

Uso de la prueba LightCycler® SeptiFast en un recién nacido y un lactante para el diagnóstico etiológico rápido de sepsis nosocomial por *Candida parapsilosis*

Karla Maldonado-Silva*

Jesús Reyna-Figueroa*

Federico Javier Ortiz-Ibarra†

Ema Valenzuela-Méndez†

Ana Elena Limón-Rojas*

*Departamento de Pediatría,

Hospital Central Sur de Alta Especialidad, Petróleos Mexicanos

†Laboratorios Diagnomol, México

Correspondencia:

M. en C.M. Jesús Reyna Figueroa. Blvd. Adolfo Ruiz Cortínez 4091, colonia Fuentes del Pedregal, Delegación Tlalpan 14140, México DF.

Correo electrónico: jesusreynaf@prodigy.net.mx

www.nietoeditores.com.mx

RESUMEN

Una nueva técnica de biología molecular fue utilizada simultáneamente en dos pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y cultivos negativos en quienes se administraron antibióticos de amplio espectro sin una mejoría visible. El primer caso es una paciente de 17 meses de edad que fué admitida en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos con diagnóstico de choque séptico de origen abdominal. En el último cuadro tuvo fiebre y alteraciones persistentes en los resultados de laboratorio y los cultivos fueron negativos en tres ocasiones; se solicitó como una alternativa la prueba de SeptiFast con una muestra de sangre del catéter permanente y se identificó material genético de *Candida parapsilosis* y *Klebsiella pneumoniae/oxytoca*, motivo por el cual se retiró el catéter, con respuesta adecuada de la paciente que egresó al resolverse la infección.

El segundo caso es un paciente masculino de 16 días de vida que fue admitido desde el nacimiento en el servicio de lactantes por dificultad respiratoria y enterocolitis necrosante; a las 72 de la suspensión del tratamiento antimicrobiano inició con fiebre, distensión abdominal, leucopenia y plaquetopenia. Se solicitaron nuevos cultivos y la prueba de SeptiFast con un mililitro de sangre periférica, la cual identificó a *Candida parapsilosis* como agente causal. El tratamiento se cambió a amfotericina B deoxicícolato con mejoría a las 24 horas del cambio.

Palabras clave: sepsis neonatal, infección nosocomial, diagnóstico, biología molecular, SeptiFast

ABSTRACT

A new molecular biology technique was used simultaneously in two patients with systemic inflammatory response syndrome and negative cultures who were given broad-spectrum antibiotics without a visible improvement. The first case is a patient of 17 months who was admitted to the Pediatric Intensive Care Unit with a diagnosis of abdominal septic shock. In the last episode had fever and persistent laboratory abnormalities and the cultures were negative on three occasions, SeptiFast was requested as an alternative test with a sample of blood from the catheter in place and identified the genetic material of *Candida parapsilosis* and *Klebsiella pneumoniae/oxytoca*, and the catheter was removed, with adequate response from the patient and discharged when the infection was solved.

The second case is a male patient of 16 days of life who was admitted at birth in infants service because of respiratory distress and necrotizing enterocolitis, at 72 hours from the suspension of the antimicrobial treatment started with fever, abdominal distension, leukopenia and thrombocytopenia. New cultures were requested and SeptiFast test with one milliliter of peripheral blood, which identified *Candida parapsilosis* as the pathogen agent. The treatment was changed to amphotericin B deoxycholate with improvement at 24 hours of the change.

Key words: neonatal sepsis, nosocomial infection, diagnosis, molecular biology, SeptiFast

Durante décadas, el hemocultivo se consideró como el patrón de referencia (estándar de oro) para el diagnóstico de sepsis. Su principal desventaja es que en 60% de los casos se reportan cultivos negativos a pesar de que los pacientes tienen datos de respuesta inflamatoria sistémica.¹⁻³ La discusión tiene muchos años y aún no se ha llegado a consensos y propuestas de identificación que satisfagan la necesidad de detectar oportuna y correctamente la sepsis en los pacientes pediátricos.^{2,4}

En la actualidad, la introducción y uso de nuevas técnicas de biología molecular para la identificación de DNA de microorganismos está revolucionando la medicina al disminuir el tiempo para la obtención de los resultados en horas, con aumento de la sensibilidad y especificidad para la detección de los agentes patógenos con una menor cantidad de muestra en comparación con el hemocultivo y con efectividad aun en los casos de pacientes con tratamiento antimicrobiano, lo que favorece el inicio oportuno de un tratamiento antimicrobiano específico.⁵

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), se emplea para la amplificación de secuencias conservadas de los genes bacterianos del ácido ribonucleico ribosomal (rRNA) 16S, 23S y las regiones intermedias entre ambos. En la actualidad, la PCR se usa en el diagnóstico de bacterias específicas de forma individual o para la búsqueda masiva de un grupo de microorganismos, que suelen detectarse con muy baja frecuencia o cuando se presume conocido el agente causal.^{6,7,8,9} La prueba de LightCycler® SeptiFast (Roche Diagnostics) es un ensayo multiplex de PCR en tiempo real que se basa en el uso de sondas específicas que permiten detectar e identificar el DNA de 25 microorganismos, con distinción de Gram positivos, Gram negativos y hongos, que representan 90% de las especies aisladas en pacientes sépticos.⁵ Con el uso de esta técnica se han mejorado los porcentajes de detección de bacterias causantes de enfermedades como endocarditis infecciosa, sepsis en pacientes neutropénicos con neoplasias hematológicas, bacteriemias, fungemias y sepsis neonatal.¹⁰⁻¹⁷

CASO CLÍNICO 1

Paciente femenino de 17 meses de edad, admitida en la Unidad de Cuidados Intensivos con diagnóstico de choque séptico de origen abdominal secundario a reconexión intestinal con entero-entero anastomosis y adherensiolisis

con aislamiento en sangre de *Klebsiella pneumoniae*. Desde su admisión, la paciente estuvo hospitalizada durante cuatro meses, tiempo en el que recibió cuatro esquemas antimicrobianos: meropenem por el aislamiento de *K. pneumoniae*, cefotaxima teicoplanina sin aislamientos, caspofungina por aislamiento de *Candida parapsilosis* y meropenem, vancomicina y caspofungina sin aislamientos. En este último episodio la paciente tuvo fiebre y alteraciones persistentes en los resultados de los análisis de laboratorio (leucopenia y trombocitopenia), los cultivos fueron negativos en tres ocasiones, motivo por el que después de 23 días de tratamiento antimicrobiano y con la paciente sin mejoría, se solicitó como alternativa la prueba de SeptiFast con una muestra de 1.5 mL de sangre del catéter permanente (Broviack, colocado dos meses atrás) y 1 mL de sangre periférica. De la primera muestra se identificó material genético de *Candida parapsilosis* y *Klebsiella pneumoniae/oxytoca*, por lo que el catéter fue retirado, con una respuesta adecuada de la paciente, que egresó una vez resuelta la infección.

CASO CLÍNICO 2

Paciente masculino de 16 días de edad, admitido desde su nacimiento en el servicio de lactantes por dificultad respiratoria y enterocolitis necrosante. Recibió tratamiento por tres días con ampicilina más amikacina y por 10 días con vancomicina y cefotaxima. A las 72 horas de la suspensión del tratamiento antimicrobiano inició con fiebre, distensión abdominal, leucopenia y plaquetopenia, por lo que se reinició el tratamiento con cefotaxima más vancomicina durante cinco días sin mejoría, con persistencia de fiebre, leucopenia, trombocitopenia y una determinación de proteína C reactiva de 50 mg/dL. Los cultivos de sangre, orina y líquido cefalorraquídeo fueron reportados negativos. A los nuevos cultivos se añadió la prueba de SeptiFast en un mililitro de sangre periférica, en la que se identificó *Candida parapsilosis* como agente causal. El tratamiento fue cambiado a anfotericina B deoxicícolato con mejoría a las 24 horas. A los 10 días de realizado, el cultivo de sangre periférica reportó crecimiento de *Candida parapsilosis*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la prueba de SeptiFast, el DNA se extrajo de una muestra de 1 mL de sangre total con anticoagulante EDTA tomada del paciente con la técnica de hemocultivo.

La muestra fue lisada de forma mecánica con el equipo MagNA Lyser (Roche). Posteriormente se utilizó el kit SeptiFast Prep® M^{GRADE} y se incubaron las muestras a 56°C con proteasa y un tampón de lisis caotrópico para liberar y proteger al DNA de las enzimas contra DNA. En este momento se agregó a cada muestra un volumen definido de Control Interno. Después se adicionó a las muestras un tampón de unión y se transfirió la solución a una columna de fibra de vidrio donde el DNA genómico humano, bacteriano y fúngico fueron retenidos, el resto del material se eliminó mediante un par de lavados. Al final se eluyeron los ácidos nucléicos en 300 µL de solución y el material obtenido se utilizó para la reacción de amplificación.

Reacción de amplificación. Se utilizó el kit LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE}, para lo que se prepararon las mezclas de reacción que contenían la enzima Taq polimerasa y primers/sondas específicas para la detección de microorganismos Gram positivos, Gram negativos y hongos. Se agregaron las muestras procesadas con las mezclas de reacción en los capilares de LightCycler® (100 µL) M^{GRADE}, donde la reacción de amplificación (PCR) se realizó con el equipo LightCycler® 2.0 (Roche).

Ánalisis de detección de los amplicones amplificados. Después de finalizar la PCR se generaron los análisis de la curva de fusión de los controles y las muestras amplificadas. Este análisis fue de forma automática con el software de identificación especial (SeptiFast Identification Software) y se generó un reporte de los resultados obtenidos.

DISCUSIÓN

La detección temprana de los microorganismos con una técnica basada en la identificación de ácidos nucléicos asegurará el uso rápido y apropiado de antimicrobianos, lo que disminuye la mortalidad. La detección rápida del agente causal de una infección es muy importante en el tratamiento correcto de los pacientes.⁴

Las ventajas de la prueba de SeptiFast se han evaluado en diversos estudios, que establecen niveles de concordancia con los hemocultivos de hasta 89%. Los casos reportados describen el rol de la prueba como auxiliar en el tratamiento correcto de los pacientes, al considerar que el porcentaje de aislamiento para *Klebsiella* sp y *Candida* sp en nuestro hospital es bajo,¹⁸ lo que explica porque no se incluyen en el modelo de tratamiento empírico primario.

De forma indirecta, la identificación temprana y simultánea de *Candida parapsilosis* en dos pacientes por métodos de biología molecular, disparó la alerta epidemiológica que evitó su diseminación a otros pacientes; el resultado tardío del cultivo positivo en un caso y el resultado negativo del otro no hubieran permitido tomar acciones de forma oportuna. En ambos casos, los cultivos de sangre no fueron una herramienta útil. Recientemente, la prueba se incluyó en protocolos de investigación en diferentes instituciones del mundo, aunque la prueba es relativamente desconocida en México.

REFERENCIAS

1. Reyna FJ, Richardson LCV, Vidal VP. De las definiciones, las vacunas y la identificación del paciente séptico en pediatría. *Rev Panam Salud Pública* 2010;27:469-470.
2. Goldstein B, Giroir B, Randolph A, et al. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 2005;6(1):2-8.
3. Reyna-Figueroa J, Toala Yuri E, Ortiz Ibarra IFJ, Rodríguez Ramírez E, Limón Rojas AE. Disparidad en los criterios para incluir pacientes con sepsis neonatal en estudios médicos científicos. ¿Nadamos en un mar sin límites? *An Pediatr (Barc)* 2006;65(6):536-540.
4. Reyna-Figueroa J, Ortiz Ibarra FJ, Navarro Godínez S, Pérez Antonio B. Recién nacidos pretérmino con sepsis nosocomial: comparación de dos consensos y una escala clínica, utilizados en la identificación de sepsis mediante un estudio de evaluación de pruebas diagnósticas. *Rev Enfer Infec Pediatr* 2008;22(85):18-23.
5. Emrich T, Moczko M, Lohmann S, et al. LightCycler SeptiFast Test. Roche Molecular Diagnostics, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany.
6. Tenover F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen P, Murray B, Persing D. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33(9):2233-2239.
7. Kost GJ, Tran NK, Louie RF, et al. Rapid diagnosis of sepsis: point of care testing, nucleic acid testing, and the value model. *J Near Patient Test Technol* 2003;2:163-171.
8. Louie RF, Tang Z, Albertson TE, et al. Multiplex polymerase chain reaction detection enhancement of bacteremia and fungemia. *Crit Care Med* 2008;36:1487-1492.
9. Lisby G, Westh H. Evaluation of SeptiFast-a new commercially available broad-range real-time PCR assay for detection of bacteria and fungi in blood. Presented at the 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; April 2006; Nice, France.
10. Mancini N, Clerici D, Diotti R, Perotti M, Ghidoli N, De Marco D, et al. Molecular diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignancies. *J Med Microbiol* 57(5):601-604.

11. Steinmann J, Buer J, Rath P-M, Paul A, Saner F. Invasive aspergillosis in two liver transplant recipients: diagnosis by SeptiFast. *Transpl Infect Dis* 2009;11(2):175-178.
12. Varani S, Stanzani M, Nardi L, Paolucci M, Vianelli N, Bacca-rani M, et al. Comparison of real-time PCR and blood culture for the diagnosis of bloodstream infections in onco-haemato-logic patients: microbiological and clinical assessment: *Clinical Microbiology & Infection* 2007;13(suppl 1):S393.
13. Reyna J, Ortiz J, Morales I. Use of the LighCycler SeptiFast Test for Rapid Etiologic Diagnosis of Nosocomial Infection in Gynecological Sepsis. *Gynecol Obstet Invest* 2010;70:215-216.
14. Treviño-Valdez PD, Reyna-Figueroa J, Ortiz-Ibarra FJ, Mo-rales-Méndez. Detección de *Streptococcus pneumoniae* por medio de la tecnología LighCycler SeptiFast®: Reporte de un caso. Abstract del 28º Congreso Interamericano de Infec-tología Pediátrica, Zacatecas, Zacatecas Noviembre 2009
15. Molina JM, Córdoba J, Ramírez P, Gobernado M. Detec-ción automática de bacterias y hongos en sangre. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26(Supl 9):75-80.
16. Vince A, Lepej SZ, Barsic B, et al. Light Cycler SeptiFast assay as a tool for the rapid diagnosis of sepsis in patients during antimicrobial therapy. *jmm.sgmjournals.org* DOI 10.1099/jmm.0.47797-0 G 2008 S:1306-1307.
17. Paolucci M, Capretti MG, Dal Monte P, et al. Labora-tory diagnosis of late-onset sepsis in newborns by multi-plex real-time PCR. *jmm.sgmjournals.org* DOI 10.1099/jmm.0.003848-0 G 2009:533-534
18. Limón RAE, Reyna FJ, Majano RG, Dominguez SF, Wakida KW. Frecuencia de infección sistémica relacio-nada a catéteres venosos no permanentes en pacientes pediátricos de un hospital de tercer nivel de Petróleos Mexicanos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 2005;25