



Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

Elsevier hereby grants permission to make all its COVID-19-related research that is available on the COVID-19 resource centre - including this research content - immediately available in PubMed Central and other publicly funded repositories, such as the WHO COVID database with rights for unrestricted research re-use and analyses in any form or by any means with acknowledgement of the original source. These permissions are granted for free by Elsevier for as long as the COVID-19 resource centre remains active.

# Detección automática de bacterias y hongos en sangre

José Miguel Molina<sup>a</sup>, Juan Córdoba<sup>a</sup>, Paula Ramírez<sup>b</sup> y Miguel Gobernado<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Microbiología. Hospital La Fe. Valencia. España.

<sup>b</sup>Servicio de Cuidados Intensivos. Hospital La Fe. Valencia. España.

La sepsis es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en los hospitales. La detección temprana de los patógenos mediante técnicas basadas en ácidos nucleicos puede facilitar el diagnóstico rápido de la bacteriemia y/o fungemia, la rápida adecuación del tratamiento antibiótico, reducir el uso de antibióticos innecesarios y disminuir la mortalidad. Se describen 2 técnicas disponibles comercialmente que ayudan, en un tiempo reducido, a identificar distintas bacterias y hongos productores de sepsis: LightCycler® SeptiFast Test Mgrade (Roche Diagnostic SL) y GenoType Blood Culture (Hain Lifescience). De estas 2 técnicas, mostramos los resultados de un estudio inicial propio con el LightCycler® SeptiFast Test Mgrade. El estudio se realizó con 50 muestras correspondientes a 28 pacientes (1-3 muestras por paciente) con síndrome séptico ingresados en la unidad de cuidados intensivos, comparando la nueva técnica con el hemocultivo convencional. La concordancia entre los resultados del hemocultivo y el SeptiFast fue buena, 79% en el primer ensayo, y 89% en el segundo, después de corregir defectos técnicos. Inicialmente se observó inhibición importante de los controles internos para los bacilos gramnegativos, por la presencia de heparina en la sangre empleada y un exceso de ácido desoxirribonucleico (ADN) debido al número de leucocitos. Con la finalidad de disminuir las inhibiciones, en otro estudio posterior se trabajó con 24 muestras a la mitad de volumen original, llevando el ácido nucleico extraído a dilución 1:4. Con estas modificaciones, se apreciaron reducciones importantes de las inhibiciones. En comparación con el hemocultivo, el SeptiFast diferencia mejor las contaminaciones por estafilococos coagulasa-negativa y especies de estreptococos.

**Palabras clave:** Sepsis. Hemocultivo. SeptiFast. Biología molecular. Técnicas basadas en ácidos nucleicos. LightCycler.

Automatic detection of bacterial and fungal infections in blood

Sepsis is one of the main causes of mortality and morbidity in hospitals. Early detection of pathogens using nucleic acid-based techniques speeds diagnosis of bacteremia and/or fungemia, aids the rapid application of appropriate antibiotics, reduces the use of unnecessary antibiotics, and lowers mortality. Two commercially available techniques that help to identify different sepsis-producing bacteria and fungi in a shorter time period are: LightCycler® SeptiFast Test Mgrade (Roche Diagnostic SL) and GenoType Blood Culture (Hain Lifescience). We present the results of an initial in-house study using the LightCycler® SeptiFast Test Mgrade. The study was carried out in 50 samples from 28 patients (1-3 samples per patient) with septic syndrome admitted to the intensive care unit by comparing the new technique with conventional blood culture. The concordance between the results of blood culture and SeptiFast was good, 79%, in the first trial and 89% in the second, after correcting for technical defects. We initially observed substantial inhibition of internal controls in Gram-negative bacilli, due to the presence of heparin in the blood used, and excess DNA because of the high number of leucocytes. To minimize these inhibitions, the second study used 24 samples at half the original volume (extracted DNA at 1/4 concentration). With these modifications, inhibitions were substantially reduced. SeptiFast is more effective than blood culture in discriminating between contamination by coagulase-negative staphylococci and species of streptococci.

**Key words:** Sepsis. Blood culture. SeptiFast. Molecular biology. Nucleic acid-based techniques. LightCycler.

## Introducción

La sepsis grave (disfunción de algún órgano inducida por la sepsis o hipoperfusión tisular) y el *shock* séptico (hipotensión a pesar de una correcta reposición de fluidos), son procesos frecuentes que afectan a millones de pacientes en el mundo, con elevada mortalidad, del 22-40%, dependiendo de los pacientes estudiados, su gravedad y los distintos países, y con importante repercusión en el consumo de recursos sanitarios<sup>1-7</sup>. En 3 hospitales españoles que atienden una población de más de medio millón de personas, se estimó que la incidencia anual de sepsis era

Correspondencia: Dr. M. Gobernado.  
Servicio de Microbiología. Hospital La Fe.  
Avda. Campanar, 21. 46009 Valencia. España.  
Correo electrónico: gobernado\_mig@gva.es

de 33,3 casos/10.000 personas mayores de 18 años, el 29% de ellos graves<sup>8</sup>. Según el estudio ENVIN, realizado en las unidades de cuidados intensivos (UCI) españolas, el 27,7% de todas las infecciones de los pacientes admitidos en estas unidades cursaron con bacteriemia, de las cuales el 53% fueron primarias<sup>9</sup>. Por este motivo, los esfuerzos encaminados a realizar un diagnóstico etiológico temprano y un tratamiento apropiado de este tipo de síndrome tienen cada vez más difusión<sup>10</sup>. Los principales microorganismos que se detectan en las sepsis de las UCI son *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Candida* spp. y otros.

La identificación de una infección como el agente desencadenante de la respuesta inflamatoria no ofrece en ocasiones grandes dificultades; sin embargo, los pacientes cuyo sustrato patológico puede justificar la aparición de una respuesta inflamatoria de origen no infeccioso son cada vez más frecuentes. Por eso, es importante determinar la causa desencadenante. Se han usado diversos tipos de marcadores inflamatorios para intentar identificar la etiología de la inflamación<sup>11,12</sup>. La procalcitonina, péptido sintetizado a partir del gen CALC-I situado en el cromosoma, ha obtenido resultados notables, y en los últimos años ha despertado gran interés por su papel como mediador secundario en el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS). La procalcitonina ayuda a distinguir la sepsis de otras causas de SRIS, a detectar infección bacteriana invasora en los niños con fiebre sin foco, a diferenciar entre infección y rechazo agudo en pacientes receptores de trasplantes, y a valorar la presencia de infección en pacientes intervenidos con cirugía mayor, sepsis en el caso de la pancreatitis aguda y enfermedades autoinmunitarias<sup>13-16</sup>. Pero la falta de sensibilidad y especificidad de la prueba en el análisis de otras poblaciones más heterogéneas, ha abierto las puertas al uso de sistemas automáticos de detección múltiple, que analicen diversos biomarcadores y, por tanto, tipifiquen la respuesta inflamatoria en función de su origen<sup>17</sup>.

El diagnóstico etiológico de la sepsis es un elemento primordial para elegir el tratamiento antibiótico, modificar el tratamiento empírico, retirar fármacos innecesarios y para conocerla desde un punto de vista epidemiológico. Los métodos microbiológicos tradicionales mediante cultivo están limitados por la inherente dificultad en identificar algunos patógenos, por la interferencia que el uso de antibióticos supone al cultivo de los microorganismos y por el tiempo que requieren, que determina una demora en ocasiones poco práctica<sup>18</sup>. Por este motivo, hoy día, la biología molecular es necesaria también en este campo.

## Sepsis y técnicas basadas en ácidos nucleicos

La aplicación de las técnicas basadas en ácidos nucleicos (TBAN) al diagnóstico sindrómico de la sepsis, como entidad global, es un campo todavía en fase de investigación preliminar<sup>19,20</sup>. Pero es indiscutible la utilidad que tienen las TBAN para determinados microorganismos en la práctica clínica. En los grandes hospitales, entran en prácticas habituales, como la detección de bacterias difi-

ciles de cultivar, la detección y la cuantificación de virus en poblaciones diana, la confirmación diagnóstica ante resultados previos poco concluyentes y la investigación de genes determinantes de resistencia a los antimicrobianos. La detección temprana de los patógenos causantes de las sepsis puede facilitar el diagnóstico rápido de la bacteriemia y/o fungemia. Por eso, es una prioridad investigar la utilidad de las TBAN en el diagnóstico de la sepsis, ya que ésta es una de las causas principales de mortalidad y morbilidad en los hospitales, teniendo en cuenta que un tratamiento adecuado con antibióticos y el inicio rápido del tratamiento son factores críticos para reducir la mortalidad y la morbilidad asociadas a ella, así como para disminuir el coste sanitario<sup>21-26</sup>.

El hemocultivo tradicional suele tardar un mínimo de 48 h en identificar los patógenos bacterianos/fúngicos, así como las resistencias bacterianas asociadas a los antibióticos a partir de los cultivos de sangre<sup>27</sup>. Desde hace varios años, son muchos los estudios llevados a cabo para detectar la presencia de agentes patógenos en sangre, la mayor parte para microorganismos específicos y de manera individual<sup>28</sup>, y muy pocos para una detección múltiple en las bacteriemias en las cuales los causantes pueden ser varios patógenos, como es el caso de las sepsis<sup>29,30</sup>. En este campo, en la actualidad disponemos, fundamentalmente, de 2 técnicas, homologadas y aprobadas por las agencias reguladoras, que nos ofrecen formas distintas de enfocar el estudio de los microorganismos (bacterias/hongos) productores de sepsis en tiempo corto, mediante TBAN: LightCycler® SeptiFast Test M<sup>grade</sup> (Roche Diagnostic GMBH, Mannheim, Alemania) y GenoType Blood Culture (Hain Lifescience, Nehren, Alemania).

## LightCycler® SeptiFast Test M<sup>grade</sup>

LightCycler® SeptiFast Test M<sup>grade</sup> es una prueba de amplificación de ácidos nucleicos in vitro, que puede detectar ADN bacteriano y fúngico de 25 especies distintas de microorganismos (tabla 1) en muestras de sangre humana recogida con anticoagulante K-EDTA. Se ha desarrollado en Alemania, y es la primera prueba basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección múltiple de patógenos causantes de sepsis. La CE Mark (Conformitée Européenne) la aprobó en enero de 2006 para comercializarla en Europa. Está pensada para ayudar en el tratamiento de pacientes sospechosos de tener una sepsis u otras infecciones bacterianas y/o fúngicas, y se lleva a cabo en el equipo LightCycler® 2.0 en un período aproximado de 6 h. Se ha diseñado para detectar el 90% de los microorganismos presentes en las bacteriemias<sup>21,31</sup>. Mientras que los métodos microbiológicos clásicos detectan sólo microorganismos vivos, esta prueba detecta tanto los viables, como los no viables, además del ácido desoxirribonucleico (ADN) no microbiano de control. También permite detectar más de un microorganismo en una misma muestra.

La prueba consiste en una preparación de las muestras de sangre mediante lisis y purificación mecánica del ADN, que posteriormente se amplifica mediante la PCR en tiempo real. Realiza 3 reacciones paralelas, para bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas y hongos, y la detección mediante sondas de hibridación específi-

TABLA 1. Panel de microorganismos disponibles en el equipo LightCycler® SeptiFast Test Mgrade

| Gramnegativos                             | Grampositivos                                 | Hongos                       |
|---|---|------------------------------|
| <i>Klebsiella (pneumoniae / oxytoca)</i>  | Estafilococos coagulasa-negativa <sup>a</sup> | <i>Candida tropicalis</i>    |
| <i>Serratia marcescens</i>                | <i>Streptococcus pneumoniae</i>               | <i>Candida parapsilosis</i>  |
| <i>Enterobacter (cloacae / aerogenes)</i> | <i>Streptococcus spp.</i> <sup>b</sup>        | <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>       |   |                              |

<sup>a</sup>*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*.

<sup>b</sup>*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*.

cas. Al final del proceso, se hace una identificación automática de los resultados positivos y controles con el programa SIS (Sistema de Identificación del SeptiFast). La lisis mecánica se lleva a cabo mediante la prueba SeptiFastLys Kit M<sup>grade</sup> en el equipo MagNALyser. Con el SeptiFast Prep Kit M<sup>grade</sup> se incuban las muestras a una temperatura de 56 °C para lisis mecánica, liberando el ácido nucleico y protegiéndolo de ADNasas presentes en la sangre mediante una proteasa y tampón de lisis caotrópico. Durante este proceso, se introduce un volumen definido de control interno junto con el reactivo de lisis. El material lisado junto con un tampón de unión se añade a columnas de filtración, por lo que el ADN se adhiere a la superficie de fibra de vidrio de la columna. El resto de los componentes celulares se elimina mediante un lavado en 2 fases, y posteriormente se eluyen los ácidos nucleicos, con un tampón de elución a una temperatura elevada. Los eluidos se someten a PCR en tiempo real. La región objeto de amplificación es la ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Esta zona ofrece una sensibilidad analítica mayor que las copias de genes individuales, porque hay varios operones en los genomas de bacterias y hongos. Además, la región ITS es capaz de diferenciar de forma más específica microorganismos dentro de la misma especie que el ARN ribosómico, por lo que resulta más adecuada para diferenciarlos. Se halla situada entre las secuencias de ADN ribosómico 16S y 23S de todas las bacterias grampositivas y gramnegativas, y entre las secuencias de ARN ribosómico 18S y 5,8S de todos los hongos. La mezcla de reacción contiene amperasa (uracil-N-glucosilasa), enzima que reconoce y cataliza la destrucción de cadenas de ADN que contienen desoxiuridina, pero no las del ADN que contiene desoxitimidina y que actúa previo al proceso de PCR.

El amplicón se detecta mediante fluorescencia utilizando un par específico de sondas de hibridación. Estas sondas se hibridan a una secuencia interna del fragmento amplificado durante la fase de acoplamiento (*annealing*) del ciclo de amplificación. El equipo LightCycler 2.0<sup>®</sup> mide la emisión de fluorescencia en uno de los canales de detección existentes<sup>32,33</sup>. Una vez finalizada la amplificación, se genera un análisis de curva de fusión. La temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) depende de la longitud, la secuencia y el grado de homología entre la sonda y el ADN diana. Las sondas están diseñadas para diferenciar las cepas por su propia T<sub>m</sub>, detectada en cada canal. Estas T<sub>m</sub> de muestras y controles se analizan mediante el programa SIS, ya indicado, que genera un informe específico. Las concentraciones bajas de estafilococos coagulasa-

negativa y algunas especies de *Streptococcus*, que reflejan el intervalo de contaminaciones del flujo de trabajo, no se muestran como resultados. Adicionalmente, si se obtiene un resultado positivo de *Staphylococcus aureus*, se puede realizar, una prueba de resistencia a la meticilina por detección del gen *mecA*<sup>34</sup>.

## GenoType Blood Culture (Hain Lifescience)

La otra prueba, GenoType Blood Culture (Hain Lifescience), se basa en la tecnología ADN-STRIP y permite la identificación, a partir del hemocultivo positivo, de varias especies bacterianas (tabla 2). Se presenta en 2 equipos por separado: GenoType Blood Culture gramnegative y GenoType Blood Culture grampositive. El procedimiento consiste en 3 pasos: a) aislamiento del ADN desde un hemocultivo positivo; b) amplificación múltiple con cebadores marcados con biotina, y c) una hibridación reversa, en la que se lleva a cabo la desnaturalización química del producto amplificado, hibridación de los amplicones marcados con biotina a sondas unidas a membrana, lavado en condiciones restrictivas, adición de conjugado de fosfatasa alcalina/estreptavidina (AP), y una reacción de tinción por fosfatasa alcalina. La interpretación se realiza con la ayuda de una plantilla con la que se compara el esquema de bandas obtenido.

Para la extracción de ADN, se deposita una gota de un hemocultivo positivo en la tarjeta para muestras GENO-CARD<sup>®</sup>. Una vez seca, se puede conservar durante 3 meses protegida de la luz y a temperatura ambiente. Con la ayuda de un punzón especial, suministrado con el equipo, se presiona sobre la gota seca en la tarjeta, y se obtiene un disco que se deposita en el tubo de amplificación, el cual previamente se ha rellenado con la mezcla de reacción de PCR, y posteriormente se debe descontaminar el punzón. Después de la reacción de PCR, se procede a la hibridación mediante el procedimiento descrito anteriormente<sup>35</sup>.

La gran aportación de las TBAN al diagnóstico de la sepsis radica en la rapidez en la obtención del resultado frente a las técnicas clásicas. En este sentido, LightCycler<sup>®</sup> SeptiFast Test M<sup>grade</sup> presenta ventajas sobre GenoType Blood Culture, ya que para este segundo procedimiento es necesario obtener previamente un hemocultivo positivo, lo que supone un tiempo extra en la obtención del resultado. Además, este método no incorpora un panel para hongos, lo que reduce la posibilidad de un diagnóstico múltiple. Al comparar las 2 tablas indicadas has-

TABLA 2. Panel de microorganismos disponibles en el panel presentado por los equipos GenoType Blood Culture

| Gramnegativos                               | Grampositivos  |
|---|--|
| <i>Acinetobacter baumannii</i>              | <i>Streptococcus anginosus / constellatus / intermedius / mutans / sanguis</i> |
| <i>Citrobacter freundii / koseri</i>        | <i>Streptococcus mitis / oralis</i>  |
| <i>Enterobacter agglomerans</i>             | <i>Streptococcus pyogenes</i>  |
| <i>Enterobacter (cloacae / aerogenes)</i>   | <i>Streptococcus agalactiae</i>  |
| <i>Enterobacter intermedium</i>             | <i>Streptococcus disgalactiae</i> sp. <i>equisimilis</i>                       |
| <i>Escherichia coli / Shigella</i> spp.     | <i>Streptococcus bovis</i>   |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>                | <i>Streptococcus pneumoniae</i>  |
| <i>Klebsiella oxytoca</i>                   | <i>Staphylococcus aureus</i>   |
| <i>Haemophilus influenzae</i>               | <i>Staphylococcus haemolyticus</i>   |
| <i>Haemophilus parainfluenzae</i>           | <i>Staphylococcus epidermidis</i>  |
| <i>Proteus mirabilis</i>                    | <i>Staphylococcus hominis</i>  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>               | <i>Staphylococcus warnerii</i>   |
| <i>Salmonella enteritidis / typhimurium</i> | <i>Staphylococcus aureus</i>   |
| <i>Serratia marcescens</i>                  | <i>Enterococcus faecalis</i>   |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>         | <i>Enterococcus faecium</i>  |
|   | <i>Enterococcus gallinarum</i>   |
|   | <i>Enterococcus casseli-flavus</i>   |

ta ahora (tablas 1 y 2), se puede apreciar que hay microorganismos que no están presentes en alguna de las 2 técnicas, con lo que se podrían combinar para obtener un resultado más completo.

## Experiencia con el LightCycler® SeptiFast Test M<sup>grade</sup>

De estas 2 técnicas, nosotros tenemos experiencia con LightCycler® SeptiFast Test M<sup>grade</sup>. Recientemente, realizamos un estudio en 50 muestras de sangre pertenecientes a 28 pacientes con sepsis, ingresados en la UCI, tomando de cada paciente entre una y 3 muestras. Se detectaron bacterias tanto grampositivas como gramnegativas y ningún hongo. Al comparar los resultados del hemocultivo tradicional con los de SeptiFast, en las 37 muestras de las que tuvimos resultados para ambas técnicas, encontramos coincidencia en 17 casos; en 11, el hemocultivo fue positivo para estafilococos coagulasa-negativa, y fue negativo para SeptiFast; en un caso, el hemocultivo fue positivo para estafilococos coagulasa-negativa, y positivo para *Escherichia coli* por SeptiFast; en 2, el hemocultivo dio un resultado positivo mixto no incluido en el panel de SeptiFast (*Pseudomonas stutzeri*, *Candida famata*); y en 6 hubo discrepancia entre resultados positivos para el hemocultivo y SeptiFast (tabla 3). Por tanto, vemos bastante coincidencia entre los resultados del hemocultivo con los de la prueba SeptiFast (79%), ya que podemos considerar, a priori, como contaminación los estafilococos coagulasa-negativa que crecieron en el hemocultivo y que SeptiFast desestimó, dada su baja concentración.

En este primer ensayo, se trabajó con 3 ml de sangre a los que, durante el proceso de extracción de ácidos nucleicos, se añadieron 3 controles internos, uno para cada uno de los 3 grupos de microorganismos estudiados: grampositivos, gramnegativos y hongos. Al analizar las inhibiciones encontradas en estos controles, observamos

que la inhibición del control interno de los gramnegativos era importante, mientras que la de los grampositivos y hongos no. Estudiando la razón de estos casos de inhibición, pensamos 2 posibles causas: posibilidad de muestras heparinizadas (tomas hechas de vía), y concentraciones muy elevadas de leucocitos (> 13.000/ml), que inhibirían la acción de la polimerasa durante el proceso de la PCR. La primera es fácil de eliminar, evitando pinchar a los pacientes en la vía con heparina; y la segunda se soluciona disminuyendo la concentración de leucocitos, por ejemplo diluyendo la muestra. Con la finalidad de ver si la idea era correcta, realizamos otra prueba consistente en procesar 24 muestras con la mitad de volumen (1,5 ml), llevando el ácido nucleico extraído a dilución 1:4. El resultado de este estudio comparativo mostró que se pasaba a obtener del 75 al 100% de los resultados correctos sin inhibición. No obstante, hubo algún caso en el que el control interno no se inhibía en el ensayo sin dilución, mientras que sí lo hacía en el diluido, probablemente por un exceso de dilución. Esto nos indica que la dilución es útil, pero adecuándola a las circunstancias de cada paciente. En esta prueba, la coincidencia entre los resultados del hemocultivo con SeptiFast aumentó al 89%.

En este ensayo se detectaron los microorganismos siguientes: *P. mirabilis*, *A. baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae-aerogenes*, estafilococos coagulasa-negativa, *S. aureus*, *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. Al comparar los casos en los que tuvimos datos

TABLA 3. Resultados discrepantes entre el hemocultivo convencional y el SeptiFast

| Hemocultivo                    | SeptiFast                              |
|--------------------------------|--|
| Negativo (2 casos)             | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>          |
| Negativo                       | <i>Escherichia coli</i>                |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Negativo                               |
| <i>Serratia marcescens</i>     | Negativo                               |
| <i>Enterobacter cloacae</i>    | <i>Klebsiella pneumoniae / oxytoca</i> |

simultáneos de hemocultivo (17 casos), encontramos coincidencia en 8 casos, 7 en los que el hemocultivo detectó estafilococos coagulasa-negativa y SeptiFast fue negativo, y 2 en los que SeptiFast fue negativo, mientras que en el hemocultivo creció *Candida parapsilopsis* en uno, y *A. baumannii* en el otro. Las conclusiones de este pequeño estudio fueron que los inhibidores disminuyen con las diluciones, aunque hay que ajustarlas en cada caso; que hay buena concordancia entre los resultados del hemocultivo tradicional y SeptiFast, y que con SeptiFast se eliminan las contaminaciones debidas a estafilococos coagulasa-negativa, ya que el sistema cuantifica las concentraciones de esta bacteria y de *Streptococcus* spp., desestimando las bajas, a las que considera contaminantes. Para ajustar las diluciones, se analizó una muestra al azar (pacientes con y sin *shock* séptico) de 18 pacientes ingresados en la unidad de intensivos del Hospital La Fe de Valencia. La cantidad de muestra que se tomó fue de 1,5 ml sin diluir. Una réplica de estas 18 muestras se envió a Roche Diagnostics GMBH Penzberg Germany. Los resultados en los 2 laboratorios tuvieron una coincidencia del 100%, y todos fueron negativos, excepto un caso positivo de *P. aeruginosa*. No hubo inhibiciones en ninguno de los 2 laboratorios.

## Comentarios

La sepsis grave y el *shock* séptico son procesos que afectan a millones de pacientes en el mundo, con elevada mortalidad, dependiendo de los pacientes estudiados, su gravedad y los distintos países, con importante repercusión en el gasto sanitario. Se han usado diversos tipos de marcadores inflamatorios para intentar identificar la etiología de la inflamación, infecciosa o no, entre los cuales está la procalcitonina, un mediador en el SRIS que ayuda a distinguir la sepsis de otras causas. Pero la falta de sensibilidad y especificidad en poblaciones heterogéneas ha abierto las puertas al uso de sistemas automáticos de detección múltiple que analicen diversos biomarcadores y, por tanto, tipifiquen la respuesta inflamatoria en función de su origen. El diagnóstico etiológico rápido y específico de la sepsis infecciosa, que cursa con bacteriemia/fungemia, es importante para elegir el tratamiento antibiótico, modificar el tratamiento empírico, retirar fármacos innecesarios y para conocerla desde un punto de vista epidemiológico. El hemocultivo tradicional, método de referencia, suele tardar un mínimo de 48 h en identificar los patógenos. Las TBAN, y concretamente SeptiFast, tienen la posibilidad de detectar múltiples microorganismos y pueden contribuir al diagnóstico más rápido, con lo que se ganan 2-3 días, ya que informan de los resultados en menos de 6 h.

Lehmann et al<sup>34</sup> estudiaron la sensibilidad del SeptiFast en 20 experimentos independientes y obtuvieron, a una concentración de 3 UFC/ml, una tasa de aciertos del 100% para *Serratia marcescens*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* y *Aspergillus fumigatus*, y del 50% para *Enterobacter aerogenes*, y del 75% para *Candida glabrata*, a concentración de 30 UFC/ml. La comparación de los resultados con los de la microbiología convencional para 1.548 aislados clínicos dio una especificidad global del 98,8%, y una especificidad del 100% en 102 donantes de

sangre sanos. En nuestro estudio, todavía en progreso, pudimos apreciar un problema de inhibición inicial de los controles internos de los gramnegativos, que se solucionó usando menos cantidad de sangre, diluyendo el extraído y evitando, para la extracción de la sangre, la vía de los pacientes con heparina, conocimientos útiles para la práctica habitual futura.

Los resultados con el SeptiFast se pueden informar en una jornada de trabajo, por lo que es importante la organización del trabajo interno del laboratorio. En función de la hora de recepción de las muestras (a primera hora de la mañana, a media mañana o por la tarde y noche), hay que pensar en distintos turnos de trabajo, ya que la extracción manual con el equipo incorporado, máximo de 7 muestras, es un escollo importante, por su laboriosidad y el considerable tiempo para realizarla. Probablemente, con una extracción automática se mejoraría mucho la operatividad de la técnica, acortando los tiempos y evitando posibles errores humanos. Algo a tener en cuenta es la intervención minuciosa en la lectura de los resultados, para los 3 grupos de microorganismos, que requiere la participación activa del operador y que es determinante en la correcta interpretación final de los resultados por parte del programa SIS, que culmina generando el informe definitivo de la prueba.

Hay otros equipos comercializados para investigación (aún no tienen marcado CE) con finalidad parecida a la del SeptiFast. Uno de ellos es el VYOO de SIRSLab (Alemania), que identifica 40 especies de hongos y bacterias. Otro equipo, el SepsitTest de la empresa Molzym, tiene un concepto diferente, dado que amplifica de modo universal ADN de los genes del ARNr de 16S y 18S. Es muy probable que en el futuro la oferta y la diversidad de técnicas existentes sea mayor que la que existe en la actualidad.

## Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001;29:1303-10.
2. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med.* 2007;35:1244-50.
3. Linde-Zwirble WT, Angus DC. Severe sepsis epidemiology: sampling, selection, and society. *Crit Care.* 2004;8:222-6.
4. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003;348:1546-54.
5. Nin N, Lorente JA, Ortiz-Leyba C, Valenzuela F, Baigorri F, López Rodríguez A, et al; por la Red para el Estudio del Shock y la Sepsis (RESYS). Estudio multicéntrico sobre la asociación entre variables relacionadas con la resucitación y la mortalidad en sepsis grave. *Med Intensiva.* 2005;29:212-8.
6. Burchardi H, Schneider H. Economic aspects of severe sepsis: a review of intensive care unit costs, cost of illness and cost effectiveness of therapy. *Pharmacoeconomics.* 2004;22:793-813.
7. Iñigo J, Sendra JM, Díaz R, Bouza C, Sarria-Santamera A. Epidemiología y costes de la sepsis grave en Madrid: Estudio de altas hospitalarias *Med Intensiva.* 2006;30:197-203.
8. Esteban A, Frutos-Vivar F, Ferguson ND, Gordo F, Honrubia T, Peñuelas O, et al. Incidence and outcomes of sepsis in an health area from Madrid, Spain. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169:A846.
9. Álvarez-Lerma F, Palomar M, Olaechea P, Otal JJ, Insausti J, Cerdá E, y Grupo de Estudio de Vigilancia de Infección Nosocomial en UCI. Estudio Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial en Unidades de Cuidados Intensivos. Informe evolutivo de los años 2003-2005. *Med Intensiva.* 2007;31:6-17.

10. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med.* 2008;34:17-60.
11. Meisner M. Biomarkers of sepsis: clinically useful? *Curr Opin Crit Care.* 2005;11:473-80.
12. Mitaka C. Clinical laboratory differentiation of infectious versus non-infectious systemic inflammatory response syndrome. *Clin Chim Acta.* 2005;351:17-29.
13. Eberhard OK, Haubitz M, Brunkhorst FM, Kliem V, Koch KM, Brunkhorst R. Usefulness of procalcitonin for differentiation between activity of systemic autoimmune disease (systemic lupus erythematosus/systemic antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis) and invasive bacterial infection. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1250-6.
14. Hammer S, Meisner F, Dirschedl P, Hobel G, Fraunberger P, Meiser B, et al. Procalcitonin: a new marker for diagnosis of acute rejection and bacterial infection in patients after heart and lung transplantation. *Transpl Immunol.* 1998;6:235-41.
15. Rau B, Steinbach G, Gansauge F, Mayer JM, Grunert A, Beger HG. The potential role of procalcitonin and interleukin 8 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis. *Gut.* 1997;41:832-40.
16. Jones AE, Fiechtl JF, Brown MD, Ballew JJ, Kline JA. Procalcitonin test in the diagnosis of bacteremia: a meta-analysis. *Ann Emerg Med.* 2007;50:34-41.
17. Giamarellos-Bourboulis EJ, Giannopoulou P, Grecka P, Voros D, Mandragos K, Giamarellou H. Should procalcitonin be introduced in the diagnostic criteria for the systemic inflammatory response syndrome and sepsis? *J Crit Care.* 2004;19:152-7.
18. Tenover FC. Rapid detection and identification of bacterial pathogens using novel molecular technologies: infection control and beyond. *Clin Infect Dis.* 2007;44:418-23.
19. Davis BH. Improved diagnostic approaches to infection/sepsis detection. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5:193-207.
20. Yip TT, Cho WC, Cheng WW, Chan JWM, Ma VWS, Yip TT, et al. Application of ProteinChip array profiling in serum biomarker discovery for patients suffering from severe acute respiratory syndrome. *Methods Mo Biol.* 2007;382:313-31.
21. Suttorp N. Changing population and future trends in the management of serious infections. Disponible en: [www.infection.academy.org](http://www.infection.academy.org)
22. Peterson LR, Dalhoff A. Towards targeted prescribing: will the cure for antimicrobial resistance be sepecific, directed therapy through improved diagnostic testing? *J Antimicrob Chemother.* 2004;53:902-5.
23. Zhang WZ, Han TQ, Tang YQ, Zhang SD. Rapid detection of sepsis complicating acute necrotizing pancreatitis using polymerase chain reaction. *World J Gastroenterol.* 2001;7:289-92.
24. Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, Gagnon M, Vaillancourt M, Bernier M, et al. New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1875-84.
25. Poppert S, Essig A, Stoehr B, Steingruber A, Wirths B, Juretschko S, et al. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3390-7.
26. Makhoul IR, Smolkin T, Sujov P, Kassis I, Tamir A, Shalginov R, et al. PCR-based diagnosis of neonatal staphylococcal bacteremias. *J Clin Microbiol.* 2005;43:4823-5.
27. Kollef M, Sharpless L, Vlasnik J, Pasque C, Murphy D, Fraser VJ. Inadequate antimicrobial treatment of infections. *Chest.* 1999;115:462-74.
28. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:165-256.
29. Klaussegger A, Hell M, Berger A, Zinober 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;37:464-6.
30. Ruppenthal RD, Souza Pereira F, Cantarelli VV, Silveira Schrank I. Application of broad-range bacterial PCR amplification and direct sequencing on the diagnosis of neonatal sepsis. *Braz J Microbiol.* 2005;36:29-35.
31. Harbarth S, Garbino J, Pugin J, Romand JA, Lew D, Pittet D. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. *Am J Med.* 2003;115:529-35.
32. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22:299-305.
33. Emrich T, Moczko M, Lohmann S, Mayr J, Stockinger H, Haberhausen G. LightCycler® SeptiFast Test: rapid detection of nosocomial pathogens by real-time PCR. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Nice, France, April 1-4 2006. Abstract: p962.
34. Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoelt A, et al. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Medical Microbiology and Immunology.* Berlin/Heidelberg: Editor Springer; 2007. Published online: 16 november 2007.
35. Eigner U, Weizenegger M, Fahr AM, Witte W. Evaluation of a rapid direct assay for identification of bacteria and the *mecA* and *van* genes from positive testing blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5256-62.