DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES EN TIEMPO REAL

JAIME ESTEBAN

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

INTRODUCCIÓN

- La Microbiología Clínica se dedica al diagnóstico de las enfermedades infecciosas desde su aparición en el siglo XIX.
- Desde entonces, el número de agentes causantes de enfermedades ha aumentado de forma espectacular.
- Sin embargo, (y con algunas excepciones), el desarrollo tecnológico no ha acompañado ese desarrollo en los conocimientos.
- En las ramas de Bacteriología, Micología y Parasitología continuamos diagnosticando las infecciones con métodos desarrollados hace más de 100 años.
- Sin embargo, la rama de Virología sí que ha evolucionado tecnológicamente desde los primeros cultivos de tejidos, fundamentalmente impulsada por el fenómeno de la epidemia de SIDA a finales del siglo XX.

DISCUSSION

The criteria employed for the identification of the staphylococci are colonial appearance on blood-agar, Gram reaction and micr

TABLE 1. *Possible coagulase and mann*
of Staphylococcus aureus and S. epi

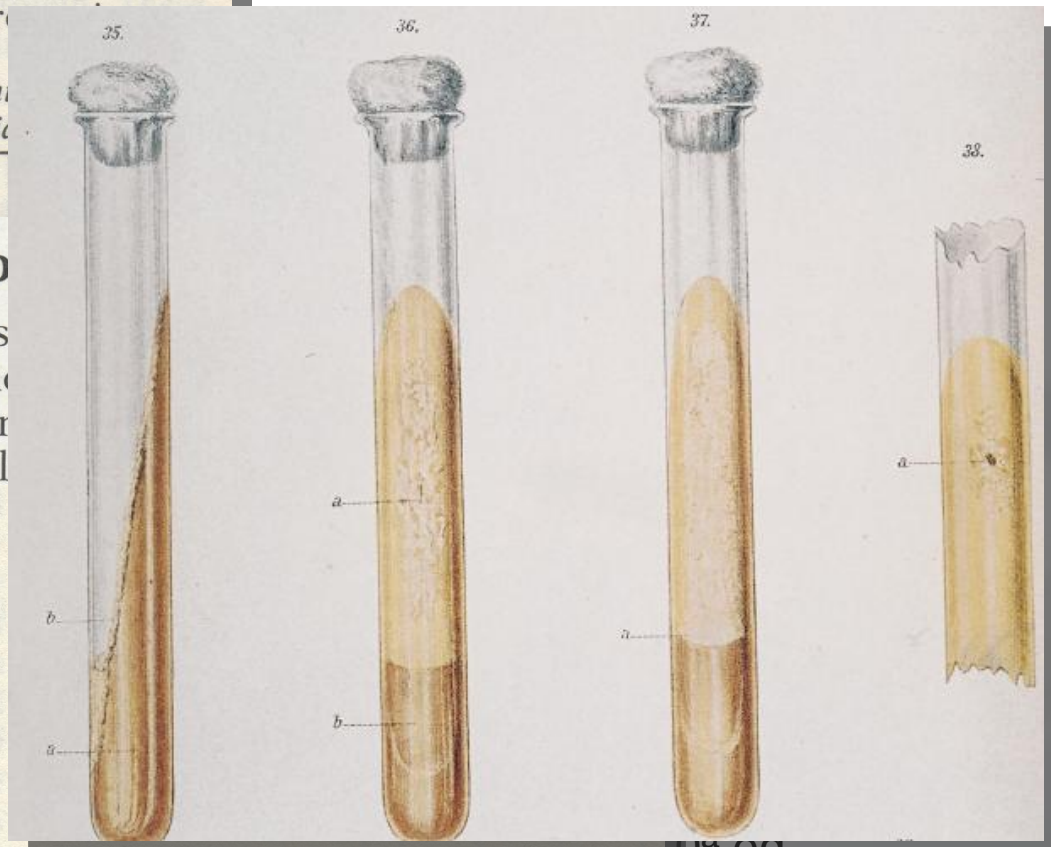
Species	Coagulase production
S. aureus	
S. epidermid	

ID

Staphylococcus s
basis of colony m
oxygen requiremer
tance, acetylmethyl

Methods for the study of pathogenic organisms

1881 • Robert Koch



Koch, Robert. 1881. Zur Untersuchung von pathogenen Organismen. 1881. *Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*, Vol. 1, pages 1–48.

10ª ed.

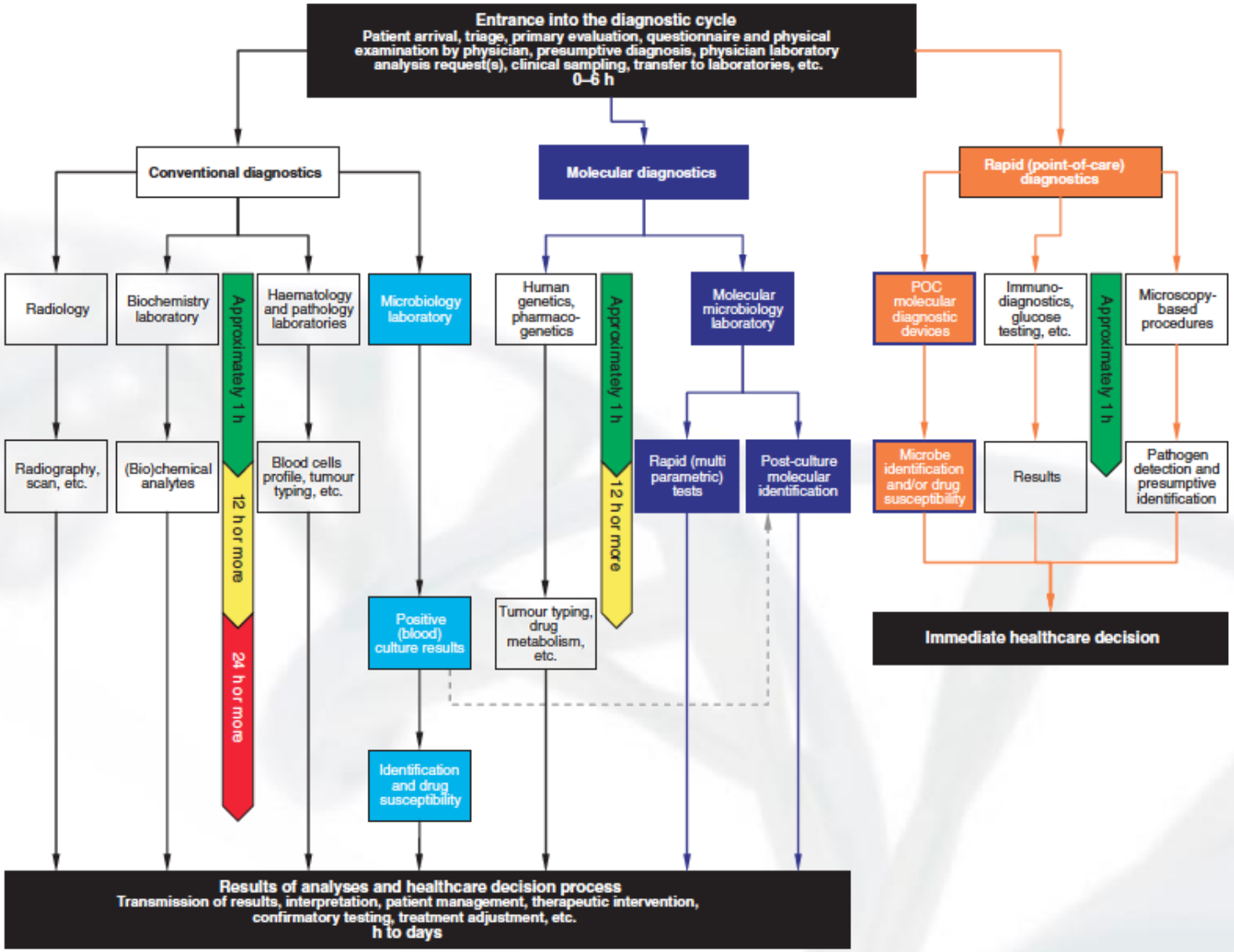


FIG. 1. The need for speed in diagnostic microbiology. From patient admission to the making of decisions orienting the management or treatment, gains in time to delivery of results may translate into a better healthcare system. For a life-threatening syndrome such as sepsis, rapid identification of the microbial pathogen in less than 6 h is especially critical for the proper management and treatment of a patient, resulting in lower morbidity and mortality.

- Necesitamos técnicas que permitan un diagnóstico rápido con implicaciones clínicas en el manejo del paciente.

- Un diagnóstico que no tiene implicaciones terapéuticas sólo tiene interés académico.

- Sin embargo, algunas de estas técnicas existen en realidad desde hace más de un siglo.

- Podemos clasificar estas técnicas en 3 grupos:

  - Tinciones

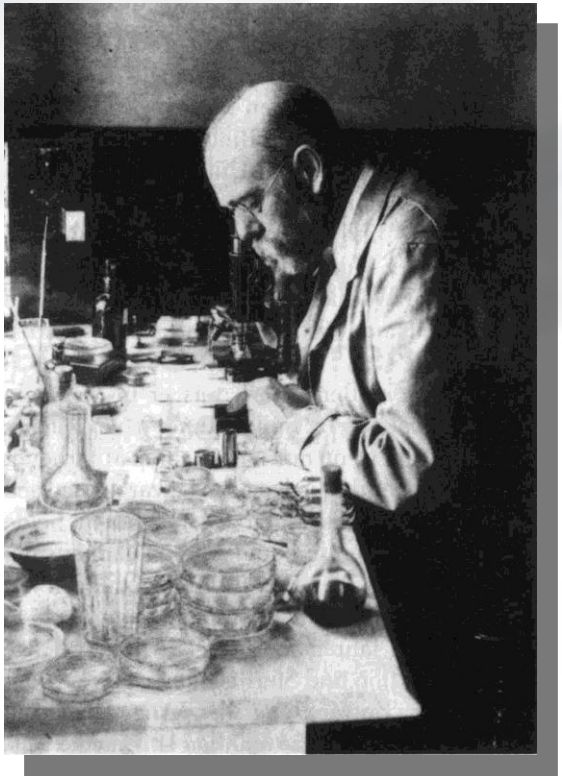
  - Técnicas inmunológicas (inmunocromatografía esencialmente)

  - Técnicas moleculares (técnicas de PCR esencialmente).

TINCIONES

- Las tinciones existen de hecho antes que los medios de cultivo.

- Hoy en día siguen siendo una parte esencial en el diagnóstico microbiológico en la práctica totalidad de los laboratorios.



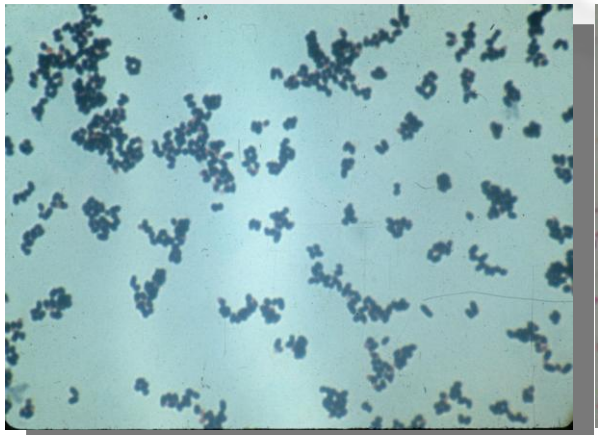
TINCIONES

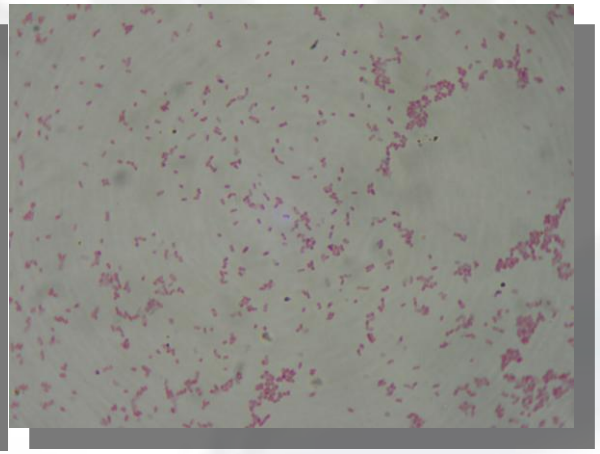
- **TINCION DE GRAM**:

- Es posiblemente la tinción más usada.

- Inventada por Christian Gram (150-1938) en 1884.

- Permite diferenciar a las bacterias de acuerdo a la estructura de su pared bacteriana en Gram positivas y Gram negativas.

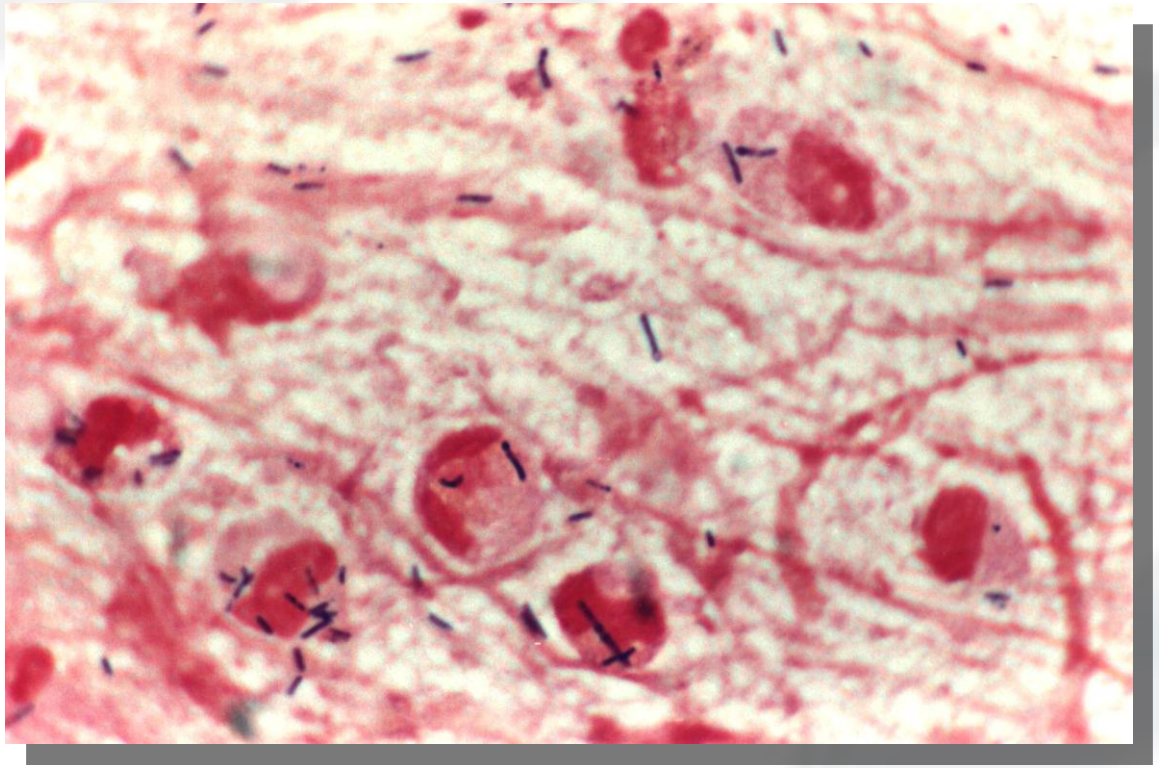




TINCIONES

- **TINCION DE GRAM**:

- Aplicada e muestras clínicas permite, además, visualizar otras estructuras (leucocitos, fibrina, células epiteliales…)

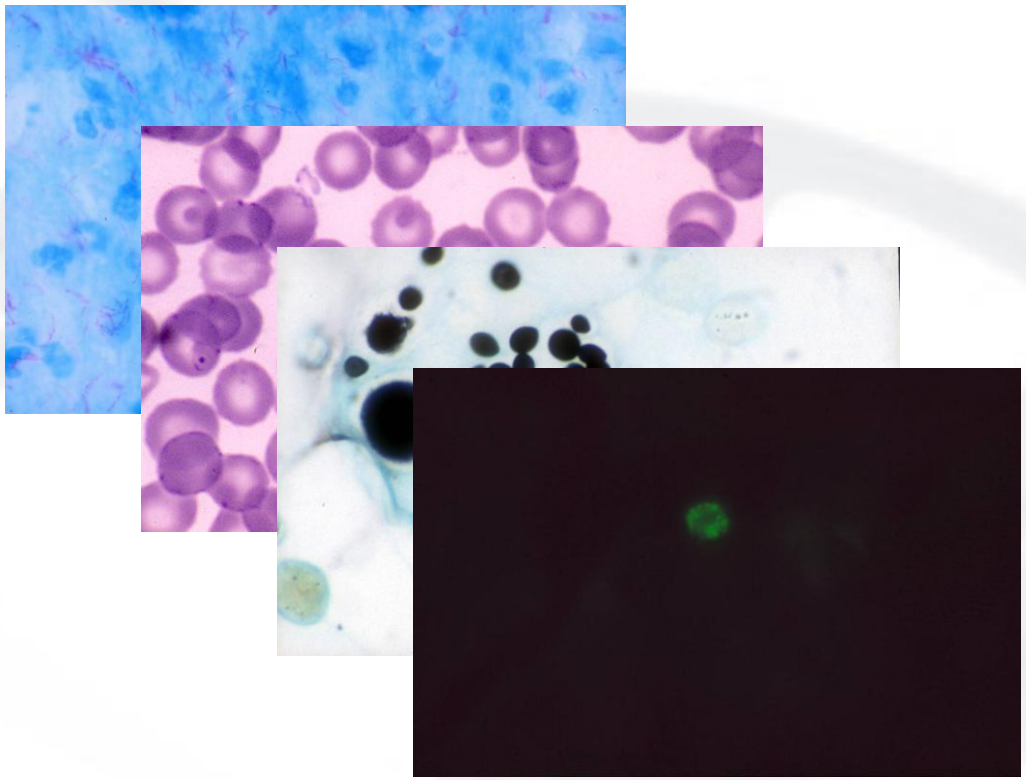


TINCIONES

- **TINCION DE GRAM**:
- Es un procedimiento rápido (minutos).
- Sin embargo plantea problemas de sensibilidad y especificidad, sobre todo en muestras paucibacterianas.
- Sigue siendo de gran utilidad en manos expertas.

TINCIONES

- **TINCION DE GRAM**:
- En el momento actual existen muchas tinciones, algunas de ellas incluso diagnósticas:
  - Tinciones ácido-alcohol resistentes:
    - Ziehl-Neelsen
    - Auramina
    - Kinyoun
  - Tniciones para parásitos:
    - Giemsa
    - Tricrómica
    - Lugol
    - etc.
  - Tinciones para hongos:
    - Blanco de Calcoflúor
    - KOH
    - Plata-Metenamina
    - etc.
  - Tinciones fluorescentes:
    - Inmunofluorescencia directa



- En general, plantean los mismos problemas que el Gram

TINCIONES

- **VENTAJAS**:

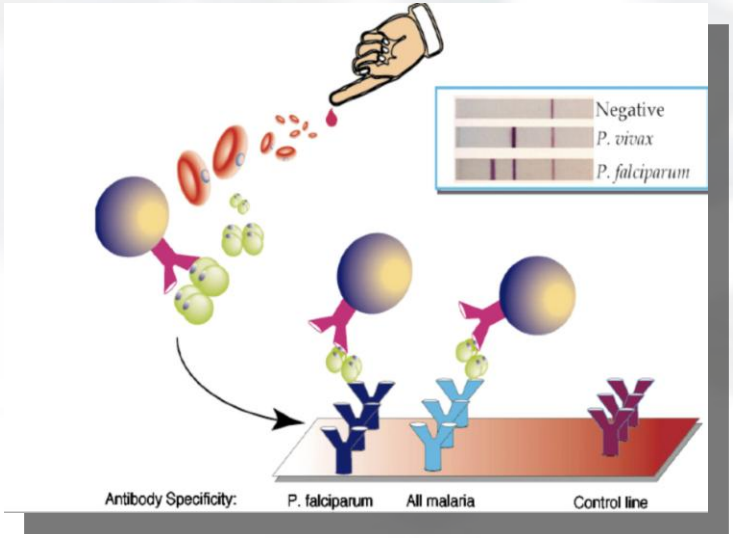
- Eficacia conocida
- Baratas
- Rápidas de llevar a cabo
- No necesitan un equipo que no exista ya en la mayoría de laboratorios.

- **INCONVENIENTES:**

- Necesitan de equipo especializado (microscopio, en algunos casos de fluorescencia)
- Requieren interpretación (personal experimentado)

INMUNOCROMATOGRAFÍA

- Son técnicas basadas en la detección de antígenos mediante técnicas inmunológicas.
- Sencillas de manejar, rápidas y fáciles de conservar.



- Son, posiblemente, la tecnología ideal “Point-of-Care” (POC)

INMUNOCROMATOGRAFÍA

- **¿Y QUÉ ES LA TECNOLOGÍA "POINT OF CARE"?**

- "Patient specimens being assayed at or near the patient, with the assumption that test results will be available instantly or in a very short time frame, to assist care-givers with immediate diagnosis and/or clinical intervention"

Bissonnette. Clin Microbiol Infect 2010; 16: 1044–1053

- **Estas técnicas deberían ser "ASSURED":**

- "**A**ffordable; **S**ensitive; **S**pecific; **U**ser-friendly (simple to perform in a few steps with minimal training); **R**obust and rapid (can be stored at room temperature and results available in <30 minutes); **E**quipment free or minimal equipment that can be solarpowered; and **D**eliverable to those who need them"

Kettler H, White K, Hawkes S. Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections. Geneva: WHO/TDR, 2004.

INMUNOCROMATOGRAFÍA

- Hoy en día existen técnicas de inmunocromatografía para el diagnóstico de diversas patologías:
  - VIH
  - Hepatitis B
  - Paludismo
  - Gastroenteritis por Adenovirus/Rotavirus
  - Diarrea por *Clostridium difficile*
  - Infección por *Streptococcus pneumoniae*
  - Infección por *Legionella pneumophila*
  - Faringitis por *Streptococcus pyogenes*
  - Viriasis respiratorias:
    - Adenovirus
    - VRS
    - Parainfluenza
    - Gripe
  - etc.

INMUNOCROMATOGRAFÍA

- Algunas de estas técnicas han revolucionado el diagnóstico de ciertas patologías:
  - *Streptococcus pneumoniae*
  - *Legionella pneumophila*
  - VRS
- Son sencillas de realizar y fáciles de conservar.
- Las muestras que se usan son habitualmente fáciles de obtener
- Sin embargo, a pesar de su teórica sencillez, no están exentas de problemas:
  - Sensibilidad y especificidad no es del 100 %
  - En algunas circunstancias requieren técnicas confirmatorias (VIH)
  - Su realización por personal no cualificado da lugar a resultados erróneos.

INTERPRETACIÓN

INMUNOCROMATOGRAFÍA

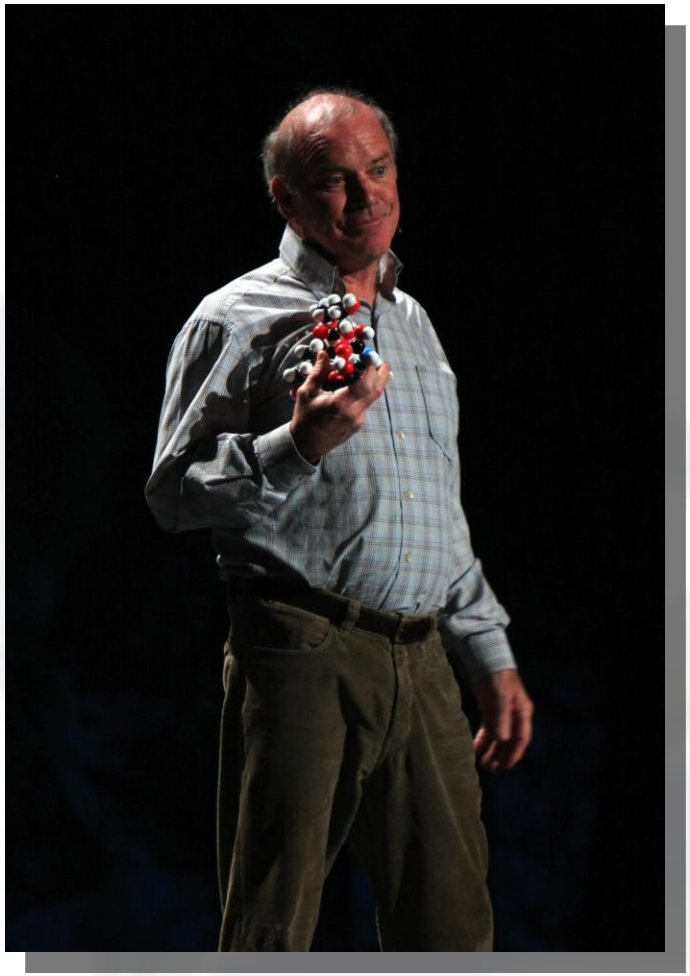
- Algunas de estas técnicas se están automatizando, lo que facilitará en el futuro su implantación.

- A pesar de esto, está por ver si los problemas anteriormente citados se solucionarán o persistirán.
- En todo caso, es una tecnología en rápido desarrollo y que verá aumentado su número en un futuro cercano.

BIOLOGÍA MOLECULAR

- En sus orígenes, las técnicas de amplificación de DNA se presentaban como la técnica ideal para el diagnóstico rápido de múltiples patologías.
- Hoy en día, se puede afirmar que estas técnicas han revolucionado el diagnóstico en múltiples ámbitos de la medicina.
- Sin embargo, aún no han desplazado a numerosas técnicas convencionales en Microbiología:

¿Por qué no?



BIOLOGÍA MOLECULAR

- Las técnicas de amplificación genética (PCR y derivados) han permitido acelerar el diagnóstico de numerosas enfermedades infecciosas, mejorarlo, e incluso en algún caso han pasado a ser la técnica de referencia:
  - Tuberculosis
  - VIH
  - Hepatitis
  - Papilomavirus
  - Enterovirus
  - etc.

- Sin embargo, la rapidez real de las técnicas no es tal para algunas patologías, y no han demostrado una superioridad evidente sobre las técnicas convencionales

BIOLOGÍA MOLECULAR

- Muchos de estos problemas son logísticos:
  - Necesidad en casos de extracción previa
  - Kits cerrados, diseñados en casos para un gran número de muestras
  - Necesidad de equipos especializados (e incluso instalaciones). En algunos casos, estos equipos son “cerrados”, lo que complica más la cosa
- Para su uso en el diagnóstico rápido tipo POC, esta tecnología debería simplificarse para poder ser usada en lugares sin instalaciones especializadas.

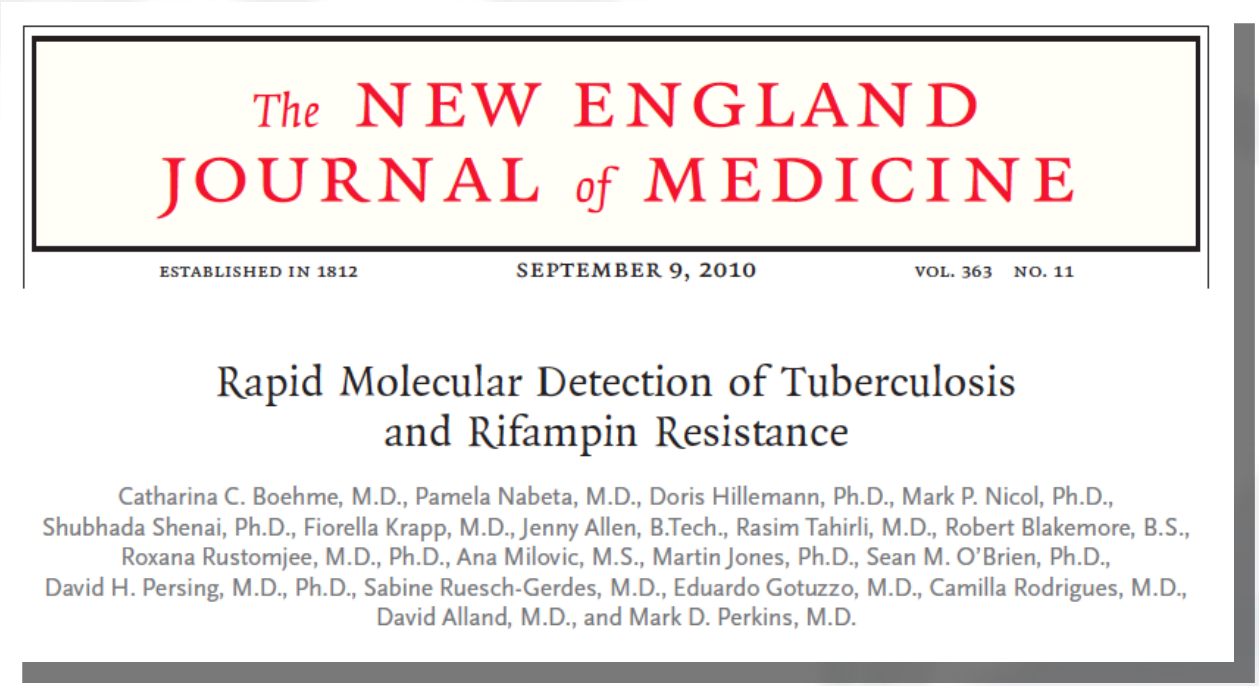
BIOLOGÍA MOLECULAR

- Sería necesario simplificar la tecnología para conseguir un sistema capaz de realizar el diagnóstico sin una complejidad excesiva

- En los últimos tiempos se han desarrollado sistemas en esta línea que han permitido notablemente la simplificación de estas técnicas.

BIOLOGÍA MOLECULAR

- Este sistema es fácil de realizar, simple de manejar, y ha sido probado para el diagnóstico de enfermedades infecciosas en entornos poco adecuados para el empleo de las técnicas convencionales de biología molecular.



The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

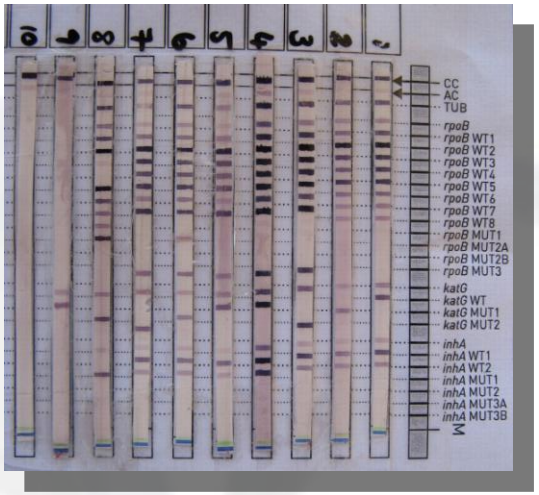
ESTABLISHED IN 1812 SEPTEMBER 9, 2010 VOL. 363 NO. 11

Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance

Catharina C. Boehme, M.D., Pamela Nabeta, M.D., Doris Hillemann, Ph.D., Mark P. Nicol, Ph.D., Shubhada Shenai, Ph.D., Fiorella Krapp, M.D., Jenny Allen, B.Tech., Rasim Tahirli, M.D., Robert Blakemore, B.S., Roxana Rustomjee, M.D., Ph.D., Ana Milovic, M.S., Martin Jones, Ph.D., Sean M. O'Brien, Ph.D., David H. Persing, M.D., Ph.D., Sabine Ruesch-Gerdes, M.D., Eduardo Gotuzzo, M.D., Camilla Rodrigues, M.D., David Alland, M.D., and Mark D. Perkins, M.D.

BIOLOGÍA MOLECULAR

- Sin embargo, a pesar de sus evidentes ventajas, el sistema no está exento de inconvenientes.
  - Muestras extrapulmonares
  - Muestras paucibacilares
  - Precio



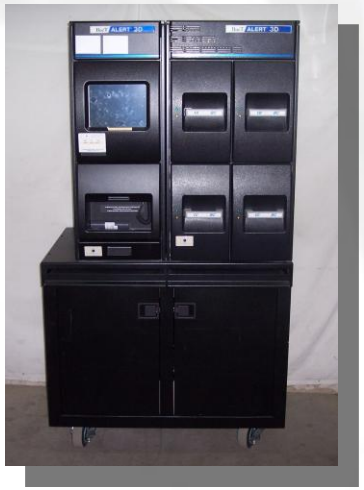
- Esto hace que, de nuevo, sea necesaria una adecuada interpretación de los datos para que el diagnóstico sea el adecuado.

CULTIVOS "CONVENCIONALES"

- ¿Significa todo lo anterior que el cultivo como medio diagnóstico está obsoleto y no puede desarrollarse más?

NO (por ahora)

- Existen posibilidades de automatizar los cultivos para detectar el crecimiento más precozmente, y con ello incrementar su valor en el diagnóstico rápido:
  - Hemocultivos
  - Urocultivos
  - Cultivos de micobacterias



CULTIVOS “CONVENCIONALES”

- Además, podemos desarrollar otras tecnologías de forma que se permita incrementar la rapidez en la obtención de resultados en la identificación y estudio de sensibilidad:

  - MALDI-TOF
  - Sistemas automatizados de estudio de sensibilidad

EL FUTURO

- En el futuro, las técnicas moleculares, inmunocromatográficas, y de todo tipo continuarán su desarrollo para mejorar la eficacia del diagnóstico microbiológico.
- Sin embargo, es muy poco probable que se alcance la perfección absoluta, por lo que siempre será necesaria la existencia de técnicos expertos en la realización de las pruebas y de especialistas que interpreten los resultados

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Nov. 2002, p. 3889–3893 Vol. 40, No. 11
0095-1137/02/$04.00+0 DOI: 10.1128/JCM.40.11.3889–3893.2002
Copyright © 2002, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

GUEST COMMENTARY

Clinical Microbiology in the Year 2025

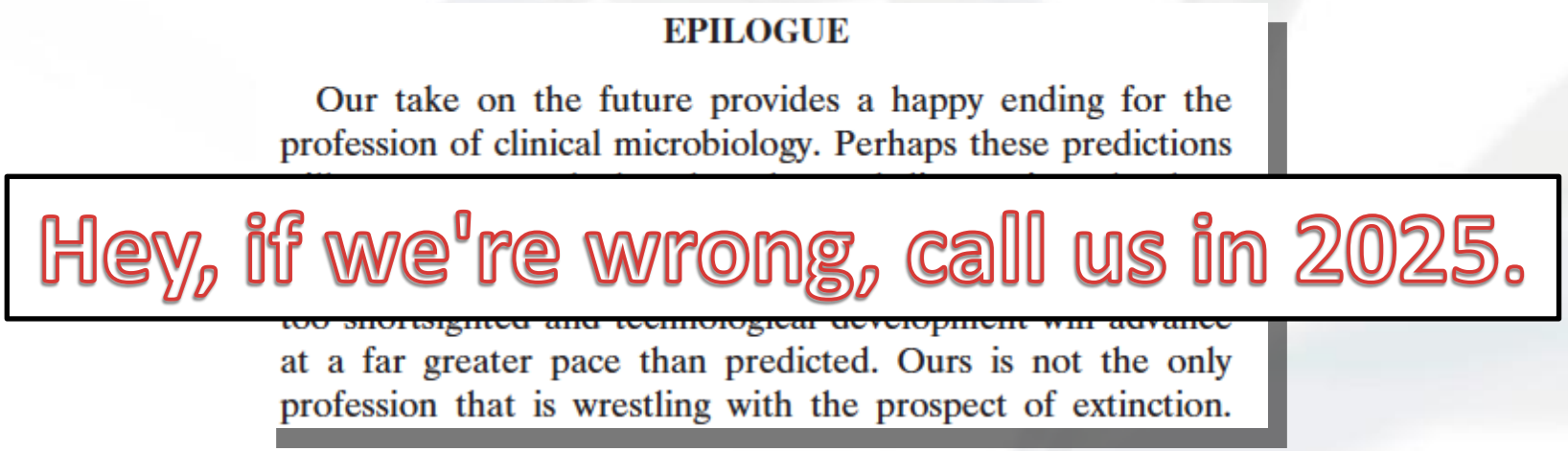
W. Michael Dunne, Jr.,[1]* J. Keith Pinckard,[1] and Lora V. Hooper[2]

Departments of Pathology and Immunology[1] and Molecular Biology and Pharmacology,[2] Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri 63110

EL FUTURO

- El papel del microbiólogo deberá cambiar para adaptarse a esta nueva tecnología (por lo demás, imparable).

- Deberá centrarse más en la interpretación de los resultados conociendo el contexto clínico del paciente, para realizar el mejor diagnóstico posible, junto con una adecuada interpretación de la sensibilidad antimicrobiana que permita la óptima elección del tratamiento de los pacientes.



EPILOGUE

Our take on the future provides a happy ending for the profession of clinical microbiology. Perhaps these predictions

Hey, if we're wrong, call us in 2025.

at a far greater pace than predicted. Ours is not the only profession that is wrestling with the prospect of extinction.

Muchas Gracias