Diagnóstico molecular rápido en pacientes críticos

El pasado 21 de noviembre de 2019 se realizó la Jornada de Diagnóstico Molecular Rápido en Pacientes Críticos en el Hotel Sheraton de Punta Carretas Montevideo, Uruguay.

La iniciativa tuvo figuras de enorme relevancia del extranjero y colegas de nuestro ambiente. Los invitados extranjeros fueron los Dres. Carlos Senne de Brasil y Rolando Soloaga de Argentina. Los representantes por Uruguay integraron un panel de expertos coordinado por la Prof. Agregada de Laboratorio del Hospital de Clínicas Dra. Anna Barindelli e integrado por el Profesor Dr. Alberto Biestro, la Profesora Dra. Raquel Ballesté, el Profesor Agregado Dr Gastón Burghi, Profesor Agdo. Dr Julio Blanco y la Profesora Adjunta Dra. Soledad Mateos.

El objetivo de la Jornada fue lograr una instancia de carácter multidisciplinario en la cual se expusiera el interés en la realización del Diagnóstico Molecular rápido en Pacientes Críticos, con un enfoque particular hacia las Neuroinfecciones (Meningitis y Encefalitis), Neumonías, Bacteriemias y Diarreas.

A continuación, documentos gráficos del evento y un resumen de las ponencias del Dr. Rolando Soloaga y las conclusiones del Panel de Expertos

Exposición del Dr. Rolando Soloaga

Distintas publicaciones han demostrado que el tratamiento inicial adecuado de los pacientes con sepsis se asocia con una reducción significativa en la mortalidad, esto se aplica tanto a bacilos gram negativos como a cocos gram positivos y a levaduras (Kumar, Chest 2009, 136:1237-1248).

Otros autores como Morreli, M (Antimicrob Ag Chemother 49, 2005) también encontraron que la demora en instaurar un tratamiento antifúngico adecuado más allá de las 12 h se asociaba con un incremento en la mortalidad.

Tabah y col (Intensive Care Med 2012) en un estudio que involucró a 162 terapias intensivas de 24 países y a 1156 pacientes hallaron que 48% de las cepas eran multiresistentes, 20% tenían resistencia extrema y 0,4% eran pan-resistentes. Solo 53% de los pacientes recibían terapia inicial adecuada o dentro de las 24 h de tomar los hemocultivos. La mortalidad global fue del 36%.

Kumar, A y col (Crit Care Med 2006) estudiando una población de pacientes con shock séptico, demostraron que, si bien el porcentaje acumulado de tratamiento adecuado a las 36 h era de casi el 100%, el porcentaje acumulado de sobrevida en ese momento era muy bajo; la mortalidad se incrementaba 7,6% por hora desde el momento cero del shock séptico en pacientes con sin terapia antimicrobiana efectiva.

El uso optimizado de la Biología Molecular se centra en una estrategia basada en síndromes tratando de detectar la mayor cantidad posible de microorganismos/mecanismos de resistencia involucrados en el cuadro clínico por medio de PCR múltiple.

Esto puede aplicarse a distintos tipo de infecciones como ser Bacteriemias y Sepsis, Meningitis, Infecciones Respiratorias y a Diarreas.

Bacteriemias y Sepsis

Dentro de los sistemas de diagnóstico por biología molecular validados por la FDA se encuentran el de FilmArray (FA) (Biofire-Biomerieux) y el de Verigene (Nanosphere).

Microorganismos/mecanismos detectados por el panel de hemocultivos de FilmArray (FA): S.aureus, Staphylococcus spp, Enterococcus spp, S.pyogenes, S.agalactiae, S.pneumoniae, L.monocytogenes, N.meningitidis, H.influenzae, P.aeruginosa, Acinetobacter baumannii, E.coli, Klebsiela pneumoniae/oxytoca, E.cloace, Proteus spp, S.marcescens, Enterobacteriaceae, C.albicans, C.tropicalis, C.krusei, C.glabrata, C.parapsilosis y los mecanismos de resistencia mecA/C, KPC, y VanA/B.

Altun,O y col (J Clin Microbiol 51, 2013) usaron el sistema FA para identificar 167 aislamientos monomicrobianos de hemocultivos con frascos de Bact-Alert FA plus aerobic, Bact-Alert PF plus pediatric, Bact-Alert FN plus anaerobic para levaduras, bacterias y anaerobios y de Bactec Mycosis ICF para levaduras y otros hongos y encontraron 91,6% de identificación correcta global en 1 h. Las fallas se producían con gérmenes ambientales que no estaban en la base de datos (muchos eran contaminantes) pero si se analizan los microorganismos incluidos en la base de datos y de importancia clínica los valores trepan al 100% de sensibilidad y especificidad para gram negativos y a 96,7% de sensibilidad y 93,7% de especificidad para gram positivos (excepto para enterococos y estreptococos viridans aproximadamente 90% de S y 97-100% de especificidad) y además en 3,6% de los casos se detectaba un germen adicional al documentado por el cultivo. Cuando los cultivos eran polimicrobianos FA detectaba al 71% en tanto que la sensibilidad fue del 96% y la especificidad del 99%.

A. Zheng,X y col (J Clin Microbiol 52, 2014) estudiaron la utilidad del panel de sepsis de FilmArray en una población pediátrica y compararon los resultados directos con la identificación por MicroScan y resolvieron las discrepancias por Malditof o por secuenciacion de 16sRNA; sobre188 microorganismos de 138 pacientes, un total de 122 eran gram positivos y 116 estaban en la base de datos y 112 (96,6%) eran identificados correctamente y la detección de meticilino resistencia en 86 cepas de Staphylococcus fue correcta en el 100%.

Por otro lado, sobre 58 cepas de bacilos gram negativos, 52 estaban en la base de datos y el sistema identificó correctamente al 96% (50/52) como así también a 6/8 cepas de levaduras y perdió solo 1 Candida lusitaneae y C.albicans en un cultivo mixto con enterococos. Los organismos no detectados eran contaminantes (gram positivos) o causas muy infrecuentes de bacteriemia en gram negativos (Hafnia alvei, Stenotrophomonas maltophilia, Haemophilus parainfluenzae, Prevotella, Capnocytophaga

La identificación rápida a partir de hemocultivos positivos puede realizarse por medio de Malditof, lo que lleva a la pregunta de si estos sistemas de PCR múltiple son necesarios en un hospital que cuenta con espectrometría de masa. Fiori, B y col (J Clin Microbiol December 2015) sugirieron un protocolo para el uso combinado de ambos equipos y establecieron que la utilidad de FA se centraba en aquellos casos donde en la coloración de Gram de los hemocultivos se veía etiología polimicrobiana o en los que Malditof no llegaba a un resultado.

Por otra parte, FA también detecta la presencia de ciertos mecanismos de resistencia (mecA/C, KPC, vanA/B) y puede ser aplicado en forma directa con sus respectivos paneles a otro tipo de muestras (LCR, materia fecal, hisopados nasofaríngeos). En esta publicación sobre 1585 microorganismos aislados de hemocultivos, 97,7% (88% para mezcla de gram positivos y gram negativos y 98% para gram negativos solos) de los episodios fueron identificadas por el algoritmo Malditof + FA; Malditof identificaba 82% de las bacteriemias monomicrobianas y FA incrementaba la identificación en 15%.

Por otro lado, 343/362 (94%) de aislamientos polimicrobianos eran identificados por FA, en cambio Malditof solo identificaba 1 microorganismo en 56% de 171 cultivos polimicrobianos y perdía principalmente Candida spp. De los gérmenes que no estan en la base de datos de FA o solo como género, Malditof identificaba a 73% de S.capitis, 79% de S.hominis, 84% de S.haemolyticus, 89% de S.epidermidis, 77% S.anginosus, 95% E.faecalis y 94% E.faecium. FA identificaba correctamente a 19/19 KPC y a 103/121 estafilococos meticilino resistentes.

El impacto clínico de estos resultados fue evaluado en pocos trabajos. Banerjee,R y col (Clin Infect Dis July 2015) demostraron que con los resultados obtenidos por FA e incorporados a un programa de antimicrobial stewardship y comparados con los del grupo control (sin FA), que no solo el tiempo desde la coloración de Gram a la identificación del microorganismo era significativamente menor (1,3 h vs 22,3 h respectivamente, p<0,001) sino que además conducía al incremento en el uso apropiado de cefazolina o nafcilina (p:0,035), reducción significativa del tratamiento de contaminantes o tratamiento por <24 h (p:0,015), disminución del uso innecesario de vancomicina (p:0,032) y disminución del tiempo de vancomicina para el tratamiento de bacteriemias por S.aureus meticilino sensible (22 vs 11,8 h; p:0,02) o a escalación (p:0,04) o desescalación más rápida a un antibiótico adecuado (p:0,015). Sin embargo, no hubo diferencias en la mortalidad.

Pardo, J y col (Diagn Microbiol Infect Dis 84, 2016) realizaron un trabajo con FA con el objetivo de evaluar el impacto clínico y económico del panel BCID incorporado a un programa de Antimicrobial Stewardship (ASP) para pacientes con bacteriemia por gram positivos y candidemias e incluyeron a 84 pacientes en el grupo de FA y 252 en el grupo control histórico (sin FA). La identificación y sensibilidad final se hacía por Vitek 2 y por API para Candida spp. Encontraron, con FA, una diferencia significativa en la reducción del tiempo de tratamiento con vancomicina de las infecciones por S.aureus meticilino sensibles y del tratamiento con vancomicina y del tiempo de estadia de los pacientes con SCN contaminantes y a tratamiento

adecuado de las infecciones por enterococos resistentes a glicopéptidos más temprano. No había diferencia en el tiempo de tratamiento adecuado de S.aureus meticilino resistentes o en las candidemias.

Infecciones Respiratorias

Existen varios paneles comerciales de PCR múltiple validados por la FDA que incluyen a FilmArray, e-Sensor y a Luminex. Todos ellos están dirigidos principalmente a la detección de agentes virales, solo FilmArray incluye a B.pertussis, C.pneumoniae y a M.pneumoniae. En comparación a coloraciones fluorescentes y a detección de antígenos virales han demostrado un incrmento significativo en la detección de infecciones virales mono y polimicrobianas.

Poritz y col compararon DFA con FilmArray y encontraron una reducción significativa de resultados negativos con este último así como un incremento en la detección de casi todos los agentes virales. El panel respiratorio de FilmArray fue validado por la FDA para trabajar con hisopados nasofaríngeos en forma directa. La base de datos incluye además de los tres agentes bacterianos mencionados a adenovirus, virus sicicial respiratorio, influenza (A /H1, A/H1 2009, A/H3), influenza B, metapneumovirus, parainfluenza [1,2,3,4], coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) y enterovirus/rinovirus.

En otro trabajo, Rand y col (J Clin Microbiol 2011) compararon cultivo/detección de antígenos virales con Luminex y con FilmArray y encontraron que las dos PCR comerciales detectaban 40-50% más de virus y a su vez FilmArray detectaba más virus en forma global y sincicial respiratorio en particular que Luminex (la preparación con este lleva 5-6 h porque requiere previa extracción de DNA vs 2-3 min con FilmArray que no la requiere). Marcone, D y col (Rev Arg Microbiol 2014) también encontraron que con el panel respiratorio de FA en las infecciones respiratorias agudas se documentaba en forma significativa mayor cantidad e virus que con la inmunofluorescencia y también mayor cantidad de co-infecciones.

Rogers y col encontraron que el uso de FilmArray llevaba a que el médico tuviera el resultado cuando el paciente todavía estaba en la emergencia y esto podía conducir a la decisión de aislarlo (individual o en cohorte dependiendo del hospital) y evitar la diseminación de un agente viral dentro del hospital; también demostraron reducción en el uso de antibióticos y en la estadia hospitalaria.

Diarreas

La mayoría de las diarreas son autolimitadas y por otra parte solo ciertos casos/microorganismos requerirán un tratamiento antimicrobiano específico, además el rendimiento del coprocultivo es muy bajo (alrededor del 20-30%); pese a todo lo señalado, la importancia epidemiológica de la documentación etiológica es indudable y además existen poblaciones donde el resultado puede tener alto impacto en el manejo del pacieente como ser diarrea con sangre (EHEC donde el antibiótico está contraindicado vs agentes potencialmente tratables con los mismos como Shigella, Salmonella, Yersinia spp, Campylobacter spp, E.hystolitica).

Otras situaciones donde se justifica ampliamente el diagnóstico son pacientes inmunocomprometidos, diarrea prolongada que no se autolimita, casos graves de diarrea aguda en pacientes desnutridos o muy deshidratados, diarrea del viajero, brotes epidémicos en comunidades cerradas donde se agrega un tema legal (hoteles, restaurantes, cruceros, hospitales, guarderías, etc.).

El rendimiento del diagnóstico puede ser elevado a 70-80% por medio de diferentes PCRs múltiples. El panel de FilmArray para PCR múltiple (Biofire-Biomerieux) incluye: Salmonella, Shigella, Campylobacter spp (C.jejuni, C.coli, C.upsaliensis), E.coli enteroagregativo, E.coli enteroinvasivo, E.coli enterotoxigénico, E.coli enterohemorrágico, E.coli enteropatógeno, Yersinia enterocolitica, V.cholerae, Vibrio spp (V.paraheomolyticus, V.vulnificus), C,difficile,

adenovirus 40/41, astrovirus, sapovirus, rotavirus A, norovirus, Giardia lamblia, Cryptosporidium, Entamoeba histolytica, Ciclospora cayetanensis.

Todos estos microorganismos son detectados directamente a partir de materia fecal en un solo panel, con un tiempo de preparación de la muestra directa de cerca de 3 min y sin necesidad de tener habitaciones separadas ni preparadas especialmente.

En un estudio multicéntrico europeo (10 países), Spina y Col (Clin Microbiol Infect, 2016) analizaron 709 casos de diarrea con FilmArray y se compararon con las técnicas convencionales del laboratorio. La PCR múltiple detectó un enteropatógeno en 54% vs 18% de los métodos convencionales (p: 0,01). Del total de positivos 30% eran coinfecciones lo que demuestra la importancia de la estrategia basada en la búsqueda de múltiples targets en vez de la dirigida hacia uno en particular.

En otro estudio, Buss,S y col (J Clin Microbiol 2015), encontraron con el panel de FilmArray sobre 1556 muestras de materia fecal una sensibilidad del 100% para 12/22 gérmenes y de >94% para otros 7, el resto no pudo ser analizado por el bajo número aislado. La especificidad fue de >97%. Khare,R y col (J Clin Microbiol 2015) compararon FilmArray, Luminex con las técnicas convencionales de laboratorio y hallaron sobre 500 muestras de materia fecal una positividad de 28% para FilmArray, 20% para Luminex y 8% para las técnicas convencionales). La detección de co-infecciones fue del 21% con FilmArray y del 13% con Luminex.

En el caso de C.difficile, la European Society of Clinical Microbiology (ESCMID) recomienda un diagnóstico en 2 pasos basado en un test inicial de screening con alto valor predictivo negativo y luego un test confirmatorio para detectar la presencia de toxinas. En el paso inicial de screening puede usarse a la detección de glutamato deshidrogenasa o a la amplificación de ácidos nucleicos (NAATs) para la detección de genes que codifican para las toxinas, ambos pueden excluir confiablemente a pacientes sin infección por C.diffficile. La detección de glutamato deshidrogenasa tiene una sensibilidad asociada de >90%. Actualmente diferentes técnicas de NAAts (ej PCR) para la detección de los genes que codifican para las toxinas se encuentran disponibles comercialmente como fuera mencionado. Su sensibilidad es mayor a la de EIA para la detección de genes asociados a toxinas y en algunos estudios incluso mayor que los métodos de referencia. La sensibilidad se encuentra en alrededor del 92-93% y la especificidad en 94-95%. Sin embargo, hay que recordar que no detectan la presencia de toxina en materia fecal (requisito indispensable para el diagnóstico) y por lo tanto no diferencian pacientes sintomáticos de asintomáticos. Esta diferenciación es crítica dada la portación asintomática que puede ocurrir en pacientes hospitalizados, en geriátricos o centros de cuidados de la salud especialmente en los de >65 años; a esto hay sumarle el hecho de que si bien en teoría se parte de heces líquidas o sea pacientes con diarrea, en las poblaciones mencionadas la misma podría deberse a laxantes o a otros patógenos como norvirus. Además la colonización con C.difficile puede ser protectora contra el desarrollo de enfermedad (aunque siguen siendo reservorios para su diseminación) y la colonización puede perdurar por 1-4 semanas luego que desaparecieron los síntomas.

Todos estos hechos demuestran la dificultad en interpretar un resultado positivo de NAATs usado como única técnica en un paciente luego de una primera infección o en poblaciones con alta colonización y la posibilidad de llevar a tratamientos innecesarios y los problemas inherentes a los mismos. Stockman y col (Clin Microbiol Infect 2015) estudiaron la utilidad de una PCR múltiple (FilmArray) en el diagnóstico de C.difficile y de otros enteropatógenos y encontraron sobre 378 episodios de diarrea una positividad de 65% con Film Array en comparación a 46% con técnicas convencionales (p<0,001). La sensibilidad con FA fue del 95% y la especificidad del 99%. Lo interesante fue que en pacientes a los que solo se les pedía C.difficile se encontraba un patógeno alternativo en 29% (12% eran norvirus) que hubieran ido a un tratamiento innecesario con vancomicina o metronidazol si solo se hubiera pensado en el primero. A los pacientes a los que se les pedía C.difficile más otros test se documentaba un enteropatógeno en 57% y a los que no se les pedía C.difficile se encontraba un enteropatógeno en 64% incluyendo un 8% de C.difficile. Esto nuevamente demuestra la ventaja de la estrategia basada en la búsqueda de múltiples targets sobre la dirigida a uno solo".

Conclusiones del Panel de Expertos

1. **Se consideró de enorme interés poder disponer de un diagnóstico molecular para conocer la etiología de las enfermedades infecciosas.**
2. **Asimismo, se reconoce el enorme desafío de poder hacer una correcta indicación del estudio (FilmArray), en virtud de las cifras de resultados negativos y así optimizar la utilización de la herramienta.**
3. **Se consideró de forma conjunta que la respuesta asistencial debe ser en la modalidad de Urgencia, las 24 hs del día los 365 días del año**
4. **Se propone la utilización de un algoritmo para la indicación del FilmArray en base a:**
   - **Características del Estudio Citoquímico del LCR.**
   - **Valor de Lactato en LCR.**
   - **Aspectos Clínicos y Epidemiológicos específicos del paciente.**