

Original breve

M^a Fátima López-Fabal^{1,2}
José Luis Gómez-Garcés^{1,2}
Marta López Lomba¹
Mario Ruiz Bastián¹

Valoración de una técnica de PCR-múltiple en el diagnóstico rápido de la bacteriemia

¹Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Móstoles, Móstoles, Madrid

²Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario de Móstoles, Móstoles, Madrid

Article history

Received: 19 October 2017; Revision Requested: 11 December 2018; Revision Received: 13 December 2017; Accepted: 19 March 2018

RESUMEN

Introducción. El diagnóstico rápido y seguro de las bacteriemias es un desafío continuo en microbiología clínica. En este trabajo evaluamos un sistema de PCR múltiple que identifica 23 patógenos frecuentes así como la producción de 3 mecanismos de resistencia potencialmente presente en ellos.

Métodos. Durante un periodo de 2 meses los hemocultivos que resultaron positivos se procesaron en la forma habitual para su identificación y determinación de su sensibilidad antimicrobiana y de forma paralela se incorporaron a paneles FilmArray.

Resultados. La concordancia en la identificación microbiana de este método con el tradicional fue del 100% para las bacteriemias clínicamente significativas. El tiempo de obtención de los resultados mediante la técnica molecular no excedió de 1 hora 15 minutos y en 7 casos de los 21 estudiados (33%) se llevó a cabo una modificación de la terapéutica empírica pautada.

Conclusiones. La implantación de técnicas rápidas como la PCR múltiple ofrece un diagnóstico rápido, fiable y poco laborioso en el manejo terapéutico de la sepsis.

PALABRAS CLAVE: bacteriemia, PCR múltiple, tratamiento precoz dirigido

Evaluation of a PCR-multiplex technique for the rapid diagnosis of bacteriemia

ABSTRACT

Introduction. Rapid and safe diagnosis of bacteremia is a continuous challenge in clinical microbiology. In this work, we evaluated a multiple PCR system that identifies 23 common pathogens as well as the production of 3 resistance mechanisms potentially present in them.

Methods. During a period of 2 months the positive blood cultures were processed in the usual way for identification and determination of their antimicrobial sensitivity. At the same time were incorporated into FilmArray panels.

Results. The agreement between two methods for bacterial identification was 100%. The time of obtaining the results by the molecular technique did not exceed 1 hour 15 minutes and in 7 cases of the 21 studied (33%) a modification of the empirical therapy was carried out.

Conclusions. The implementation of rapid techniques such as multiple PCR offers a fast, reliable and easy to perform diagnosis in the therapeutic management of sepsis.

KEYWORDS: bacteremia, PCR multiplex, targeted early treatment

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico rápido y seguro en microbiología clínica, y en particular en el ámbito de las bacteriemias, ha constituido un reto para el laboratorio de Microbiología Clínica [1,2]. En muchas ocasiones se acude a la emisión de resultados parciales o incompletos para paliar este déficit, prefiriendo, por ejemplo, identificaciones microbianas presuntivas previas a resultados definitivos más lentos. Aún más, la determinación de la sensibilidad a los agentes antimicrobianos de los agentes aislados requiere de forma tradicional un tiempo aún más prolongado, por lo que en muchas ocasiones es obligado

Correspondencia:
M^a Fátima López-Fabal
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Móstoles
C/ Río Júcar s/n. 28935 - Móstoles (Madrid)
Tfno.: 916648695
E-mail: flopezf@salud.madrid.org

realizar una inferencia empírica de los datos obtenidos primariamente, basándose en estudios epidemiológicos previos a la hora de establecer un manejo terapéutico adecuado.

La detección genómica de las bacteriemias ha significado un paso decisivo en el diagnóstico microbiológico de las mismas, en cuanto a seguridad y rapidez. En esta línea, sistemas de diagnóstico que incluyan la posible detección de múltiples dianas de ácidos nucleicos microbianos contenidos en una muestra clínica permiten en un corto tiempo la identificación de un buen número de microorganismos, fundamentalmente los encontrados más frecuentemente en microbiología clínica. También, entre las dianas posibles pueden incluirse las referidas a los mecanismos más frecuentes de resistencia a los antimicrobianos, asociados a grupos o especies microbianas acortando, por tanto, de forma sustancial el tiempo necesario para estos menesteres.

El objetivo de este trabajo ha sido, brevemente, la evaluación de un sistema de PCR-múltiple que conlleve la extracción y purificación de ácidos nucleicos de los posibles agentes microbianos presentes en una muestra de hemocultivo, seguida de un análisis de los resultados obtenidos y su comparación en cuanto a concordancia y tiempo de obtención de estos resultados con una técnica semiautomática como la llevada cabo en la actualidad en la inmensa mayoría de los laboratorios de microbiología.

MATERIAL Y MÉTODOS

El sistema FilmArray (bioMérieux, France) es un sistema automatizado de diagnóstico *in vitro* que utiliza una técnica de PCR- multiplex anidada, que permite la extracción y purificación de ácidos nucleicos microbianos a partir de una muestra de hemocultivo y su posterior amplificación y análisis de fusión de ADN dentro de una matriz de múltiples pocillos [3].

Durante un periodo de 2 meses se llevó a cabo un estudio prospectivo en el que se incluyeron los hemocultivos de aquellos pacientes vistos en nuestro Hospital con sospecha clínica de sepsis y que resultaron positivos mediante el sistema automático habitual empleado en nuestro Servicio (Bact/Alert, bioMérieux, France). Estos hemocultivos se procesaron para su identificación mediante espectrometría utilizando el sistema VITEK-MS (bioMérieux) a partir del cultivo convencional. La determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos se llevó a cabo mediante un sistema automatizado de microdilución (Vitek-2, bioMérieux).

De forma paralela al proceso anterior, alícuotas de 200 µl del frasco de hemocultivo se incorporaron a los paneles BCID (Blood Culture Identification) de FilmArray y se procesaron siguiendo las instrucciones del fabricante necesitando un tiempo de 2 minutos de manipulación y 1 hora aproximadamente por muestra para obtener el resultado. Este panel permite identificar 6 especies de bacterias grampositivas, 10 de gramnegativas, 5 levaduras y 3 mecanismos de resistencia a antimicrobianos: *mecA*, *van A/B* y KPC.

No se incluyeron en el estudio los hemocultivos que, siendo positivos, carecían presumiblemente de significado clínico, p.ej. la presencia de cocos grampositivos en una sola botella procedentes de pacientes ambulatorios sin dispositivos intravasculares o corineformes en situaciones similares.

Los datos clínicos y microbiológicos, el tiempo necesario para la obtención de resultados y los posibles cambios en la terapéutica antimicrobiana fueron reseñados y evaluados a continuación.

RESULTADOS

A lo largo del período del estudio se evaluaron 21 pacientes cuyos hemocultivos fueron positivos. La procedencia de los hemocultivos fue variada, en 9 casos los pacientes estaban ingresados en diferentes unidades clínicas: 3 en Medicina Interna, 2 en Cirugía de Aparato Digestivo, 2 en Hematología, 1 en Traumatología, 1 en UCI y 1 en la Unidad de Reanimación, mientras que los 12 restantes procedían del Servicio de Urgencias, independientemente de su posterior ingreso hospitalario.

La sospecha clínica en el momento de la toma del hemocultivo igualmente variada, predominando los cuadros de peritonitis y aquellos otros en los que no se sospechaba el foco séptico. Los hemocultivos se obtuvieron a partir de una vía periférica en 16 casos y los 5 restantes a partir de una vía central.

Mediante la tinción de Gram se observaron en conjunto, 7 bacilos gramnegativos, 6 cocos grampositivos dispuestos en parejas y cadenas, 4 cocos grampositivos en acúmulos, 2 organismos levaduriformes, 1 bacilo grampositivo y otro en el que no se visualizaron microorganismos.

Mediante la espectrometría de masas se identificaron: 4 *Escherichia coli*, 1 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Pseudomonas aeruginosa*, 2 *Streptococcus agalactiae*, 1 *Streptococcus pneumoniae*, 2 *Streptococcus* grupo *viridans* (1 *Streptococcus mitis* y 1 *Streptococcus sanguis*), 1 *Enterococcus faecalis*, 1 *Enterococcus raffinosus*, 3 *Staphylococcus coagulasa* negativa (1 *Staphylococcus epidermidis*, 2 *Staphylococcus haemolyticus*), 2 *Staphylococcus aureus*, 2 *Candida albicans*, 1 *Corynebacterium tuberculoestearicum* y 1 *Neisseria subflava*.

Los aislamientos se correspondieron con diferentes pacientes cada uno de ellos, salvo en 2 casos en los que los hemocultivos fueron dobles (*S. haemolyticus* + *S. mitis* y *K. pneumoniae* + *E. faecalis*). En un caso el cultivo fue negativo.

El sistema de PCR-múltiple fue concordante en 18 casos, incluyendo los hemocultivos dobles y el negativo, mientras que en 3 casos no hubo paralelismo con el método convencional ya que el sistema de PCR-múltiple no detectó ningún microorganismo en los aislamientos correspondientes a *C. tuberculoestearicum*, *N. subflava* y *E. raffinosus* aunque en ninguno de los 3 se presumió un significado clínico.

El tiempo empleado en el diagnóstico convencional fue de 24 horas para los hemocultivos positivos mientras que

Tabla 1		Resultados de FilmArray			
Aislamiento	Microorganismo (método convencional)	Microorganismo (PCR)	Mecanismo de resistencia detectado mediante PCR	Tratamiento empírico	Tratamiento post-resultado PCR
1	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>		Meropenem	Ciprofloxacino
2	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>		Piperacilina-tazobactam	Cefotaxima
3	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	Resistencia a meticilina	Ninguno	Daptomicina
4	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	No carbapenemasa	Ninguno	Ciprofloxacino
5	<i>C. tuberculoestearicum</i>	No se detecta		Ninguno	Ninguno
6	<i>S. epidermidis</i>	SCN		Ninguno	Ninguno
7	<i>K. pneumoniae</i> + <i>E. faecalis</i>	<i>K. pneumoniae</i> + <i>E. faecalis</i>	No carbapenemasa No resistencia a vancomicina	Linezolid+ ciprofloxacino	Linezolid + ciprofloxacino
8	<i>S. haemolyticus</i> + <i>S. mitis</i>	SCN + <i>Streptococcus</i> sp.		Ninguno	Ninguno
9	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>		Imipenem	Anidulafungina
10	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	No carbapenemasa	Ceftriaxona	Ceftriaxona
11	<i>S. haemolyticus</i>	SCN		Cefazolina	Linezolid + ciprofloxacino
12	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. agalactiae</i>		Ceftriaxona + vancomicina +ampicilina	Gentamicina
13	Cultivo estéril	No se detecta		Ninguno	Ninguno
14	<i>S. sanguinis</i>	<i>Streptococcus</i> sp.		Meropenem	Ninguno
15	<i>N. subflava</i>	No se detecta		Ninguno	Ninguno
16	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	No carbapenemasa	Levofloxacino + claritromicina	Meropenem
17	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>		Ninguno	Fluconazol
18	<i>E. raffinosus</i>	No se detecta		Piperacilina-tazobactam	Ninguno
19	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	No carbapenemasa	Ceftriaxona	Meropenem
20	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. agalactiae</i>		Ciprofloxacino	Ampicilina
21	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	Resistencia a meticilina	Linezolid	Daptomicina

la técnica genómica ofreció los resultados entre 1 y 2 horas desde el inicio del procedimiento.

En 2 casos el fenotipo de resistencia al microorganismo pudo conocerse a través del panel de PCR-múltiple (2 *S. aureus* resistentes a meticilina) y en otros 9 pudieron descartarse los mecanismos más trascendentes desde el punto de vista clínico: producción de carbapenemasa tipo KPC en 5 casos de enterobacterias, resistencia a oxacilina en estafilococos en 3 casos y resistencia a vancomicina en enterococo en 1 caso.

Un tratamiento empírico antimicrobiano se había iniciado en 13 casos y, tras los resultados obtenidos por el sistema de PCR se cambió en 9 ocasiones, se discontinuó en 2 casos y se mantuvo en otros 2 casos. Por otro lado, en 3 ocasiones, se inició el tratamiento después de conocerse el resultado de PCR y en 5 casos en los que no se había pautado tratamiento empírico, siguieron sin antimicrobiano tras conocerse el resultado (tabla 1).

DISCUSIÓN

El diagnóstico rápido y seguro del agente ó agentes causales de las bacteriemias, ha constituido un reto continuo para el laboratorio de Microbiología Clínica [1]. La importancia clínica de esta patología, en muchas ocasiones directamente relacionadas con la vida del paciente, ha sido motivo de diferentes aproximaciones técnicas con objeto de poder llevar a cabo un diagnóstico etiológico fiable que permitiera a continuación la implantación de un tratamiento antimicrobiano dirigido, con vistas a obtener los mejores resultados posibles. Además la rapidez en la obtención de estos resultados resulta capital a la hora de intervenir eficazmente en el transcurso de la enfermedad [2,3].

En los últimos años las técnicas moleculares, cada vez más seguras y rápidas, han ido incorporándose paulatinamente a la rutina diagnóstica microbiológica, no sin dificultades, principalmente por su laboriosidad y/o su costo. El desarrollo

de equipos compactos diseñados para la identificación de los agentes etiológicos de las bacteriemias y su aplicación rutinaria no está incorporado de una manera definitiva en una buena parte de los laboratorios por los obstáculos anteriormente señalados.

En esta línea distintas aproximaciones van tomando cuerpo paulatinamente, entre ellas sistemas de PCR-múltiple, que integran extracción, purificación, amplificación, detección y análisis de resultados en sistemas cerrados que minimizan las posibles contaminaciones y que ofrecen resultados a las pocas horas, incluyendo la identificación de los patógenos más frecuentes, y, aún más, sus fenotipos de resistencia más importantes frente a los antimicrobianos habitualmente empleados frente a ellos. La fiabilidad y la rapidez de estos sistemas ofrecen, por tanto, nuevas posibilidades muy atractivas en el manejo adecuado de las infecciones del torrente circulatorio [4].

En nuestro estudio procesamos 21 hemocultivos con señal positiva mediante el procedimiento habitual, procedentes de otros tantos pacientes, en los que se obtuvieron aislamientos microbianos en 20 de ellos, siendo el sistema de PCR-múltiple concordante en 18 casos, incluyendo dos hemocultivos dobles y uno sin crecimiento objetivable. En los tres casos restantes el sistema de PCR-múltiple no detectó ningún microorganismo.

En estas tres ocasiones los microorganismos aislados se correspondieron con bacterias habitualmente no significativas como agentes relacionados con cuadros sépticos y que, una vez valorados desde el punto de vista clínico no fueron considerados significativos. Sin embargo, desde un punto de vista estrictamente microbiológico, esta situación ofrece diferentes posibilidades relacionadas con posibles contaminaciones en el procesamiento del hemocultivo, y/o el tamaño del inóculo empleado y/o las características metabólicas de los diferentes microorganismos.

Uno de los parámetros más señalados del estudio lo constituye la potencial rapidez en la información obtenida [5]. En nuestra serie los resultados ofrecidos mediante el uso tradicional de la incubación de los frascos de hemocultivos fue de al menos 24 horas desde la visualización de la tinción hasta la obtención de la identificación microbiana del subcultivo por espectrometría a los que habría que añadir otras 24 horas adicionales para la determinación de la sensibilidad por microdilución. El empleo de la técnica molecular acortó sensiblemente estos períodos, ya que la identificación se obtuvo aproximadamente a la hora de la señal positiva en el incubador, junto con la posibilidad de establecer los fenotipos de resistencia más frecuentes entre los microorganismos aislados. Concretamente en 13 de los 21 hemocultivos estudiados existió concordancia a nivel de género y especie entre ambas técnicas, a las que habría que añadir otros 4 en los que la identificación que ofrece el equipo fue a nivel de género y en los que la determinación de especie es poco relevante, *Staphylococcus coagulans* negativos y *Streptococcus* grupo *viridans*. En los cuatro casos restantes el sistema molecular no detectó la presencia de microorganismos, uno de ellos de

forma similar al sistema clásico en el que a pesar de la señal positiva no se obtuvo crecimiento alguno, debido quizás a una incorrecta proporción de la sangre inoculada o a la presencia de sustancias inhibitoras por medicaciones previas, incluyendo la existencia de antibióticos residuales. En los tres casos restantes los aislamientos obtenidos se correspondieron con microorganismos considerados no significativos para el manejo clínico de estos pacientes, *C. tuberculoestaticum*, *N. subflava* y *E. raffinosus*, ninguno de los cuales se encontraban entre las dianas del sistema molecular utilizado. Es asimismo destacable que en dos casos los aislamientos fueron dobles y que la técnica de PCR-múltiple fue capaz de identificarlos correctamente [6].

Otro aspecto de interés en el estudio fue el relativo a la corrección, implantación o eliminación de tratamientos antimicrobianos empíricos [7,8], ya que mientras en 2 casos se continuó el tratamiento iniciado, en 9 ocasiones se cambió el mismo, incluyendo una fungemia por *C. albicans* en la que se sustituyó el antibacteriano empírico elegido por anidulafungina y, en general modificando los tratamientos de amplio espectro por una monoterapia específica y dirigida. Entre ellas y en dos ocasiones, en las que la sospecha clínica sugería una infección estafilocócica, el diagnóstico rápido de bacteriemia por *S. aureus* resistente a meticilina permitió instaurar prontamente el tratamiento eficaz con daptomicina. En 3 casos en los que no se había empezado un tratamiento empírico se inició uno, ya dirigido, tras los resultados moleculares. Finalmente en el resto de los casos, o bien se suspendió el tratamiento, o no se llevó a cabo, tras conocerse el resultado de la técnica molecular y considerar que el mismo no estaría justificado (tabla 1).

La identificación rápida y un primer acercamiento a la sensibilidad de los microorganismos presentes en hemocultivos conlleva una serie de ventajas potenciales relativas al ajuste de terapias eficaces, evitando el inicio de tratamientos erróneos y, en general, incidiendo en una reducción de costes (disminución de pruebas adicionales innecesarias, reducción de estancias más prolongadas, etc) además de los obvios objetivos relativos al diagnóstico individual de cada paciente estudiado y a la iniciación de un tratamiento antimicrobiano lo más temprano posible en cada uno de ellos.

En resumen, creemos que la implantación de técnicas rápidas como la PCR-múltiple u otras, que permiten un diagnóstico certero, poco laborioso, rápido y fiable resultan cada vez más imprescindibles en el manejo de una infección trascendental como es la infección del torrente circulatorio.

FINANCIACIÓN

Los autores declaran no haber recibido financiación para la realización de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Perez KK, Olsen RJ, Musick WL, Cernoch PL, Davis JR, Land GA, et al. Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. *Arch Pathol Lab Med*. 2013; 137(9): 1247-54. DOI: 10.5858/arpa.2012-0651-OA
2. Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad. Documento de consenso. Código Sépsis. 2014
3. Gabriel Alberto March-Rosselló. Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2017;35:182-8 - DOI: 10.1016/j.eimc.2016.12.005
4. Altun O, Almuhayawi M, Ullberg M, Ozenci V. Clinical Evaluation of the FilmArray[®] Blood Culture Identification Panel in Identification of Bacteria and Yeasts from Positive Blood Culture Bottles. *J Clin Microbiol*. 2013;51(12):4130-6. DOI: 10.1128/JCM.01835-13.
5. Ray S.T., Drew R.J., Hardiman F., Pizer B., Riordan A. Rapid Identification of Microorganisms by FilmArray[®] Blood Culture Identification Panel Improves Clinical Management in Children. *Pediatric Infect Dis J*. 2016; 35(5):134-8. DOI: 10.1097/INF.0000000000001065.
6. Fiori B, D'Inzeo T, Giaquinto A, Menchinelli G, Liotti FM, de Maio F. Optimized Use of the MALDI BioTyper System and the FilmArray BCID Panel for Direct Identification of Microbial Pathogens from Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol*. 2016; 54: 576-584. DOI: 10.1128/JCM.02590-15
7. Messacar K., Hurst A., Child J. et al. Clinical Impact and Provider Acceptability of Real-Time Antimicrobial Stewardship Decision Support for Rapid Diagnostics in Children With Positive Blood Culture Results. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 2016 Aug 19. DOI: 10.1093/jpids/piw047
8. Pardo J., Klinker K.P., Borgert S.J, Butler BM, Giglio PG, Rand KH. Clinical and economic impact of antimicrobial stewardship interventions with the FilmArray blood culture identification panel. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;84(2):159-64. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.023.