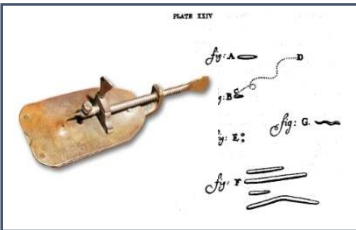


BIOLOGIA MOLECULAR: nuevas metodologías en el diagnóstico microbiológico.

Dra. Mariela Sciara
Laboratorio Cibic
Rosario

Biología Molecular en Microbiología. Historia.



1676

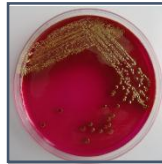
Primer microscopio
Descripción de
primeros
microorganismos

1800s

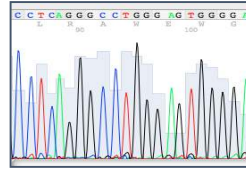
Relación entre
microorganismos
y enfermedad

1888 - presente

R Koch: aislamiento
de microorganismos
en medio sólido



Cultivo, tinción y
microscopía para
microorganismos
cultivables



1977

Sanger:
secuenciación
del ADN

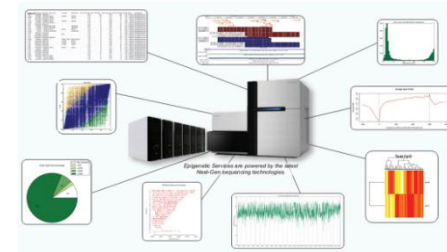
K. Mullis:
desarrollo
de la PCR

1980



1990s

Next Generation
Sequencing
(NGS)
2005



- ✓ 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**

Biología Molecular en Microbiología. Aplicaciones.

- **Microorganismos no cultivables** (HPV, HBV)
- **Microorganismos fastidiosos, crecimiento lento** (*M. tuberculosis*, *Legionella*)
- **Microorganismos altamente infecciosos de cultivo de alto riesgo**
- **Microorganismos presentes en muy baja cantidad en la muestra** (humor vítreo, muestras forenses)
- **Monitoreo de carga viral** (pronóstico y respuesta al tratamiento 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**



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**

MANEJO DE SEPSIS

URGENCIAS MICROBIOLÓGICAS

Respiratorias Gastrointest. Meningitis

Utilidad en

**UCI
Terapistas
Infectólogos**

**GUARDIA
Emergentólogos
Internación criteriosa**

Necesidad

DECISION CLINICA basada en información precisa, rápida e integral

Beneficios

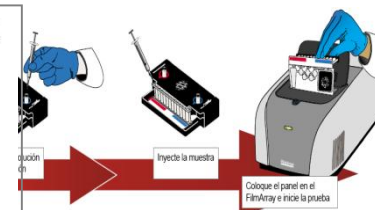
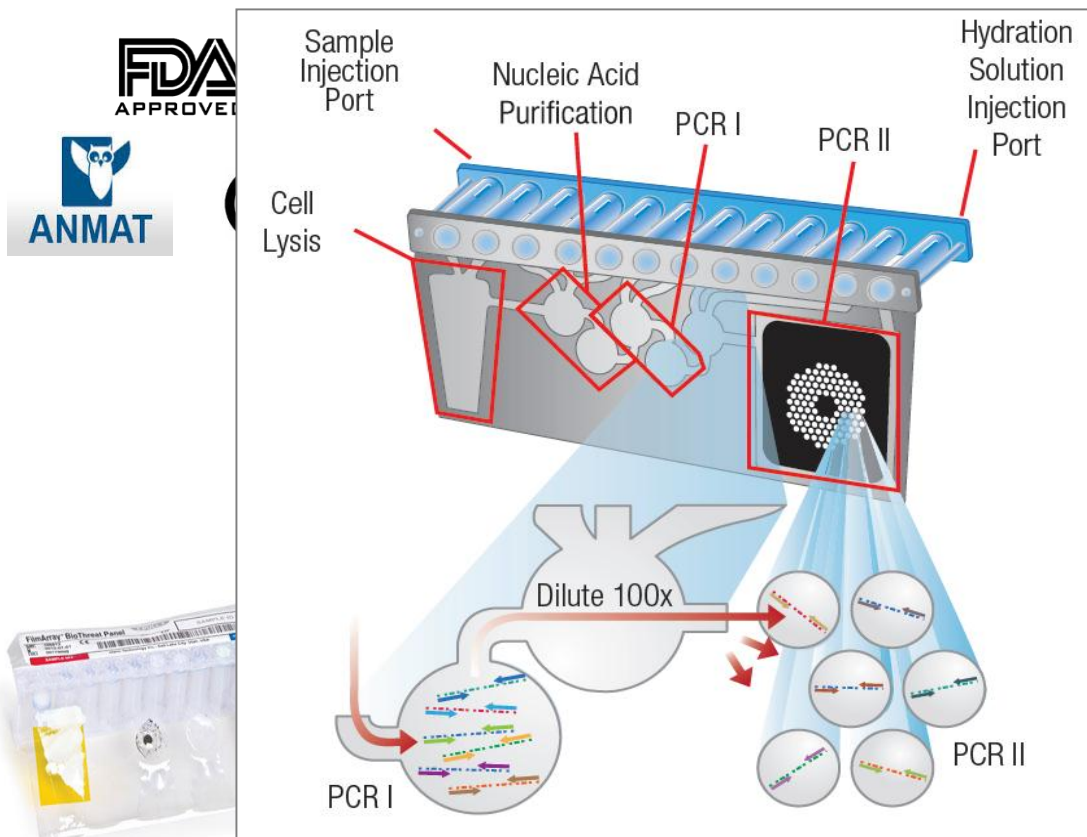
- ✓ **Ajuste de terapia empírica a tiempo**
- ✓ **Resolver casos de urgencia**
- ✓ **Reducción de tiempos de internación**
- ✓ **Disminución de resistencia antibiótica**
- ✓ **Menor morbi-mortalidad**
- ✓ **Disminución de estudios asociados.**

Métodos diagnósticos rápidos: PCRs multiplex-Paneles



FilmArray®

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



SIMPLICIDAD
2 MINUTOS DE PROCESAMIENTO

REACTIVOS LISTOS PARA USAR
CONSERVACION A TAMB

FilmArray® BCID Panel							
Raw Summary	<table border="1"> <tr><td>Organismo Detectado</td><td>Shigella sonnei</td></tr> <tr><td>Organismo Antigenicidad</td><td>Shigella</td></tr> <tr><td>Resistencia Detectada</td><td>Penicilina</td></tr> </table>	Organismo Detectado	Shigella sonnei	Organismo Antigenicidad	Shigella	Resistencia Detectada	Penicilina
Organismo Detectado	Shigella sonnei						
Organismo Antigenicidad	Shigella						
Resistencia Detectada	Penicilina						
Basic Summary - Interpretation	<p>Shigella</p> <ul style="list-style-type: none"> PCR (Enterohemorrhagic Escherichia Coli) detected PCR (E. coli enterohemorrhagic genes) detected PCR (Shigella enterohemorrhagic genes) detected PCR (Shigella sonnei) detected PCR (Shigella sonnei) detected <p>Other Negative Results</p> <ul style="list-style-type: none"> PCR (Shigella flexneri) Not Detected PCR (Shigella flexneri) Not Detected PCR (Shigella flexneri) Not Detected PCR (Shigella flexneri) Not Detected PCR (Shigella flexneri) Not Detected PCR (Shigella flexneri) Not Detected PCR (Shigella flexneri) Not Detected PCR (Shigella flexneri) Not Detected PCR (Shigella flexneri) Not Detected PCR (Shigella flexneri) Not Detected 						

RESULTADOS EN 1 HORA

FilmArray: Diagnóstico Sindrómico

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



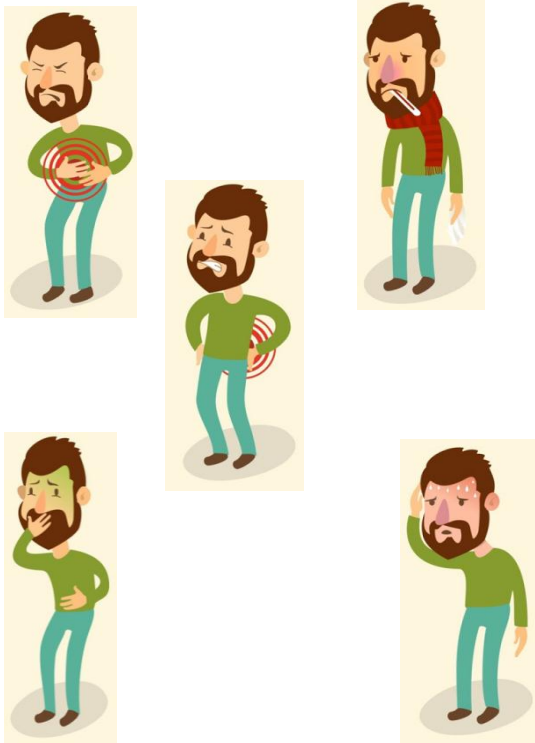
PATOGENOS

- 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.



Gastroenteritis infecciosa

SINTOMAS



PATOGENOS



DIAGNOSTICO



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

Diagn Microbiol Infect Disease 2014

Multiplex gastrointestinal pathogen panels: implications for infection control[☆]

Kenneth H. Rand^{a,*}, Elizabeth E. Tremblay^d, Mari Hoidal^b, Lori B. Fisher^c, Katrina R. Grau^e, Stephanie M. Karst^e

Clinical Microb Infect 2015

Spectrum of enteropathogens detected by the FilmArray GI Panel in a multicentre study of community-acquired gastroenteritis

A. Spina¹, K. G. Kerr², M. Cormican³, F. Barbut⁴, A. Eigentler⁵, L. Zerva⁶, P. Tassios⁶, G. A. Popescu⁷, A. Rafila⁷, E. Eerola⁸, J. Batista⁹, M. Maass¹⁰, R. Aschbacher¹¹, K. E. P. Olsen¹² and F. Allerberger¹

J Clinical Microbiol 2015

Multicenter Evaluation of the BioFire FilmArray Gastrointestinal Panel for Etiologic Diagnosis of Infectious Gastroenteritis

Sarah N. Buss,^{a*} Amy Leber,^b Kimberle Chapin,^c Paul D. Fey,^a Matthew J. Bankowski,^{d,e} Matthew K. Jones,^f Margarita Rogatcheva,^f Kristen J. Kanack,^f Kevin M. Bourzac^f



FilmArray Panel GI

Diagn Microbiol Infect Disease 2014

Multiplex gastrointestinal pathogen panels: implications for infection control[☆]

- 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.

Panel for Etiologic Diagnosis of Infectious Gastroenteritis

Sarah N. Buss,^{a*} Amy Leber,^b Kimberle Chapin,^c Paul D. Fey,^a Matthew J. Bankowski,^{d,e} Matthew K. Jones,^f Margarita Rogatcheva,^f Kristen J. Kanack,^f Kevin M. Bourzac^f



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

Mariela Sciarra¹, Dr. P. Candarle², Dra. N. Giordani², Dra. S. Sciacaluga². ¹Laboratorio Cibic. ²Sanatorio de Niños

- Pacientes < 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 ptdora toxina tipo Shiga
***E. coli* O157**
Shigella/E. coli Enteroinvasiva

Parásitos

Cryptosporidium
Cyclospora cayetanensis
Entamoeba histolytica
Giardia lamblia

Virus

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

SENSIBILIDAD ESPECIFICIDAD

98,5%

99,3%

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

Mariela Sciarra¹, Dr. P. Candarle², Dra. N. Giordani², Dra. S. Sciacaluga². ¹Laboratorio Cíbic. ²Sanatorio 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)

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

Infección Respiratoria Aguda

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.



Héritas

Medicina de precisión

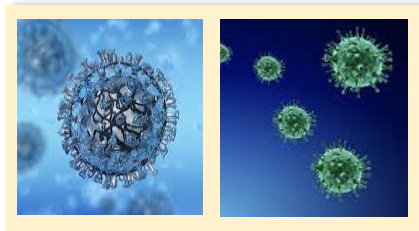
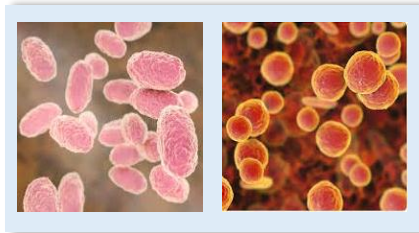
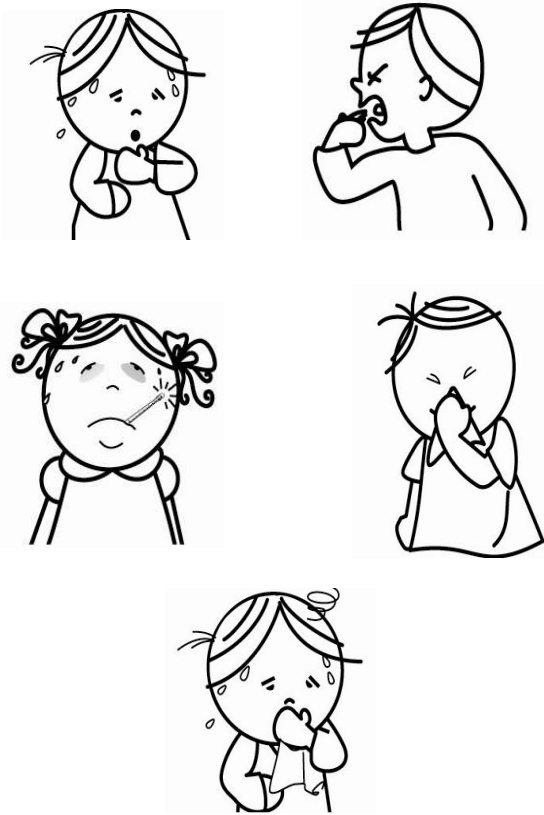
CIBIC + INDEAR

Infección Respiratoria Aguda

SINTOMAS

PATOGENOS

DIAGNOSTICO



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

J Clinical Microbiology 2015

Impact of Early Detection of Respiratory Viruses by Multiplex PCR Assay on Clinical Outcomes in Adult Patients

Urania Rappo,^{a*} Audrey N. Schuetz,^{b,c*} Stephen G. Jenkins,^{b,c} David P. Calfee,^b Thomas J. Walsh,^{b,d} Martin T. Wells,^e
James P. Hollenberg,^a Marshall J. Glesby^b

J Pediatrics 2016

Impact of Multiplex Polymerase Chain Reaction Testing for Respiratory Pathogens on Healthcare Resource Utilization for Pediatric Inpatients

Anupama Subramony, MD, MBA^{1,*}, Philip Zachariah, MD, MS^{2,3,*}, Ariella Krones, MD⁴, Susan Whittier, PhD^{2,3},
and Lisa Saiman, MD, MPH^{2,3}

J Clinical Microbiology 2015

- **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 Sciara¹, Dra. A. Ugolini², Dra. N. Zancocchia², Dr. L. Flynn². ¹Laboratorio Cibic. ²Sanatorio 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

- ✓ **IFI**
 - Influenza A
 - Influenza B
 - Parainfluenza 2
 - Parainfluenza 3
 - Adenovirus
 - VSR
- ✓ **PCR *Bordetella pertussis***

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

SENSIBILIDAD

95%

ESPECIFICIDAD

99%

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

Mariela Sciara¹, Dra. A. Ugolini², Dra. N. Zancocchia², Dr. L. Flynn². ¹Laboratorio Cibic. ²Sanatorio 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)

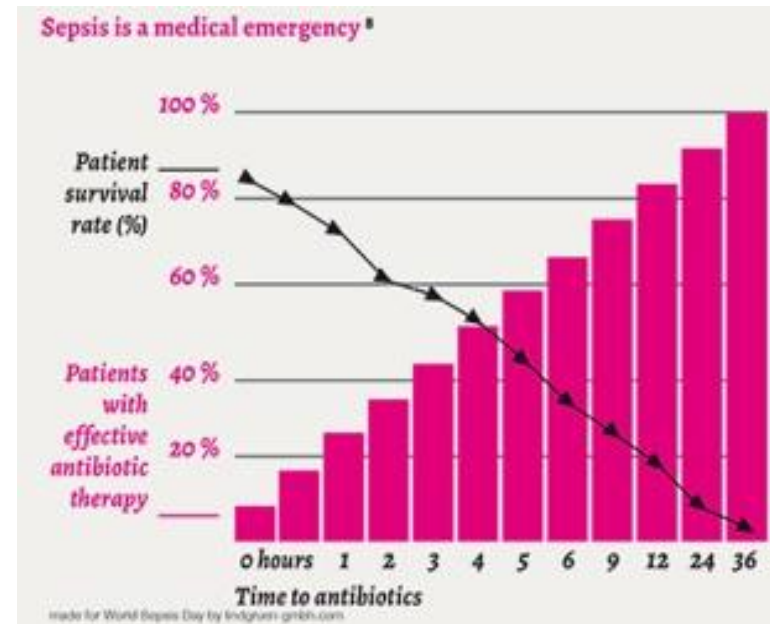
✓ Rhino/EV + Infl A/H3 + Parainfl 3 (n=1)

✓ Adenovirus + Metapneumovirus (n=1)

Resultados en 3hs promedio

Manejo de 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.



Muestra: **hemocultivo positivo**

Bacterias Gram -

Acinetobacter baumannii
Haemophilus influenzae
Neisseria meningitidis
Pseudomonas aeruginosa
Enterobacteriaceae
Enterobacter cloacae complex
Escherichia coli
Klebsiella oxytoca
Klebsiella pneumoniae
Proteus
Serratia marcescens

Bacterias Gram +

Enterococcus
L. monocytogenes
Staphylococcus
S. aureus
Streptococcus
S. agalactiae
S. pyogenes
S. pneumoniae

Levaduras

Candida albicans
Candida glabrata
Candida krusei
Candida parapsilosis
Candida tropicalis

Resistencia a Antibióticos:

mecA
van A/B
KPC

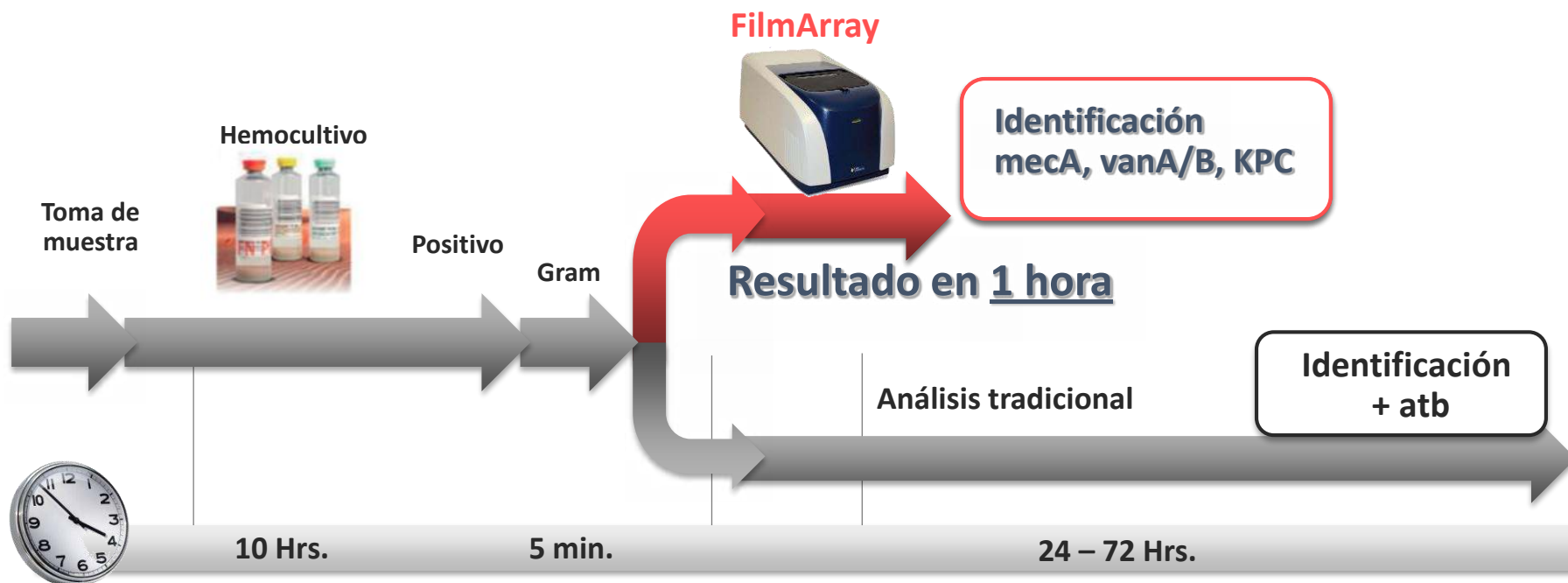
SENSIBILIDAD ESPECIFICIDAD

97,5%

99,8%

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

FilmArray Panel de Sepsis



- ✓ **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.

Utilidad del FilmArray Panel de Sepsis

- 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)

- 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 Meningitis FilmArray

Muestra: **líquido cefalorraquídeo**

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)

SENSIBILIDAD ESPECIFICIDAD

94,2%

99,8%

•NOTA: EBV No está incluido en el Panel

Panel Meningitis FilmArray

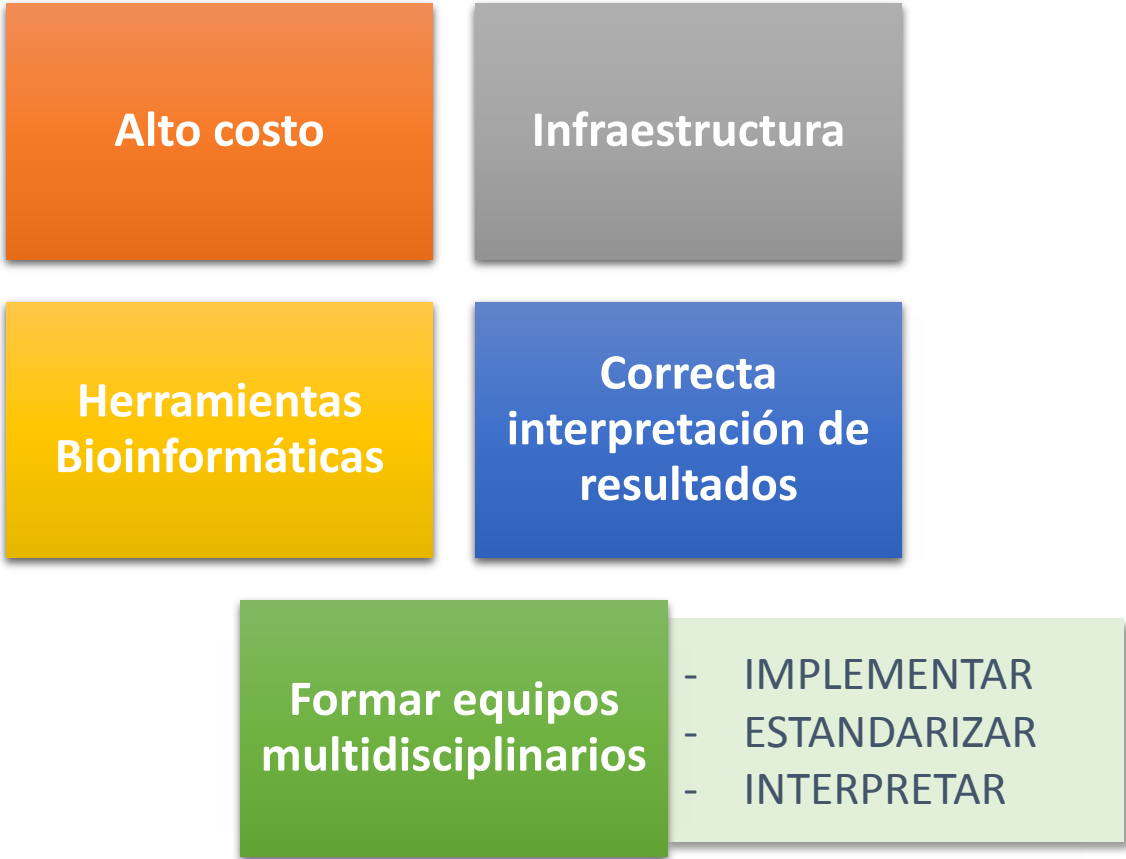
- **TERAPIA DIRIGIDA (sensible + rápido TAT): menos mortalidad morbilidad en meningitis bacteriana.**
- **PERMITE DEESCALAR TERAPIAS ANTIBIOTICAS EMPIRICAS.**
- **MINIMO VOLUMEN DE LCR (limitante para la cantidad de pruebas tradicionales)**
- **REDUCE MULTIPLES PRUEBAS- ahorro de tiempo y costos**
-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

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.

Desafíos de las nuevas herramientas diagnósticas.



Muchas gracias!

msciara@cibic.com.ar