

Experiencia de investigación en un laboratorio de análisis clínicos y microbiológicos

Autoras/es: Blanco, M.E; Scandizzo, E; Gonzalez, Y.D.S; D'Urso, G.H; Godoy, D.A y Skrypnyk, G.M

1. Servicio de Laboratorio. Hospital de Alta Complejidad en Red El Cruce Dr. Néstor C. Kirchner, Florencio Varela.

Contacto: Miriam Blanco. Correo electrónico miriblanco@yahoo.com

Resumen

En el año 2013, en el marco de un Proyecto Biotecnológico de Investigación Traslacional (PBIT), se incorporó al Área de Microbiología del Servicio de Laboratorio del Hospital El Cruce “Alta Complejidad en Red” Dr N.C. Kirchner un sistema automatizado de identificación microbiana que utiliza la tecnología de espectrometría de masas (MALDITOF MS). Este equipamiento brinda resultados de identificación en cuestión de minutos a partir de una colonia microbiana aislada.

La interacción entre la investigación biomédica y la asistencia clínica orientada a detección precoz y valoración pronóstica de enfermedades transmisibles y no transmisibles constituye una necesidad para intentar mejorar la calidad de atención de salud de la población, y este fue el pilar de este desafío; siendo el HEC el encargado de enrolar a los pacientes de las diferentes líneas de investigación (datos clínicos y muestras biológicas).

La identificación bacteriana correcta y en el menor tiempo posible es indispensable para cumplir con la “hora de oro” en el manejo de los pacientes infectados, especialmente en aquellos internados en unidades de cuidados críticos; Kumar y col mostraron un incremento en la mortalidad de 7% por hora cuando existe un retraso en el inicio de la terapia antimicrobiana adecuada.

Nuestro objetivo fue implementar un algoritmo propio que permitiera disminuir los tiempos de procesamiento del hemocultivo positivo utilizando el MALDITOF MS para realizar la identificación microbiana, sin alterar el ritmo normal de trabajo.

Palabras clave: Laboratorios de hospital; Servicios de Laboratorios de Salud Pública; Análisis Microbiológico; Investigación

Introducción

En el año 2013, en el marco de un Proyecto Biotecnológico de Investigación Traslacional (PBIT), se incorporó al Área de Microbiología del Servicio de Laboratorio del Hospital El Cruce Alta Complejidad en Red un sistema automatizado de identificación microbiana que utiliza la tecnología de espectrometría de masas (MALDITOF MS). Este equipamiento brinda resultados de identificación en cuestión de minutos a partir de una colonia microbiana aislada.

El proyecto en cuestión es “Epidemiología clínica y molecular de enfermedades transmisibles y crónicas no transmisibles en un Hospital de alta complejidad” y está orientado a abordar la epidemiología clínica y molecular de problemas de interés hospitalario, con un eje en el diagnóstico precoz. Se realizarán tareas colaborativas entre el Hospital El Cruce (HEC), Universidad Nacional Arturo Jauretche (UNAJ), Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) y Fundación UNAJ (FUNAJ).

La interacción entre la investigación biomédica y la asistencia clínica orientada a detección precoz y valoración pronóstica de enfermedades transmisibles y no transmisibles constituye una necesidad para intentar mejorar la calidad de atención de salud de la población, y este fue el pilar de este desafío; siendo el HEC el encargado de enlazar a los pacientes de las diferentes líneas de investigación (datos clínicos y muestras biológicas).

Un área estratégica para las líneas de investigación es el Laboratorio de Análisis Clínicos de Alta Complejidad donde ocurre la primera fase de estudios de muestras y los estudios de Alta Complejidad ya que se cuenta con técnicas de última generación en Biología Molecular, Citología y Citogenética. No disponíamos de tecnología en la rama de la proteómica que permitiera su uso en microbiología. En el desarrollo del proyecto, el laboratorio se encarga de la caracterización fenotípica y proteómica de los microorganismos multirresistentes (aislados a partir de muestras clínicas) y de su almacenamiento y conservación

en un cepario. Dicho cepario tiene como fin el estudio posterior de las cepas con técnicas moleculares de alta resolución.

La identificación bacteriana correcta y en el menor tiempo posible es indispensable para cumplir con la “hora de oro” en el manejo de los pacientes infectados, especialmente en aquellos internados en unidades de cuidados críticos; Kumar y col mostraron un incremento en la mortalidad de 7% por hora cuando existe un retraso en el inicio de la terapia antimicrobiana adecuada. Los métodos convencionales utilizados en los laboratorios de microbiología clínica demoran alrededor de 16 horas desde que un cultivo es positivo (si se cuenta con un equipo de identificación automatizado) hasta 2 a 3 días (si se realizan técnicas manuales o se aíslan microorganismos fastidiosos).

La incorporación de la espectrometría de masas por tiempo de migración (tiempo de vuelo) con desorción/ionización laser asistida por una matriz (MALDITOF MS, por su sigla en inglés matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry), en el laboratorio de microbiología (a nivel mundial hay experiencias desde el año 2008) permite disminuir el tiempo de detección (6 minutos por bacterias) y los costos (más económico que la identificación convencional).

Esta tecnología nos brinda una huella peptídica de los microorganismos que permite identificar tanto aquellos que desarrollan en condiciones normales como aquellos que presentan requerimientos especiales. La base de datos del software asociado para realizar la identificación cuenta con 38428 espectros para 1046 especies: 882 bacterias y micobacterias + 164 hongos (Figura 1). Vale aclarar que estamos en un continuo aprendizaje con esta tecnología y la base de datos está bajo un desarrollo permanente.

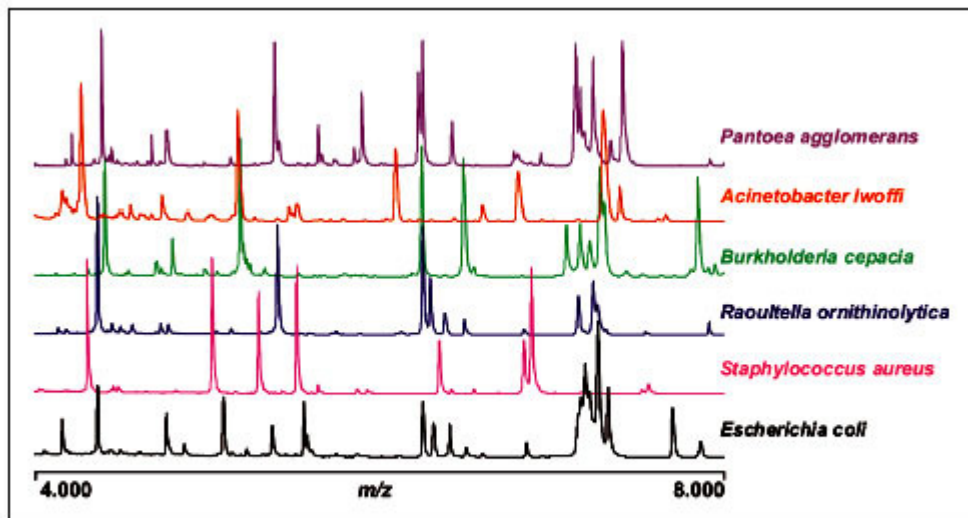


Figura 1. Diferentes perfiles de proteínas obtenidas para diferentes bacterias por MALDI-TOF MS (cortesía bioMérieux).

Figura 1. Diferentes perfiles de proteínas

Objetivos

Nuestro objetivo fue implementar un algoritmo propio que permitiera disminuir los tiempos de procesamiento del hemocultivo positivo utilizando el MALDI-TOF MS para realizar la identificación microbiana, sin alterar el ritmo normal de trabajo.

Materiales y métodos:

Ante un hemocultivo positivo (cuando la coloración de Gram mostró la presencia de un microorganismo único) se realizó la siembra masiva en placa, a partir de la cual se efectuó la identificación microbiana por MALDI-TOF MS a diferentes tiempos de crecimiento. Se compararon los resultados obtenidos con los de la microbiología habitual del servicio.

Resultados

Para analizar los resultados encontrados dividimos a los microorganismos según la coloración de Gram.

Los Cocos Gram positivos (CGP) presentaron tiempos de crecimiento con respuesta para MALDITOF MS entre las 5 y 6 hs. *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus haemolyticus* tienen identificación correcta 1-2 hs antes que *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus hominis*. Para los *Enterococcus* spp el tiempo para la identificación correcta fue de 5hs. La concordancia observada respecto a la tradicional fue del 92%.

El número de *Streptococcus* spp y levaduras analizados no nos permitió sacar conclusiones.

Los Bacilos Gram negativos (BGN) presentaron tiempos de crecimiento con respuesta para MALDITOF MS entre las 3 y 4 hs. Dentro de los BGN las enterobacterias tuvieron menor tiempo de respuesta que los BGN no fermentadores (BNNF). Dentro de los BNNF la *Pseudomonas aeruginosa* tuvo tiempos más prolongados que *Acinetobacter* spp. La concordancia encontrada en los BGN en general fue del 95%.

Conclusiones

Si bien resulta promisorio son necesarias nuevas experiencias, aumentando el número de microorganismos e intentando aplicar esta metodología directamente sobre las muestras o de cultivos con cortos intervalos de incubación que permitan disminuir el tiempo de respuesta.

Bibliografía

1. Carroll K C, Weinstein M P. Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms. In: Murray P R, Baron E J, Jorgensen J H, Landry M L, Pfaller M A, eds. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington, DC American SocietyforMicrobiology 2007; 192-217.
2. Kumar A, Roberts D, Wood K E, Light B, Parrillo J E, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation effective antimicrobial therapy the critical determinant of survival in human septic shock. Crit Care Med 2006; 34: 1589-96.
3. Rapid Identification of Positive Blood Cultures by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Using Prewarmed Agar Plates. J. Clin. Microbiol. December 2014 52:12 4334-4338.
4. Legarraga Paulette, Moraga Marcela, Lam Marusella, Geoffroy Enrique, Zumarán Cecilia, García Patricia. Impacto de la espectrometría de masas por MALDI-TOF MS en la identificación rápida de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia clínica. Rev. chil. infectol. [Internet]. 2013 Abr [citado 2016 Dic 03] ; 30(2): 140-146. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182013000200004&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000200004>.
5. Hervé Beatrice, CorvalánValerie, Hormazábal Sara, Salas Alberto, Cabezas Catalina, Badilla Nora et al . Utilización de espectrometría de masas para la identificación precoz de hemocultivos positivos: Validación de un algoritmo local. Rev. chil. infectol. [Internet]. 2015 Ago [citado 2016 Dic 03] ; 32(4): 399-402. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182015000500005&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182015000500005>.