

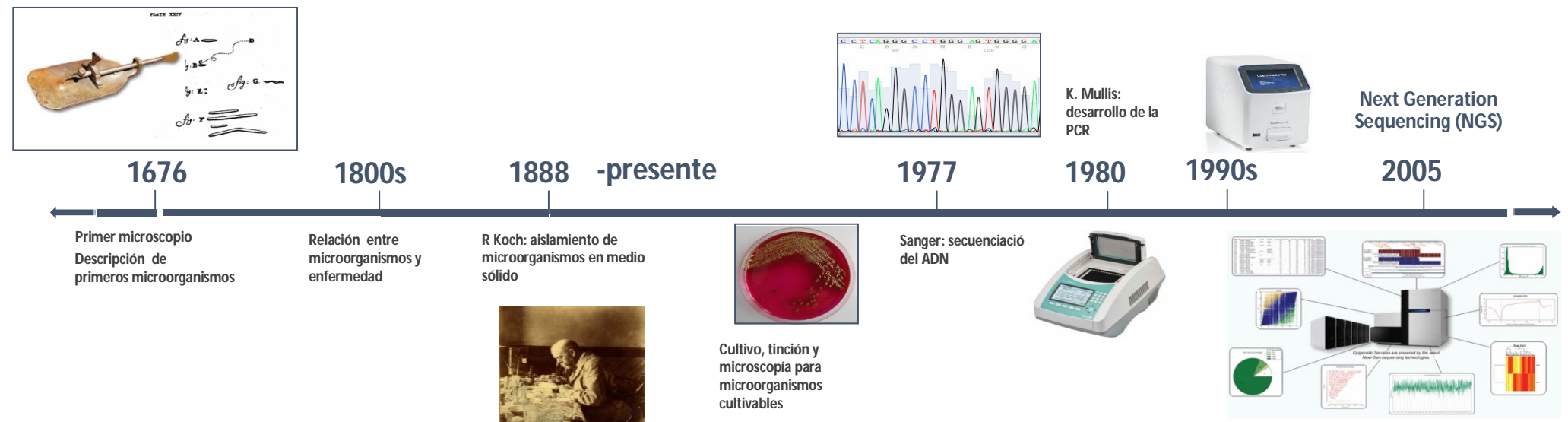


**CURSO: Biología Molecular Aplicada al Diagnóstico Médico**  
**Círculo Médico de Rosario**

**BIOLOGIA MOLECULAR: nuevas metodologías**  
**en el diagnóstico microbiológico.**

**Dra. Mariela Sciara**  
**Laboratorio Cibic**  
**Rosario**

# Biología Molecular en Microbiología. Historia.



- ✓ Área de diagnóstico de **MAYOR DINAMISMO Y CRECIMIENTO**
- ✓ Liderada por la **AUTOMATIZACION**
- ✓ **ESTANDARIZACION** de procesos y resultados
- ✓ **REVOLUCION** en el sistema de salud
- ✓ Lidera la **INVESTIGACION BIOMEDICA**

- **Microorganismos no cultivables** (HPV, HBV)
- **Microorganismos fastidiosos, crecimiento lento** (*M. tuberculosis*, *Legionella*)
- **Microorganismos altamente infecciosos de cultivo de alto riesgo** (*Bacillus anthracis*)
- **Microorganismos presentes en muy baja cantidad en la muestra** (humor vítreo, muestras forenses)
- **Monitoreo de carga viral** (pronóstico y seguimiento: EBV, CMV, HIV, HBV, HCV)
- **Genotipificación de agentes antigénicamente similares** (tipos de HPV)
- **Determinación de genes de resistencia** (*mecA*, KPC) **o susceptibilidad a drogas** (resistencia a ART)
- **Epidemiología molecular**
- **Confirmación de cultivos**

## Preguntas al Laboratorio de Microbiología



**Paciente tiene o no una infección**

**Cual es el agente causal**

**Con qué tratarlo**



**TRATAMIENTO EMPIRICO**

- ✓ Resistencia antimicrobiana
- ✓ Efectos colaterales
- ✓ Gasto innecesario

# Preguntas al Laboratorio de Microbiología



Paciente tiene o no una infección

Cual es el agente causal

Con qué tratarlo



**Técnicas Moleculares**  
**TRATAMIENTO ADECUADO** en menor tiempo

- Rápidas
- Alta sensibilidad y especificidad
- Alto costo
- Validación y control de calidad



**Identificación rápida mediante pruebas guiadas por los síntomas.**

Problema Clínico  
Utilidad en  
Necesidad  
Beneficios

**MANEJO DE SEPSIS**

**URGENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

Respiratorias    Gastrointestinales    Meningitis

UCI  
Terapistas  
Infectólogos

GUARDIA  
Emergentólogos  
Internación criteriosa

**DECISION CLINICA BASADA EN INFORMACION PRECISA, RAPIDA E INTEGRAL.**

- ✓ **Ajuste de terapia empírica a tiempo**
- ✓ **Resolver casos de urgencia**
- ✓ **Reducción de tiempos de internación**
- ✓ **Disminución de resistencia antibiótica**
- ✓ **Menor morbi-mortalidad**
- ✓ **Disminución de estudios asociados.**

## Métodos diagnósticos rápidos: PCRs multiplex-Paneles

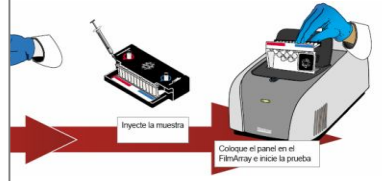
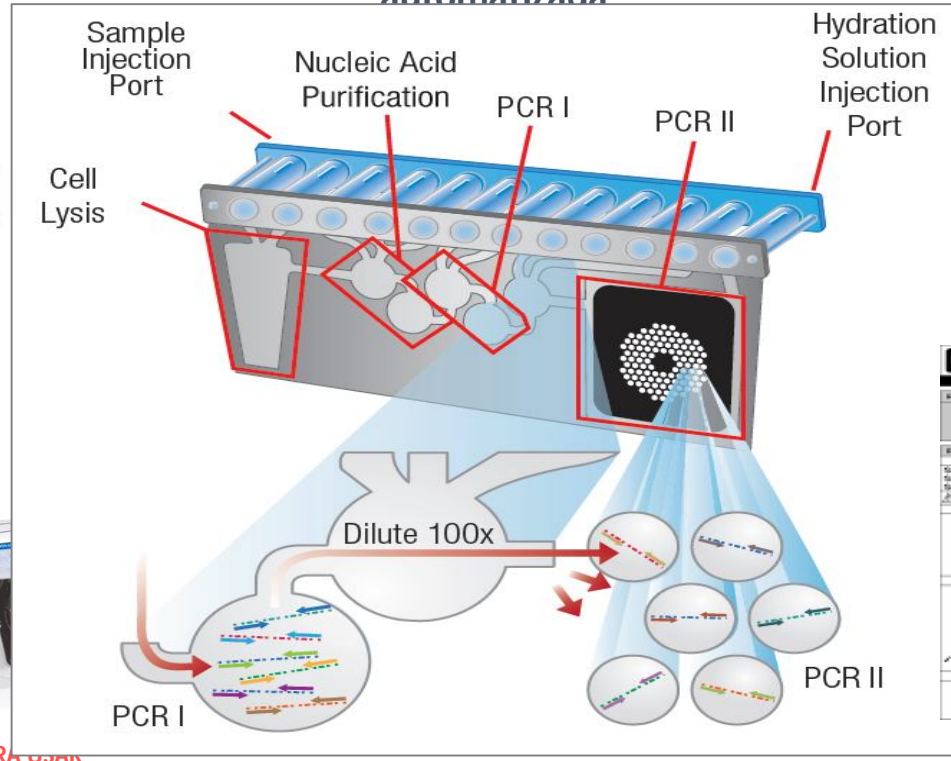




FilmArray®

FilmArray®

# Sistema PCR multiplex que integra la preparación, amplificación y detección automatizada



**SIMPLICIDAD**  
2 MINUTOS DE PROCESAMIENTO



**REACTIVOS LISTOS PARA USO**  
CONSERVACION A TAMB

FilmArray® BCID Panel		
<b>Run Summary</b>	Sample ID: Microbiome meningitidis	Run Date: [blank]
	Approval: Autoverified	Control: Passed
<b>Result Summary - Interpretations</b>		
<b>Antimicrobial Resistance Genes</b>		
SP, PEA	MPC (polymyxin resistance gene)	Not Detected
SP, PEA	SHC (streptococcal resistance gene)	Not Detected
SP, PEA	SHC2 (streptococcal resistance gene)	Not Detected
<b>WCFE (Whole Cell Fluorescence Enumeration) - A full detector liquid for the FilmArray antimicrobial resistance gene assay (S) cannot detect antimicrobial resistance. Identifying is based on genus identification and low-sensitivity using a culture.</b>		
<b>Gram Positive Bacteria</b>		
Not Detected	Enterococcus	
Not Detected	Listeria monocytogenes	
Not Detected	Staphylococcus	
Not Detected	Staphylococcus aureus	
Not Detected	Streptococcus	
Not Detected	Streptococcus agalactiae (Group B)	
Not Detected	Streptococcus pneumoniae	
Not Detected	Streptococcus pyogenes (Group A)	
<b>Gram Negative Bacteria</b>		
Not Detected	Aeromonas baumannii	
Not Detected	Enterobacteriaceae	
Not Detected	Enterobacter cloacae complex	
Not Detected	Escherichia coli	
Not Detected	Haemophilus influenzae	
Not Detected	Haemophilus parainfluenzae	
Not Detected	Haemophilus influenzae	
Not Detected	Neisseria meningitidis	
Not Detected	Yersinia enterocolitica	
Not Detected	Yersinia enterocolitica	
Not Detected	Yersinia enterocolitica	
Not Detected	Yersinia enterocolitica	
Not Detected	Yersinia enterocolitica	

**RESULTADOS EN 1 HORA**





## FilmArray: Diagnóstico Síndromico

### Panel Respiratorio



**20**  
targets

- 3 bacterias
- 17 virus

### Panel de Sepsis



**27**  
targets

- 19 bacterias
- 5 levaduras
- 3 genes resistencia

### Panel Gastrointestinal



**22**  
targets

- 13 bacterias
- 5 virus
- 4 parásitos

### Panel de Meningitis



**13**  
targets

- 6 bacterias
- 7 virus
- 1 hongo

### Panel Respirat. Inferior



**34**  
targets

- 18 bacterias
- 9 virus
- 7 genes resistencia



## URGENCIAS MICROBIOLÓGICAS

- **GASTROENTERITIS INFECCIOSA**
- **INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS**
- **MENINGITIS / ENCEFALITIS**

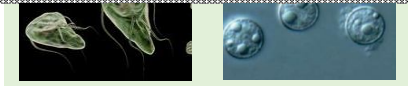
# Gastroenteritis infecciosa

## SINTOMAS



## PATOGENOS

- Mayoritariamente autolimitadas
- Sin embargo, existen cuadros severas, con alta morbimortalidad, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos o edad avanzada.
- Recomendaciones de la ACG\*:
  - Realizar estudios de diagnóstico en casos de disentería, enfermedad moderada a severa y síntomas por más de 7 días.
  - Si están disponibles se recomienda el uso de métodos independientes de cultivo avalados por la FDA al menos en paralelo a los métodos tradicionales.



\* ACG Clinical Guideline: Diagnosis, treatment and prevention of acute diarrheal infection in adults (2016)

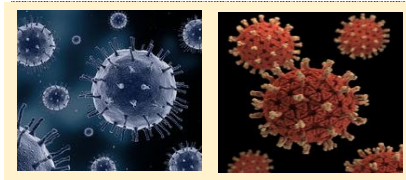


# Gastroenteritis infecciosa

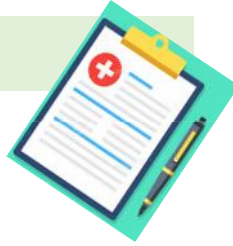
## SINTOMAS



## PATOGENOS



## DIAGNOSTICO



- ✓ Examen directo
- ✓ Coprocultivo
- ✓ Examen parasitológico
- ✓ Detección de antígenos
- ✓ Búsqueda específica de patógenos
- ✓ PCRs





# Panel Gastrointestinal FilmArray

Muestra: **materia fecal**

22 patógenos

SENSIBILIDAD ESPECIFICIDAD

98,5%

99,3%



## FilmArray Panel GI

- El Panel GI detectó mayor cantidad de patógenos que los métodos tradicionales, en muchísimo menos tiempo y menos costoso que si se realizan todas las pruebas por separado para obtener el mismo resultado.
- Se detectaron co-infecciones, no detectadas por los métodos convencionales.
- El Panel GI llevó a un aislamiento más racional del paciente, lo que generaría a largo plazo una menor transmisión nosocomial.



## Aplicación del Panel Gastrointestinal FilmArray en el diagnóstico de diarrea en pacientes pediátricos.

Mariela Sciara<sup>1</sup>, Dr. P. Candarle<sup>2</sup>, Dra. N. Giordani<sup>2</sup>, Dra. S. Sciaccaluga<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio Cibic. <sup>2</sup>Sanatorio de Niños

- Pacientes menores de 6 años que lleguen a la guardia del Sanatorio de Niños presentando: diarrea con más de 7 días de evolución, diarrea relacionada con viajes, diarrea con signos de gravedad como fiebre, disentería, dolor abdominal, deshidratación, pacientes inmunocomprometidos.

### Métodos de rutina

- ✓ EXAMEN DIRECTO
- ✓ COPROCULTIVO
- ✓ IFI    Rotavirus Ag  
          Adenovirus Ag  
          Norovirus Ag
- ✓ Búsqueda de *Campylobacter*
- ✓ Búsqueda de *Yersinia*
- ✓ PCR *E. coli* O157 stx1/2
- ✓ PCR Toxina de *C. difficile*

### Panel Gastrointestinal FilmArray

#### Bacterias

*Campylobacter*  
*Clostridium difficile* (toxin A/B)  
*Plesiomonas shigelloides*  
*Salmonella*  
*Vibrio / Vibrio cholerae*  
*Yersinia enterocolitica*  
*E. coli / Shigella* diarreagénicas  
*E. coli* Enteroagregativa  
*E. coli* Enteropatógena  
*E. coli* Enterotoxigénica  
*E. coli* pdtora toxina tipo Shiga  
*E. coli* O157  
*Shigella / E. coli* Enteroinvasiva

#### Parasitos

*Cryptosporidium*  
*Cyclospora cayetanensis*  
*Entamoeba histolytica*  
*Giardia lamblia*

#### Virus

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



## Aplicación del Panel Gastrointestinal FilmArray en el diagnóstico de diarrea en pacientes pediátricos.

Mariela Sciara<sup>1</sup>, Dr. P. Candarle<sup>2</sup>, Dra. N. Giordani<sup>2</sup>, Dra. S. Sciaccaluga<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio Cibic. <sup>2</sup>Sanatorio de Niños

Muestra: Materia fecal

### Métodos de rutina

✓ *E. coli* O157 STX2 (n=2)

Resultados en 48hs promedio

### Panel Gastrointestinal FilmArray

✓ *E. coli* O157 STX2 (n=2)

✓ *C. difficile* Tx A/B (n=1)

✓ *E. coli* enteropatógena (n=1)

✓ *Salmonella* (n=1)

✓ *Campylobacter* (n=3)

✓ *Campylobacter* *E. coli* STX2 (n=1)

- MAYOR NUMERO DE PATOGENOS DETECTADOS
- DISMINUCION SIGNIFICATIVA EN EL TIEMPO de obtención del resultado
- UTILIDAD EN DIAGNOSTICOS DIFERENCIALES (evitar internación o endoscopias).





## A qué pacientes realizar el Panel Gastrointestinal FilmArray?

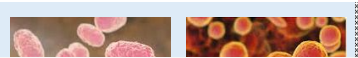
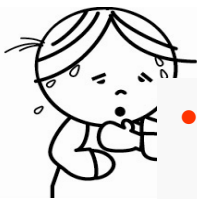
- Sospecha de infección nosocomial por *Clostridium difficile*.
- Pacientes inmunocomprometidos (HIV con bajos CD4, oncológicos, etc)
- Diarreas prolongadas, sanguinolientas.
- Diarreas en pacientes internados.
- Diarreas en pacientes con comorbilidades de riesgo (insuficiencia intestinal, intestino corto, insuficiencia renal, etc).



# Infecciones Respiratorias Agudas

## SINTOMAS

## PATOGENOS



- En Argentina, las IRA constituyen la 4ta causa de muerte por enfermedad.
- Principal causa de consulta y hospitalización en niños < 5 años, adultos >65 años y pacientes inmunocomprometidos.
- 80% de las infecciones respiratorias son virales, pero el 60% se tratan con antibióticos.

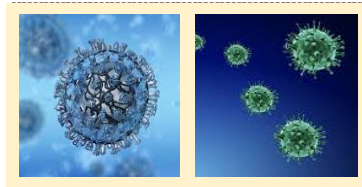
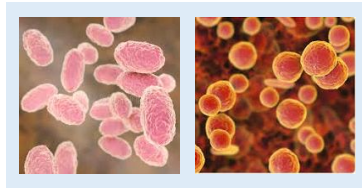


# Infecciones Respiratorias Agudas

## SINTOMAS

## PATOGENOS

## DIAGNOSTICO



- ✓ Cultivo
- ✓ Tests rápidos
- ✓ IFI
- ✓ PCRs



# Panel Respiratorio FilmArray

Muestra: hisopado nasofaríngeo

SENSIBILIDAD ESPECIFICIDAD

95%

99%

20 patógenos

## Virus

Adenovirus  
Coronavirus 229E  
Coronavirus HKU1  
Coronavirus OC43  
Coronavirus NL63  
Metapneumovirus  
Rhinovirus/ Enterovirus  
Influenza A  
Influenza A/H1  
Influenza A/H1-2009  
Influenza A/H3  
Influenza B

Parainfluenza 1  
Parainfluenza 2  
Parainfluenza 3  
Parainfluenza 4  
VSR

## Bacterias

*Bordetella pertussis*  
*Chlamydomphila pneumoniae*  
*Mycoplasma pneumoniae*



## FilmArray Panel Respiratorio

- Disminución significativa en la duración de la terapia antibiótica.
- Reducción de la cantidad de placas radiográficas durante los primeros dos días de hospitalización.
- Aumento de la cantidad de pacientes en aislamiento durante los primeros dos días de hospitalización.
- Disminución del tiempo de obtención de resultados (2-5 d a 3 hs)
- Disminución del tiempo de internación.

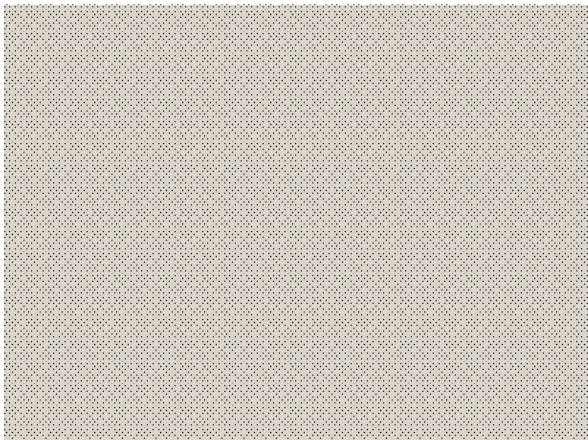


## Panel Respiratorio FilmArray: Aplicación en niños con dificultad respiratoria severa.

Mariela Sciarra<sup>1</sup>, Dra. A. Ugolini<sup>2</sup>, Dra. N. Zancocchia<sup>2</sup>, Dr. L. Flynn<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio Cibic. <sup>2</sup>Sanatorio de Niños

- 12 pacientes menores de 24 meses internados en el Sanatorio de Niños por dificultad respiratoria severa y bronquiolitis y/o catarro de vías aéreas superiores.

### Métodos de rutina



### Panel Respiratorio FilmArray

#### Virus

Adenovirus  
Coronavirus 229E  
Coronavirus HKU1  
Coronavirus OC43  
Coronavirus NL63  
Metapneumovirus  
Rhinovirus/ Enterovirus  
Influenza A  
Influenza A/H1  
Influenza A/H1-2009  
Influenza A/H3  
Influenza B

Parainfluenza 1  
Parainfluenza 2  
Parainfluenza 3  
Parainfluenza 4  
VSR

#### Bacterias

*Bordetella pertussis*  
*Chlamydomphila pneumoniae*  
*Mycoplasma pneumoniae*

## Panel Respiratorio FilmArray: Aplicación en niños con dificultad respiratoria severa.

Mariela Sciarra<sup>1</sup>, Dra. A. Ugolini<sup>2</sup>, Dra. N. Zancocchia<sup>2</sup>, Dr. L. Flynn<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio Cibic. <sup>2</sup>Sanatorio de Niños

### Métodos de rutina

✓ VSR (n=1)

Resultados en 24hs promedio

### Muestra: Hisopado nasofaríngeo

### Panel Respiratorio FilmArray

✓ Rhinovirus / Enterovirus (n=4)

✓ VSR (n=3)

✓ Parainfluenza 3 (n=2)

✓ Rhino/EV + Parainfl 3 (n=1)

✓ Rhino/EV + Infl A/H3 + Parainfl 3 (n=1)

✓ Adenovirus + Metapneumovirus (n=1)

Resultados en 3hs promedio



## A qué pacientes realizar el Panel Respiratorio FilmArray?

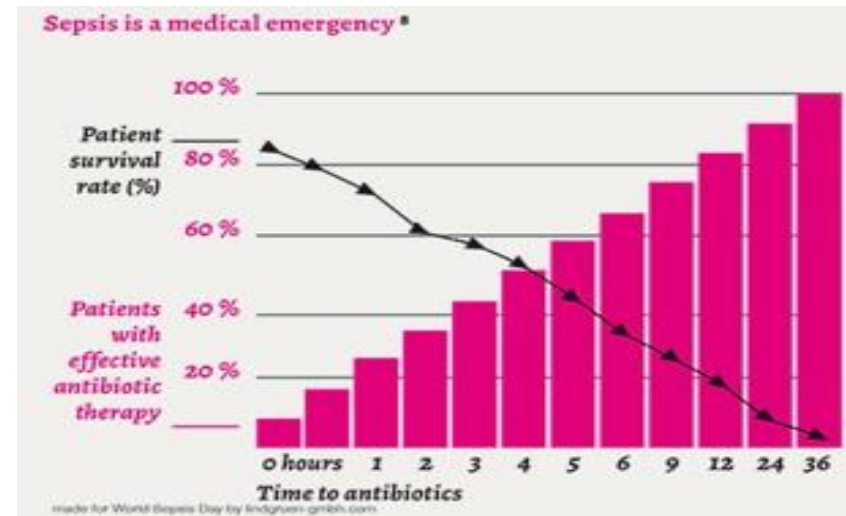
- **Pacientes pediátricos con bronquiolitis con internación (sibilancia, taquipnea y disnea respiratoria, hipoxemia, hiperinsuflación en radiografía).**
- **Pacientes con síndrome Coqueluchoide (acceso de tos con inspiración, estridor inspiratorio, cianosis, con o sin fiebre).**
- **Cuadro de neumonía intersticial en pacientes en UTI o en emergencias que requieren internación (fiebre alta, disnea, insuficiencia respiratoria aguda, infiltrados en radiografía).**
- **Pacientes inmunocomprometidos con cuadro respiratorio.**





# Sepsis

- En Argentina, mueren 10736 pacientes por septicemia al año (Min. Salud 2013) – 29 muertes/día.
- Tasa de mortalidad entre 10-38%.
- Cada hora decrece un 7,6% la sobrevivida. En una sepsis cada minuto cuenta.
- 1/3 de pacientes sépticos graves, reciben una terapia antibiótica inapropiada.
- El tratamiento empírico inadecuado lleva a mayor morbi-mortalidad e incrementa la resistencia a los antibióticos.



Kumar A et al (2006) Crit Care Med, 34: 1589-1596, 2006.

**La Identificación rápida de patógenos y mecanismos de resistencia mejora el tiempo en administrar la terapia correcta.**





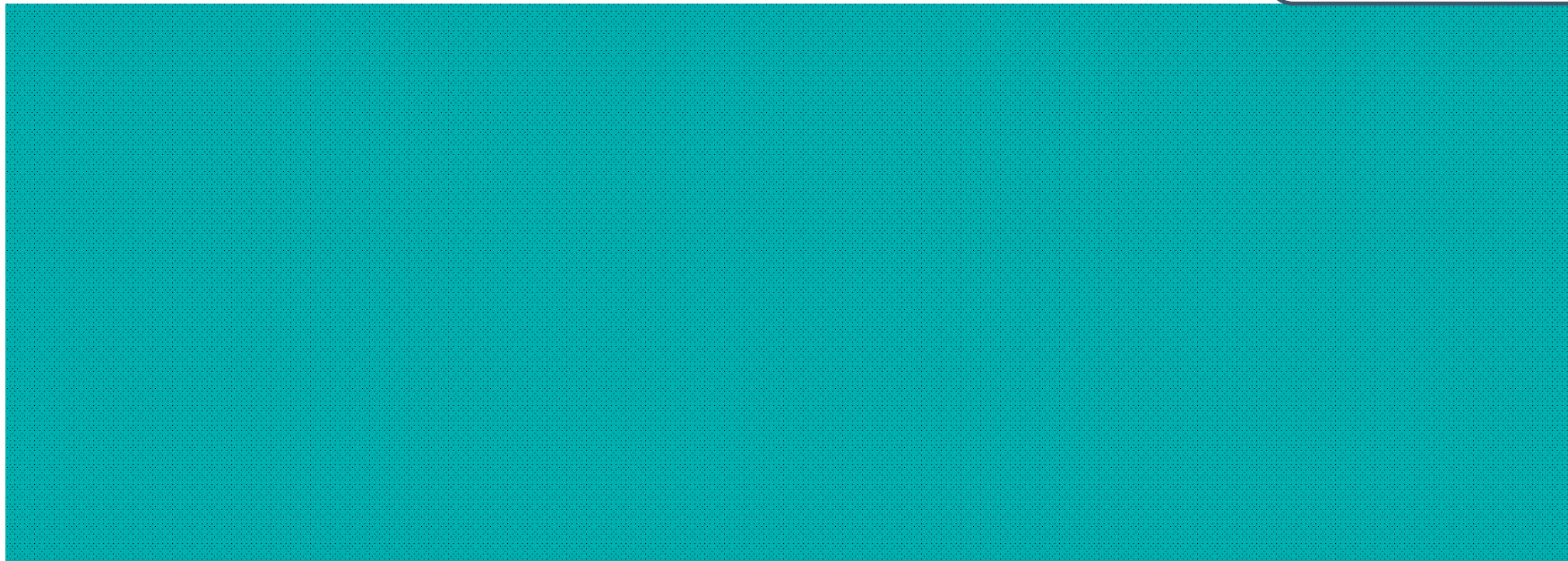
# Panel de Sepsis FilmArray

Muestra: **hemocultivo positivo**



24 patógenos y 3 genes de resistencia

SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
97,5%	99,8%



- IDENTIFICA **9** DE CADA 10 HEMOCULTIVOS POSITIVOS



# Panel de Sepsis FilmArray



- **TRATAMIENTO DIRIGIDO:** Mejor elección del antibiótico, sin efectos secundarios no deseados ni incremento de costos.
- **MENOR TIEMPO EN UCI Y MENOR MORTALIDAD:** En infecciones por *S. aureus mecA* permitió el descalamamiento de terapia empírica en 44hs vs 67 hs, disminución de mortalidad (10% vs 23%) y estancia en UCI (3 vs 7 días)
- **REDUCCION DE INFECCION NOSOCOMIAL:** Reconocimiento temprano de microorganismos. Optimización de la terapia basado en programa de ATS.



## Utilización del Panel de Sepsis FilmArray en shock séptico.

### Caso 1

- Hombre de 17 años que consulta a la guardia por diarrea abundante, vómitos y fiebre, sin antecedentes. Inestable hemodinámicamente, requiere asistencia respiratoria mecánica inmediata.
- Ingresa a UTI con deterioro renal, digestivo y neurológico con shock séptico.
- Hemocultivo en sistema automatizado Bact/Alert® 3D: 2/2 positivos a las 8,5 hs.
- Se realiza FilmArray® BCID Panel detectándose *S. pyogenes* una hora después, rotando a tratamiento específico a las **10 hs** de tomada la muestra.

### Caso 2

- Mujer de 13 años que consulta a la guardia por fiebre, cefalea, eritema y edema de ojo izquierdo, sin antecedentes.
- El cuadro evoluciona en forma agresiva, con sensorio alternante, ingresando a la UCIP el mismo día por shock séptico y celulitis necrotizante orbitaria y periorbitaria.
- Hemocultivo en sistema automatizado Bact/Alert® 3D: 1/2 positivo a las 3,6 hs.
- Se realiza FilmArray® BCID Panel detectándose *S. pyogenes* una hora después, rotando a tratamiento específico a las **5 hs** de tomada la muestra.



## A qué pacientes realizar el Panel de Sepsis FilmArray?

- En hemocultivos positivos de pacientes en UCI o críticamente enfermos con signos de sepsis graves.
- Si se observa Gram con bacilos negativos, levaduras o cultivo polimicrobiano (con apoyo de información clínica).
- En hemocultivos de pacientes inmunocomprometidos, neutropénicos febriles, inestabilidad hemodinámica.
- En casos puntuales de estudios epidemiológicos definido por el comité de infecciones (brote institucional)



## Meningitis / Encefalitis

- **Infecciones del Sistema Nervioso Central con significativa morbilidad, mortalidad y altos costos en salud.**
- **Amplio diagnóstico diferencial**
- **Signos y síntomas clínicos no son organismo-específicos.**
- **Métodos convencionales (Gram, cultivos, detección de antígenos): alto tiempo de obtención de resultados, necesidad de contar con volumen de muestra significativo.**



# Panel de Meningitis FilmArray

Muestra: **liquido cefalorraquídeo**

SENSIBILIDAD ESPECIFICIDAD

94,2%

99,8%

13 patógenos

## Bacteria:

*E. coli* K1

*H. Influenzae*

*L. monocytogenes*

*N. meningitidis* (encapsulada)

*S. Agalactiae*

*S. pneumoniae*

## Hongos:

*Cryptococcus neoformans/gattii*

## Virus:

Cytomegalovirus (CMV)

Enterovirus (EV)

Herpes simplex tipo 1 (HSV-1)

Herpes simplex tipo 2 (HSV-2)

Human Herpesvirus 6 (HHV-6)

Human Parechovirus (HPeV)

Varicella Zoster virus (VZV)

•NOTA: EBV No esta incluido en el Panel



## Panel Meningitis Encefalitis FilmArray

- TERAPIA DIRIGIDA ( sensible + rápido TAT): menos mortalidad morbilidad meningitis bacteriana.
- PERMITE DEESCALAR TERAPIAS ANTIBIOTICAS EMPIRICAS.
- MINIMO VOLUMEN DE LCR (limitante para la cantidad de pruebas tradicionales)
- REDUCE MULTIPLES PRUEBAS- ahorro de tiempo y costos
- REDUCE COSTOS POR DIAGNOSTICO RAPIDO
- REDUCE TIEMPO DE INTERNACION SI SE IDENTIFAC MENINGITIS VIRAL
- OPTIMIZA AISLAMIENTO DEL PACIENTE





## A qué pacientes realizar el Panel de Meningitis FilmArray?

- En pacientes con fuerte sospecha clínica de meningitis en pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos.



## FilmArray. Diagnóstico Sindrómico.

### Diagnóstico preciso, rápido e integral:

- Adecuación de la terapia empírica a tiempo
- Reducción de tiempos de internación
- Aislamiento rápido de los pacientes
- Disminución de estudios asociados

- Resultado debe ser utilizado en conjunto con otros datos de laboratorio, clínicos, y epidemiológicos.
- Resultados positivos no descartan co-infección
- Resultado negativo puede deberse a agentes no detectados por el panel.
- El cultivo es necesario para la recuperación bacteriana, tipificación y pruebas de sensibilidad.



**Muchas gracias!**

[msciara@cibic.com.ar](mailto:msciara@cibic.com.ar)

