

NUEVAS TECNOLOGÍAS EN DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO: AUTOMATIZACIÓN Y ALGUNAS APLICACIONES EN IDENTIFICACIÓN MICROBIANA Y ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD

NEW TECHNOLOGIES IN MICROBIOLOGY: AUTOMATIZATION AND SOME APPLICATIONS IN MICROBIAL IDENTIFICATION AND SUSCEPTIBILITY TESTS

DRA. BEATRICE HERVÉ E. (1)

(1) Microbióloga. Médico Consultor Laboratorio de Microbiología. Clínica Las Condes.

Email: bherve@clinicalascondes.cl

RESUMEN

A diferencia de otras áreas del laboratorio, la automatización del laboratorio de microbiología no ha sido fácil, sin embargo es una necesidad clínica para mejorar el manejo de pacientes críticos. Para lograr este objetivo, es necesario optimizar la productividad y flujos de trabajo, partiendo desde el pre-analítico, pasando por los diferentes test de identificación y susceptibilidad, hasta el post-analítico, que en gran medida se ha automatizado a través de la informatización de los resultados. Se muestra en este documento, cuáles son algunos avances en las diferentes áreas, respecto de las metodologías tradicionales, proponiendo esquemas de trabajo para identificación precoz mediante metodología MALDI-TOF, así como elementos de juicio para realizar un correcto informe de antibiograma. La implementación de metodologías rápidas y automatizadas en el laboratorio de microbiología implica una adaptación del personal técnico y profesional, interpretando correctamente los resultados obtenidos, tanto en identificación como en estudios de susceptibilidad. También constituye una exigencia para los administradores, que deben hacer las inversiones necesarias y modificaciones en la planta física y humana, para mantener el servicio en una base de 24/7, aprovechando al máximo las ventajas ofrecidas por la automatización de los procesos.

Palabras clave: Diagnóstico de laboratorio, microbiología, automatización, identificación microbiana, estudios de susceptibilidad.

SUMMARY

Unlike other areas of the laboratory, microbiology laboratory automation has not been easy, but it is a clinical need to improve the management of critically ill patients. To achieve this goal, it is necessary to optimize productivity and workflow, starting from the pre-analytical, through different identification and susceptibility tests, to the post-analytical, which has been largely automated through computerized results. It is shown in this paper, some of the advances in the different steps, for traditional methodologies, proposing schemes of work for early identification by MALDI-TOF methodology as well as criteria for correct susceptibility report. The implementation of rapid methodologies and automated microbiology laboratory equipment in turn leads to the need for an adaptation of technical and professional staff, correctly interpreting the results obtained, both for identification and susceptibility studies. It is also a requirement for managers who must make the necessary investments and changes , to maintain service on a 24/7 basis, maximizing the advantages offered by automation.

Key words: Laboratory diagnosis, microbiology, automatization, microbial identification, susceptibility testing.

INTRODUCCIÓN

La microbiología ha sido tradicionalmente una disciplina manual. A diferencia de otras áreas del laboratorio, la automatización de ésta no ha sido fácil, principalmente debido a la gran variabilidad en el tipo de muestras, diversidad y número de microorganismos a identificar y un volumen relativamente menor de exámenes (en comparación con el número de exámenes químicos y hematológicos), que hace menos rentable la incorporación de nuevas tecnologías (1, 2).

Sin embargo y a pesar de estas consideraciones, hay evidencia científica creciente que demuestra que el pronóstico de un paciente crítico infectado, depende del inicio precoz con el antimicrobiano adecuado, para lo cual es fundamental que el laboratorio sea capaz de proveer identificación microbiana confiable y oportuna, así como reportes de susceptibilidad estandarizados y reproducibles (3, 4).

Es así que durante muchos años, la identificación de microorganismos ha dependido de la producción local de medios de cultivos para siembra y realización de pruebas bioquímicas, con la consiguiente menor estandarización de estas pruebas. Asimismo, el antibiograma ha sido realizado clásicamente por técnicas de difusión manual, que si bien cada vez se han estandarizado mejor y están en la actualidad adecuadamente validados, es una técnica laboriosa y que requiere de más tiempo para obtener resultados que las técnicas automatizadas disponibles actualmente.

Para lograr el objetivo de la automatización en microbiología, es necesario optimizar la productividad y flujos de trabajo, partiendo desde el pre-analítico, pasando por los diferentes test de identificación y susceptibilidad, hasta el pos analítico, que en gran medida se ha automatizado a través de la informatización de los resultados (1, 5).

En el pre analítico se han desarrollado equipos que de manera robotizada, logran sembrar muestras en formato líquido, sobre diversas placas para luego ser incubadas y analizadas (6).

En cuanto a la identificación bacteriana y los estudios de susceptibilidad, se ha desarrollado un gran número de técnicas rápidas, semiautomatizadas o automatizadas. Estos equipos aportan estandarización y velocidad, pero no han logrado resolver toda la problemática que el estudio microbiológico plantea, por lo que aún es necesario complementar su uso con pruebas manuales. En relación a la identificación, la incorporación del análisis proteómico de las especies bacterianas o fúngicas aisladas, ha cambiado el paradigma microbiológico en los últimos años (5, 7-9).

Si bien el laboratorio de microbiología involucra además técnicas de diagnóstico inmunológico (tanto para conocer el estado inmune de un paciente, como determinar si hubo contacto reciente o antiguo con algún patógeno específico), técnicas rápidas para detectar presencia de antígenos virales o bacterianos en diversas secreciones o muestras, y técnicas de biología molecular, que permiten detectar secuencias de ácidos nucleicos propias de cada patógeno, así como factores de virulencia específicos, en el presente documento no se abordará estas metodologías, que sin duda también han sido objeto de grandes evoluciones hacia la automatización, circunscribiendo la discusión solamente al ámbito de identificación y estudio de susceptibilidad de microorganismos bacterianos y fúngicos por métodos fenotípicos.

AUTOMATIZACIÓN DEL PRE-ANALÍTICO

La inoculación automatizada de las diferentes muestras clínicas en la superficie de medios de cultivo que permitan el desarrollo de microorganismos aeróbicos, facultativos, fastidiosos y anaeróbicos, ha sido un punto largamente anhelado con el fin de lograr optimizar los flujos de trabajo.

Existe hoy en el mercado diferentes equipos que abordan esta necesidad. Todos ellos intentan resolver problemas de calidad y estandarización de la estría o inóculo, contaminación cruzada, tiempo de procesamiento y costos. Al lograr una siembra con colonias bien aisladas, se reduce la necesidad de hacer traspasos y subcultivos, con el consiguiente ahorro en tiempo y reactivos. En términos generales, todos estos equipos utilizan muestras líquidas o en medio de transporte líquido. En Tabla 1, se muestra una comparación somera de los principales equipos inoculadores disponibles en el mercado y sus características (1, 10).

TABLA 1. SISTEMAS DE SIEMBRA AUTOMATIZADA

Nombre del equipo	Fabricante/ Proveedor	Tipo de muestra	Técnica de siembra
Inoqua	BD	Líquida	perlas magnéticas
Previ- Isola	Bio Merieux	Líquida	peineta
WASP	Copan	Líquida	asa

AUTOMATIZACIÓN DEL ANALÍTICO: IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIOS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

El ideal actual consiste en la "automatización total" del laboratorio de microbiología, lo que comprende equipos en línea para siembra, incubación, análisis remoto de colonias desarrolladas mediante digitalización de imágenes y posterior identificación mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF; *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization -Time of Flight*) con realización de antibiograma automatizado a las colonias así identificadas. Todos estos equipos en línea, estarían interconectados mediante un software que además comunica con equipos de hemocultivo automatizado, tinción de Gram y la realización de técnicas serológicas.

Si bien el ideal de automatización involucra el proceso completo del laboratorio de microbiología, la automatización total es un concepto aún lejano en la realidad de la mayor parte de los laboratorios. Lo que sí es posible en la actualidad, es contar con metodologías de identificación más rápida que la convencional.

IDENTIFICACIÓN

Los procedimientos convencionales de identificación de microorganismos consisten en observación de características físicas y tintoriales (morfología de colonias, tinción de Gram) y de reacciones bioquímicas. Inicialmente, estas pruebas bioquímicas se realizaban en medios en tubos, los que con el tiempo se miniaturizaron en formatos que permitieron aumentar el número de pruebas y eventualmente automatizar la lectura de estos resultados. Dependiendo de las reacciones de cada microorganismo frente a diferentes sustratos, se obtiene un

perfil bioquímico, que al ser comparados con perfiles conocidos, permite la identificación (5, 8, 9).

El tiempo de la identificación convencional era de 24-48 hrs para permitir la expresión de la reacción, ya que debía lograrse un número crítico de bacterias, que dependen de su velocidad de replicación. Con la automatización se logró reducir este tiempo a 8-10 horas, ya sea porque se detecta reacción con sustratos preformados, o se logra visualizar la reacción bioquímica con un menor número de replicaciones, dada la miniaturización de la reacción. Esta reducción en los tiempos exige la necesidad a contar con personal capacitado durante las 24 hrs en el laboratorio, para optimizar y hacer más eficientes los procesos, aprovechando así las ventajas que ofrece esta tecnología más rápida. En Tabla 2 se presentan los diferentes tipos de equipos y kits disponibles para identificación bioquímica (11).

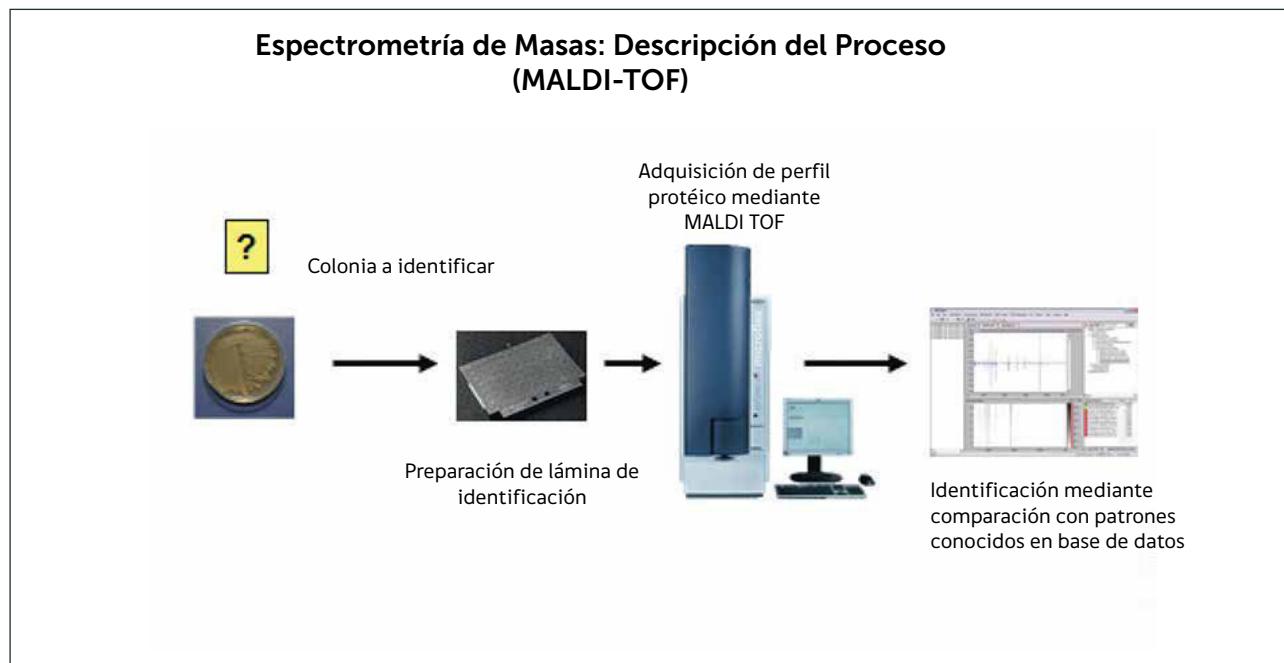
Durante los últimos años, cada vez más laboratorios están implementando la tecnología de espectrometría de masas MALDI-TOF, que mediante el análisis proteómico de cepas bacterianas y fúngicas, permite su identificación en minutos. La Figura 1 muestra un esquema de esta tecnología y sus principales etapas. Existen diversos equipos disponibles en el mercado, siendo los más representativos: MALDI-Biotyper de Bruker y Vitek MS, de BioMerieux, ambos presentan fortalezas y debilidades.

En nuestro centro, realizamos una verificación de la tecnología MALDI-TOF, con el objetivo de conocer la concordancia en identificación de género y de especie, entre metodología convencional y espectrometría de masas, comparando

TABLA 2. SISTEMAS PARA IDENTIFICACIÓN MEDIANTE PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Metodología de identificación bioquímica	Kits/equipos disponibles	Automatizado	Tiempo que demora
Observación visual de turbidez o cambio de pH, por utilización de diversos sustratos	Panelles Api, Crystal, baterías convencionales	no	15-24 hrs
Detección de cambios de pH por utilización de Hidratos de carbono, actividad enzimática, patrones de resistencia	Tarjetas Vitek, Phoenix, Microscan tradicionales, Sensititre	sí	8-12 hrs
Detección fluorométrica o colorimétrica de liberación de productos cromogénicos por reacción de enzimas preformadas	MicroScan Rapid panels, BD Phoenix, Vitek, Trek diagnostic Systems	sí	2-4 hrs

FIGURA 1. METODOLOGÍA DE ESPECTOMETRÍA DE MASAS (MALDI-TOF)



los resultados obtenidos por Vitek 2 Compact y Vitek MS en 205 cepas, obteniendo una concordancia global de 95% para género y especie y 98% para género solamente. Cabe destacar que la identificación de enteropatógenos, no es

satisfactoria por esta metodología, ya que no permite diferenciar cepas de *E. coli* de *Shigella*, ni tipificar las cepas de *Salmonella spp*. En Tabla N° 3 se muestra los resultados por grupo de microorganismo. La probabilidad de identifica-

TABLA 3. RENDIMIENTO IDENTIFICACIÓN POR METODOLOGÍA MALDI-TOF VS TÉCNICAS CONVENCIONALES

Tipo de microorganismo	n	% concord género	% concord género y especie
Enterobacterias*	80	100	98,75
Bacilos no fermentadores	36	97,2	97,2
<i>Enterococcus spp</i>	16	100	100
<i>Streptococcus spp</i>	12	91,6	83,3
<i>Staphylococcus spp</i>	21	100	95,2
Misceláneas**	18	88,8	77,8
Levaduras***	20	100	95
Total	185	98	95,12

(Comparado Vitek MS vs Vitek 2).

*Se excluye cepas de enteropatógenos en este análisis.

**Misceláneos incluye: bacilos gram positivo aeróbicos y anaeróbicos, bacilos gram negativo fastidiosos y anaeróbicos y cocáceas gram negativo.

***Levaduras requieren una etapa de extracción en equipo Bruker y una etapa de aplicación de ácido fórmico en equipo Vitek MS.

ción de una cepa bacteriana o fúngica por espectrometría de masas, depende de que el perfil proteómico de esa cepa esté incluido en la biblioteca de perfiles del equipo, es así que las especies "mischeláneas" de la tabla, tienen un menor grado de identificación, posiblemente por ser cepas aisladas con menor frecuencia y por ende, menos representadas en esta biblioteca o base de datos (12).

El análisis proteómico de microorganismos por espectrometría de masas (MS) es una metodología confiable, económica y rápida, que muestra resultados promisorios al compararlo con métodos convencionales (MC). Se han publicado reportes que indican que MS puede ser utilizado con buenos resultados en la identificación a partir de muestra directa, con protocolos publicados para urocultivo y hemocultivo, destacando el aporte que esto significa en el manejo clínico. Sin embargo, la aplicación de los protocolos publicados para hemocultivo, resulta laboriosa e interrumpe el flujo normal de trabajo de un laboratorio, ya que en el momento en que un hemocultivo da alarma de positivo, debe haber un profesional disponible para realizar la secuencia completa de concentración-centrifugación y resuspensión de pellet que indica el procedimiento, lo que no siempre existe en la práctica diaria. En nuestro centro aplicamos este protocolo el año 2012 en 39 muestras de hemocultivo, logrando un 74% de diagnóstico directo, que se veía fuertemente reducido si el frasco de hemocultivo tenía resina/carbón activado. Dado que este resultado no fue satisfactorio, se mantuvo el método convencional de identificación (incubación por 18 horas en placas y luego identificación de colonias). Durante el primer semestre de 2014, establecimos un algoritmo acortado del método tradicional, realizando una identificación a ciegas a partir de placas incubadas por 4 a 6 horas (sin colonias visibles), para conocer la correlación del diagnóstico adelantado a ciegas por MS en hemocultivos positivos

inoculados en placas de agar sangre, comparado con método convencional (MC), según tipo de frasco y tipo de microorganismo. Se incluyó en el estudio 145 muestras de hemocultivo positivo detectados por equipo Bact /Alert. Los resultados de ambos procesos fueron comparados en relación a resultado de identificación. Se toma en cuenta el tipo de frasco y tipo de microorganismo detectado. Los resultados se muestran en Tablas 4 y 5, evidenciando que el estudio de hemocultivos positivos en forma directa por MS, sembrando a ciegas a las 4 a 6 horas de inoculación en placas, permite identificar en forma segura el 81% de los casos, adelantando el dg en 12-16 horas respecto del método tradicional. Este resultado mejora cuando se utilizan frascos sin resina o carbón activado (dg correcto en 93% de los casos), y se observa mayor precocidad para diagnosticar bacilos Gram negativo que cocáceas Gram positivo. En base a estos resultados, se estableció un algoritmo que se muestra en Figura 2, que permite adelantar la ID sin aumentar los costos ni la carga de trabajo del laboratorio de microbiología (13, 14).

ESTUDIOS DE SUSCEPTIBILIDAD

En cuanto a estudios de susceptibilidad a antimicrobianos, existen diferentes metodologías, que se pueden sistematizar en: convencionales o fenotípicos, y automatizados ya sea fenotípicos o genotípicos. Cada vez más, se hace necesario detectar de manera oportuna y precisa, la existencia de mecanismos de resistencia con implicancia epidemiológica, como son: *Enterococcus* resistentes a vancomicina, *S. aureus* con sensibilidad reducida a vancomicina, enterobacterias productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) o productoras de carbapenemas. Estos mecanismos de resistencia pueden ser detectados por técnicas rápidas, de screening, o confirmatorias, ya sea fenotípicas o genotípicas, que deben estar disponibles para realizar frente a una alerta

TABLA 4. RENDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN PRECOZ, SEGÚN TIPO DE FRASCO HEMOCULTIVO POSITIVO, POR VITEK MS

Tipo de frasco	nº tot positivos	nº identificación precoz concordante con identificación 18 hrs	% identificación precoz concordante
FA	53	35	66
PF	21	14	67
SA	54	50	93
SN	17	16	94
Total	145	115	79,3

FA y PF: frascos con carbón activado. SA, SN: frascos sin carbón activado.

TABLA 5. RENDIMIENTO IDENTIFICACIÓN PRECOZ SEGÚN TIPO DE MICROORGANISMO, HEMOCULTIVO POSITIVO POR VITEK MS

Tipo de Microorganismo	nº total identificados	nº concordantes por identificación precoz vs identificación 18 hrs	% identificación precoz concordante
BNEG	72	62	86
CPOS	62	49	79
LEVAD	7	4	57
BPOS	2	0	0
mixto	2	0	0
total	145	115	79,3

BNEG: bacilo gram negativo; CPOS:cocácea gram positivo; LEVAD:levadura;BPOS:bacilo gram positivo. Mixto: desarrollo de mas de un microorganismo

en la interpretación del antibiograma (generalmente estas alertas están dadas por la identificación de alguna especie en particular , o la detección de concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) sugerentes). (15-18).

Los métodos convencionales o fenotípicos, a su vez pueden ser:

a) Cuantitativos: permiten conocer la CIM de un antimicrobiano frente a un determinado microorganismo (en ug/ml), lo que es de gran utilidad al momento de definir las dosificaciones, especialmente en pacientes críticos. Existen métodos cuantitativos de referencia o *Gold standard* (ya sea micro o macro dilución en caldo y/o dilución en agar) y aquellos que no son de referencia (E-test, Just-One), pero que facilitan de manera importante la realización de antibiograma por CIM en la práctica diaria a la vez que da flexibilidad respecto de a qué antimicrobianos estudiar la CIM y a cuáles no.

b) Cualitativos (difusión en disco o Kirby Bauer), que a través de la medición de un halo en mm permite correlacionar con la CIM y entregar una categoría de Susceptible, Intermedio o Resistente frente a cada antimicrobiano.

c) De screening y punto de corte, permiten separar cepas con algún mecanismo de resistencia específico, de aquellas que no lo poseen. Para esto, existen diversos agares cromogénos o de screening, que contienen una concentración de antimicrobiano que constituye el punto de corte para identificar las cepas resistentes.

Los métodos automatizados disponibles son:

a) Micodilución rápida (métodos comerciales fenotípicos: Vitek, Phoenix, Microscan). Estos métodos, al igual que la identificación automatizada, consisten en paneles con pocios miniaturizados que contienen diferentes concentraciones de antimicrobianos, según los puntos de corte que permiten diferenciar cepas resistentes de cepas intermedias o sensibles. Estos paneles o tarjetas contienen antimicrobianos definidos para los distintos grupos de microorganismos (bacilos, cocáceas, levaduras, gram positivo, gram negativo), se ingresan al equipo respectivo, el cual mediante turbidimetría establece las CIM de cada cepa. Actualmente estos equipos cuentan con softwares de interpretación o reglas de experto, para informar resultados coherentes de susceptibilidad. Estos equipos permiten realizar la identificación (ya sea bioquímica o por MALDI) y estudio de susceptibilidad en forma integrada (19).

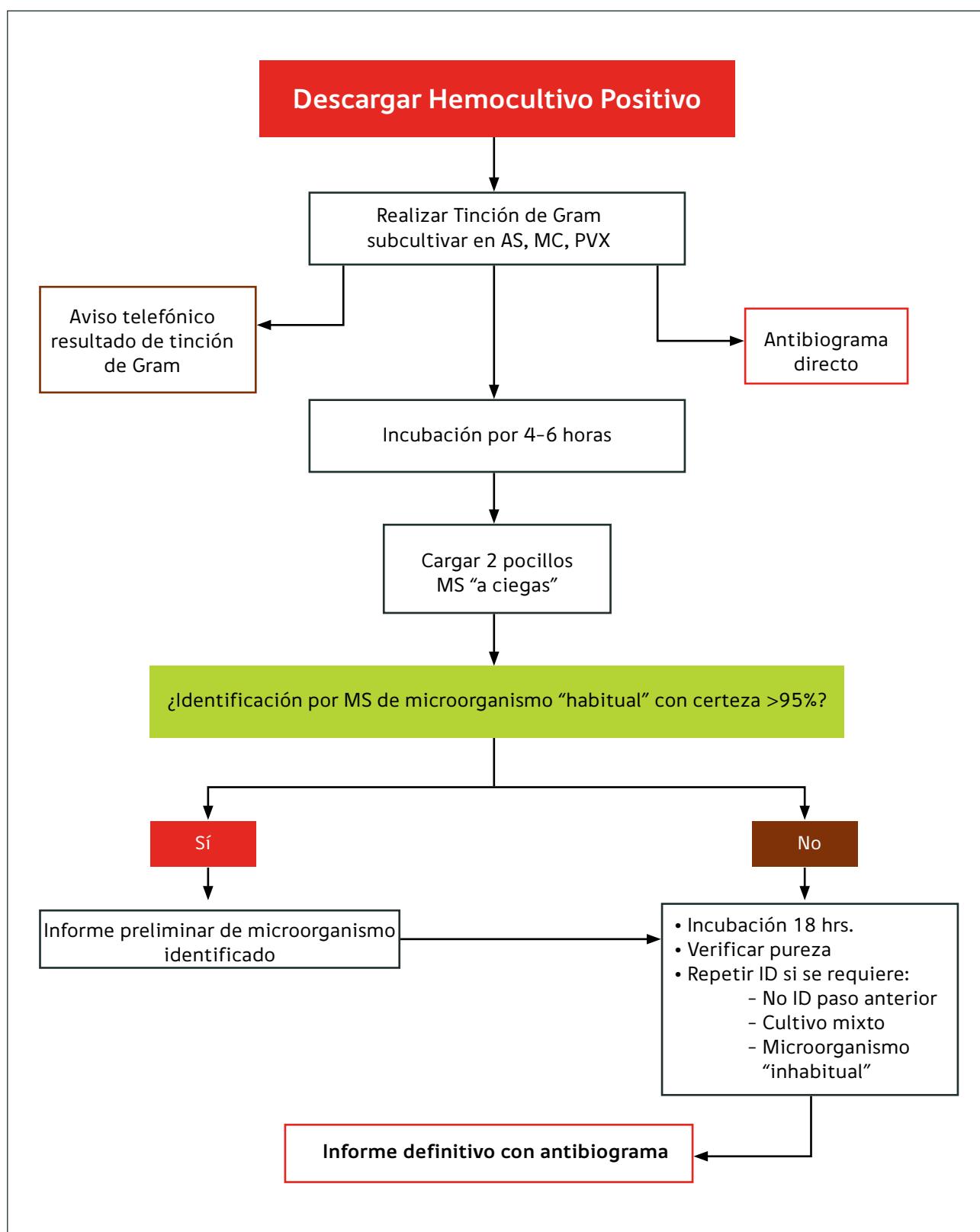
b) PCR (métodos comerciales genotípicos), que detectan presencia de genes de resistencia conocidos, o bien,

c) La detección de perfiles proteómicos mediante MALDI-TOF post exposición a un determinado antimicrobiano.

Las últimas dos mencionadas, son técnicas en desarrollo o ya comercializadas, que escapan el ámbito de esta revisión (20, 21).

En Tabla N°6 se muestra una comparación de las principales características de las diferentes metodologías fenotípicas mencionadas.

FIGURA 2. ALGORITMO PROPUESTO PARA IDENTIFICACIÓN PRECOZ EN HEMOCULTIVO POSITIVO, MEDIANTE METODOLOGÍA DE ESPECTOMETRÍA DE MASAS



AS: Agar Sangre. MC: Ma Conkey. PVX: Agar Chocolate.

TABLA 6. CUADRO COMPARATIVO PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS MÉTODOS DE ESTUDIO FENOTÍPICOS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

Método	Precisión	Facilidad	Flexibilidad	Velocidad (resultado)	Costo
Dilución caldo	<i>Gold Standard</i>	+	+++	+	++
Dilución Agar	<i>Gold Standard</i>	+	+++	+	++
Difusión Disco	+	+++	+++	+	+
Screening	+	+++	+	+	++
Automatizados	++	++	+	+++	+++
E-test	++	+++	+++	+	+++

Actualmente persiste un desfase entre la velocidad de identificación que se logra por espectrometría de masas, y la menor velocidad en obtener un resultado de susceptibilidad a antimicrobianos, ya que a pesar de su automatización, esta última sigue basada en la velocidad de replicación del microorganismo.

Es necesario considerar también que, pese a los grandes avances logrados en relación a automatización de estudios de susceptibilidad, en este momento aún no es posible prescindir del todo de los métodos manuales, ya que hay algunos microorganismos, o combinaciones de microorganismo/antimicrobiano (Tabla 7) que presentan falsas sensibilidades o resistencias (22).

Es fundamental, para una correcta interpretación de los resultados de susceptibilidad, contar con una identificación precisa y confiable, ya que existen microorganismos

con resistencias intrínsecas o naturales, que no siempre se evidencian *in vitro*, por lo que el laboratorio de microbiología debe emitir un informe de susceptibilidad interpretado de acuerdo a la identificación del microorganismo, y de los mecanismos de resistencia subyacentes. También existen fenotipos de resistencia inusuales, que deben hacer sospechar al microbiólogo y repetir el estudio, o intentar confirmarlo por algún otro método. En Tabla 8 se presentan los microorganismos con fenotipos de resistencia intrínseca más frecuentemente encontrados en la práctica clínica y en Tabla 9 aquellos fenotipos de resistencia poco habituales, que deben llevar a realizar más pruebas (23).

Asimismo, el laboratorio de microbiología debe proveer a sus clínicos de tablas de susceptibilidad de la microbiota local actualizadas en forma periódica, de manera de orientar adecuadamente los tratamientos empíricos que se inician frente a una sospecha clínica determinada (24).

TABLA 7. RECOMENDACIONES ESPECÍFICAS PARA REALIZAR ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD POR METODOLOGÍA MANUAL

Microorganismo	Metodología recomendada	Antimicrobiano
Bacilos no Fermentadores de paciente con Fibrosis Quística*	Difusión en disco o E-test	todo el antibiograma
<i>S.aureus</i> MR	E-test	Vancomicina
<i>A.baumannii- P.mirabilis</i>	E-test	Carbapenémicos
<i>A.baumannii</i>	E-test	Tigeciclina
Enterobacterias	Difusión en disco o E-test	Piperacilina-Tazobactam**
<i>S.viridans- S.pneumoniae</i> invasor	E-test	Penicilina y Cefotaxima
<i>C.glabrata</i>	E-test	Fluconazol y Anfotericina B
<i>C.crusei</i>	E-test	Fluconazol

*En pacientes con FQ, los BNF presentan un metabolismo lento, que hace que los equipos automatizados consideren cepas sensibles cuando pueden ser resistentes.

** Especialmente cuando las CIM por método automatizado caen en el rango de intermedio o resistente.

TABLA 8. RESISTENCIA INTRÍNSECA A TENER EN CUENTA AL MOMENTO DE INFORMAR UN ANTIPIOGRAMA

Resistencia Intrínseca	
<i>C.krusei</i>	R a Fluconazol
<i>Citrobacter freundii</i>	R a ampi, sulbactam-ampicilina, amoxi-clavulánico y cefalosporinas de 1º y 2º
<i>Enterobacter aerogenes y cloacae</i>	R a ampi, sulbactam-ampicilina, amoxi-clavulánico y cefalosporinas de 1º y 2º
<i>Hafnia alvei</i>	R a ampi, sulbactam-ampicilina, amoxi-clavulánico y cefalosporinas de 1º
<i>K.pneumoniae</i>	R a ampicilina
<i>Morganella morgannii</i>	R a ampi, amoxi-clavulánico y cefalosporinas de 1º y 2º, tetraciclinas, Nitrofurantoina, Colistin
<i>Proteus mirabilis</i>	Tetraciclinas, Nitrofurantoina, Colistin
<i>Proteus vulgaris</i>	R a ampi, cefalosporinas de 1º y 2º, tetraciclinas, Nitrofurantoina, Colistin
<i>Proteus Providence y Morganella</i>	Pueden presentar CIM elevado a Imipenem por mecanismo de impermeabilidad.

R: Resistencia.

Table CLSI MID0 S24.

TABLA 9. FENOTIPOS DE ALERTA, IMPLICAN CONFIRMACIÓN O REPETICIÓN

Fenotipos infrecuentes		
Especie	Fenotipo de alerta	Comentario
<i>H.influenzae</i>	NS a carbapenémico, o cefalosporina de 3º o fluoroquinolona	no reportado
<i>S.maltophilia</i>	R a Cotrimoxazol	poco frecuente
<i>N.meningitidis</i>	NS a Am, Cef 3º o Meropenem	no reportado
Enterococcus	NS a Daptomicina o Linezolid	poco frecuente
<i>S.aureus</i>	CIM Vanco > 4 ug/ml	poco frecuente
<i>S.pneumoniae</i>	NS a Linezolid o Vancomicina	no reportado
<i>Streptococo beta hemolítico</i>	NS a Penicilina, Vancomicina o Linezolid	no reportado
<i>Streptococo viridans</i>	NS a Vancomicina o Linezolid	no reportado
<i>A.baumannii</i>	R a Colistin	poco frecuente
<i>C.glabrata</i>	S a Fluconazol	poco frecuente
<i>C.parapsilosis</i>	S a Caspofungina	poco frecuente
<i>Candidas spp</i>	R a Anfotericina B	poco frecuente

NS: No sensible.

CONCLUSIÓN

La microbiología clínica está cambiando rápidamente en el último tiempo, como respuesta a la evidencia científica de contar con información de manera precoz, mejora el pronóstico de los pacientes, así como la necesidad de las instituciones de hacer sus procesos más eficientes. Esto implica a su vez, la exigencia de una adaptación del personal técnico y profesional

a las nuevas tecnologías, interpretando correctamente los resultados obtenidos, tanto en identificación como en estudios de susceptibilidad. También constituye una exigencia para los administradores, que deben hacer las inversiones necesarias y modificaciones en la planta física y de personal, para mantener el servicio en una base de 24/7, aprovechando al máximo las ventajas ofrecidas por la automatización de los procesos.

La autora declara no tener conflictos de interés, en relación a este artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Doern C, Holzleiter M. Automation and design of the clinical microbiology laboratory. Jorgensen J, Pfarrell M, Carroll K, Landry M, Funke G, Richter S, Warnock D. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th Ed, Washington DC, ASM Press 2015. Pag 44-53.
2. Burnham C, Dunne W, Greub G, Novak S, Patel R. Automation in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Chemistry* 2013; 59: 1696-1702.
3. Clerc, O., Prod'hom, G., Vigne, C., Bizzini, A., Calandra, T., & Greub, G. Impact of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry on the Clinical Management of Patients With Gram-negative Bacteremia: A Prospective Observational Study. *Clin. Infect. Dis.* 56 (8), 1101-1007, doi: 10.1093/cid/cis1204 (2013).
4. Neville, S. A. et al. Utility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry following introduction for routine laboratory bacterial identification. *J. Clin. Microbiol.* 49 (8), 2980-4, doi: 10.1128/JCM.00431-11 (2011).
5. Carol C, Patel R. Systems for Identification of Bacteria and Fungi. Jorgensen J, Pfarrell M, Carroll K, Landry M, Funke G, Richter S, Warnock D. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th Ed, Washington DC, ASM Press 2015. Pag 29-43.
6. Mischnik A, Trampe M, Zimmermann S. Evaluation of the impact of Automated Specimen Inoculation, using Previ Isola, on the Quality of and Technical Time for Stool Cultures. *Annals of Laboratory Medicine* 2015; 35:82-88.
7. Greub G, Prod'hom G. Automation in Clinical bacteriology: what system to choose? *Clinical Microbiology and Infection* 2011; 17:655-660.
8. Dekker, J. P., & Branda, J. A. MALDI-TOF Mass Spectrometry in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2011;33 (12), 87-93.
9. Seng, P. et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49 (4), 543-51, doi: 10.1086/600885.
10. Bourbeau P, Ledebur N. Automation in Clinical Microbiology. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51: 1658-1665.
11. Duggal S, Gaind R, Tandon N, Deb M, das Chugh T. Comparison of an Automated System with Conventional Identification and Antimicrobial Susceptibility testing *ISRN Microbiology* 2012.
12. Hervé B, Corvalan V, Hormazabal S, Salas A, Cabezas C, Badilla N et al. Utilización de Espectrometría de Masas para la identificación precoz de hemocultivos positivos. Validación de un algoritmo local. *Rev. Chil de Infect* 2015; 32:401-404.
13. Schmidt, V., Jarosch, A., März, P., Sander, C., Vacata, V., & Kalka-Moll, W. Rapid identification of bacteria in positive blood culture by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012; 31 (3), 311-7, doi: 10.1007/s10096-011-1312-0.
14. Idelevich E, Schule I, Grunastel B, Wullenweber J, Peters G, Becker K. Rapid Identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. 2014; 20:1001-6.
15. Jorgensen J, Ferraro M. Antimicrobial Susceptibility testing: A review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases* 2009; 49: 1749-55.
16. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases* 2012; 18:1503-1507.
17. Duggal S, Gaind R, Tandon JN, Deb M, Das Chugh . Comparison of an Automated System with Conventional Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing. *ISRN Microbiology* 2012; Article ID 107203, 4 pages.
18. Junkins A, Lockhart S, Heilmann K, Dohrn C, Von Stein D, Winokur P. BD Phoenix and Vitek 2 Detection of meca-mediated Resistance in *S.aureus* with Cefoxitin. *Journal of Clin Microb* 2009;47: 2879-2882.
19. Sader H, Fritsche T, Jones R. Accuracy of Three automated Systems (MicroScan WalkAway, VITEK and VITEK2) for susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* against five Broad-Spectrum Beta lactam agents. *Journal of Clin Microb*. 2006; 44:1101-1104.
20. Belkum A, Dunne M. Next-Generation Antimicrobial Susceptibility Testing. *Journal of Clin Microb* 2013;51: 2018-2024.
21. Rolain J, Mallet M, Fournier P, Raoult D, Real-time PCR for universal antibiotic susceptibility testing. *J of Antimicrob Chemother* 2004; 54:538-541.
22. Garcia L. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Third Edition , Washington DC , ASM Press 2010. Chapter 3.11.3 Respiratory Cultures From Cystic Fibrosis Patients.
23. CLSI: performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty fifth informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA. Clinical and Laboratory standards Institute: 2015.
24. CLSI: Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data: Approved Guideline. Second edition.. CLSI document M39-A2. Wayne, PA. Clinical and Laboratory standards Institute: 2005.