

PCR multiplex en tiempo real para sepsis (Film array): caracterización como método diagnóstico en un centro pediátrico en Cali

Real-time multiplex PCR for sepsis (Film array): characterization as a diagnostic method in a pediatric center in Cali

Maria Eugenia Cuastumal^{1,2}, Maria Isabel Rodríguez^{1,2}, Luis Fernando Mejía Rivera^{1,2}, José Gómez Urrego^{1,2}

RESUMEN

Introducción: La sepsis es una condición que genera alta morbilidad y mortalidad en donde la detección temprana de los microorganismos causantes es esencial para un manejo oportuno. **Objetivo:** determinar la frecuencia de detección y tipificación de los microorganismos por el PCR multiplex (Film Array) en pacientes pediátricos (menores de 18 años) ingresados al servicio de urgencias con el diagnóstico confirmado de sepsis. **Materiales y Métodos:** Se realizó un estudio observacional descriptivo retrospectivo. Fueron analizados los paneles positivos de hemocultivos de pacientes menores de 18 años, con diagnóstico de sepsis, por medio de la tecnología PCR multiplex (Film Array) en el Hospital Clínica Infantil Club Noel. Los resultados fueron comparados. Los datos fueron analizados con Microsoft Excel, empleando estadísticas descriptivas. **Resultados:** De 101 hemocultivos positivos, el panel molecular Film Array detectó el 92 (91%). Hubo predominio de sepsis con puerta de entrada respiratoria y menores de 3 años de edad. Los gérmenes más frecuentemente detectados fueron los gram negativos tanto en el hemocultivo como en el panel molecular. **Conclusiones:** los hallazgos en cuanto a detección de bacteriemia, en nuestra población por PCR multiplex en tiempo real demuestran su capacidad de detección y su importancia en el diagnóstico temprano y tratamiento oportuno.

Palabras clave: Bacteriemia, sepsis, pediatría, reacción en cadena polimerasa, diagnóstico.

ABSTRACT

Introduction: Sepsis is a condition that generates high morbidity and mortality: The early detection of the causative microorganisms is essential for timely management. **Objective:** to determine the frequency of detection and typing of microorganisms by multiplex PCR (Film Array) in pediatric patients (under 18 years of age) admitted to the emergency department with a confirmed diagnosis of sepsis. **Materials and Methods:** This was a retrospective, descriptive and observational study. Positive blood culture panels of patients under 18 years of age, diagnosed with sepsis, were analyzed using multiplex PCR technology (Film Array) at the Hospital Clínica Infantil Club Noel. The results were compared. The data was analyzed with Microsoft Excel, using descriptive statistics. **Results:** Of 101 positive blood cultures, the Film Array molecular panel detected 92 (91%). There was a predominance of sepsis from a respiratory source and children under 3 years of age. The most frequently detected germs were gram-negative organisms, both in the blood culture and in the molecular panel. **Conclusions:** the findings regarding the detection of bacteremia in our population, using multiplex real-time PCR, demonstrate its detection ability and its importance in early diagnosis and timely treatment.

Key words: Bacteremia, sepsis, pediatrics, polymerase chain reaction, diagnosis.

¹Universidad Libre seccional Cali. Grupo de Investigación en Pediatría (GRINPED). Cali, Colombia.


²Fundación Infantil Club Noel de Cali. Cali, Colombia.

Correspondencia: Maria Eugenia Cuastumal. Correo: mar.cuastumal@gmail.com

Conflicto de interés: Los autores declaran no poseer conflicto de interés.

Recibido: 14/12/19 **Aceptado:** 11/06/2020

Doi: <https://doi.org/10.31698/ped.47022020006>

 Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una Licencia Creative Commons CC-BY 4.0

INTRODUCCIÓN

La sepsis es un síndrome caracterizado por anormalidades fisiológicas, patológicas y bioquímicas que se producen como respuesta a una infección^(1,2,3). Es una condición que genera alta morbilidad y mortalidad en donde la detección temprana de los microorganismos causantes es esencial para un manejo oportuno.

El diagnóstico rápido del agente causal de las bacteriemias, ha constituido un reto continuo para la microbiología y la medicina, las cuales buscan un tratamiento antimicrobiano dirigido en beneficio de la vida del paciente^(4,5).

Los hemocultivos siguen siendo el Gold estándar para el diagnóstico de las Infecciones del torrente sanguíneo en niños⁽⁶⁾ ya que confirma el diagnóstico de bacteriemia, el cual requiere aislamiento de patógenos para identificación definitiva y susceptibilidad antimicrobiano. Este proceso puede durar hasta 72 horas o más, lo que causa retraso en el diagnóstico^(6,7).

Actualmente se han desarrollado una variedad de técnicas moleculares para la detección de patógenos⁽⁸⁾ como la Reacción en cadena polimerasa multiplex en tiempo real para sepsis; Este método fue diseñado para la detección de 24 patógenos y 3 genes de resistencia a antibióticos asociados con infecciones del torrente sanguíneo; Con sólo una prueba se puede identificar patógenos en 9 de cada 10 hemocultivos positivos, lo cual permiten tipificar de forma rápida los microorganismos y dar así un manejo dirigido^(7,8).

El objetivo del presente estudio fue determinar la frecuencia de detección y tipificación de los microorganismos por el PCR multiplex (Film Array) en pacientes pediátricos (menores de 18 años) ingresados al servicio de urgencias con el diagnóstico confirmado de sepsis por hemocultivo.

MATERIALES Y METODOS

Se realizó un estudio observacional descriptivo retrospectivo, de corte transversal. Se revisaron los paneles de sepsis PCR multiplex (Film Array) de

pacientes pediátricos ingresados en el servicio de urgencias y terapia intensiva pediátrica, de la fundación Infantil Club Noel de Cali con sospecha de sepsis, en el periodo comprendido entre diciembre 01 del 2016 a marzo 31 del 2019 y cuyos resultados fueron positivos tanto el panel molecular como los hemocultivos.

Se excluyeron los reportes que carecían de datos demográficos del paciente.

Se comparó los resultados del hemocultivo con el del Film Array. Se determinó la prueba simultánea de bacterias, virus, levaduras, parásitos y genes resistentes a los antimicrobianos. El panel detecta 24 patógenos, y 3 genes de resistencia mecA-resistencia a Meticilina; vana/B - resistencia a Vancomicina y KPC - resistencia a carbapenémicos de los patógenos contenidos en la muestra de hemocultivos positivos

Las variables estudiadas fueron edad, sexo, procedencia, diagnósticos principales, tipo de gérmenes aislados, antibioticoterapia y la mortalidad.

Técnica del PCR multiplex (Film Array): es un sistema de amplificación, detección y análisis del material genérico de una variedad de microorganismos con certificación de la Food and Drug Administration (FDA), cuya técnica es rápida y los resultados pueden estar disponible entre 1 y 2 horas.

El presente trabajo fue presentado y aprobado por el comité de ética institucional, respetando los principios de ética de la investigación.

El análisis de los datos se realizó con el programa Excel 2016. La edad se presenta en porcentajes de grupos etarios y mediana con rangos intercuartílicos. Las variables cualitativas en porcentajes.

RESULTADOS

Se revisaron 111 paneles positivos para sepsis de pacientes pediátricos menores de 18 años, que ingresaron durante el periodo de estudio.. Se

excluyeron 10 del estudio porque presentaban datos demográficos incompletos. La edad mediana de los pacientes fue de 26 meses (IQR 11 - 95,5 meses) Otros datos demográficos de los pacientes incluidos se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características demográficas de los pacientes con panel molecular para sepsis positivo.

Edad en meses	N (%)
0-3	10 (9,9)
3.1- 36	51(50.9)
36.1 -72	7 (6.9)
72.1-142	16 (15.9)
142.1-214	17(16.9)
AREA	
Urbano	90 (89.9)
Rural	11(10.9)
SEXO	
Femenino	40 (39.6)
Masculino	61(60.3)
Total	101 (101)

En la tabla 2 se observan las patologías de los pacientes participantes

Tabla 2. características clínicas y paraclínicas de los pacientes atendidos en hospital infantil club Noel.

PATOLOGIA	N (%)
Patología respiratoria	46 (45.5)
Bronquiolitis grave con coinfección	12 (11.8)
Neumología grave	17 (16.8)
Otras causas	17(16.8)
Patología renal	7 (6.9)
Síndrome nefrótico	4(3.9)
Infección urinaria	2(1.9)
Falla renal crónica	1(0.9)
Patología de tejidos blandos y ósea	11 (10.8)
Celulitis aguda	7(6.9)
Artritis séptica	2(1.9)
Miositis	2 (1.9)
Encefalitis autoinmune	1(0.9)
Meningitis	3(1.9)
Enfermedad diarreica aguda	5(4.9)
Peritonitis primaria	4(3.9)
Fiebre entérica	1 (0.9)
Sepsis origen abdominal	9(8.9)
Nefritis lupica	3(2.9)
Artritis idiopática juvenil	1(0.9)
Crisis convulsiva febril	3 (2.9)
Diabetes insípida	2(1.9)
Desnutricion aguda	2(0.9)
Síndrome de choque toxico	1(0.9)
Purpura trombocitopenia autoinmune	1 (0.9)
Varicela	1(0.9)

La comparación de los resultados del hemocultivo con el Panel Film Array se encuentra en la tabla 3.

Tabla 3. Hallazgos del Film array respecto a los hemocultivos. N=101

Microorganismos	Hemocultivo	PCR Film Array
	N (%)	N (%)
Gram positivos	39 (38.6)	38 (37,6)
Gram negativos	52(51.5)	45 (44,5)
Hongos	10(9.9)	9 (8,9)
Total	101 (100)	92

La tipificación de los gérmenes se observa en la Tabla 4.

Tabla 4. Tipificación de microorganismos de film array en relación a hemocultivo.

Gérmenes	Hemocultivo	PCR Film Array
	N (%)	N(%)
	101	101
Gérmenes Gram Positivos aislados	39 (38.6)	38 (37.6)
<i>Estafilococo aureus</i>	28(71.7)	28(71.7)
SARM	23 (82.2)	23 (82.2)
SAMS	5(17.8)	5(17.8)
<i>Stafilococo Epidermidis</i>	2 (40)	2 (40)
<i>Stafilococo Capitis</i>	1(20)	1(20)
<i>Stafilococo hominis</i>	2(40)	2(40)
<i>Streptococcus</i>	10 (25.6)	10 (25.6)
<i>streptococcus pneumoniae</i>	7(70)	7(17.9)
<i>streptococo piogenes</i>	3 (30)	3(7.6)
<i>leuconostoc lactis</i>	1(2.5)	Nd
Gérmenes gram negativos aislados	52 (51.5)	45(44.5)
<i>Klebsiella oxitoca</i>	1(1.9)	1(1.9)
<i>Salmonella tity</i>	5(9.6)	5(9.6)
<i>E. Coli</i>	7(13.4)	7(13.4)
<i>klebsiella pneumoniae</i>	15 (28.8)	14(28.8)
<i>serratia marcescens</i>	1(1.9)	1(1.9)
<i>pseudomonas aeruginosa</i>	4(7.6)	4(7.6)
<i>Acinetobacter baumani</i>	3(5.7)	2(3.8)
<i>Enterobacteriaceae enterobacter cloacae</i>	3(5.7)	3(5.7)
<i>complex</i>	4(7.6)	4(7.6)
<i>Acinetobacter</i>	2(3.8)	2(3.8)
<i>Neisseria meningitidis</i>	2(3.8)	2(3.8)
<i>Pseudomonas putidas</i>	1(1.9)	Nd
<i>Morganella morgani</i>	1(1.9)	Nd
<i>Salmonella arizona</i>	1(1.9)	Nd
<i>Pseudomonas luteola ampc</i>	1(1.9)	Nd
<i>Burkholderia cepacia complejo</i>	1(1.9)	Nd
Hongos	10(9.9)	9(8.9)
<i>Candida tropicalis</i>	2(20)	2(20)
<i>Candida parasilopsis</i>	8(80)	7(70)

Abreviaturas:
SARM: stafilococo meticilino resistente
SAMS: Stafilococco meticilino sensible
Nd: no detectado

DISCUSIÓN

En el presente estudio el panel molecular detecto en un porcentaje similar a los encontrado en otros reportes, entre 90 a 100% dependiendo de la capacidad del Film Array^(9,10,11). La capacidad de tener los resultados de los gérmenes responsables de las infecciones en poco tiempo con el panel molecular Film Array en relación al hemocultivo, permite tomar decisiones terapéuticas tempranas y con un target microbiano definido^(12,13).

En cuanto a los microorganismos aislados correspondieron a bacterias de predominio gram negativos en comparación a gram positivos y hongos, siendo este hallazgo esperable puesto que estas constituyen la mayor etiología de la sepsis y bacteriemia en la población pediátrica sobre todo en los lactantes que representan la mayor población de nuestro estudio. También se podría relacionar a condiciones médicas asociados, comorbilidades y factores de riesgo asociados teniendo en cuenta que el estudio se hizo tanto de pacientes de urgencia y unidad de cuidado intensivo pediátrico en donde el uso de catéteres, la estancia prolongada, la resistencia antibiótica que representa factores de riesgo para la invasión de bacterias gram negativas; Esto refleja la importancia de este método en el diagnóstico oportuno para las enterobacterias las cuales representan altas tasas de mortalidad^(11,13,14).

En cuanto a enterobacterias más comunes se encontró a *klebsiella pneumoniae* en mayor porcentaje que los observados en otros estudios como el realizado por la Universidad de Jordán donde solo se presentó en el 7.4 % en población ligeramente diferente a la del presente estudio, en el que se incluyó a lactantes en mayor proporción y la

patología respiratoria fue predominante frente a la gastrointestinal del citado estudio⁽¹⁵⁾.

Entre las bacterias Gram positivas cabe resaltar como *streptococo pneumoniae* solo se presentó en proporción menor al *stafilococcus aureus*. Estos resultados son diferentes a lo reportado en otro estudio en el que encontraron una prevalencia entre el 30 y el 50% como responsable de neumonías y bacteriemia.⁽¹⁶⁾

La fungemia se observó en escaso porcentaje en el presente estudio. La mayoría fueron detectados con el Film array. Otros estudios como el realizado por Pauloci et al, encontró una capacidad de detección del 91%⁽¹⁷⁾. Es muy importante la capacidad de detección de este método en fungemia asociado a coinfecciones, teniendo en cuenta que los métodos diagnósticos para fungemia no son altamente sensibles ni tienen buen rendimiento diagnóstico⁽¹⁸⁾.

Algo de destacar en este estudio la importancia de este método a la hora de tomar una decisión sobre cobertura antibiótica. Un tratamiento antibiótico dirigido y oportuno puede ayudar a disminuir la resistencia microbiana.

Los casos con hemocultivo positivos en los que no hubo detección por la nueva tecnología film array, podría deberse a alteración en la cantidad y calidad de la muestra y/o las características metabólicas de los diferentes microorganismos.

La mortalidad en el presente estudio fue baja.

En cuanto a las limitaciones, al ser una nueva tecnología diagnóstica, lleva poco tiempo de implementación. El escaso número de muestras no permite generalizar los resultados a otras poblaciones.

REFERENCIAS

1. NICE. Sepsis: recognition, diagnosis and early management [Internet]. NICE; 2016 [citado 2.junio.2019]. Disponible en: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng51>
2. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 2016;315(8):801-810. doi: <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>

3. Baique-Sánchez PM. Sepsis en pediatría: nuevos conceptos. *An. Fac. med.* 2017;78(3):333-342. doi: <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v78i3.13769>
4. Sánchez HJL, Parra OI, Hernández SC, Pichardo VL, Cruz LA, Villanueva GD, et al. Evaluación de una prueba de PCR múltiple para la identificación del ADN bacteriano y fúngico en el diagnóstico de sepsis neonatal. *Rev Mex Patol Clin Med Lab.* 2018;65(3):167-174.
5. López-Fabal MF, Gómez-Garcés JL, López Lomba M, Ruiz Bastián M. Valoración de una técnica de PCR-múltiple en el diagnóstico rápido de la bacteriemia [Evaluation of a PCR-multiplex technique for the rapid diagnosis of bacteriemia]. *Rev Esp Quimioter.* 2018;31(3):263-267.
6. Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, Pizzorno B, Putignani L, Bernaschi P, Menichella D. 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. doi: <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.02460-10>
7. Dien Bard J, McElvania TeKippe E. Diagnosis of Bloodstream Infections in Children. *J Clin Microbiol.* 2016;54(6):1418-1424. doi: <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.02919-15>
8. Liesenfeld O, Lehman L, Hunfeld KP, Kost G. Molecular diagnosis of sepsis: New aspects and recent developments. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 2014;4(1):1-25. doi: <https://dx.doi.org/10.1556/EuJMI.4.2014.1.1>
9. Fiori B, D'Inzeo T, Giaquinto A, Menchinelli G, Liotti FM, de Maio F, et al. 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(3):576-84. doi: <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.02590-15>
10. 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: <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.01835-13>
11. Phoooblall M, Nkwanyana F, Mlisana KP. Evaluation of the BioFire® FilmArray® Blood Culture Identification Panel on positive blood cultures in a regional hospital laboratory in KwaZulu-Natal. *Afr J Lab Med.* 2016;5(1):411. Mdoi: <https://dx.doi.org/10.4102/ajlm.v5i1.411>
12. Salimnia H, Fairfax MR, Lephart PR, Schreckenberger P, Desjarlais SM, Johnson JK, et al. Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification Panel: Results of a Multicenter Controlled Trial. *J Clin Microbiol.* 2016;54(3):687-698. doi: <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.01679-15>
13. Levy I, Leibovici L, Drucker M, Samra Z, Konisberger H, Ashkenazi S. A prospective study of Gram-negative bacteremia in children. *Pediatr Infect Dis J.* 1996;15(2):117-122. doi: <https://doi.org/10.1097/00006454-199602000-00006>
14. Babay HA, Twum-Danso K, Kambal AM, Al-Otaibi FE. Bloodstream infections in pediatric patients. *Saudi Med J.* 2005;26(10):1555-1561.
15. Nimri LF, Rawashdeh M, Meqdam MM. Bacteremia in children: etiologic agents, focal sites, and risk factors. *J Trop Pediatr.* 2001;47(6):356-360. doi: <https://dx.doi.org/10.1093/tropej/47.6.356>
16. Nagalingam NA, Adesiyun AA, Swanston WH, Bartholomew M. A cross-sectional study of isolates from sputum samples from bacterial pneumonia patients in Trinidad. *Braz J Infect Dis.* 2005;9(3):231-240. doi: <https://doi.org/10.1590/S1413-86702005000300006>
17. Paolucci M, Foschi C, Tamburini MV, Ambretti S, Lazzarotto T, Landini MP. Comparison between MALDI-TOF MS and FilmArray Blood Culture Identification panel for rapid identification of yeast from positive blood culture. *J Microbiol Methods.* 2014;104:92-93. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.06.018>
18. Lazo V, Hernández G, Méndez R. Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. *Horiz. Med.* 2018;18(1):75-85. doi: <http://dx.doi.org/10.24265/horizmed.2018.v18n1.11>