

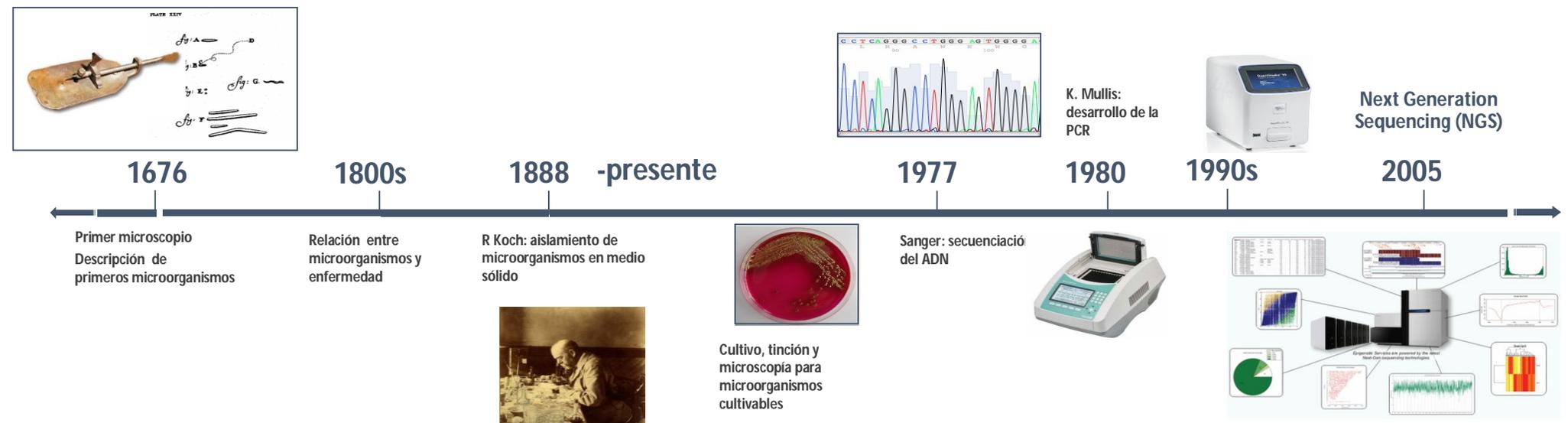


CURSO: Biología Molecular Aplicada al Diagnóstico Médico
Círculo Médico de Rosario

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

MANEJO DE SEPSIS

URGENCIAS MICROBIOLÓGICAS

Respiratorias Gastrointestinales Meningitis

Utilidad en

**UCI
Terapistas
Infectólogos**

**GUARDIA
Emergentólogos
Internación criteriosa**

Necesidad

DECISION CLINICA BASADA EN INFORMACION PRECISA, RAPIDA 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: 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 severos, 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)

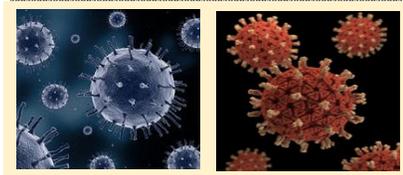


Gastroenteritis infecciosa

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 Sciara¹, Dr. P. Candarle², Dra. N. Giordani², Dra. S. Sciaccaluga². ¹Laboratorio Cibic. ²Sanatorio 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 Sciara¹, Dr. P. Candarle², Dra. N. Giordani², Dra. S. Sciaccaluga². ¹Laboratorio Cibic. 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)

✓ *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.

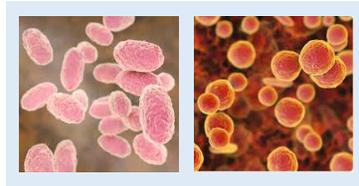


Infecciones Respiratorias Agudas

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.

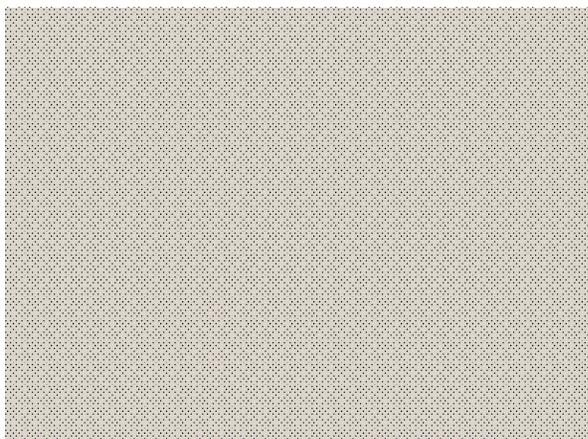


Panel Respiratorio FilmArray: Aplicación en niños con dificultad respiratoria severa.

Mariela Sciarra¹, 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



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 Sciarra¹, Dra. A. Ugolini², Dra. N. Zancocchia², Dr. L. Flynn². ¹Laboratorio Cbic. 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



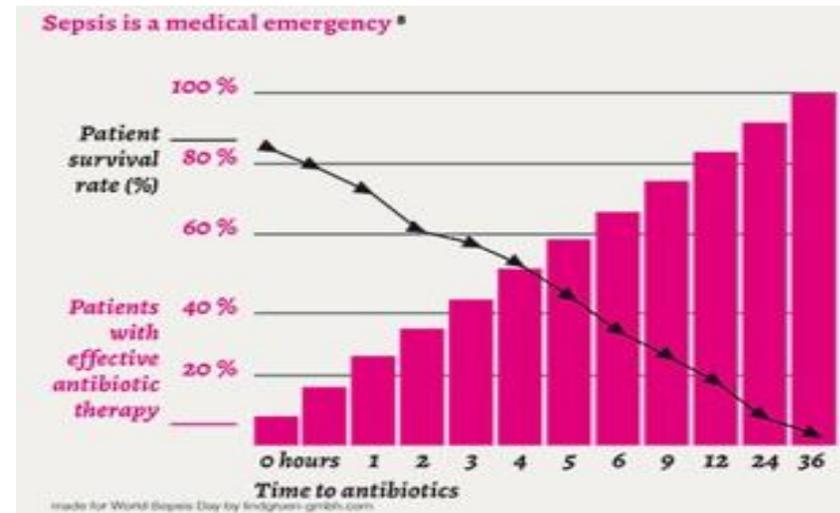
A qué pacientes realizar el Panel Respiratorio FilmArray?

- 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.





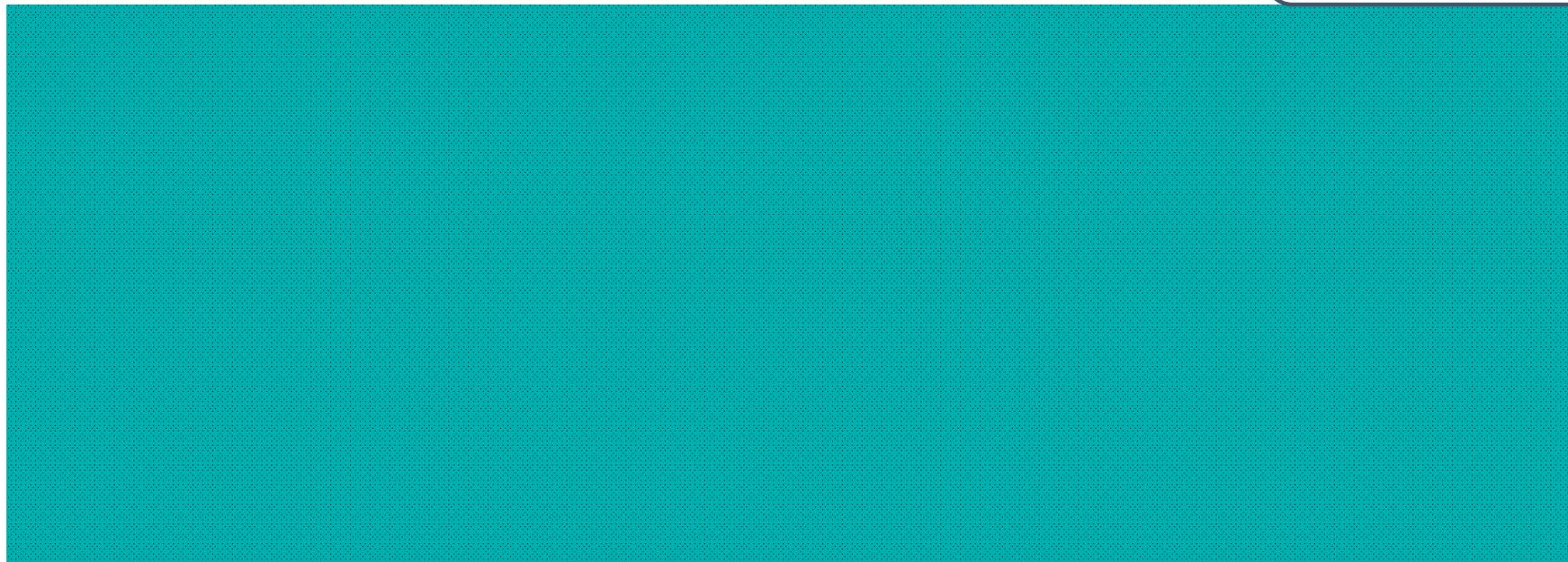
Panel de Sepsis FilmArray

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

