



Evaluación de una prueba de PCR múltiple para la identificación del ADN bacteriano y fúngico en el diagnóstico de sepsis neonatal

Sánchez Huerta José Luis,* Parra Ortega Israel,*

Hernández Sánchez Consuelo,* Pichardo Villalón Lilia,* Cruz López Alicia,*
Villanueva García Dina,† López Martínez Briceida,§ Villa Guillen Mónica¶

Palabras clave:
Sepsis, PCR múltiple,
gestión de calidad,
control reactivo.

Key words:
Sepsis, multiplex PCR,
quality management,
reactive controls.

* Departamento de
Laboratorio Clínico.
† Departamento de
Neonatología.
§ Subdirección de
Servicios Auxiliares de
diagnóstico.
¶ Subdirección de
Asistencia Médica.

Hospital Infantil de
México Federico
Gómez.

Correspondencia
Dra. Mónica Villa
Guillen
Hospital Infantil de
México Federico
Gómez.
Dr. Márquez 162,
Col. Doctores,
06720, Ciudad
Méjico.
E-mail:
mvillaguillen@himfg.
edu.mx

Recibido:
10/09/2018
Aceptado:
27/09/2018

RESUMEN

Introducción: La sepsis es una de las causas de mortalidad en los niños en el mundo, reportándose 7.5 millones anualmente. Dentro del abordaje clínico y de laboratorio son necesarias pruebas rápidas y precisas. Las pruebas de biología molecular son una opción disponible, pero tienen que ser evaluadas. Los sistemas de gestión de calidad y los procesos de mejora continua nos llevan a generar evidencias objetivas en la toma de decisiones y por ello se recomienda la verificación analítica de un método cualitativo para demostrar las especificaciones analíticas del fabricante. **Objetivo:** Evaluar el desempeño analítico de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple en tiempo real LightCycler® SeptiFast Test M^{grade}. **Material y métodos:** Estudio prospectivo y descriptivo realizado en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), de Junio 2015 a Junio del 2017. De la plataforma analítica LightCycler® SeptiFast Test M^{grade}. **Resultados:** El proceso de estandarización de la prueba de LightCycler® SeptiFast Test M^{grade}, se realizó con apego a las instrucciones del fabricante. La prueba cuenta con diversos niveles de control, que deben ser incluidos en cada experimento. El control interno (CI) son moléculas de ADN sintético que se agrega en volumen definido a las muestras, y debe ser positivo, mientras que el control negativo (CN) debe ser negativo. Los controles reactivos (CR), de bacterias Gram positivas (G+), Gram negativas (G-) y hongos deben ser positivos. En la fase de estandarización, se realizaron 13 experimentos y, a pesar de reconocer los microorganismos adicionados (cepas ATCC), nos invalida la prueba debido a que, en los controles reactivos, no detecta amplificados de bacterias Gram positivas y/o Gram negativas, mientras que los hongos sí amplificaron. Sin embargo, para que una prueba pueda ser válida analíticamente, todos los controles reactivos deben amplificar. **Conclusiones:** A pesar de ser una prueba para diagnóstico *in vitro* (IVD), en las condiciones de infraestructura, equipamiento y trabajo, no fue posible la estandarización y verificación de la prueba de LightCycler® SeptiFast Test M^{grade} en el HIMFG, incluso después de realizar 13 experimentos apegados a las instrucciones y en presencia de asesores del fabricante que constataron el estricto seguimiento de éstas. Por lo que concluimos que, aun siguiendo las recomendaciones del fabricante, no resultó una prueba confiable ni clínicamente útil.

ABSTRACT

Introduction: Sepsis is one of the causes of child mortality in the world, with 7.5 million reported annually. Within the clinical and laboratory approach, rapid and accurate tests are necessary. Molecular biology tests are an available option but have to be evaluated. Quality management systems and continuous improvement processes lead us to generate objective evidence in decision making and for this reason we recommend the analytical verification of a qualitative method to demonstrate the manufacturer's analytical specifications. **Objective:** To evaluate the analytical performance of a multiplex PCR real-time LightCycler® SeptiFast Test M^{grade}. **Material and methods:** Prospective and descriptive study carried out at the Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), from June 2015 to June 2017. From the analytical platform LightCycler® SeptiFast Test M^{grade}. **Results:** The standardization process of the LightCycler® SeptiFast Test M^{grade} was carried out in accordance with the manufacturer's instructions. The test has several levels of control, which must be included in each experiment. The internal control (IC) are synthetic DNA molecules that are added in defined volume to the samples, and must be positive, while the negative control (NC) must be negative. The reactive controls (CR), G+, G- and fungi bacteria must be positive. In the standardization phase, 13 experiments were performed and despite recognizing the microorganisms added (ATCC strains), it invalidate the test because in reactive controls, it does not detect amplified G+ and/or G- bacteria, while the fungi did amplify. However for a test to be analytically valid all reactive controls must amplify. **Conclusions:** In spite of being an *in vitro* diagnostic (IVD) test, under the conditions of infrastructure, equipment and work, it was not possible to standardize and verify the LightCycler® SeptiFast Test M^{grade} test in the HIMFG, even after 13 experiments according to the instructions and in the presence of the manufacturer's advisors who verified the strict follow-up of these. Therefore, we concluded that, even following the manufacturer's recommendations, it did not turn out to be a reliable and clinically useful test.

INTRODUCCIÓN

Entre 1990 y 2015, la tasa de mortalidad neonatal del mundo disminuyó de 33 a 19 muertes por cada 1,000 niños nacidos vivos. Como la caída de la mortalidad neonatal ha sido más lenta que la mortalidad de niños entre 1 y 59 meses, las muertes neonatales ahora representan una parte mayor del total de las muertes de niños menores de cinco años. La mayoría de las muertes neonatales son causadas por complicaciones de partos prematuros (35%), complicaciones durante el trabajo de parto y el parto propiamente dicho (24%), y sepsis (15%). (Objetivos de Desarrollo del Milenio Informe de 2015).¹⁻⁸

Para el diagnóstico de la sepsis, que es una importante causa de morbimortalidad, se requiere de pruebas rápidas y precisas.⁷⁻¹⁰ Las pruebas de biología molecular son una opción disponible, pero tienen que ser evaluadas. El uso de pruebas basadas en la detección y amplificación de **ácido desoxirribonucleico** (ADN) y **ácido ribonucleico** (ARN) para el diagnóstico de enfermedades infecciosas tienen sus bases en el conocimiento molecular de la enfermedad y en las capacidades tecnológicas, considerando también las limitaciones antes de la implementación clínica.¹¹⁻¹⁴

En los últimos años las actividades relacionadas con la verificación y validación de métodos analíticos han tomado gran importancia, debido al continuo desarrollo y actualización de técnicas y equipos analíticos cada vez más sofisticados y, por otro lado, al interés de los profesionales en garantizar la calidad de sus procesos y resultados.¹⁵⁻¹⁷ Una prueba IVD (diagnóstico *in vitro*) debe ser *validada* por el fabricante, y estar sujeta a revisión y verificación exhaustiva con muestras clínicas, considerando la incorporación de estudios de correlación analítica, se deben realizar estudios apropiados para *verificar* que las características de rendimiento establecidas por el fabricante se obtengan en el laboratorio, además de demostrar que el laboratorio está capacitado para cumplir las especificaciones establecidas en la validación.¹⁵⁻¹⁹

Los laboratorios clínicos deben generar estrategias para tener un óptimo funcionamiento de sus plataformas, considerando las características de infraestructura, así como flexibilidad y adaptabilidad de los procesos analíticos.¹⁶⁻²¹

Los instrumentos seleccionados para el laboratorio clínico del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) requieren una evaluación previa antes de ser utilizados para el apoyo diagnóstico, con el objetivo de sumar un valor agregado a las diferentes determinaciones y brindar certeza y confianza en los resultados. Por lo que

es indispensable poner en evidencia las características analíticas declaradas por el fabricante.^{22,23}

Los sistemas de gestión de calidad y los procesos de mejora continua nos llevan a generar evidencias objetivas en la toma de decisiones y, por ello, se planteó la necesidad de realizar la evaluación analítica de un método cualitativo para la detección de patógenos, utilizando técnicas de biología molecular dentro de nuestro laboratorio, con el objetivo de demostrar el cumplimiento de las características analíticas que se requieren para el trabajo diario del Laboratorio de Biología Molecular del HIMFG.^{22,23}

Objetivo. Evaluar el desempeño analítico de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple en tiempo real LightCycler® SeptiFast Test M^{grade} (Roche Diagnostics), para la detección de ADN bacteriano y fúngico.

METODOLOGÍA

Estudio prospectivo y descriptivo de la prueba de LightCycler® SeptiFast Test M^{grade}, realizado en el HIMFG, durante el periodo de Junio 2015 a Junio del 2017.

Se evaluó la sensibilidad y especificidad de la prueba considerando la capacidad del método para detectar muestras verdaderas positivas (sensibilidad diagnóstica) y muestras verdaderas negativas (especificidad diagnóstica), usando como base la guía EP12-A2 de CLSI. Para evaluar la veracidad de la prueba LightCycler® SeptiFast Test M^{grade}, se realizó la comparación de los resultados obtenidos versus el método tradicional de identificación, tomando como método de referencia pruebas para hemocultivos. Utilizando una muestra de sangre periférica recolectada de manera simultánea a la toma de muestra de un hemocultivo, con previa autorización de los padres mediante la recepción y autorización de un consentimiento informado.

Proceso analítico: Los procesos de extracción de ácidos nucleicos, amplificación y lectura de resultados fueron realizados de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, se utilizaron los reactivos: LightCycler® SeptiFast Kit M^{grade}, SeptiFastLys Kit M^{grade}, SeptiFastPrep Kit M^{grade}, para la amplificación y el análisis el equipo LightCycler® 2.0 el programa SeptiFast Identification Software (SIS).

La prueba LightCycler® SeptiFast Test M^{grade} es una prueba IVD de amplificación de ácidos nucleicos para la detección e identificación de ADN bacteriano y fúngico, de los microorganismos especificados en la lista maestra (cuadro I) de la prueba SeptiFast (SML) en sangre humana colectada con anticoagulante K3-EDTA y en el equipo LightCycler® 2.0 Instrument.

Cuadro I. Lista maestra de la prueba SeptiFast (SML) (información obtenida de la ficha técnica de la prueba).

Gram negativos	Gram positivos	Hongos
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Klebsiella (pneumoniae/oxytoca)</i>	CoNS ¹	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Enterobacter (coacae/aerogenes)</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Candida glabrata</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		

¹ *Staphylococcus coagulasa negativo* (las cepas del grupo CoNS).

Preparación del material biológico usado como referencia. Se prepararon cepas ATCC de Gram negativos *Escherichia coli* (25922), *Pseudomonas aeruginosa* (27853), *Klebsiella pneumoniae* (18883) y Gram positivos *Staphylococcus aureus* (43300) y *Candida albicans* (10231) realizando una suspensión en 2 mL de solución salina fisiológica estéril, para cada cepa microbiana de desarrollo reciente, ajustando a una turbidez de 0.5 de la escala de MacFarland con el densímetro DensiCHECK™ PlusBioMérieux, para lograr una concentración de 1×10^8 UFC/mL, a partir de ella se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una concentración de 1×10^3 UFC/mL. Se tomaron 100 µL de ésta, con una cuenta viable de aproximadamente 100 UFC/mL los cuales fueron integrados en 900 µL de sangre total de individuos sanos.

Proceso analítico. A partir de las inoculaciones del material de referencia en muestras de sangre periférica se realizó la extracción de ADN (mezcla de 900 µL de sangre total y 100 uL de la dilución de las bacterias y hongos). La lisis de la muestra se realizó con SeptiFastLys Kit M^{grade} en el equipo MagNaL y serInstrument. Para la liberación y purificación del ADN se utilizó el SeptiFastPrep Kit M^{grade} con el que se incubó la muestra a 56 °C en presencia de proteasa, amortiguador de lisis y 10 µL de control interno (CI) para liberar y proteger el ADN de la acción de las ADNasas. Posteriormente, la solución fue transferida a la columna con fibras de sílice en la que se retiene el ADN genómico de humano, bacterias y hongos, las cuales fueron purificadas con dos lavados. Finalmente, se realizó la elución en 300 µL utilizada para la amplificación, para lo que se utilizaron los reactivos LightCycler® SeptiFast Kit M^{grade} que contienen la Taqpolimerasa y los juegos de sondas e iniciadores específicos para detectar bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos y el control interno (CI).

Se prepararon las mezclas de reacción con el ADN de las muestras, las cuales fueron transferidas a capilares de 100 µL del LightCycler 2.0 Instrument con el programa correspondiente para la amplificación, curvas de melting y posteriormente el análisis con el programa SIS. Para finalmente realizar la lectura de la amplificación del material de referencia (bacterias Gram positivos, Gram negativos y hongos).

Con el objetivo de monitorear la sensibilidad y especificidad, en el laboratorio se realizó un ensayo en el que incluimos muestras inoculadas con 100 UFC/mL de las cepas mencionadas.

Adicionalmente, se realizaron ensayos con las recomendaciones emitidas por los expertos del fabricante del kit. Dentro de esas recomendaciones se encontraba lo siguiente: aumentar el volumen de CI de 10 a 30 y 50 µL y otro experimento con extracción automatizada con el equipo MagNaPure Compact Instrument y el reactivo MagNaPureNucleicAcid Kit de volumen grande, posterior a la lisis descrita anteriormente.

El proceso de estandarización de la prueba de LightCycler® SeptiFast Test M^{grade}, se realizó con apego a los lineamientos establecidos en la ficha técnica del fabricante, utilizando cepas ATCC de algunos microorganismos. La prueba cuenta con diversos niveles de control, los cuales fueron incluidos en cada experimento y están descritos como control interno (CI), control negativo (CN) y controles reactivos (CR). El CI son moléculas de ADN sintético de doble cadena que contiene sitios de unión únicos para iniciadores y sondas, que permite diferenciar su amplificado del específico de cada microorganismo y se agrega en volumen definido a las muestras en el resultado, se espera que el CI amplifique considerado como el control positivo del proceso de

extracción. CN es el control negativo, como su nombre lo dice, no se espera identificar nada en el análisis y CR es el control reactivo que contiene los fragmentos de los 25 microorganismos de la PCR multiplex, por lo que en el análisis este CR debe ser positivo. Si no cumple estos criterios en los diferentes controles en el análisis la prueba no es válida.

Consideraciones éticas. Este protocolo cuenta con autorización del comité de ética, investigación y bioseguridad y está catalogado como un estudio de riesgo mínimo con el registro «HIM/2015/030 SSA.1179».

RESULTADOS

En seis experimentos (procesos analíticos completos desde extracción hasta lectura de resultados) realizados, todos los resultados del ensayo presentaron avisos de invalidez del experimento, ya que el CI fue negativo cuando debería ser positivo y los CR no detectaron los 25 microorganismos del multiplex; esta primera fase de implementación fue realizada con la asesoría de los expertos del fabricante. Sin embargo, se realizaron revisiones de los procesos de extracción, amplificación y análisis, por la invalidez de los mismos y en una segunda fase se hicieron cuatro experimentos más, siguiendo las recomendaciones del fabricante y la asesoría de expertos de distribuidores y fabricante; sin embargo, los resultados no fueron validados, por lo que en una tercera fase se incluyeron tres experimentos adicionales, los controles correspondientes con concentraciones superiores a las establecidas. Las *figuras 1* y *2* muestran el análisis y gráfico de los resultados de un experimento.

Se identificó que la prueba LightCycler® SeptiFast Test M^{grade} es una técnica muy sensible a errores en el procedimiento y a variaciones en la excitación y detección que pueden presentarse en el instrumento LightCycler 2.0, por lo que, según las recomendaciones de los expertos del fabricante, los experimentos fueron realizados por diferentes operadores para eliminar el error operador dependiente.

Se realizó finalmente el experimento número 10, en el que se incluyeron ocho muestras de sangre periférica de pacientes neonatos, los cuales presentaban clínicamente datos de sepsis y como parte de su abordaje se les tomaron hemocultivos y citometrías hemáticas, con previa autorización y firma de un consentimiento informado. Los resultados de las muestras de estos pacientes se describen en el cuadro II.

DISCUSIÓN

La prueba evaluada es una técnica cualitativa, con una sensibilidad analítica mínima de 30 UFC/mL descrita en la ficha técnica para todas las cepas, excepto para *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus mitis* que es de 100 UFC/mL y una especificidad que no se describe en la ficha técnica del fabricante; sin embargo, siguiendo los estándares de calidad de la guía de CLSI EP12-A2, Guía para la evaluación del desempeño de pruebas cualitativas, el tutorial sobre la validación de métodos cualitativos: del enfoque univariado al multivariado²¹⁻²⁵ y el programa de control de calidad analítico del Laboratorio Clínico

Imported LC-File: SEPTIFAST 04-12-2015		28/04/2017 12:29:13 p.m.		page 1					
Specimen	Assay	Data	Results		Flags	Comment			
SeptiFast sample 1	G(+)					Assay invalid			
SeptiFast sample 1	G(-)					Assay invalid			
SeptiFast sample 1	F			⊖					
SeptiFast sample 2	G(+)					Assay invalid			
SeptiFast sample 2	G(-)	ch670 t51.09 h0.14	E. coli			Assay invalid			
SeptiFast sample 2	F		⊖						
SeptiFast sample 3	G(+)					Assay invalid			
SeptiFast sample 3	G(-)	ch670 t57.78 h0.24	P. aeruginosa			Assay invalid			
SeptiFast sample 3	F		⊖						
SeptiFast sample 4	G(+)					Assay invalid			
SeptiFast sample 4	G(-)	ch640 t57.58 h0.10	K. pneumoniae/oxytoca			Assay invalid			
SeptiFast sample 4	F		⊖						
SeptiFast sample 5	G(+)	ch640 t61.07 h0.89 cp13.76	S. aureus			Assay invalid			
SeptiFast sample 5	G(-)					Assay invalid			
SeptiFast sample 5	F		⊖						
SeptiFast sample 6	G(+)					Assay invalid			
SeptiFast sample 6	G(-)					Assay invalid			
SeptiFast sample 6	F	ch640 t55.30 h0.08 ch640 t56.39 h0.05	C. albicans C. albicans						
SeptiFast sample 7	G(+)					Assay invalid			
SeptiFast sample 7	G(-)					Assay invalid			
SeptiFast sample 7	F		⊖						

Figura 1. Reporte SIS del ensayo A. Avisos de invalidez. CR no detectado en bacterias Gram positivas (G+) y Gram negativas (G-). Resultados válidos para hongos (F) en las siete muestras analizadas. Diversos microorganismos detectados.

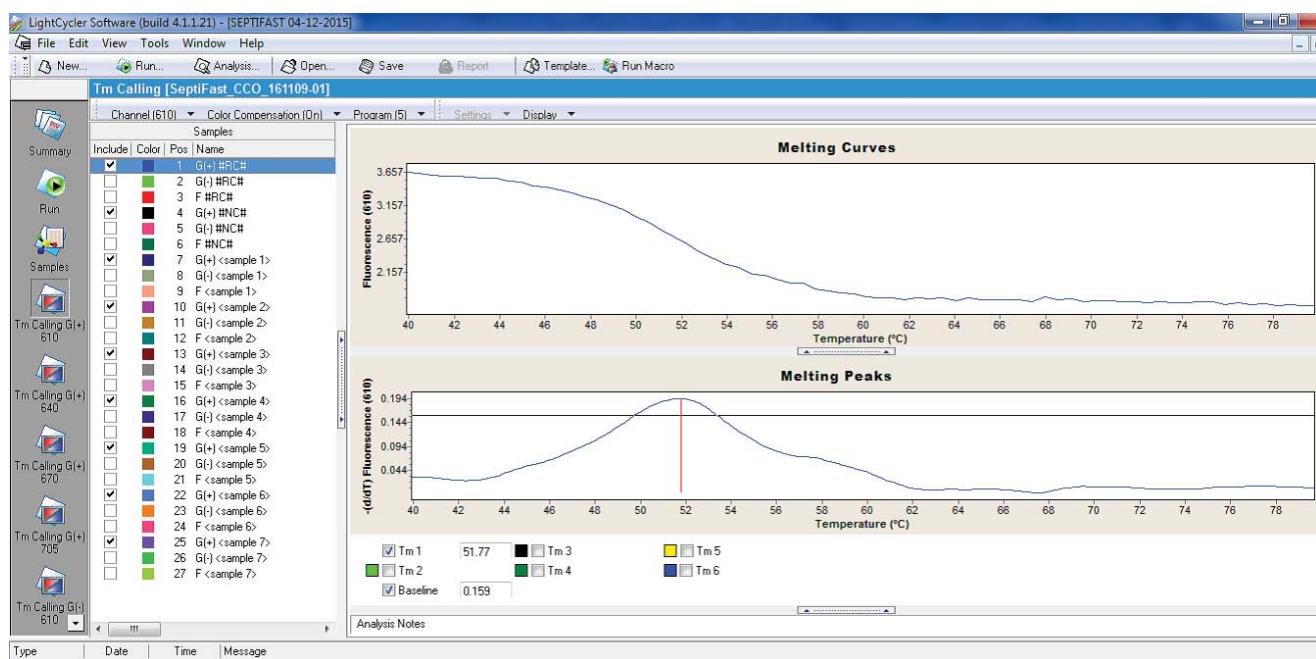


Figura 2. Canal 610 G+ de ensayo A.

Cuadro II. Comparativo de resultados de SeptiFast vs hemocultivo de pacientes con diagnóstico presuntivo de sepsis.

Paciente	Resultado SeptiFast	Resultado Hemocultivo
1	Negativo	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
2	<i>Enterobacter cloacae/aerogenes</i>	Negativo
3	<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i>	Negativo
4	Negativo	<i>Candida boidinii</i>
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
6	Negativo	Negativo
7	<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
8	Negativo	Negativo

del HIMFG se debe verificar y obtener un resultado satisfactorio en el desempeño analítico de la plataforma en el sitio de proceso para constatar lo declarado por el fabricante.^{23,25}

Dentro de las primeras observaciones a la información declarada por el fabricante tenemos que en la ficha técnica manifiestan que la sensibilidad y la especificidad no se calcularon porque no se dispone de un método de referencia adecuado. Sin embargo, la sensibilidad analítica de la prueba LightCycler® SeptiFast Test M^{grade}, la calcularon mediante el análisis de la tasa de resultados de cada analito de una serie de diluciones de 100, 30 y 3 UFC/mL en sangre

recolectada con anticoagulante EDTA, de donantes sanos. Obteniendo una sensibilidad mínima de 30 UFC/mL para todas las cepas, excepto para *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus mitis* con 100 UFC/mL (cuadro III).

Posterior a los experimentos analíticos, en los cuales se intentó reproducir lo antes mencionado para verificar los valores de sensibilidad analítica, se obtuvieron resultados negativos, lo cual resta confiabilidad a la prueba; si bien las pruebas de biología molecular (PCR) tienen un alto grado de sensibilidad, en esta ocasión se ha evi-

denciado una debilidad analítica que no permite que en esta prueba sea incorporada al diagnóstico clínico, existen publicaciones en las cuales se hace énfasis en los valores de sensibilidad y especificidad.²³

La especificidad se evaluó al probar la uniformidad y la homogeneidad de la región ITS objetivo, donde recogieron aislados clínicos originarios de varias regiones geográficas de Europa (sur, centro y norte), Japón y Estados Unidos. En total, caracterizaron 1,709 aislados mediante métodos microbiológicos y probaron

con la prueba LightCycler® SeptiFast m^{grade}, hallando resultados discrepantes en menos del 1.2% de todos los resultados.

En los 13 experimentos realizados, al menos uno de todos los controles no fue identificado por el programa SIS por lo que, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, se repitió todo el proceso y se solicitó asistencia técnica. Al comparar los resultados del reporte (SIS) con los gráficos del software LightCycler, se identificaron casos en los que no es contundente la ausencia de picos

Cuadro III. Cepas probadas mediante el análisis de la tasa de resultados (información obtenida de la ficha técnica de la prueba).

Sección A	Núm. de positivos/Núm. de pruebas		
	Concentración [UFC/mL]		
Objetivo	100	30	3
<i>Acinetobacter baumannii</i>	8/8	12/12	11/20
<i>Aspergillus fumigatus</i>	8/8	12/12	20/20
<i>Candida albicans</i>	8/8	12/12	12/20
<i>Candida glabrata</i>	8/8	12/12	10/20
<i>Candida krusei</i>	8/8	12/12	8/20
<i>Candida parapsilosis</i>	8/8	12/12	7/20
<i>Candida tropicalis</i>	8/8	12/12	9/20
<i>Enterobacter aerogenes</i>	8/8	12/12	16/20
<i>Enterobacter cloacae</i>	8/8	12/12	12/20
<i>Enterococcus faecalis</i>	8/8	12/12	15/20
<i>Enterococcus faecium</i>	8/8	12/12	17/20
<i>Escherichia coli</i>	8/8	12/12	20/20
<i>Klebsiella oxytoca</i>	8/8	12/12	14/20
Sección B			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8/8	12/12	17/20
<i>Proteus mirabilis</i>	8/8	12/12	16/20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8/8	12/12	5/20
<i>Serratia marcescens</i>	8/8	12/12	19/20
<i>Staphylococcus aureus</i>	8/8	12/12	8/20
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ¹	8/8	1/12	0/20
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ¹	8/8	0/12	0/20
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	8/8	12/12	18/20
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	8/8	7/12	1/20
<i>Streptococcus agalactiae</i> ²	8/8	7/12	0/20
<i>Streptococcus pyogenes</i> ²	8/8	9/12	4/20
<i>Streptococcus mitis</i> ²	8/8	9/12	0/20

¹ Cepas que representan el grupo *Staphylococcus coagulasa negativo* (CoNS) de la Lista maestra de la prueba SeptiFast (SML) de la sección A del cuadro III.

² Cepas que representan en grupo *Streptococcus* spp. de la lista SML de la sección B del cuadro III.

de control CR y CI que reporta el software SIS, en algunos casos las curvas están presentes. Pero, si comparamos los niveles de fluorescencia alcanzados en estos experimentos con una corrida válida, se observó que los picos están subestimados aproximadamente 50% en los niveles de fluorescencia. Tomando en cuenta esta evidencia, es probable que el programa SIS no considere picos existentes cuya fluorescencia no corresponde a la esperada.

Para asegurar la confiabilidad y verificación de las pruebas como parte del proceso analítico, se aplicaron los lineamientos para el aseguramiento interno de la calidad y se llevaron los registros correspondientes a lo largo de los diferentes experimentos.

Se utilizaron seis juegos de reactivos de LightCycler® SeptiFast Test M^{grade}, para 50 reacciones cada uno, en los 13 experimentos realizados, en los cuales se siguieron las instrucciones y modificaciones recomendadas por los especialistas del fabricante, se concluyó que la detección de ADN bacteriano y fúngico de la prueba LightCycler® SeptiFast Test M^{grade}, no es posible estandarizar y, por lo tanto, tampoco es posible realizar la verificación de la prueba porque no se cumplieron los requisitos de verificación de los diferentes experimentos y concluimos que, en nuestras condiciones, no es una prueba clínicamente útil en el diagnóstico de la sepsis neonatal.

En el reporte SIS del ensayo A, figura 1, se puede observar que los resultados fueron anulados debido a dos avisos de invalidez de la prueba en bacterias. RC: No Amplicon S spp. From SML (610) y CR: No amplicon; *P. mirabilis*. Cuando se analizaron las curvas en el LightCycler Software, figura 2, se observa que el pico correspondiente al CR del grupo de bacterias Gram positivas (G+) en el canal 610 está presente; sin embargo, este gráfico no es tomado en cuenta por programa SIS.

Existen estudios publicados que hacen mención a la evaluación de pruebas moleculares para el diagnóstico de sepsis neonatal, dentro de estos estudios se encuentra el publicado por el grupo de trabajo de precisión de la prueba de diagnóstico de Cochrane (*Cochrane Diagnostic Test Accuracy Working Group*).²³ En dicho estudio se realizaron búsquedas en bases de datos bibliográficas electrónicas, resúmenes de conferencias, archivos personales y listas de referencias de artículos identificados. Se incluyeron estudios de diseño de casos y controles o series consecutivas, que evaluaron ensayos moleculares (prueba de índice) en neonatos con sospecha de sepsis (participantes) en comparación con cultivos microbianos (estándar de referencia). Y obtuvieron mediante un modelo de efectos aleatorios bivariados para un metanálisis de los 23 estudios incluidos, y se generaron estimaciones resumidas de sensibilidad y especificidad con intervalos

de confianza (IC) del 95%. La sensibilidad media y la especificidad fueron de 0.90 (IC del 95%: 0.78-0.95) y 0.96 (IC del 95%: 0.94-0.97), respectivamente. La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR) y la PCR convencional de amplio rango tienen mayor sensibilidad y especificidad que otros ensayos. No se dispuso de suficientes datos para evaluar los subgrupos de edad gestacional y de tipo sepsis. Esta información publicada y tomada como referencia hace notar la deficiencia en el ensayo que nosotros evaluamos y pone en manifiesto la necesidad de evaluar todas las plataformas que se van a utilizar para los procesos de diagnóstico en los pacientes con sepsis.²³

Adicionalmente de la evaluación a las plataformas analíticas es importante realizar un cuestionamiento técnico científico al personal de aplicaciones, asesoría o capacitadores de las pruebas ya que, en nuestra experiencia, los diferentes ensayos no pudieron llevarse a cabo aun con la participación de los expertos de los procesos analíticos de las marcas comerciales. Dentro de los puntos de las normas de certificación y acreditación es indispensable contar con la competencia técnica y el respaldo de los fabricantes en dichos procesos; esta situación debe considerarse de manera especial, ya que los resultados de las pruebas pueden verse afectados negativamente.²¹⁻²⁵

CONCLUSIONES

La plataforma evaluada (LightCycler® SeptiFast Test M^{grade}) es un ensayo analítico que no mostró evidencia objetiva para su implantación como prueba diagnóstica en nuestro laboratorio clínico.

El ensayo carece confiabilidad al no tener resultados positivos en sus puntos de control interno, aun con las recomendaciones de los expertos técnicos del fabricante y distribuidores.

Dentro del Laboratorio Clínico del HIMFG y áreas médicas decidimos que no es pertinente usar un ensayo analítico con las características descritas en el ejercicio de atención a pacientes de nuestra institución.

REFERENCIAS

- Naciones Unidas. Objetivos de Desarrollo del Milenio. Informe de 2015. Nueva York: Naciones Unidas; 2015. Disponible en: http://www.un.org/es/millenniumgoals/pdf/2015/mdg-report-2015_spanish
- López MI, Callao MP, Ruisánchez I. A tutorial on the validation of qualitative methods: from the univariate to the multivariate approach. *Anal Chim Acta*. 2015; 891: 62-72.
- Darmstadt GL, Bhutta ZA, Cousens S, Adam T, Walker N, de Bernis L et al. Evidence-based, cost-effective interventions: how many newborn babies can we save? *Lancet*. 2005; 365 (9463): 977-988.

4. Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE et al. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet.* 2012; 379 (9832): 2151-2161.
5. Lawn JE, Cousens S, Zupan J; Lancet Neonatal Survival Steering Team. 4 million neonatal deaths: when? Where? Why? *Lancet.* 2005; 365 (9462): 891-900.
6. Flores-Herrera H, Maida-Claros R, Solís-Herrera H, Illescas-Medrano E, Zavala-Díaz de la Serna FJ. Identificación molecular de bacterias causales de sepsis neonatal mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Acta Pediatr Mex.* 2009; 30 (3): 148-155.
7. Ramírez-Sandoval MLP, Macías-Parra M, Lazcano-Ramírez F. Etiología de la sepsis neonatal en una unidad hospitalaria de segundo nivel. *Salud pública Méx.* 2007; 49 (6): 391-393.
8. Camacho-Gonzalez A, Spearman PW, Stoll BJ. Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis. *Pediatr Clin North Am.* 2013; 60 (2): 367-389.
9. Vergnano S, Sharland M, Kazembe P, Mwansambo C, Heath PT. Neonatal sepsis: an international perspective. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2005; 90 (3): F220-F224.
10. Goldstein B, Giroir B, Randolph A; International Consensus Conference on Pediatric Sepsis. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med.* 2005; 6 (1): 2-8.
11. Fischer JE, Bachmann LM, Jaeschke R. A readers' guide to the interpretation of diagnostic test properties: clinical example of sepsis. *Intensive Care Med.* 2003; 29 (7): 1043-1051.
12. Wellinghausen N, Wirths B, Franz AR, Karolyi L, Marre R, Reischl U. Algorithm for the identification of bacterial pathogens in positive blood cultures by real-time LightCycler polymerase chain reaction (PCR) with sequence-specific probes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004; 48 (4): 229-241.
13. Chiesa C, Panero A, Osborn JF, Simonetti AF, Pacifico L. Diagnosis of neonatal sepsis: a clinical and laboratory challenge. *Clin Chem.* 2004; 50 (2): 279-287.
14. Klausegger A, Hell M, Berger A, Zinöber K, Baier S, Jones N et al. Gram type-specific broad-range PCR amplification for rapid detection of 62 pathogenic bacteria. *J Clin Microbiol.* 1999; 37 (2): 464-466.
15. CLSI. User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document EP12-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
16. Ruppenthal RD, Souza Pereira F, Cantarelli VV, SilveiraSchrank I. Application of broad-range bacterial PCR amplification and direct sequencing on the diagnosis of neonatal sepsis. *Braz J Microbiol.* 2005; 36 (1): 29-35.
17. Srinivasan L, Harris MC. New technologies for the rapid diagnosis of neonatal sepsis. *Curr Opin Pediatr.* 2012; 24 (2): 165-171.
18. Tschiedel E, Steinmann J, Buer J, Onnebrink JG, Felderhoff-Müller U, Rath PM et al. Results and relevance of molecular detection of pathogens by SeptiFast—a retrospective analysis in 75 critically ill children. *Klin Padiatr.* 2012; 224 (1): 12-16.
19. Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, Pizzorno B, Putignani L, Bernaschi P et al. Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. *J Clin Microbiol.* 2011; 49 (6): 2252-2258.
20. Jordan JA, Durso MB. Real-time polymerase chain reaction for detecting bacterial DNA directly from blood of neonates being evaluated for sepsis. *J Mol Diagn.* 2005; 7 (5): 575-581.
21. Chang SS, Hsieh WH, Liu TS, Lee SH, Wang CH, Chou HC et al. Multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis - a systemic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2013; 8 (5): e62323.
22. Hernández-Huerta FE, Ruiz-Bedolla E, Cruz-López A, Vilchis-Ordoñez A, Gutiérrez-Almanza Z, López-Martínez B et al. Desempeño analítico de dos plataformas automatizadas para química clínica en un Instituto de Salud Pediátrica. *Rev Latinoamer Patol Clin.* 2017; 64 (1): 14-26.
23. Pammi M, Flores A, Leeflang M, Versalovic J. Molecular assays in the diagnosis of neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Pediatrics.* 2011; 128 (4): e973-e985.
24. Hernández-Huerta F, Ruiz-Bedolla E, Cruz-López A, Vilchis-Ordoñez A, Almanza-Gutiérrez Z, López-Martínez B et al. Evaluación de plataformas de química clínica mediante la comparación de los resultados de muestras biológicas. *Rev Latinoamer Patol Clin.* 2017; 64 (4): 169-180.
25. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Principles and procedures for blood cultures; approved guideline. CLSI document M47-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
26. Pammi M, Flores A, Versalovic J, Leeflang MM. Molecular assays for the diagnosis of sepsis in neonates. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017; 2: CD011926.