



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Formación médica continuada: Métodos de diagnóstico rápido en Microbiología Clínica

Métodos de diagnóstico rápido en microbiología clínica: necesidades clínicas



Jordi Vila^{a,b,*}, María Dolores Gómez^c, Miguel Salavert^d y Jordi Bosch^{a,b}

^a ISGlobal, Barcelona Ctr. Int. Health Res. (CRESIB), Hospital Clínic - Universitat de Barcelona, Barcelona, España

^b Servicio de Microbiología, Centro de Diagnóstico Biomédico, Hospital Clínic, Barcelona, España

^c Servicio de Microbiología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, España

^d Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 16 de noviembre de 2016

Aceptado el 16 de noviembre de 2016

On-line el 16 de diciembre de 2016

Palabras clave:

Métodos

Diagnóstico microbiológico

Necesidades

Impacto

R E S U M E N

Los métodos para diagnosticar enfermedades infecciosas han de ser rápidos, precisos, sencillos y asequibles. La rapidez en el diagnóstico puede jugar un papel crucial en la curación del paciente, ya que permite la administración de un tratamiento adecuado. Un aspecto que condiciona cada vez más la necesidad de disponer de técnicas de diagnóstico rápido es el aumento de las tasas de infecciones graves causadas por bacterias resistentes a los antibióticos, lo que ocasiona una elevada probabilidad de error en el tratamiento antibiótico empírico. Algunos de los métodos convencionales, como la tinción de Gram o la detección de antígenos pueden generar resultados en menos de una hora pero adolecen de sensibilidad.

En la actualidad estamos asistiendo a un cambio importante en los laboratorios de microbiología clínica, en el que se incluyen avances tecnológicos tales como el diagnóstico molecular, la microbiología digital y las técnicas de espectrometría de masas. Existen diversos estudios que demuestran que dichos cambios en el diagnóstico microbiológico reducen el tiempo de generación de los resultados de las pruebas, lo cual posee un impacto clínico evidente.

Sin embargo, si miramos hacia el futuro, otras nuevas tecnologías están en el horizonte, las cuales permitirán cubrir las necesidades que se requieren en el diagnóstico microbiológico rápido. Esta revisión proporciona un análisis en profundidad del impacto clínico que la implementación de técnicas de diagnóstico rápido tendrá en las necesidades clínicas no satisfechas.

© 2016 Elsevier España, S.L.U.

y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Methods of rapid diagnosis in clinical microbiology: Clinical needs

A B S T R A C T

The diagnostic methods of infectious diseases should be fast, accurate, simple and affordable. The speed of diagnosis can play a crucial role in healing the patient, allowing the administration of appropriate antibiotic treatment. One aspect that increasingly determines the need for rapid diagnostic techniques is the increased rates of serious infections caused by multidrug resistant bacteria, which cause a high probability of error in the empirical treatment. Some of the conventional methods such as Gram staining or antigen detection can generate results in less than 1 hour but lack sensitivity.

Today we are witnessing a major change in clinical microbiology laboratories with the technological advances such as molecular diagnostics, digital microbiology and mass spectrometry. There are several studies showing that these changes in the microbiological diagnosis reduce the generation time of the test results, which has an obvious clinical impact.

However, if we look into the future, other new technologies which will cover the needs required for a rapid microbiological diagnosis are on the horizon. This review provides an in depth analysis of the clinical impact that the implementation of rapid diagnostic techniques will have on unmet clinical needs.

© 2016 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Keywords:

Methods

Microbiological diagnosis

Impact

Needs

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jvila@ub.edu (J. Vila).

Introducción

Actualmente el «trending topic» en el ámbito biomédico es la medicina personalizada, también denominada medicina de precisión, medicina estratificada y P4 (predictiva, personalizada, preventiva y práctica). Se entiende como tal utilizar el fármaco adecuado para la persona indicada en el momento oportuno. Si bien este concepto ha adquirido mayor relevancia en el área del cáncer, si consideramos todas las especialidades, podríamos decir que la microbiología clínica y concretamente el diagnóstico microbiológico es el paradigma de medicina personalizada. Se pueden utilizar varios métodos de diagnóstico que van desde los métodos directos, con la detección directa del microorganismo causante de la infección, como son la microscopía, los cultivos, la detección de genes específicos y la detección del antígeno a los métodos indirectos, como la serología, en la que se detectan los niveles de anticuerpos específicos contra antígenos concretos de los microorganismos. En líneas generales los métodos diagnósticos han de ser rápidos, precisos, sencillos y asequibles. Evidentemente, algunos de los métodos citados anteriormente, por ejemplo la tinción de Gram, detección de antígenos o detección génica, presentan varias de estas características. Sin embargo, los principales requisitos de un método de diagnóstico, son una elevada especificidad y sensibilidad. Otras propiedades colaterales interesantes, aunque no imprescindibles, serían la posibilidad de automatización y ser coste-efectivo.

Para algunas infecciones, un diagnóstico y tratamiento tempranos pueden tener un papel crucial en la curación del paciente o en reducir su morbimortalidad, ya que se administra un tratamiento antibiótico adecuado en el momento oportuno y necesario. Un aspecto que condiciona cada vez más la necesidad de disponer de técnicas de diagnóstico rápido es el aumento de la tasa de infecciones graves causadas por bacterias resistentes a los antibióticos, lo que ocasiona una alta probabilidad de error en el tratamiento empírico.

En la actualidad estamos asistiendo a un cambio importante en los laboratorios de microbiología clínica liderado por la automatización. Esta tendencia está apoyada por avances tecnológicos tales como el diagnóstico molecular, la microbiología digital y las técnicas de espectrometría de masas (MALDI-ToF y ESI-ToF). Estos avances abren la puerta a una mayor estandarización de los procesos y resultados, a un nuevo nivel de excelencia operativa y de rendimiento, así como una mayor eficiencia en el laboratorio. Existen diversos estudios que demuestran que dichos cambios en el diagnóstico microbiológico reducen el tiempo de generación de resultados de las pruebas, lo cual posee un impacto clínico evidente.

A pesar de que los laboratorios de microbiología clínica están implementando los muchos avances que están teniendo lugar en nuestro campo, si miramos hacia el futuro, otras nuevas tecnologías están en el horizonte, entre ellas la secuenciación de nueva generación (next-generation sequencing), que si bien a día de hoy solo se utiliza en algunos laboratorios es, sin duda alguna, una metodología a tener en cuenta, a medida que se vayan optimizando el tiempo de análisis bioinformático y su coste.

En esta revisión pretendemos analizar en detalle el impacto clínico que genera la implementación de técnicas de diagnóstico rápido y las necesidades clínicas no cubiertas.

Impacto clínico y necesidades del diagnóstico rápido

Sepsis

Es evidente el hecho de que un retraso en la instauración de un tratamiento antibiótico adecuado de la sepsis aumenta el riesgo de mortalidad¹. Hasta el advenimiento de pruebas de diagnóstico molecular, el hemocultivo era y sigue siendo el método

estándar para la detección rutinaria de bacterias y hongos patógenos en la sangre. Sin embargo, el hemocultivo tiene las limitaciones inherentes a la metodología entre las que cabe destacar fundamentalmente la demora de tiempo en la obtención de resultados. En la actualidad tanto la implementación del MALDI-ToF directo del hemocultivo positivo junto con la detección de ciertos genes de resistencia (fundamentalmente, el gen *mecA* y genes que codifican BLEES y carbapenemasas), así como las técnicas basadas en la PCR múltiple para la detección de los patógenos que con mayor frecuencia causan bacteriemia y sus determinantes de resistencia, han generado un importante impacto clínico y económico reduciendo el establecimiento del tratamiento adecuado hasta 46 horas²⁻⁵.

Generalmente la sepsis es tratada empíricamente, utilizando antibióticos de amplio espectro. Sin embargo, un antibiótico de amplio espectro no siempre es suficiente para el tratamiento ya que la resistencia a los antimicrobianos está aumentando. Los estudios han demostrado que cada hora de retraso en la implementación de un tratamiento eficaz en pacientes con sepsis conduce a un aumento de mortalidad de 7,6%¹. Las técnicas de diagnóstico molecular que detectan genes específicos directamente en la sangre producen resultados más rápidos que el hemocultivo pues eluden el tiempo de crecimiento antimicrobiano. Sin embargo, estas nuevas técnicas de diagnóstico poseen también sus limitaciones. La interpretación de los resultados es, a veces, complicada, dado el hecho de que estas pruebas moleculares detectan el ADN de los microorganismos más que a ellos mismos como patógenos vivos, además del riesgo de interferencia por contaminación, la presencia de ADN «de fondo» en sangre y de la carencia de un «gold standard» ideal⁶. Otra limitación es que los resultados de sensibilidad antimicrobiana no siempre se pueden proporcionar de forma simultánea. Por esta razón, tales técnicas tienden a ser vistas más como una herramienta potencialmente útil que complementa los hemocultivos convencionales que no como un método definitivo que eximiría de su práctica⁷. Por ello, el cultivo de la sangre sigue siendo la piedra angular para el diagnóstico de sepsis, ya que es un requisito previo para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos. La principal necesidad futura para el diagnóstico de la sepsis es identificar el microorganismo causante y, además, conocer la sensibilidad antibiótica directamente de sangre. Una prueba ideal debería ser capaz de procesar un pequeño volumen de sangre, ser rápida, técnicamente simple o automatizada, de bajo costo y que no requiriese procesamiento por lotes. Una ventaja adicional sería la posibilidad de poder determinar la carga bacteriana también directamente de la sangre. Los datos publicados indican que la determinación de la carga bacteriana en muestras clínicas mediante PCR cuantitativa (qPCR) representa potencialmente un marcador útil para la evaluación de la eficacia del tratamiento y el pronóstico en pacientes con infecciones bacterianas agudas⁸.

Las pruebas de diagnóstico basado en qPCR cuantitativa seguirán creciendo en los próximos años, sin embargo aparecerán nuevas técnicas, sobre todo basadas en la microfluídica y nanotecnología, que permitirán determinar la sensibilidad antibiótica directamente del microorganismo presente en la sangre sin tener que pasar por el hemocultivo.

Infecciones respiratorias

Hasta hace pocos años, al atender el tópico sobre diagnóstico rápido en infecciones respiratorias, muchos seguían pensando en las variadas tinciones directas de muestras del tracto respiratorio. Por una parte, estas técnicas clásicas nos permitían, y aún permiten, valorar la celularidad de la muestra, y con ello aproximarnos al valor clínico del aislado, y, por otra, distinguir la presencia de microorganismos considerados patógenos respiratorios típicos. Posteriormente se unieron a ellas las tinciones de inmunofluorescencia directa para el diagnóstico de las infecciones por *Legionella*

pneumophila e infecciones víricas. La llegada de las técnicas de inmunocromatografía supuso una nueva herramienta a incorporar al diagnóstico rápido de las infecciones respiratorias: *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*), antígenos en orina de *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) y de *Legionella*, virus respiratorio sincitial (VRS), adenovirus y virus de la gripe A y B⁹.

Aun así, en el caso de la neumonía adquirida en la comunidad, cerca de un 50% de las mismas carecen de diagnóstico etiológico definitivo, y se admite que aproximadamente otro 50% de las causas microbianas conocidas son por *S. pneumoniae*. Con ello, entre otras limitaciones, es difícil precisar cuál es el verdadero porcentaje e impacto de la neumonía «mixta» por dos o más patógenos, variable entre un 3-12% de las neumonías comunitarias según el potencial de diagnóstico microbiológico. En las infecciones respiratorias los signos y síntomas de distintos patógenos se superponen, por lo que un diagnóstico etiológico basado solo en la clínica no es fiable. El desarrollo de las técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) permite disponer ahora de técnicas moleculares que se pueden realizar directamente de la muestra e incluyen la posibilidad de determinar más de un patógeno respiratorio, como es el caso de las técnicas de PCR múltiples disponibles. Ello permite soslayar el ir descartando cada microorganismo siguiendo un algoritmo, lo que implica a su vez ir tomando repetidamente nuevas muestras e ir sumando nuevas pruebas diagnósticas.

La incorporación de técnicas rápidas de diagnóstico microbiológico se traduce en un beneficio para el paciente con síndrome infeccioso respiratorio, ya que permiten instaurar un tratamiento precoz y dirigido, y tomar medidas de aislamiento y de salud pública si fuesen necesarias. Sin embargo, en el posicionamiento de las pruebas rápidas no debe olvidarse que las técnicas moleculares y las de detección de antígeno no distinguen entre microorganismo viable y no viable (las antigenurias siguen siendo positivas incluso meses después del inicio de la infección), y no diferencian entre estado de portador y enfermedad, aspectos clave teniendo en cuenta que la mayoría de los patógenos respiratorios pueden encontrarse en los pacientes como simples colonizadores del tracto respiratorio. Estas limitaciones se podrían solventar parcialmente con técnicas cuantitativas moleculares y con la elección del gen a amplificar, siendo un ejemplo *S. pneumoniae* y el gen *lytA*¹⁰. Además, al no realizarse el cultivo queda ausente toda la información proporcionada por el mismo, como es la sensibilidad antibiótica o las variaciones de la composición antigénica para el desarrollo de nuevas vacunas.

Desconocemos todavía qué tipo de enfermos o qué factores (estacionalidad, estado inmunitario, edad, estadio y gravedad de la enfermedad) deben concurrir para que se aprovechen o beneficien de todas estas nuevas técnicas rápidas disponibles. Faltan estudios de evidencia sobre su repercusión en la práctica clínica¹¹. Y hasta entonces deberían aplicarse protocolos clínicos-microbiológicos para una correcta interpretación y valoración de los resultados¹².

Gastroenteritis / enterocolitis

La mayoría de los laboratorios de microbiología clínica siguen utilizando métodos de cultivo específicos, detección de antígenos y el examen microscópico para detectar bacterias, virus y parásitos en muestras de heces de pacientes con diarrea. El porcentaje de muestras en las que el enteropatógeno no se detecta puede ser muy alto, debido a varias razones: 1) no todos los enteropatógenos se buscan rutinariamente; por ejemplo, enteropatógenos con una baja prevalencia, como *Bacteroides fragilis*, *Edwardsiella tarda*, *Escherichia alberti*¹³; 2) la labilidad de algunos enteropatógenos tales como *Shigella*; 3) la baja sensibilidad del método utilizado para la detección de algunos enteropatógenos y, 4) enteropatógenos desconocidos.

Las técnicas moleculares se han introducido en el diagnóstico de rutina de la diarrea en varios laboratorios microbiológicos en

todo el mundo. En líneas generales estas técnicas se pueden agrupar en dos grupos¹⁴: 1) detección mediante PCR de uno o varios genes de un mismo microorganismo (ejemplo, detección de *Clostridium difficile*, o detección de norovirus) y 2) detección mediante PCR múltiple, para la detección concomitante de bacterias, virus y parásitos causantes de gastroenteritis. Una ventaja importante de los métodos moleculares es la automatización del flujo de trabajo de laboratorio. Los paneles moleculares disponibles en el mercado son sistemas que incluyen la extracción de la muestra, amplificación de dianas y la detección de los productos amplificados de una manera integrada. Estos métodos proporcionan ventajas adicionales tales como la velocidad (1-2 h), no necesitan de personal capacitado, un tiempo de manipulación mínimo y menor riesgo de contaminación. La principal limitación de estos sistemas integrados es su coste. Sin embargo, la incorporación de estos paneles podría ser rentable en ciertos pacientes con gastroenteritis o enterocolitis, como podrían ser aquellos inmunodeprimidos^{15,16}. Sin embargo, se necesitan más estudios para evaluar los costes y los beneficios de los paneles moleculares en otro tipo de pacientes con diarrea.

Una de las principales limitaciones relacionadas con estas técnicas es la incapacidad de distinguir entre la infección y la colonización o la detección de una carga de patógenos insignificante que pudiera estar relacionada, o no, con la clínica que presenta el paciente. Varios estudios han informado de que la cuantificación de la carga de enteropatógenos puede proporcionar información sobre el papel del enteropatógeno detectado como causa de la diarrea^{17,18}. Por lo tanto, se necesita un método más preciso para cuantificar los enteropatógenos presentes en las muestras de heces.

Por otra parte, todos los resultados microbiológicos deben interpretarse dentro de un contexto clínico. Además de la detección de una baja carga de enteropatógenos, se pueden obtener resultados falsos positivos debido a la detección de microorganismos no viables, ADN/ARN libres, o incluso debido a la amplificación no específica en la PCR múltiple.

La detección de resistencia a los antibióticos por métodos moleculares es otro problema difícil de resolver en el caso de muestras de heces, debido a la imposibilidad de asignar el marcador de resistencia detectada a un patógeno en particular. Por lo tanto, todavía debemos procesar la muestra de heces para aislar la bacteria y así poder llevar a cabo las pruebas de sensibilidad. Aunque dicho cultivo se podría realizar solo en aquellas muestras que dieran resultado positivo a algún patógeno bacteriano mediante PCR múltiple. Algunas preguntas aún deben ser contestadas, como por ejemplo: ¿Hay que utilizar las herramientas de diagnóstico molecular en todos los pacientes con diarrea o solo en grupos específicos de pacientes?; ¿pueden estas nuevas pruebas ser rentables en el caso de la diarrea de la comunidad?; ¿podemos diferenciar con precisión la infección de la colonización utilizando solo una aproximación molecular?

Meningitis y encefalitis

El diagnóstico clínico y microbiológico rápido, junto a un tratamiento precoz y eficaz, son aspectos claves para minimizar la morbimortalidad de las infecciones del sistema nervioso central (SNC), especialmente de las meningitis y encefalitis de origen infeccioso, cuyas complicaciones pueden ser muy graves y las secuelas devastadoras, pese a la supervivencia^{19,20}. Además, los costes asociados con estas infecciones son significativos tanto a corto plazo, en relación con la hospitalización y tratamiento, como a largo plazo por la pérdida de contribución al medio social y laboral²¹. Su manejo es diferente al de las complicaciones supurativas intracraneales como el absceso cerebral, el empiema subdural y el absceso epidural, más cercanos a una actitud diagnóstica similar al de otras colecciones purulentas, excepto por la salvedad de la localización, menos accesible a la toma de muestras. En esa diferencia para el

diagnóstico clínico, citobioquímico y microbiológico de las meningitis y encefalitis, el líquido cefalorraquídeo (LCR) constituye una muestra de valor incuestionable. Las pruebas esenciales en el estudio del LCR suelen incluir las tinciones rápidas (Gram, Ziehl-Neelsen, tinta china, etc.), la detección de antígenos bacterianos, los distintos tipos de cultivos (bacterias, micobacterias y hongos, excepcionalmente hoy los cultivos virales) y, cada vez más, la implementación de métodos moleculares. Todo ello emparejado con el análisis celular y estudio bioquímico de una serie de parámetros de laboratorio.

Los protocolos de manejo de muestras requieren habitualmente un volumen significativo de LCR para llevar a cabo un estudio amplio, no siempre fácil de conseguir o de repetir el muestreo para su consecución.

Las sospechas de meningitis con una tinción de Gram del LCR negativa representan un desafío diagnóstico y terapéutico importante, puesto que en la mayoría de los casos, los microorganismos causantes serán desconocidos. En ocasiones, una prueba rápida de aglutinación de antígenos puede utilizarse en el diagnóstico, y esta opción cubre una amplia gama de microorganismos bacterianos, pero es poco sensible. A causa de los resultados falsos positivos que también se han comunicado con este método, algunas instituciones lo han abandonado²².

En el caso de la meningitis bacteriana, el cultivo es de utilidad, pero puede necesitar de 2-5 días, y podría ser falsamente negativo si el microorganismo es nutricionalmente exigente, hubo tratamiento antibiótico previo o la manipulación de la muestra fue incorrecta, rindiendo un resultado estéril o no creciendo el microorganismo en cultivos convencionales. Por todo ello, es posible que el advenimiento de las modernas TAAN permita solucionar, o compensar, parte de estas limitaciones de la microbiología tradicional en el procesamiento, trabajo, rendimiento y resultados de las muestras. Las TAAN pueden ser de ayuda en el diagnóstico y en la monitorización y resolución de la meningitis bacteriana²³. Dos importantes cuestiones acerca de la PCR son: 1) la PCR no requiere replicación del virus para su detección, por lo que una PCR positiva no necesariamente debe conllevar la presencia de infección en sí misma ni contribuir a un diagnóstico etiológico en la fase de recuperación postinfecciosa de pacientes en los que el diagnóstico patológico permanece sin esclarecer; 2) la PCR no debe obviar, por ahora, la práctica de cultivos microbiológicos, que siguen siendo necesarios además para determinar la sensibilidad de los aislados a los antibióticos y monitorizar la resistencias en un contexto epidemiológico y geográfico concreto.

Actualmente se dispone ya incluso de paneles de detección múltiple de varios microorganismos patógenos implicados en estas infecciones del SNC. El hecho de poder discriminar agentes bacterianos y virales ayuda a conducir un tratamiento más dirigido en el uso de antibióticos y antivirales.

Infecciones de transmisión sexual

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) han presentado un considerable incremento en su incidencia en los últimos años. La aparición del tratamiento antirretroviral frente a la infección por el VIH motivó un creciente abandono del empleo de preservativos para prevenir esta y otras infecciones.

En la actualidad son tres las poblaciones más susceptibles y en riesgo de padecer una ITS: los hombres que practican sexo con hombres, los ambientes relacionados con la prostitución tanto femenina como masculina y finalmente, los heterosexuales que mantienen relaciones sexuales con múltiples parejas, especialmente los jóvenes.

El diagnóstico microbiológico rápido de estas infecciones persigue un doble objetivo. Por un lado, instaurar un tratamiento efectivo que evite el avance de la enfermedad y sus posibles

secuelas. Y por otro, establecer las medidas preventivas encaminadas a evitar la diseminación de la infección. La rapidez en el diagnóstico es esencial para conseguir ambos objetivos debido a la peculiaridad de estas infecciones, que a menudo provocan en los que las padecen tanto conductas de ocultación como resistencia a acudir a los centros sanitarios.

La existencia de consultas de ITS²⁴ que ofrezcan al paciente, además de discreción, un diagnóstico clínico y microbiológico rápido, contribuye sin lugar a dudas a frenar su expansión. En este contexto, el diagnóstico microbiológico rápido debe ir encaminado a establecer la existencia o no de infección, así como a descubrir cuál es el agente etiológico de la misma. Clásicamente, el microbiólogo ha dispuesto de diversas técnicas rápidas basadas en el examen microscópico que siguen manteniendo su eficacia, como la tinción de Gram del exudado uretral (para la uretritis gonocócica) o del exudado vaginal (para la vaginosis bacteriana), el examen en fresco del exudado vaginal (para las vaginitis por *Trichomonas vaginalis* [*T. vaginalis*] o *Candida* spp.) o la microscopía en campo oscuro para la sífilis primaria (aunque con sus limitaciones de índole práctico).

Algunas pruebas serológicas, como la detección de anticuerpos reagínicos mediante técnicas rápidas de aglutinación (RPR), pueden ser negativas en las fases iniciales de la sífilis primaria. Otras técnicas rápidas, como las de detección de antígeno de *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) o del virus del herpes simple, han caído en desuso por su baja sensibilidad. Otras, como las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos (para la detección de *T. vaginalis*, *Candida* spp. o *Gardnerella vaginalis* [*G. vaginalis*]) se han visto superadas por TAAN.

Y son estas TAAN, especialmente las de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (rt-PCR), y dentro de ellas, aquellas PCR múltiples que permitan la detección de los diversos microorganismos implicados en determinada infección, las que permiten ya en ocasiones, y permitirán en el futuro, cubrir las necesidades de un diagnóstico microbiológico rápido de las diversas ITS: 1) la detección de *Neisseria gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* y *Ureaplasma* spp. en pacientes con uretritis, proctitis, cervicitis y enfermedad inflamatoria pélvica²⁵; 2) la detección de *T. vaginalis* y *Candida* spp. en pacientes con vaginitis o el diagnóstico de la vaginosis bacteriana mediante técnicas que cuantifiquen la presencia o ausencia de *G. vaginalis* y *Lactobacillus* spp.²⁶, o las encaminadas a detectar *Mycoplasma hominis*, *Atopobium vaginae* y *Mobiluncus* spp.; 3) la detección de *Treponema pallidum*, de las cepas L1-L2-L3 de *C. trachomatis* causantes del linfogranuloma venéreo, de *Haemophilus ducreyi* y de los virus del herpes simple 1 y 2, causantes de úlceras genitales, rectales o faríngeas^{27,28}.

Existen actualmente algunas plataformas de rt-PCR múltiple que permiten la detección de algunos de estos microorganismos en menos de una hora²⁵. Otras, permiten la detección de siete o más patógenos genitales^{29,30} aunque requieren para ello un tiempo mayor. La adecuada combinación de los microorganismos capaces de ser detectados para una determinada ITS, una excelente sensibilidad y especificidad, un aumento en la rapidez de la técnica y en la facilidad en llevarla a cabo, además evidentemente de su decreciente coste económico, facilitarán el empleo de estas TAAN múltiples como método de diagnóstico rápido de las ITS.

Diagnóstico microbiológico rápido en pacientes inmunodeprimidos

El tratamiento antibiótico empírico apropiado administrado de forma precoz en el caso de los enfermos inmunocomprometidos, y especialmente en el paciente con neutropenia febril^{31,32}, ha sido asociado reiteradamente a una mejora en la supervivencia de los pacientes con sepsis y/o bacteriemia³³. Al igual o más que los pacientes inmunocompetentes, hasta un 40% reciben

antibioterapia inadecuada hasta que se produce la primera notificación del hemocultivo positivo, generalmente con el resultado de la tinción de Gram³⁴. En este punto, el 12–20% de los pacientes puede que todavía no hayan iniciado tratamiento antibiótico y el 30–45% de los enfermos necesitarán de modificaciones en el tratamiento antibiótico empírico como resultado del informe de la tinción. Se ha demostrado que la información de la tinción de Gram tiene mucho mayor impacto sobre el tratamiento antimicrobiano que el resultado definitivo del hemocultivo, aportado posteriormente por la identificación del aislamiento en los cultivos y los estudios de sensibilidad antimicrobiana³⁵.

El hemocultivo sigue siendo el «gold standard» en el diagnóstico de la bacteriemia, pero tienen una baja sensibilidad para bacterias y hongos denominados «fastidious», término que suele englobar a los microorganismos con exigencias nutricionales, defectivos en su metabolismo o que precisan de atmósferas y condiciones de temperatura especiales. La sensibilidad del hemocultivo también decrece cuando la muestra de sangre es tomada tras el inicio del tratamiento antimicrobiano. La especificidad es desafiada por la contaminación del hemocultivo. Así, el aislamiento de contaminantes habituales en los hemocultivos (particularmente teniendo en cuenta que algunos de ellos, como los estafilococos coagulasa-negativos, son también causas frecuentes de bacteriemia) hace que la interpretación de los resultados sea mucho más dificultosa³⁶. El aislamiento de un microorganismo potencialmente contaminante a partir de más de una muestra de sangre extraída de punciones de venas periféricas independientes es considerado típicamente diagnóstico de bacteriemia verdadera; sin embargo, el estudio genético molecular de estas cepas de estafilococos coagulasa-negativos aisladas de muestras de sangre pareadas sugiere que, o bien la contaminación puede ocurrir también en estas circunstancias o que las infecciones son frecuentemente policlonales³⁷.

Dado que el hemocultivo como «gold standard» es lento e insuficientemente sensible, se han desarrollado nuevas técnicas para detectar bacterias y hongos en la sangre, tal como se ha descrito anteriormente. Recientemente, se ha comunicado en el campo de la candidemia la introducción de una nueva plataforma diagnóstica basada en la metodología de resonancia magnética T2 (T2RM), capaz de una detección ultrasensible y rápida de dianas fúngicas en sangre completa, sin necesidad de hemocultivo previo^{38,39}. Esta capacidad para excluir rápidamente y con precisión la posibilidad de la candidemia, especialmente por especies no-*albicans*, tiene importantes implicaciones en la práctica clínica, ya que permite disminuir el número de pacientes que reciben terapia antifúngica empírica, reduciendo así la incidencia de cepas resistentes, la aparición de efectos adversos y costo económico de la atención sanitaria. Queda por comprobar si esta plataforma tecnológica podría ser rentable y trasladable a distintos tipos de huéspedes (inmunocompetentes e inmunodeprimidos), a pacientes tanto adultos como pediátricos, así como a otros tipos de muestras distintas a la sangre.

Diagnóstico microbiológico rápido en niños

Las enfermedades infecciosas siguen siendo una de las primeras causas de demanda de asistencia sanitaria, extrahospitalaria, hospitalaria y de urgencias, en la población pediátrica. Desde antes incluso de su nacimiento, hasta que alcanza la madurez, la población infantil es especialmente susceptible a muchas de las infecciones. El recién nacido y el lactante no disponen todavía de un sistema inmunitario lo suficientemente desarrollado para hacer frente a estas enfermedades. En la edad infantil, los niños van desarrollando esta inmunidad, en parte gracias a las vacunas, aunque se ven sometidos a múltiples ocasiones de contagio, tanto de los adultos como de otros niños. Las infecciones de vías respiratorias y gastrointestinales, por no hablar de infecciones más graves como

las sepsis o las meningitis, son frecuentes en esta población particularmente predispuesta a ellas.

En este contexto, el diagnóstico clínico y microbiológico rápido de estos procesos, y la instauración de un tratamiento adecuado, antibiótico o no, son esenciales no solo para la vida y posterior desarrollo del niño, sino también para evitar otros efectos colaterales, como la masificación de los servicios de urgencias pediátricas y la inevitable angustia de los padres y familiares.

El control de las infecciones pediátricas empieza ya cuando el niño se encuentra todavía en el útero de su madre. Y un ejemplo de ello, entre otros, puede ser la necesidad de detectar el estado de portadora de *Streptococcus agalactiae* en las gestantes en las que no se ha realizado un cultivo vagino-rectal para detectar a este microorganismo, bien porque su embarazo no ha sido controlado, bien porque el parto tiene lugar de forma prematura. O el de aquellas mujeres que presentan una infección intraamniótica que puede desencadenar un grave cuadro de sepsis o de meningitis neonatal. Hasta ahora, los microbiólogos disponían de un número limitado de técnicas rápidas capaces de ser empleadas en la población pediátrica, desde la observación microscópica (la tinción de Gram de LCR en un niño con sospecha de meningitis sigue siendo una técnica esencial para su diagnóstico etiológico), hasta las técnicas de detección de antígeno.

Existen pruebas de aglutinación para detectar en el LCR antígenos de algunas bacterias causantes de meningitis aunque su baja sensibilidad y la poca cantidad de LCR de que podemos disponer, limitan su uso a determinadas situaciones.

También existen técnicas de inmunocromatografía para detectar *S. pneumoniae* (en la orina) y *S. pyogenes* (en faringe), o algunos virus respiratorios (como el virus respiratorio sincitial [VRS] o el de la gripe) o gastrointestinales (como rotavirus o ciertos adenovirus) que son de cierta utilidad por su fácil manejo, aunque adolecen de poca sensibilidad.

No ha sido hasta la aparición de las TAAN, especialmente las técnicas de rt-PCR y PCR múltiples, en que se ha desarrollado, y va a seguir desarrollándose, el diagnóstico rápido de las infecciones pediátricas. Estos son algunos ejemplos de las necesidades clínicas: 1) detección intraparto de *S. agalactiae* en frotis vagino-rectal de la madre (existen ya plataformas que permiten su detección en menos de una hora⁴⁰) o detección de *Ureaplasma* spp., *S. agalactiae*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* en muestras de líquido amniótico; 2) detección de agentes causantes de meningoencefalitis: existen ya plataformas que permiten la detección de bacterias (*S. agalactiae*, *E. coli* K-1, *L. monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *S. pneumoniae*), hongos (*Cryptococcus* spp.) o virus (citomegalovirus, enterovirus, virus del herpes simple 1 y 2, virus varicela zóster, herpes virus humano tipo 6 y Parechovirus) en alrededor de una hora⁴¹; 3) detección de agentes causantes de bacteriemia y fungemia: existen diversas plataformas que permiten, mediante TAAN, la identificación de los microorganismos crecidos en los frascos de hemocultivo o la detección de diversos mecanismos de resistencia^{42,43}, aunque el auténtico reto sería disponer de métodos lo suficientemente sensibles como para ser aplicables directamente en la sangre del paciente, como se ha comentado anteriormente, teniendo en cuenta el escaso volumen de muestra de que podremos disponer en determinados pacientes, como los recién nacidos prematuros; 4) detección de microorganismos causantes de infecciones de las vías respiratorias, tanto las causadas por bacterias (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Mycoplasma pneumoniae* o *Chlamydia pneumoniae* entre otros) como por virus (gripe A y B, VRS, parainfluenza, adenovirus, etc.)⁴⁴; 5) detección de microorganismos causantes de faringo-amigdalitis, especialmente *S. pyogenes*⁴⁵ (pero también otras bacterias como *Streptococcus dysgalactiae* o *equisimilis*, *Arcanobacterium haemolyticum* o *Fusobacterium necrophorum*) o el virus de Epstein-Barr; 6) detección de microorganismos causantes de gastroenteritis:

desde bacterias (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica* o *E. coli* enterohemorrágico, entre otros), hasta parásitos (*Giardia lamblia*) o virus (rotavirus, adenovirus 40–41, norovirus, etc.), así como la detección en heces de *Helicobacter pylori*⁴⁶.

La diversidad de los microorganismos susceptibles de ser detectados, la necesidad de poco volumen de muestra, la sensibilidad y especificidad de la técnica, la rapidez y la facilidad en llevarla a cabo, y el decreciente coste económico, facilitarán el empleo de estas TAAN múltiples como método de diagnóstico rápido de las infecciones pediátricas.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* 2006;34:1589–96.
- Perez KK, Olsen RJ, Musick WL, Cernoch PL, Davis JR, Peterson LE, et al. Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137:1247–54.
- Wolk DM, Struelens MJ, Pancholi P, Davis T, Della-Latta P, Fuller D, et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in wound specimens and blood cultures: multicenter preclinical evaluation of the Cepheid Xpert MRSA/SA skin and soft tissue and blood culture assays. *J Clin Microbiol.* 2009;47:823–6.
- Zboromyrska Y, Vergara A, Cosgaya C, Verger G, Mosqueda N, Almela M, et al. Rapid detection of β -lactamases directly from positive blood cultures using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based assay. *Inter J Antimicrob Agents.* 2015;46:355–6.
- Kothari A, Morgan M, Haake DA. Emerging technologies for rapid identification of bloodstream pathogens. *Clin Infect Dis.* 2014;59:272–8.
- Nikkari S, McLaughlin JJ, Bi W, Dodge DE, Relman DA. Does blood of healthy subjects contain bacterial ribosomal DNA? *J Clin Microbiol.* 2001;39:1956–9.
- Lehmann LE, Alvarez J, Hunfeld KP, Goglio A, Kost GJ, Louie RF, et al. Potential clinical utility of polymerase chain reaction in microbiological testing for sepsis. *Crit Care Med.* 2009;37:3085–90.
- Rello J, Lisboa T, Lujan M, Gallego M, Kee C, Kay I, et al. Severity of pneumococcal pneumonia associated with genomic bacterial load. *Chest.* 2009;136:832–40.
- Drancourt M, Michel-Lepage A, Boyer S, Raoult D. The point-of-care laboratory in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29:429–47.
- Sanchez JL, Cooper HJ, Myers CA, Cummings JF, Vest KG, Russell KL, et al. Respiratory infections in the US military: recent experience and control. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28:743–800.
- Doern GV. The value of outcomes data in the practice of clinical microbiology. *J Clin Microbiol.* 2014;52:1314–6.
- Schreckenberger PC, McAdam AJ. Point-Counterpoint: large multiplex PCR panels should be first-line test for detection of respiratory and intestinal pathogens. *J Clin Microbiol.* 2015;53:3110–5.
- Humphries RM, Linscott AJ. Laboratory diagnosis of bacterial gastroenteritis. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28:3–31.
- Zboromyrska Y, Vila J. Advanced PCR-based molecular diagnosis of gastrointestinal infections: challenges and opportunities. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016;16:631–40.
- Rand KH, Tremblay EE, Hoidal M, Fisher LB, Grau KR, Karst SM. Multiplex gastrointestinal pathogen panels: implications for infection control. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;82:154–7.
- Goldenberg SD, Bacelar M, Brazier P, Bisnauthsing K, Edgeworth JD. A cost benefit analysis of the Luminex xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel for detection of infectious gastroenteritis in hospitalised patients. *J Infect.* 2015;70:504–11.
- Bennett A, Bar-Zeev N, Jere KC, Tate JE, Parashar UD, Nakagomi O, et al. Determination of a viral load threshold to distinguish symptomatic versus asymptomatic rotavirus infection in a high-disease-burden african population. *J Clin Microbiol.* 2015;53:1951–4.
- Teunis PF, Sukhrie FH, Vennema H, Bogerman J, Beersma MF, Koopmans MP. Shedding of norovirus in symptomatic and asymptomatic infections. *Epidemiol Infect.* 2015;143:1710–7.
- Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23:467–92.
- Edmond K, Clark A, Korczak VS, Sanderson C, Griffiths UK, Rudan I. Global and regional risk of disabling sequelae from bacterial meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2010;10:317–28.
- Portnoy A, Jit M, Lauer J, Blommaert A, Ozawa S, Stack M, et al. Estimating cost of care for meningitis infections in low- and middle-income countries. *Vaccine.* 2015;33 suppl.1:A240–7.
- El Bashir H, Laundry M, Booy R. Diagnosis and treatment of bacterial meningitis. *Arch Dis Child.* 2003;88:615–20.
- Tunkel AR. Meningitis. [consultado 28 Feb 2016]. Disponible en: www.antimicrobe.org/e7.asp
- Gaydos C, Hardick J. Point of care diagnostics for sexually transmitted infections: perspectives and advances. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014;12:657–72.
- Gaydos CA, Cartwright CP, Colaninno P, Welsch J, Holden J, Ho SY, et al. Performance of the Abbott RealTime CT/NG for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. *J Clin Microbiol.* 2010;48:3236–43.
- Cartwright CP, Lembke BD, Ramachandran K, Body BA, Nye MB, Rivers CA, et al. Development and validation of a semi-quantitative, multitarget PCR assay for diagnosis of bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2321–9.
- Glatz M, Juricevic N, Altwegg M, Bruisten S, Komericki P, Lautenschlager S, et al. A multicenter prospective trial to assess a new real-time polymerase chain reaction for detection of *Treponema pallidum*, herpes simplex-1/2 and *Haemophilus ducreyi* in genital, anal and oropharyngeal ulcers. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:01020–7.
- De Vrieze NH, van Rooijen M, Schim van der Loeff MF, de Vries HJ. Anorectal and inguinal lymphogranuloma venereum among men who have sex with men in Amsterdam, The Netherlands: trends over time, symptomatology and concurrent infections. *Sex Transm Infect.* 2013;89:548–52.
- Samra Z, Rosenberg S, Madar-Shapiro L. Direct simultaneous detection of 6 sexually transmitted pathogens from clinical specimens by multiplex polymerase chain reaction and auto-capillary electrophoresis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70:17–21.
- Kriesel JD, Bhatia AS, Barrus C, Vaughn M, Gardner J, Crisp RJ. Multiplex PCR testing for nine different sexually transmitted diseases. *Int J STD AIDS.* 2015. pii: 0956462415615775.
- Rosa RG, Goldani LZ. Cohort study of the impact of time to antibiotic administration on mortality in patients with febrile neutropenia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:3799–803.
- Virizuela JA, Carratalà J, Aguado JM, Vicente D, Salavert M, Ruiz M, et al. Management of infection and febrile neutropenia in patients with solid cancer. *Clin Transl Oncol.* 2016;18:557–70.
- Averbuch D, Orasch C, Cordonnier C, Livermore DM, Mikulska M, Viscoli C, et al. ECIL4, a joint venture of EBMT, EORTC, ICHS, ESGICH/ESCMID and ELN. European guidelines for empirical antibacterial therapy for febrile neutropenic patients in the era of growing resistance: summary of the 2011 4th European Conference on Infections in Leukemia. *Haematologica.* 2013;98:1826–35.
- Uehara Y, Yagoshi M, Tanimichi Y, Yamada H, Shimoguchi K, Yamamoto S, et al. Impact of reporting Gram stain results from blood culture bottles on the selection of antimicrobial agents. *Am J Clin Pathol.* 2009;132:18–25.
- Bouza E, Sousa D, Muñoz P, Rodriguez-Creixems M, Fron C, Lechuz JG. Bloodstream infections: a trial of the impact of different methods of reporting positive blood culture results. *Clin Infect Dis.* 2004;39:1161–9.
- Weinstein MP. Blood culture contamination: persisting problems and partial progress. *J Clin Microbiol.* 2003;41:2275–8.
- Mylonakis E, Clancy CJ, Ostrosky-Zeichner L, Garey KW, Alangaden GJ, Vazquez JA, et al. T2 magnetic resonance assay for the rapid diagnosis of candidemia in whole blood: a clinical trial. *Clin Infect Dis.* 2015;60:892–9.
- Neely LA, Audeh M, Phung NA, Min M, Suchocki A, Plourde D, et al. T2 magnetic resonance enables nanoparticle-mediated rapid detection of candidemia in whole blood. *Sci Transl Med.* 2013;5:182ra54.
- Seo SK, Venkataraman L, DeGirolami PC, Samore MH. Molecular typing of coagulase-negative staphylococci from blood cultures does not correlate with clinical criteria for true bacteremia. *Am J Med.* 2000;109:697–704.
- El Helali N, Nguyen JC, Ly A, Giovangrandi Y, Trinquart L. Diagnostic accuracy of a rapid real-time polymerase chain reaction assay for universal intrapartum group B streptococcus screening. *Clin Infect Dis.* 2009;49:417–23.
- Messacar K, Breazeale G, Robinson CC, Dominguez SR. Potential clinical impact of the film array meningitis encephalitis panel in children with suspected central nervous system infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016;86:118–20.
- Quiles MG, Menezes LC, Bauab Kde C, Gumpel EK, Rocchetti TT, Palomo FS, et al. Diagnosis of bacteremia in pediatric oncologic patients by in-house real-time PCR. *BMC Infect Dis.* 2015;15:283.
- Tschieler E, Steinmann J, Buer J, Onnebrink JG, Felderhoff-Müser 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;224:12–6.
- Mengelle C, Mansuy JM, Pierre A, Claudet I, Grouteau E, Micheau P, et al. The use of a multiplex real-time PCR assay for diagnosing of acute respiratory viral infections in children attending an emergency unit. *J Clin Virol.* 2014;61:411–7.
- Dunne EM, Marshall JL, Baker CA, Manning J, Gonis G, Danchin MH, et al. Detection of group A streptococcal pharyngitis by quantitative PCR. *BMC Infect Dis.* 2013;13:312.
- Onori M, Coltella L, Mancinelli L, Argentieri M, Menichella D, Villani A, et al. Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of bacterial and viral enteropathogens in stool samples of paediatric patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;79:149–54.