



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

[www.elsevier.es/eimc](http://www.elsevier.es/eimc)



Formación médica continuada: Métodos de diagnóstico rápido en Microbiología Clínica

## Métodos moleculares para el diagnóstico de septicemia

Francesc Marco<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Microbiología, Centro de Diagnóstico Biomédico, Hospital Clínic, Barcelona, España

<sup>b</sup> ISGlobal, Barcelona Institute for Global Health, Hospital Clínic-Universitat de Barcelona, Barcelona, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 3 de marzo de 2017

Aceptado el 6 de marzo de 2017

On-line el xxx

#### Palabras clave:

Septicemia  
Diagnóstico molecular  
Diagnóstico rápido

#### Keywords:

Sepsis  
Molecular diagnostics  
Rapid diagnostics

### R E S U M E N

La septicemia es una de las causas más importantes de muerte en pacientes hospitalizados. El hemocultivo es el método de referencia para detectar el agente etiológico responsable, pero el resultado definitivo depende de la velocidad de crecimiento del microorganismo. En los últimos años el empleo de diversas tecnologías como la espectrometría de masas (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*), la hibridación del ADN, los *microarrays* o las reacciones de PCR rápidas han disminuido de forma considerable el tiempo necesario para la identificación de los microorganismos y la detección de genes de resistencia a partir de hemocultivos positivos. El diagnóstico molecular de una septicemia directamente de la sangre del paciente permite conocer el resultado en pocas horas, aunque todavía existen diversas limitaciones que dificultan su empleo. En esta revisión se exponen los diversos métodos moleculares disponibles (*LightCycler SeptiFast*, *Magicplex sepsis real time*, *Septitest*, *VYOO*, PCR/ESI-MS análisis, *T2Candida*) y su posible utilidad.

© 2017 Elsevier España, S.L.U.

y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

### Molecular methods for septicemia diagnosis

#### A B S T R A C T

Septicemia remains a major cause of hospital mortality. Blood culture remains the best approach to identify the etiological microorganisms when a bloodstream infection is suspected but it takes long time because it relies on bacterial or fungal growth. The introduction in clinical microbiology laboratories of the *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight* mass spectrometry technology, DNA hybridization, *microarrays* or rapid PCR-based test significantly reduce the time to results. Tests for direct detection in whole blood samples are highly desirable because of their potential to identify bloodstream pathogens without waiting for blood cultures to become positive. Nonetheless, limitations of current molecular diagnostic methods are substantial. This article reviews these new molecular approaches (*LightCycler SeptiFast*, *Magicplex sepsis real time*, *Septitest*, *VYOO*, PCR/ESI-MS analysis, *T2Candida*).

© 2017 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

### Introducción

El diagnóstico microbiológico precoz de una infección del sistema circulatorio producida por bacterias (bacteriemia), hongos (fungemia) o virus (viremia) debe ser un objetivo prioritario de cualquier laboratorio de microbiología. En los cuadros clínicos severos que evolucionan hacia una situación grave de septicemia con

shock, la adopción de medidas terapéuticas adecuadas y la administración de un tratamiento antimicrobiano correcto lo más precoz posible son imprescindibles para disminuir la elevada morbimortalidad que se observa en estos casos<sup>1</sup>. La septicemia es una de las causas más importantes de muerte en los pacientes hospitalizados. De acuerdo con los datos recogidos en diversas publicaciones, en las que se incluyen pacientes europeos y norteamericanos, el número de enfermos fallecidos atribuibles a esta entidad clínica se estima en 400.000 cada año<sup>2-4</sup>. Desde un punto de vista clínico, la forma de presentación de una septicemia es un síndrome impreciso cuyo

Correo electrónico: [fmarco@clinic.ub.es](mailto:fmarco@clinic.ub.es)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2017.03.002>

0213-005X/© 2017 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

diagnóstico se fundamenta en la sospecha clínica de infección combinada con signos de disfunción orgánica. La confirmación de una septicemia requiere la identificación del agente etiológico. Hasta ahora, la metodología estándar recomendada descansa en la realización de hemocultivos que, en caso de ser positivos y empleando métodos tradicionales, requieren un mínimo de 48-72 h para tener el resultado de la identificación del microorganismo responsable y su sensibilidad a los antibióticos. El rendimiento de los hemocultivos es variable. Si se obtienen de 2 a 4 hemocultivos (40-80 ml de sangre) antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano, se detecta el agente etiológico entre el 80-96% de los casos<sup>5,6</sup>. Sin embargo, los hemocultivos son negativos en una proporción elevada de casos (50%) cuando el paciente tiene una septicemia grave<sup>7</sup>. Ello puede deberse a varios factores, como tratamiento antimicrobiano previo, escaso número de microorganismos circulantes en la sangre o microorganismos no cultivables o de crecimiento lento. Por otra parte, en los pacientes con shock séptico se estima que por cada hora que transcurre desde el inicio de la hipotensión hasta la administración de antibióticos activos se produce un descenso medio de la supervivencia del 7,6%<sup>8</sup>. Como el tratamiento antimicrobiano es un determinante crítico en la supervivencia de los pacientes con septicemia, se suelen emplear inicialmente antibióticos de amplio espectro para cubrir todos los agentes patógenos posibles y posteriormente, en función de los resultados de los hemocultivos, adaptar el tratamiento. Por ello es obvio que el objetivo que deberíamos conseguir sería acortar el tiempo necesario para llegar al diagnóstico microbiológico de una septicemia. Ante este reto se plantean dos opciones. La primera de ellas —y que en teoría es la más deseable por la inmediatez del diagnóstico— implica identificar el microorganismo responsable de la septicemia directamente a partir de la sangre del paciente. La segunda opción persigue identificar el agente etiológico lo más pronto posible una vez el hemocultivo se ha hecho positivo. En ambos casos también debería ser posible la detección de los genes de resistencia a los antibióticos más frecuentes y/o determinar la sensibilidad a los antibióticos.

### Diagnóstico directo a partir de sangre

La aplicación de técnicas moleculares directamente en muestras de sangre completa ofrece la posibilidad de identificar el agente etiológico responsable de la septicemia en un corto periodo de tiempo. Además, según la metodología empleada, es posible detectar la presencia de determinados genes de resistencia a los antibióticos, facilitando la elección del tratamiento antimicrobiano más adecuado. Esta opción diagnóstica se ha visto beneficiada en los últimos años por las modificaciones aplicadas en las técnicas que permiten extraer los ácidos nucleicos, sus métodos de amplificación y la posibilidad de utilizar reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) múltiples que aumentan las opciones diagnósticas. Sin embargo, y *a priori*, el empleo de estas técnicas moleculares debe hacer frente a diversos inconvenientes. En la sangre del paciente hay gran cantidad de ADN humano, así como ADN contaminante y la persistencia de ADN procedente de microorganismos muertos. También hay que tener en cuenta la presencia de inhibidores de la PCR, como el ión hierro o las inmunoglobulinas<sup>9</sup>. La cantidad de ADN presente se puede reducir mediante una extracción de leucocitos o bien empleando métodos que permitan extraerlo o degradarlo de forma específica. Así mismo, se deben evitar anticoagulantes como la heparina por el riesgo que inhiba la PCR, y se empleará EDTA. El segundo inconveniente que debe tenerse en cuenta es el bajo número de microorganismos circulantes en la sangre en un episodio de bacteriemia y que se estima entre 1 y 10 UFC/ml<sup>10</sup>. Estos valores se basan en estudios cuantitativos realizados con métodos convencionales que quizá no representen el número real de microorganismos circulantes y viables. Bacconi

et al.<sup>11</sup> sugieren que para métodos como la PCR es mejor considerar el número de copias genómicas (CG) de un microorganismo presentes en una muestra. Este concepto también tendría en consideración el ADN de bacterias muertas o las capturadas por células fagocíticas circulantes. De acuerdo con esta opción, se estima que en un episodio de bacteriemia el número de CG circulantes sería entre  $10^3$  y  $10^4$ /ml. Este valor estaría por encima del límite de detección de la mayoría de las PCR.

Se han comercializado diversos sistemas que pueden utilizarse en el diagnóstico directo a partir de sangre completa. La técnica ideal debería contemplar las siguientes características: rapidez, sensibilidad y especificidad elevada, capacidad para detectar microorganismos no cultivables, detección de diversos mecanismos de resistencia, la mayor automatización posible, fácil de implementar en la rutina diaria de un laboratorio de microbiología y ser coste-efectiva. Cumplir todos estos requisitos es difícil, y además debemos tener en cuenta que su empleo tiene ciertos inconvenientes, como no disponer del microorganismo identificado o contaminación del proceso con material genético externo, lo que dificultaría su interpretación. Todos los estudios realizados hasta ahora con estos nuevos métodos moleculares plantean ciertas dudas relacionadas con su sensibilidad real, ya que se comparan con el hemocultivo estándar, que probablemente no es lo suficientemente sensible como para ser considerado el método de referencia en el diagnóstico de una septicemia. Por lo que hemos comentado, la opción más sensata sería emplear ambos métodos y valorar los resultados en función de la situación clínica del paciente.

### LightCycler SeptiFast

El sistema LightCycler SeptiFast (Roche Molecular System, Suiza) fue el primero en comercializarse y ha sido evaluado en diversos estudios clínicos<sup>12-16</sup>. Permite detectar e identificar directamente a partir de la sangre 25 agentes patógenos que suponen un 90% de los agentes etiológicos más frecuentes en una septicemia. En el panel de estudio se incluyen bacilos gramnegativos: *Escherichia coli*, *Klebsiella (pneumoniae/oxytoca)*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter (cloacae/aerogenes)*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia*; cocos grampositivos: *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulasa negativa, *Streptococcus pneumoniae*, otras especies de *Streptococcus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, así como *Candida* spp. (5 especies) y *Aspergillus fumigatus*. Además, tiene la posibilidad de detectar la presencia del gen *mecA*, responsable de la resistencia a la meticilina. Solo requiere 1,5 ml de sangre completa y el proceso de detección tiene una duración de 3,5 a 6 h según los resultados. El sistema utiliza como diana para identificar las bacterias las secuencias localizadas entre el 16S y el 23S del ADN ribosomal, y para los hongos las situadas entre el 18S y el 5,8S. Una vez se ha extraído el ADN, se purifica y se realizan 3 PCR múltiples (bacterias gramnegativas, grampositivas y hongos) que permiten identificar los microorganismos incluidos en el panel a nivel de género y especie según el análisis de los puntos de fusión de los amplicones obtenidos. El límite de detección del método es de 3-30 UFC/ml para las bacterias y de 100 UFC/ml para las levaduras.

Se han comunicado los resultados de diversos estudios clínicos realizados en pacientes con septicemia grave<sup>13,14</sup>, pacientes neutropénicos con fiebre<sup>13,15</sup>, pacientes pediátricos<sup>16</sup> o pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos<sup>13</sup>. Los datos de especificidad y sensibilidad observados son variables, probablemente porque la población estudiada es diferente. Chang et al.<sup>17</sup> efectuaron una revisión sistemática de los datos publicados en la literatura y realizaron un metaanálisis que evaluó un total de 8.438 episodios de sospecha de septicemia en 6.012 pacientes. La sensibilidad global para detectar una septicemia fue del 75% y la especificidad, del 92%.

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/8745590>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/8745590>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)