

Automatización en Microbiología Clínica

The automation in clinical microbiology

Marcia Hart Casares ¹

¹ Médico especialista en Microbiología. Máster en Informática de Salud.

RESUMEN

El diagnóstico microbiológico en los últimos años ha sido favorablemente modificado por el impetuoso desarrollo tecnológico actual. La introducción de equipos automatizados en la identificación de agentes etiológicos de enfermedades infecciosas a partir de los cultivos microbiológicos y sus correspondientes estudios de sensibilidad antimicrobiana, ha implicado una mejora sustancial en el tiempo de obtención de los resultados, mayor sensibilidad o positividad de las muestras, tanto de hemocultivos como de otros líquidos estériles, mejora y ampliación en la identificación de los microorganismos, mayor confiabilidad y reproducibilidad de los estudios de sensibilidad antimicrobiana, ha dado respuesta al mayor desarrollo de la biología molecular y a los cambios que se derivan en la taxonomía de los microorganismos. La automatización ha determinado entonces mejorar la sensibilidad y especificidad de las pruebas microbiológicas, al lograr acortar el tiempo de espera de resultados confiables y útiles. La introducción de estos métodos depende en gran medida del nivel de atención médica, del tipo de pacientes y del tamaño del hospital, para una mejor aplicación clínica, sin descartar estudios de costo-beneficio, ya que debemos tener en cuenta la adecuada utilización y racionalización de los recursos disponibles. En este trabajo mostramos algunos de nuestros resultados y el impacto de esta tecnología en un hospital de tercer nivel de atención médica.

Palabras clave: Automatización del diagnóstico, resistencia bacteriana.

ABSTRACT

In past years the microbiological diagnosis has been favorably modified due to the significant current technological development. The introduction of automated equipments to identify etiological agents of infectious diseases from the microbiological cultures and its corresponding studies of antimicrobial sensitivity, has involved a marked improvement in the time to achieve results, a greater sensitivity or positive samples both from blood cultures and other sterile fluids, an improvement and lengthening in identification of microorganisms, a greater reliability and reproducibility of the antimicrobial sensitivity studies, to answer to the great development of molecular biology and to changes derived in taxonomy of microorganisms. The objective of automation is to improve the sensitivity and specificity of microbiological tests shortening the time waiting for useful and reliable results. Introduction of these methods depends in a greater measure of medical care level, the type of patient and the hospital's size for a better clinical application without rule out the cost-benefit studies since we must to take into account the use and rationalization of available resources. Present paper shows some of our results and the impact of this technology on a third level medical care hospital.

Key words: Diagnosis automation, bacterial resistance.

Desde sus orígenes, y de forma especial en los últimos años, la Microbiología clínica ha experimentado un incremento extraordinario en el de-

sarrollo científico y tecnológico, que ha transcurrido en forma paralela con los avances de la robótica y la automatización, estos han sido y son

de inestimable ayuda ante el aumento de la demanda de las pruebas microbiológicas y en la realización de procesos, que se han convertido en aliados de los nuevos sistemas de gestión que persiguen la eficiencia en los servicios de diagnóstico y un incremento en la utilidad clínica de los resultados de laboratorio.

A mediados del siglo xx se pensaba que las enfermedades infecciosas disminuirían su incidencia y dejarían de ser un problema serio para la salud del hombre, sin embargo la realidad se encargó de mostrar que la lucha contra los microorganismos productores de enfermedades estaba lejos de ser ganada y que, en el vaivén dialéctico de la relación entre el ser humano y los microorganismos, estos nos iban a dar nuevas sorpresas.¹

A mediados de la década de los 60 aparecen las primeras resistencias a los antibióticos, que han llegado en estos momentos a proporciones alarmantes, nosotros no hemos sido capaces de desarrollar vacunas exitosas contra enfermedades importantes; ya que los microbios han demostrado tener formas sorprendentes de cambiar y de evadir los mecanismos inmunológicos de nuestros organismos, y para completar han aparecido enfermedades infecciosas "emergentes y reemergentes", muchas de ellas asociadas a las drásticas alteraciones ambientales y sociales que el mismo ser humano ha introducido con el manejo frecuentemente irracional de su entorno.

Los "microbiólogos clínicos" también debemos formar parte de estos problemas cambiantes del mundo actual y deberíamos ser unos "buenos patólogos" de las infecciones, conocer las necesidades de los médicos clínicos, poseer una idea rigurosa de la trascendencia del diagnóstico etiológico y de los recursos técnicos de que se dispone para alcanzarlo. Deberíamos ser muy críticos respecto al valor de dichas técnicas, sabiendo evaluar lo nuevo con prudencia y evitar 2 extremos peligrosos (el estancamiento tecnológico y el ser víctima de innovaciones) tenemos que ser capaces de saber el valor de las pruebas de sensibilidad *in vitro* y poseer un criterio sólido sobre la aplicación de los antimicrobianos, atributos estos que no se adquieren solo en el laboratorio, sino también a la cabecera del enfermo. Esto, por tanto, es uno de nuestros objetivos en estos tiempos y sobre todo en hospitales del 3er. nivel, donde los

problemas de resistencia se ven aun más elevados por las características propias de estos centros asistenciales.²

Analizar cuáles son en la actualidad los métodos automatizados de más relevancia en los laboratorios de microbiología genera un problema muy difícil y esto depende en gran medida del 1er. nivel de atención, el tipo de pacientes y el tamaño de hospital

Los métodos más novedosos en el diagnóstico se centran en el estudio de las bacteriemias, el diagnóstico de identificación de los microorganismos y las pruebas de susceptibilidad, los métodos de detección de reacciones antígenos-anticuerpos y ya más recientemente y con aplicaciones muy específicas en el diagnóstico y la epidemiología la introducción de técnicas de biología molecular.

El diagnóstico de las bacteriemias que abordaremos ha sufrido muchos cambios con la introducción de los equipos automatizados, así la detección de positividad de las muestras ha tenido un gran impacto clínico en la implementación de estos sistemas, en los hospitales, el monitoreo constante y la agitación de las botellas han demostrado una aceleración del crecimiento por tanta disminución del tiempo de detección de positividad lo que va aparejado a un uso más racional de los antimicrobianos.³

Esto también tiene un impacto económico, porque a pesar de que son sistemas caros que incrementan el costo de las botellas 2 ó 3 veces más que las convencionales, esto se ve compensado por una disminución de los subcultivos, disminución de accidentes del operador, un diagnóstico más rápido que genera menor estadía hospitalaria y una disminución del costo de antimicrobianos, además del impacto epidemiológico que genera, ya que el soporte informático permite conocer los resultados por salas, gérmenes, contaminantes, esto facilita la información de la bacteriemia nosocomial así como un impacto en la microbiología pues disminuye la carga de trabajo del laboratorio la posibilidad de procesamiento de grandes volúmenes de muestras en el tiempo, la disminución de la contaminación en el laboratorio, además de que aumenta la positividad de los hemocultivos y el espectro de gérmenes posibles a identificar.

Todo esto ha tenido no solo una gran relevancia en el aislamiento de bacterias sino también de

hongos, en especial especies de levaduras que han sido capaces de crecer en menor tiempo y con mayor variabilidad.⁴

En nuestra experiencia, y lo mostramos a continuación, nuestro laboratorio ha sido capaz de establecer un vínculo muy estrecho con los médicos de asistencia y hemos logrado con la implementación de esta tecnología un incremento de la positividad de más del 10 % que con los hemocultivos convencionales.

En el laboratorio se introdujeron los equipos automatizados en el año 2000 con una sustitución de tecnología en 2006 por el Bact/alert con el que se han estudiado las muestras hasta enero de 2008 como mostramos en la tabla (tabla 1).

Tabla 1. Muestras tomadas en el Laboratorio de Microbiología. 2006-2008

Muestras	Total	Positivas	%
LCR	210	53	25,2
L. Pleural	39	17	43,5
L. Peritoneal	16	9	56,2
L. Pericárdico	3	2	66
Sangre	2828	972	34,3

Durante el año 2007 se realizaron en el hospital 1 468 muestras de hemocultivos automatizados, se realizaron fundamentalmente en las unidades de atención al paciente grave, en estos a diferencia de los hemocultivos convencionales obtuvimos una positividad del 32,3 % que si la comparamos con los hemocultivos realizados en ese período vemos que la positividad fue de un 23,1 % , además que el tiempo de detección de positividad permitió un diagnóstico mas rápido de las bacteriemias en 2 días (tabla 2).

Tabla 2. Resultados de hemocultivos automatizados en áreas de atención al paciente grave HHA 2007

	Total	Positivos	%
Hospital	1468	468	32,3
UCI 5	332	138	41,5
UCI 8	202	85	42,6
CCV 23	192	75	39,0
CCV 24	48	5	10,4
Hema 12 B	12	4	33,3

Los principales gérmenes aislados se muestran en el siguiente gráfico, como vemos los estafilococos coagulasa negativa, han sido y siguen

siendo los protagonistas de infecciones del torrente sanguíneo, aunque en ocasiones la no adecuada recolección de la muestra constituye una causa de hemocultivos contaminados y la toma de muestras de catéteres y otros dispositivos intravasculares la causa de hemocultivos falsos positivos ya que se sabe que los catéteres después de 24 horas, en su totalidad están colonizados por gérmenes de la piel.

La mayoría de los microorganismos son capaces de invadir el torrente sanguíneo. La distribución de los agentes causales de la bacteriemia y la fungemia ha variado en los últimos años y actualmente los microorganismos grampositivos, especialmente estafilococos y enterococos, igualan o superan en frecuencia a los bacilos gram- negativos.⁴

Dentro de los bacilos no fermentadores el género que con mayor frecuencia se aisló fue el *Acinetobacter spp*, género este que se ha mantenido en los 2 últimos años como la segunda causa de bacteriemia. Estos son la principal causa de sepsis grave en pacientes hospitalizados y en estos momentos también constituyen los primeros agentes biológicos causales de sepsis nosocomial, lo que muchos autores incluso lo reportan como los protagonistas de unas de las epidemias más grandes del siglo 21 por la alta tasa de mortalidad a la que se ve asociada, debido a la alta resistencia a los antimicrobianos.⁵

Las levaduras ocuparon el número 3 en cuanto a frecuencia de aislamiento de gérmenes y esto es un resultado muy significativo, ya que mundialmente se reporta que las candidemias o fungemias son cada vez más frecuentes en la práctica médica y su incidencia ha aumentado en 500 % en los últimos años en hospitales de alta complejidad, como es el caso del nuestro.⁶ Las especies más frecuentes encontradas por nosotros en pacientes con fungemias son diferentes de *Candida albicans*, exhibiendo mayor resistencia o disminución de la sensibilidad a los antifúngicos utilizados en la práctica clínica.

En nuestro centro se ha observado un ascenso de las fungemias en general, muchas de ellas incluso sin evidencia clínica de infección, tema este muy controvertido pues en las infecciones por hongo el sistema inmunológico del paciente juega un papel muy importante, por ejemplo en Estados

Unidos, la candidemia es la cuarta causa más frecuente de infecciones del torrente sanguíneo en pacientes hospitalizados, después de estafilococo coagulasa negativo⁷ (Fig. 1).

El advenimiento de los métodos automatizados para la identificación y el antibiograma ha sido capaz de mejorar la reproducibilidad de los resultados por su estandarización existen incluso sistemas de expertos y sistemas *online* entre laboratorio.

Los métodos automatizados en la identificación de microorganismos y estudios de sensibilidad a antimicrobianos han estado sometido a múltiples cambios, a lo largo de los años estos han sido modificados en aras de mejorar la especificidad y la sensibilidad de las pruebas y en acortar junto con estos el tiempo de espera de unos resultados confiables y útiles. En el caso de los estudios de sensibilidad la concordancia con los métodos de difusión es buena pero tiene como limitación que las galerías o paneles tienen antibióticos fijos y algunos mecanismos de resistencia requieren confirmación.⁸

El antibiograma tiene como objetivo evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica.

Las pruebas de sensibilidad, basadas en la difusión o en la definición de la concentración mínima inhibitoria (CMI) no se empezaron a perfilar hasta la década de los años 1940, sin que su uso se generalizase hasta bien entrada la década de los años 1960.

Esta circunstancia se debió en gran medida a la constatación de las numerosas variables que afectaban a los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad y a la ausencia de consensos que estableciesen las condiciones en las que debían realizarse estas determinaciones.

Una vez establecida la metodología utilizada, la mayor preocupación se centró en su desarrollo técnico, su normalización e in vitro con el fin primario de mejorar la terapia antimicrobiana, su reproducibilidad, problema que aún perdura en

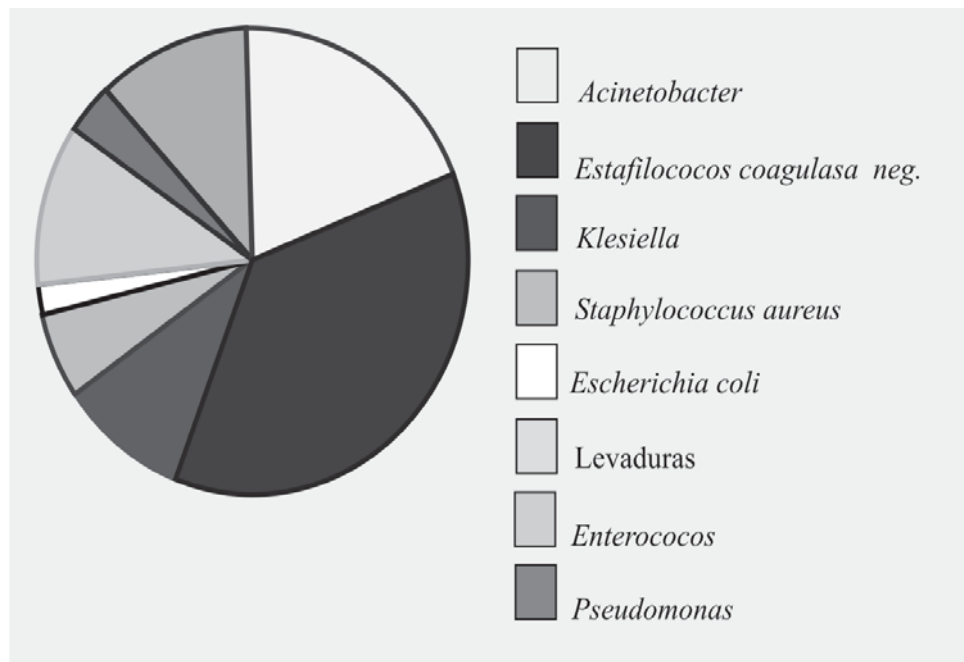


Fig.1. Principales gérmenes aislados.

nuestros días al comprobarse diversos criterios en la interpretación de los antibiogramas

Ya en los años 1970, y de forma más constante durante los años 1980, numerosos laboratorios de microbiología comenzaron a analizar de manera sistemática los datos de sensibilidad, esencialmente a antibióticos betalactámicos y aminoglicósidos, al tratar de asimilar sus resultados con los posibles mecanismos de resistencia. Esta actitud permitió detectar e identificar algunos mecanismos de resistencia, incluso antes de que estos tuvieran verdadera trascendencia clínica. Este proceso se denominó lectura interpretada del antibiograma y se fundamentó en el conocimiento molecular de los mecanismos de resistencia y en la interpretación terapéutica de las pruebas de sensibilidad *in vitro* con el fin primario de mejorar la terapia antimicrobiana.⁹

En la figura siguiente se esquematiza la evolución de las pruebas de sensibilidad y las diversas

etapas que ha atravesado este proceso. Sin duda, el próximo reto de las pruebas de sensibilidad, de la lectura interpretada y de los métodos automáticos será su convergencia con los sistemas de tipificación epidemiológica, para establecer sistemáticamente la clonalidad de los aislamientos estudiados, y con las técnicas moleculares para caracterizar de manera simultánea el mecanismo o los mecanismos de resistencia¹⁰ (Fig. 2).

Los conceptos y objetivos de la lectura interpretada del antibiograma fueron recogidos y explicados por Patrice Courvalin en 1992. El conocimiento acumulado hasta esa fecha acerca de los mecanismos de resistencia, la madurez en la realización de las pruebas de sensibilidad, el análisis de los valores de CMI o halos de inhibición y su significado en relación con la resistencia a los antimicrobianos, permitió enunciar los 3 pilares básicos o pasos en los que se fundamenta esta filosofía.¹¹

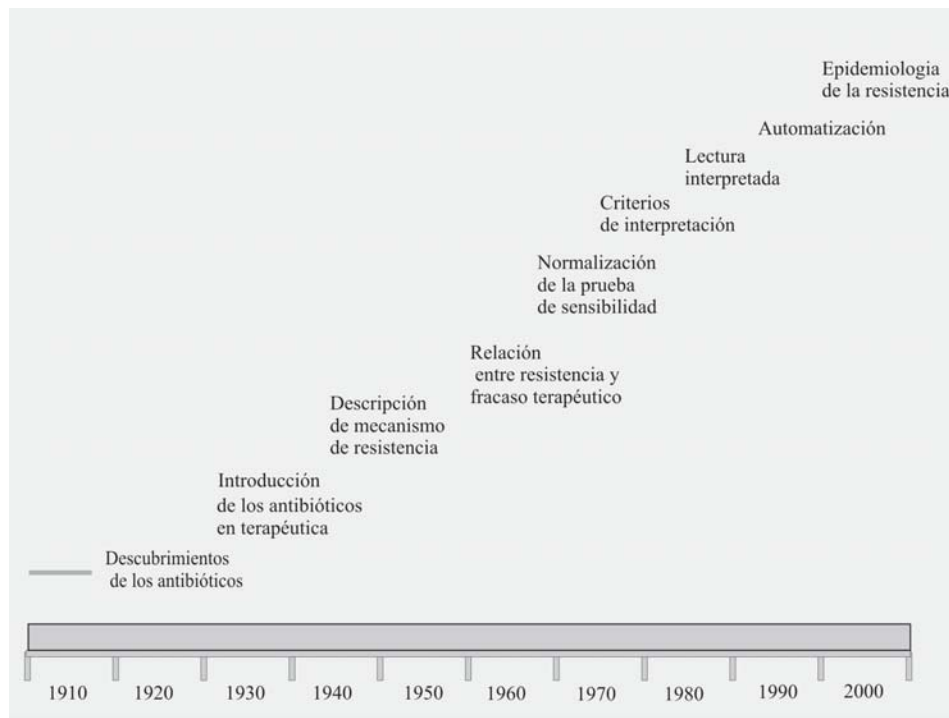


Fig.2. Evolución de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

- a) Caracterización del fenotipo de resistencia a partir del estudio de sensibilidad de un microorganismo previamente identificado frente a grupos de antibióticos pertenecientes a una misma familia o relacionados por mecanismos de resistencia comunes;
- b) Deducción a partir del fenotipo de resistencia del correspondiente mecanismo bioquímico implicado.
- c) Inferencia, y modificación si es necesario, del fenotipo previamente establecido a partir del mecanismo de resistencia deducido.

Durante la lectura interpretada del antibiograma se modifica la interpretación clínica de los resultados, sobre todo de aquellos antibióticos poco afectados por los mecanismos de resistencia y que en las pruebas de sensibilidad se informarían como sensibles. También puede inferirse la sensibilidad de antibióticos no incluidos en el antibiograma, y como objetivo final la detección de los mecanismos de resistencia, incluidos los de bajo nivel de expresión.

Con este proceso se consiguen valores añadidos a la información generada por las pruebas de sensibilidad y que tienen trascendencia epidemiológica y clínica.

Como le mostramos en esta diapositiva estos son algunos ejemplos que incluso llevan pocos recursos materiales que se pueden utilizar en la práctica diaria de un laboratorio y que daría mayor interpretación a un antibiograma. En muchas ocasiones los antibióticos que se van a estudiar han dejado de tener vigencia en la práctica clínica, pero son fundamentales para inferir los mecanismos de resistencia. Ejemplos de ello son el ácido nalidíxico y la kanamicina, utilizados respectivamente para

detectar con mayor eficiencia enterobacterias resistentes a las quinolonas por mutaciones en la girasa, la oxacilina para predecir la resistencia a los betalactámicos en los estafilococos o a la penicilina en *S. pneumoniae*.¹² (cuadro)

Al igual que es necesaria la inclusión de antibióticos marcadores, también se recomienda el estudio de combinaciones entre antimicrobianos e inhibidores de los mecanismos de resistencia. En la mayoría de las ocasiones las combinaciones empleadas no se utilizan en la práctica clínica o los compuestos inhibidores se emplean con otros fines. Entre ellos destacan los inhibidores de betalactamasas, como el ácido clavulánico, que asociado a ceftazidima o cefotaxima permite deducir la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) o el EDTA, que asociado al imipenem facilita el reconocimiento de determinadas carbapenemasas por debajo del punto de corte de sensibilidad, que permitan caracterizar los mecanismos de resistencia con bajo nivel de expresión.

Nosotros también hemos realizado estudios por ejemplo en cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* en las que hemos encontrado desde 2002 al 2008 un incremento en la resistencia a los carbapenémicos de 3 a 55 % hemos realizado pruebas en las cuales nuestras cepas no tienen mecanismos de resistencia a los carbapenémicos por producción de carbapenasa, sino que debe haber otros mecanismos de resistencias involucrados.

Estos beneficios derivados de la lectura interpretada del antibiograma son evidentes y dan valores añadidos a las pruebas de sensibilidad. Tanto es así, que hoy en día no debe entenderse el estudio sin llevar asociada la lectura interpretada.

Cuadro.

Microorganismo	Fenotipo observado	Mecanismo de resistencia deducido	Cambios en la interpretación e implicaciones terapéuticas
Enterobacterias	Sinergia clavulánico y cefalosporinas	BLEE	Resistencia a todas las cefalosporinas
<i>P. aeruginosa</i>	Sinergia imipenem y EDTA	^o Metallo-betalactamasa	Resistencia de carbapenems
<i>H. influenzae</i>	Nalidíxico ^R	Mutaciones en <i>gyrA</i> ± <i>parC</i>	Pérdida de sensibilidad a quinolonas
Estafilococos	Oxacilina ^R	PBP2a	Resistencia a todos los betalactámicos
Enterococos	Vancomicina ^R teicoplanina ^{S1}	vanB	Evitar uso de glicopéptidos
<i>S. pneumoniae</i>	Oxacilina ^R	PBP modificadas	Posible resistencia a penicilinas y cefalosporinas de 1ª y 2ª generación

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Robinson A, Marcon M, Mortensen JE, McCarter YS, LaRocco M, Peterson LR, et al. Controversies affecting the future of clinical microbiology. *J Clin Microbiol* 1999;37:883-9.
2. Poupard JA, Rittenhouse SF, Walsh LR. The evolution of antimicrobial susceptibility testing methods. En: Poupard JA, Walsh LR, Kleger B, eds. *Antimicrobial susceptibility testing*. New York: Plenum Press, 1994;3-14.
3. Soloaga, r., Almuzara, m., Casimir, L. et al. Sistema automatizado de hemocultivos Bact-Alert: 5 vs 7 días de incubación: Primer estudio multicéntrico argentino. *Rev. Argent. Microbiol. ene./mar. 2004, vol.36, no.1.24-27.*
4. Herwaldt La, Geiss The positive predictive value isolating coagulase negative staphylococcus from blood culture. *Clin infection Dis*.1996, 22:14.
5. Diomedis P, Alexis. Infecciones por *Acinetobacter baumannii* pan-resistente: Consideraciones epidemiológicas y de manejo antimicrobiano actualizado. *Rev. chil. infectol., dic. 2005, vol.22, no.4, p.298-320. ISSN 0716-1018.*
6. Cantón, E., Viudes, Á y Pemán, J: Infección sistémica nosocomial por levaduras. *Forum micológico Rev Iberoam Micol* 2001; 18: 51-55.
7. Taller Automatización del diagnóstico Microbiología en Latinoamérica. Disponible en [http:// www.aam.org.ar/actividades/T_AUTOMATIZACION.pdf](http://www.aam.org.ar/actividades/T_AUTOMATIZACION.pdf) Acceso 2 febrero 2009.
8. Medeiros AA, Kent RL, O'Brien TF. Characterization and prevalence of the different mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1974;6:791-801.
9. Loza Fernández de Bobadilla E, Martínez-Beltrán J. Evolución de la actividad de cefotaxima en 6 años y fenotipos de sensibilidad en Enterobacteriaceae. *Enf Infecc Microbiol Clin* 1988;6(Suppl 1):3-13.
10. Cantón Moreno Rafael. Lectura interpretada del antibiograma: ¿ejercicio intelectual o necesidad clínica *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002;20(4):176-86.
11. Grupo MENSURA. Recomendaciones del grupo MENSURA para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad y criterios para la interpretación del antibiograma. *Rev Esp Quimioterap* 2000; 13: 73-86.
12. Rahal JJ, Urban C, Segal-Mauras S. Nosocomial antibiotic resistance in multiple gram-negative species: experience at one hospital with squeezing the resistance ballom at multiple sites. *Clin Infect Dis* 2002;34:499-503.

Recibido: 31 de marzo de 2010

Aprobado: 14 de abril de 2010



Automatización del diagnóstico microbiológico en el Hospital "Hermanos Ameijeiras".



Tecnólogos de la salud incorporados a la pesquisa microbiológica en un hospital complejo.