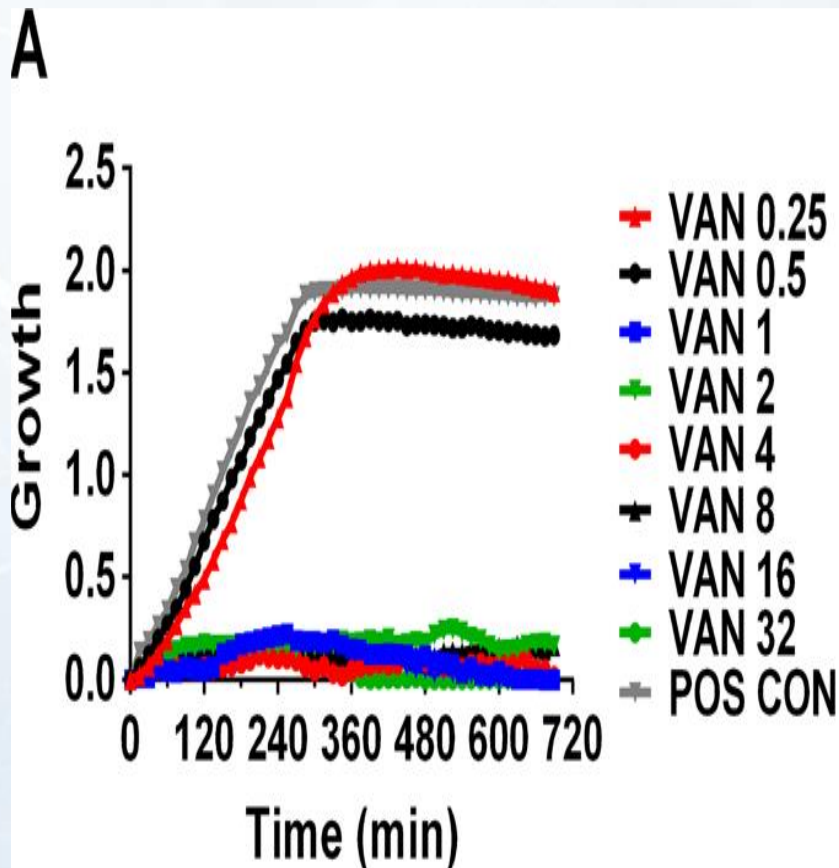


Smartphone



MICROSCOPIA DIGITAL

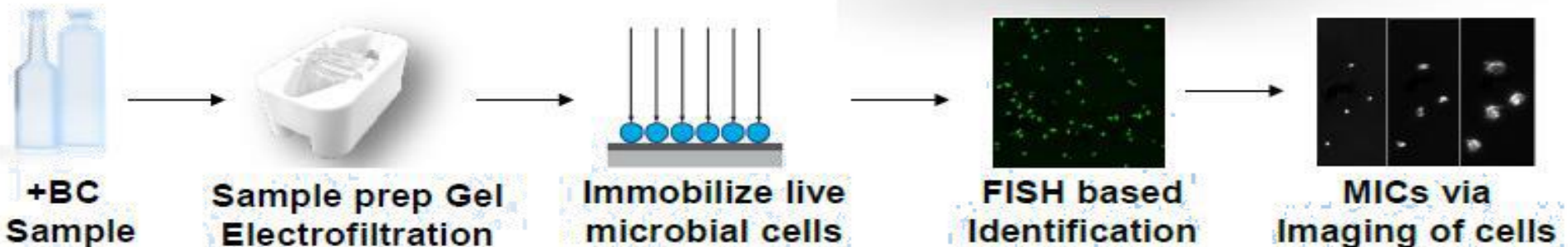
Example of an oCelloScope image and graphical output. **A)** Growth curves for *S. aureus* ATCC29213 treated with vancomycin (0.25–32 mg/L) and without as a positive control (POS CON). **B)** 2D picture of *S. aureus* ATCC29213 obtained by the oCelloScope system, with a magnitude comparable to a 200x magnification in a standard light microscope



MICROSCOPIA DIGITAL

1. Digital Microscopy: Accelerate Diagnostics

- Direct from positive blood culture
- Future development direct from specimen such as BAL, wound, urine
- 1hr ID & 5hr MIC / susceptibility
- Polymicrobial ID & MICs



FLUJO EFICAZ DE LA INFORMACIÓN

Resultado
microbiológico
rápido

Informe al
médico
responsable

Ajuste
diagnóstico/
terapéutico





Gerencia
de Atención
Integrada
Alcázar de San Juan



Hospital General
LA MANCHA CENTRO

www.rcarranza@sescam.jccm.es

Muchas gracias

