

M^a Luisa Monforte¹
Rocío Cebollada¹ 
M^a Jesús Escobar²
Raquel Abad³ 
Carmen Aspiroz¹ 

Resultado falso negativo en diversas PCR multiplex y monoplex en un episodio de bacteriemia por *Neisseria meningitidis*. Implicaciones diagnósticas, terapéuticas y epidemiológicas

¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Royo Villanova, Zaragoza (HURV).

²Servicio de Hematología, Hospital Universitario Royo Villanova, Zaragoza (HURV).

³Unidad de *Neisseria*, *Listeria* y *Bordetella*, Centro Nacional de Microbiología (CNM), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

Article history

Received: 23 April 2024; Revision Requested: 27 May 2024; Revision Received: 11 June 2024;

Accepted: 21 June 2024; Published: 10 July 2024

Estimado Editor:

La enfermedad meningocócica invasiva (EMI) es una importante causa de meningitis y sepsis, especialmente en niños y adolescentes [1]. Su agente causal es *Neisseria meningitidis*. Generalmente está causada por los serogrupos A, B, C, W-135 e Y, y sólo excepcionalmente por otros. Los meningococos de otros grupos se encuentran principalmente en portadores sanos, ya que las especies de *Neisseria* forman parte de la microbiota nasofaríngea [2].

El diagnóstico microbiológico convencional de las infecciones por *N. meningitidis* se realiza por cultivo, que es lento (24-48 horas). Es conocida su extrema labilidad, y que situaciones como tratamientos previos con antimicrobianos o transporte y conservación inadecuados (es muy sensible al frío) pueden interferir en su recuperación [3]. También se dispone para su diagnóstico de técnicas de PCR en tiempo real, con resultados en pocas horas.

Presentamos el caso de un varón de 84 años con antecedentes de mieloma múltiple de reciente diagnóstico, en tratamiento con quimioterapia. A los 15 días de ingreso en Hematología el paciente presentó sensación distérmica y malestar general. Se le realizó analítica general, en la que llamaba la atención la procalcitonina (35 ng/mL) y PCR (proteína C reactiva) (33 mg/dl). Ante la sospecha de infección sistémica se extrajeron hemocultivos y se administraron antimicrobianos.

Los dos hemocultivos aerobios resultaron positivos a las 28 horas de incubación. En la tinción de Gram se observaron diplococos Gram negativo, por lo que se sospechó *N. meningitidis*. Se realizó un array multiplex (*FilmArray®Blood Culture Identification, Biofire*, BioMérieux, France), que resultó negativo. Se comunicó la información disponible y la sospecha de meningococemia al médico responsable. El paciente había re-

cibido meropenem y, aunque la evolución era satisfactoria, se decidió simplificar a ceftriaxona.

La identificación mediante proteómica confirmó *Neisseria meningitidis* dos días después de su recuperación en cultivo (MALDI-TOF se realiza en el hospital de referencia, y esto conlleva un retraso diagnóstico, evitable si se posee esta dotación en el propio hospital).

Ante la extrañeza del resultado negativo por PCR y la confirmación por cultivo de *N. meningitidis* se procedió a realizar dos pruebas moleculares más: 1) *Filmarray®panel meningitis/encefalitis Biofire* (BioMérieux, France) y 2) *VIASURE Haemophilus influenzae + Neisseria meningitidis + Streptococcus pneumoniae Real Time PCR* (Certest Biotec). Ambos resultados fueron asimismo negativos.

El paciente continuó con ceftriaxona (2 g/12 h durante 10 días) y su evolución fue favorable. Se enviaron al Centro Nacional de Microbiología (CNM) el aislado en placa y una botella de hemocultivo. La cepa fue sensible a todos los antimicrobianos testados (penicilina, ceftriaxona, levofloxacino, meropenem y rifampicina). La caracterización fue: *N. meningitidis* no aglutinable; Genosubtipo VR1:18 VR2:25-14; MLST: ST-823 (CC ST-198). Aislado no capsulado, presenta el locus *cnl* (*capsule null*). Mediante secuenciación genómica se confirmó la ausencia del locus *ctrA* y se detectó la presencia del denominado locus *cnl* (*capsule null*), región intergénica localizada en el locus capsular que se encuentra reemplazando los genes *cps* (*capsule gene complex*) dando como resultado un aislado no capsulado.

La PCR realizada en el CNM fue también negativa. Revisadas otras técnicas (como STA-Dx ME de QIAGEN) tienen también como diana el gen *ctrA* y/o lo especifican en su información técnica que, en el caso de *N. meningitidis*, solamente se detectan cepas capsuladas.

Los falsos negativos en la detección por PCR de *N. meningitidis* suelen obedecer a que estas técnicas utilizan como diana el gen *ctrA*, que está ausente en las cepas no capsuladas [4,5]. *ctrA* es un gen capsular que se pensaba estaba conser-

Correspondencia:
Dra. Carmen Aspiroz.
Microbiología, Hospital Universitario Royo Villanova, Zaragoza
Avda San Gregorio, 50015, Zaragoza.
E-mail: mcaspiroz@salud.aragon.es; caspiroz@gmail.com

vado en todas las cepas invasivas de *N. meningitidis* debido al papel de la cápsula en eludir la muerte bacteriana mediada por el complemento. Sin embargo, la sensibilidad del gen *ctrA* en la identificación de todos los aislados invasivos de *N. meningitidis* no es infalible y ya se han descrito varios casos de enfermedad invasiva -y a veces mortal- causada por cepas de cápsula nula (*cnI*) que carecen de *ctrA*, generalmente en pacientes inmunocomprometidos pero también en pacientes sin una inmunodeficiencia identificable [6-9].

En cuanto a las técnicas diagnósticas moleculares, *N. meningitidis* tiene un alto grado de diversidad genómica, lo que plantea un riesgo adicional para el uso de un solo gen para la identificación [5]. Para evitar estos problemas, hay técnicas de PCR que, además del gen *ctrA*, añaden otras dianas no capsulares [10]. Para evitar estos problemas, se han desarrollado técnicas de PCR que, además del gen *ctrA*, añaden otras dianas no capsulares como *metA*, *sodC* y *tauE* [5,10,11].

Los aislados no capsulados en pacientes inmunocomprometidos pueden dar lugar a infecciones graves [9,10]. Así es en el caso descrito, y hace especialmente relevante conocer las limitaciones diagnósticas de las PCR para evitar un resultado falso negativo de graves consecuencias, tanto clínicas (por ausencia de un tratamiento antimicrobiano, fatal para el paciente) como epidemiológicas, por no implementar medidas de aislamiento en el paciente y de profilaxis de sus contactos, especialmente en un contexto de pacientes frágiles con inmunodepresión.

La generalización del diagnóstico molecular nos puede hacer bajar la guardia y dejar de implementar los necesarios métodos diagnósticos convencionales. Es imprescindible conocer también los problemas o "lagunas" de estas técnicas. Así, hay poca información acerca de los posibles falsos negativos en infecciones por *N. meningitidis*: en meningocemias hay una casuística muy limitada, pero además de en esta infección invasiva, se ha descrito este grave problema de falsos negativos e incorrecto diagnóstico -debido a *ctrA* como única diana- en otras muestras no invasivas (respiratorias p.ej.) y también en cepas capsuladas como *N. meningitidis* de los serogrupos B y C [4,5,10].

FINANCIACIÓN

Los autores declaran que han recibido financiación para la realización de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

- Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. Lancet. 2007;369(9580):2196-2210. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61016-2.
- Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM. Meningococcal disease. N Engl J Med. 2001;344(18):1378-88. doi: 10.1056/NEJM200105033441807.
- Pollard A, Finn A. *Neisseria meningitidis*. In: Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. Long SS, Pickering LK, Prober CH G. Elsevier Saunders. 2012;pp: 730-741.
- Cavrini F, Liguori G, Andreoli A, Sambri V. Multiple nucleotide substitutions in the *Neisseria meningitidis* serogroup C *ctrA* gene cause false-negative detection by real-time PCR. J Clin Microbiol. 2010;48(8):3016-8. doi: 10.1128/JCM.00103-10.
- Jaton K, Ninet B, Bille J, Greub G. 2010. False-negative PCR result due to gene polymorphism: the example of *Neisseria meningitidis*. J Clin Microbiol 48:4590-4591. <https://doi.org/10.1128/JCM.01766-10>.
- Ganesh K, Allam M, Wolter N, Bratcher HB, Harrison OB, Lucidar-me J, et al. Molecular characterization of invasive capsule null *Neisseria meningitidis* in South Africa. BMC Microbiol. 2017 Feb 21;17(1):40. doi: 10.1186/s12866-017-0942-5.
- Johswich KO, Zhou J, Law DKS, St Michael F, McCaw SE, Jamieson FB, Cox AD, Tsang RSW, Gray-Owen SD. 2012. Invasive potential of nonencapsulated disease isolates of *Neisseria meningitidis*. Infect Immun 80:2346-2353. <https://doi.org/10.1128/IAI.00293-12>.
- Findlow H, Vogel U, Mueller JE, Curry A, Njanpop-Lafourcade B-M, Claus H, Gray SJ, Yaro S, Traoré Y, Sangaré L, Nicolas P, Gessner BD, Borrow R. 2007. Three cases of invasive meningococcal disease caused by a capsule null locus strain circulating among healthy carriers in Burkina Faso. J Infect Dis 195:1071-1077. <https://doi.org/10.1086/512084>.
- Vogel U, Claus H, von Müller L, Bunjes D, Elias J, Frosch M. Bacteremia in an immunocompromised patient caused by a commensal *Neisseria meningitidis* strain harboring the capsule null locus (*cnI*). J Clin Microbiol. 2004;42(7):2898-901. doi: 10.1128/JCM.42.7.2898-2901.2004.
- Sirluck-Schroeder I, Al-Rawahi GN, Gadkar V, Hoang L, Tsang R, Tilley P. Limitation of *ctrA* as a Target for *Neisseria meningitidis* Identification and Potential Alternative Targets. J Clin Microbiol. 2022 ;60(6):e0015222. doi: 10.1128/jcm.00152-22.
- Diene SM, Bertelli C, Pillonel T, Jacquier N, Croxatto A, Jaton K, Greub G. Comparative genomics of *Neisseria meningitidis* strains: new targets for molecular diagnostics. Clin Microbiol Infect. 2016 Jun;22(6):568.e1-7. doi: 10.1016/j.cmi.2016.03.022.