

Diagnóstico molecular de sepsis polimicrobiana en pacientes internados en la unidad de cuidados intensivos

RESUMEN

Los casos de sepsis siguen causando altas morbilidad y mortalidad en pacientes de las unidades de cuidados intensivos, ello ha provocado el uso temprano y empírico de antibióticos de amplio espectro que ha conllevado a la selección de cepas multirresistentes, a la descompensación de la flora comensal en la persona y al aumento de complicaciones que pueden culminar en la muerte del paciente. El desarrollo de técnicas moleculares y su incursión paulatina a los hospitales brinda una alternativa diagnóstica rápida, sensible y específica para identificar al agente causal, determinar la sensibilidad o resistencia a los antimicrobianos y discriminar efectivamente la flora contaminante. En el presente trabajo se exponen los resultados de muestras remitidas por el Departamento de Epidemiología al laboratorio de Medicina Genómica para integrar el diagnóstico de un probable cuadro de sepsis en un período comprendido entre mayo de 2012 a septiembre de 2013, donde se recibieron un total de 25 muestras (18 adultos y 7 neonatos) y los resultados se obtuvieron en 72 horas. El 80% de las muestras presentaron infecciones polimicrobianas y el *Stenotrophomonas maltophilia* fue el principal agente identificado, incluso en cuatro de los casos estuvo presente como el único microorganismo en la muestra.

Palabras clave: sepsis, diagnóstico molecular, unidad de cuidados intensivos

Molecular diagnosis of polymicrobial sepsis in patients in intensive care unit

ABSTRACT

Sepsis continue to cause high morbidity and mortality in intensive care unit patients, this have promoted an early and empirical use of wide spectrum antibiotics which has selected multi-resistant strains, unbalanced normal microflora from patient and increased illness complications which could lead to death. Development of molecular techniques and their gradual incursion to hospitals bring a fast, sensitive and specific alternative diagnostic test to identify the causal agent of sepsis, determine sensitivity or resistance of antimicrobial drugs and effectively discriminate contaminating flora. This paper presents the results of samples sent by the Department of Epidemiology at the Genomic

María del Rocío Thompson Bonilla¹
Guillermina Rosas Sandoval²
Manuel Lara Lozano³
José Luis Merino García⁴
Hayde Nallely Moreno Sandoval⁵
Esmeralda Morán Mendoza⁶
Rodríguez Gallegos Jorge⁷
Gabina Calderón Rosete⁸
Sergio Israel Rangel Guerrero⁹
Juana Salazar Salinas¹⁰
Ricardo Núñez Ceballos¹¹
Juan Antonio González Barrios¹²

¹⁻²⁻¹² Doctor en Ciencias

³⁻⁵⁻⁸ Maestro en Ciencias

⁴⁻¹⁰ Químico

¹¹ Epidemiólogo

⁶⁻⁷⁻⁹ Pasante de la carrera de Química

¹⁻²⁻³⁻⁴⁻⁵⁻¹² Laboratorio de Medicina Genómica, Hospital Regional 1° de Octubre.

² Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Anáhuac.

⁶⁻⁷ Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM.

⁸ Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina UNAM.

⁹ Facultad de Química, UNAM.

⁵ Laboratorio de Virología, Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de "Pediatria", CMN SXXI.

¹⁰ Jefatura de Servicios de Vigilancia y Control Epidemiológico.

¹¹ Depto. De Vigilancia y Control Epidemiológico, Dirección Médica, ISSSTE.

Recibido: octubre 2013

Aceptado: enero 2014

Correspondencia

Dr. Juan Antonio González Barrios
Hospital Regional 1o de Octubre
Avenida IPN No. 1669
Colonia Magdalena de las Salinas
CP 07760 México D.F.
Tel: 01 (55) 51415300 Ext. 16605
jantgonzalez@issste.gob.mx

Este artículo debe citarse como

Thompson Bonilla MR, Rosas Sandoval G, Lara Lozano M, Merino García JL, Moreno Sandoval HN, Morán Mendoza E y col. Diagnóstico molecular de sepsis polimicrobiana en pacientes internados en la unidad de cuidados intensivos. Rev Esp Med Quir 2014;19:52-61.

Medicine Laboratory to integrate a likely picture of sepsis diagnostic in a period between May, 2012 to September 2013, where a total of 25 samples were received (18 adults and 7 infants) and results were obtained within 72 hours. 80% of samples were polymicrobial infections and *Stenotrophomonas maltophilia* was the main agent identified, even for four of the cases it was detected as a single organism in the sample.

Key words: sepsis, molecular diagnostics, intensive care units.

El síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) es la respuesta del ser humano a las agresiones severas derivadas de un proceso biológico; provoca fiebre ($> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$) o hipotermia ($< 36\text{ }^{\circ}\text{C}$) acompañadas de taquicardia (> 80 latidos/minuto), taquipnea (> 20 respiraciones/minuto) o hipocapnia (PaCO_2 32 mmHg); leucocitosis ($> 12,000$ leucocitos/ mm^3) o leucopenia ($< 4,000$ leucocitos/ mm^3) y más de 10% de células banda.¹ Si además esta respuesta se asocia con una infección se habla de sepsis.² Los cuadros sépticos son dinámicos, tanto a escala celular como molecular, se manifiestan como una red de respuestas genómicas, proteómicas y metabólicas del paciente, de la microflora ya existente y del agente patógeno.³⁻⁵ El paciente con sepsis generalmente desarrolla el síndrome de disfunción múltiple de órganos (SDMO), también conocida como falla orgánica múltiple, los sitios más frecuentes de infección son los pulmones (33-40%), la región abdominal (30-47%), el tracto urinario (7-10%), los tejidos blandos (5-8%), el neurológico y el osteoarticular (5 %).^{3,4,6} Una de las guías disponibles para el manejo de la sepsis severa y choque séptico incluye las siguientes recomendaciones: 1) Administración temprana de terapia con antibióticos de amplio espectro empírica (a 1 h de haber realizado el diagnóstico clínico); 2) toma de una muestra de sangre para cultivo y, de ser posible, cultivos de los sitios relevantes antes de iniciar la terapia con antibióticos; 3) adecuada reanimación cardio-

pulmonar del paciente en las primeras 6 horas; y 4) determinar la fuente del proceso infeccioso (evaluación clínica y radiológica) del paciente; sin embargo, hay variantes en la definición del cuadro séptico que afectan su seguimiento.^{7,8}

La sepsis puede ocurrir a cualquier edad, aunque las personas en los extremos de la vida son las más susceptibles. El riesgo aumenta si el paciente presenta alguna afección oncohematológica, prematuridad o infecciones causadas por complicaciones quirúrgicas, dispositivos intravasculares contaminados, bacteriemias en las regiones abdominal, pulmonar o urinaria, entre otras.^{5,6,9} La persona que sobrevive a la enfermedad generalmente tiene una calidad de vida pobre.⁴ La incidencia anual de sepsis se ha estimado en 13 millones de pacientes, de estos 30% morirá (4 millones de decesos) y esto constituye un número mayor de muertes a las causadas por cánceres de colon y de mama, síndrome de inmunodeficiencia adquirida o la combinación de los éstos.^{6,8,10} Las salas de emergencia y las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) enfrentan diariamente casos de sepsis que representan, en promedio, 30% de los ingresos hospitalarios totales, proporción que la clasifica como epidemia. No obstante, los reportes oficiales rara vez reconocen a la sepsis como el padecimiento principal que afecta al paciente, particularmente al neonato.^{6,11,12} La tasa de casos de sepsis neonatal en México y otros países en

vías de desarrollo se ha estimado en 4 a 30 por cada 1,000, con una letalidad entre 9.5 y 30%; se estima que un mexicano muere por sepsis cada 2.6 horas.^{6,12-14}

En Estados Unidos se calcula el costo entre 20 y 50 mil dólares por paciente con sepsis, con un costo anualizado general de 17 mil millones de dólares. En China el costo de la atención hospitalaria es de 11,390 dólares por enfermo y en México el 87% de los pacientes que cursa con sepsis se atiende en instituciones públicas y el costo aproximado por paciente es de 600,000 pesos mexicanos. Generalmente, esta enfermedad ocasiona estancias hospitalarias prolongadas, gastos elevados de atención y frecuentemente culmina con la muerte del paciente.^{6,7,10,15}

Uno de los principales problemas en los casos de sepsis es la identificación temprana del agente causal para tratar específicamente al paciente y con ello evitar el uso indiscriminado de antimicrobianos, que provocan la selección de cepas resistentes y la destrucción de la flora normal del paciente.¹⁶ Los agentes microbiológicos comúnmente aislados son bacterias grampositivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*; bacterias gramnegativas como *Klebsiella* sp, *Pseudomonas* sp, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Proteus* sp, *Acinetobacter* sp, *Enterococcus* sp; *Listeria*, bacterias anaerobias estrictas; hongos como *Candida* spp; parásitos como *Plasmodium falciparum* y virus como herpes simple, herpes zóster, citomegalovirus, enterovirus, dengue e infecciones causadas por agentes múltiples.^{3,6,7,12,14} La tasa de mortalidad se incrementa cuando existen infecciones polimicrobianas o cuando la carga microbiana es alta.³ En los últimos años los enfermos han tenido un cambio en el perfil epidemiológico de las infecciones dentro de las UCI, cuyas infecciones son graves y causadas por gérmenes oportunistas

o multirresistentes; eso incrementa los efectos colaterales y eleva los costos. Las variaciones en las cepas microbianas reportadas dependen de la edad del paciente, del origen de la persona, del tipo de muestra, de los procedimientos médico-quirúrgicos, de los períodos de hospitalización e incluso se han detectado microorganismos de la flora normal que en un microambiente diferente presentan un fenotipo patológico.^{12,17-20}

El procedimiento de elección para el diagnóstico del agente causal de la sepsis es el hemocultivo, se aíslan él o los patógenos y se identifican por pruebas bioquímicas rutinarias; adicionalmente se realizan antibiogramas para determinar las características de sensibilidad o resistencia a los antibióticos.⁸ Las limitaciones de esta prueba son: la cantidad mínima de muestra requerida para asegurar la detección del microorganismos en un cultivo positivo, especialmente cuando se trata de neonatos; la carga bacteriana necesaria para evidenciar crecimiento en el cultivo; el enmascaramiento del crecimiento cuando el paciente recibió tratamiento antimicrobiano previo a la toma de la muestra; la dificultad para asegurar el verdadero agente causal cuando existen infecciones polimicrobianas; los falsos negativos cuando la muestra contiene microorganismos fastidiosos de crecimiento lento o requerimientos especiales de crecimiento y el crecimiento de microorganismos contaminantes cuando la asepsia previa a la toma de la muestra fue deficiente. Un hemocultivo es declarado negativo hasta después de cinco días de incubación, lo que promueve el uso anticipado de antibióticos de amplio espectro con la consecuente selección de cepas resistentes, aumento de días de hospitalización de los pacientes y la falta de tratamiento específico provoca el incremento de la tasa de mortalidad.^{3,12,20-23}

Las técnicas de detección microbiana actuales han evolucionado para ofrecer la identificación microbiana de forma rápida y confiable; hoy en

día las pruebas que existen para el diagnóstico de sepsis son hemocultivos, el sistema VITEK, FISH, PCR, microarreglos, espectrometría de masas, pirosecuenciación, entre otras, y su adaptación al diagnóstico de rutina depende principalmente de los costos, la capacitación del personal, la especificidad y sensibilidad de las técnicas.²⁴⁻²⁷ Algunas técnicas moleculares requieren del aislamiento previo del agente causal, pero poco a poco se realizan a partir de la muestra directa.^{28,29} La primera prueba molecular aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA) fue Gen-Probe, en 1986, para identificar *Legionella* de un cultivo bacteriano; posteriormente se aprobó AMPLICOR CT para la detección de *C. trachomatis* directamente de la muestra.³⁰ La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la representante de las técnicas moleculares, se caracteriza por ser una prueba rápida, versátil con sus versiones de punto final, cuantitativa y múltiple, sensible (detecta de 3 a 10 unidades formadoras de colonia [UFC] por mililitro, 3 a 10 veces mayor que el hemocultivo), detecta tanto el material genético que proviene de organismos vivos como de restos celulares, existen versiones manual y automatizada y determina al mismo tiempo la resistencia a los antimicrobianos. El riesgo de infección disminuye porque se trabaja sólo con el material genético del agente causal y se está convirtiendo en el método de elección para identificar organismos fastidiosos como *Bartonella*, *Bacteroides*, *Bergeyella*, *Chlamydomphila*, *Clostridium*, *Coxiella*, *Francisella*, *Fusobacterium*, *Legionella*, *Leptotrichia/Sneathia*, *Mycoplasma*, *Nocardia*, *Peptostreptococcus*, *Rickettsia*, *Tropheryma*, *Ureaplasma*, virus y hongos.^{8,22,31-34} Las limitaciones de los métodos moleculares dependen principalmente del panel de microorganismos incluidos en las pruebas de detección, el método de extracción del material genético, la presencia de inhibidores que afecten la reacción en cadena de la polimerasa, el costo (aproximadamente \$5,000 pesos mexicanos por prueba), que requiere validación exhaustiva cuanto se

monta un nuevo protocolo a causa de su sensibilidad, la posibilidad de detectar contaminantes es muy alta y las variantes genómicas en la misma especie causan falsos negativos.^{5,20,27,35-39} A la fecha existen diferentes pruebas moleculares comerciales como SeptiFast-LightCycler, SepsiTtest-Molzylm, VYOO, SIRS-LAB, Magicplex y Sepsis Real-time. Cada prueba maneja un panel diferente de microorganismos donde se incluyen los agentes comunes causantes de sepsis, la especificidad y sensibilidad dependen primordialmente del diseño de sondas y su sistema de detección; se reporta una especificidad entre 80-99% y 5% de falsos negativos.^{22,26-29,40-44} Debido a la heterogeneidad microbiológica en una muestra de sangre de un paciente con sepsis y a la posibilidad de contaminaciones durante la toma de muestra, este estudio busca detectar objetivamente al agente causal con ayuda de la determinación del ciclo umbral (Ct) en una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa múltiple comercial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de sangre-EDTA de pacientes con diagnóstico clínico de sepsis, internados en la unidad de cuidados intensivos (UCI) del Hospital Regional 1° de Octubre, fueron remitidas al laboratorio de Medicina Genómica; todas las solicitudes para diagnóstico molecular incluyeron el estudio epidemiológico correspondiente y fueron avaladas por el Servicio de Epidemiología del mismo hospital.

Se extrajo el ADN de 5 mL de sangre total con EDTA usando RTP Pathogen kit de Invitex (Invitex 1040500300, Alemania) y se procedió de la siguiente manera: la muestra se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos, se colectó la capa leucocitaria, las células se resuspendieron en 800 µL de amortiguador de resuspensión y se dividieron en dos tubos. Un tubo se etiquetó como bacterias grampositivas/drogoresistencia y

se incubó secuencialmente a 37°, 65° y 95°C por 10 minutos; el segundo tubo se etiquetó como bacterias gramnegativas/hongos y se le incubó a 65° y 95°C, secuencialmente, por diez minutos. Posteriormente, a cada extracto celular se le adicionaron 400 µL de la solución de unión, se homogenizó la mezcla y cada una se transfirió a una columna (*Spin Filter*), se incubó durante un minuto a temperatura ambiente, se centrifugó a 10,000 rpm durante un minuto, se adicionaron 500 µL del amortiguador de lavado R1, se incubó por un minuto y se centrifugó a 10,000 rpm durante un minuto, posteriormente se adicionaron 700 µL de buffer de lavado R2, se incubó por un minuto y se centrifugó a 10,000 rpm durante un minuto, después se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm durante cuatro minutos. La columna se colocó ahora sobre un tubo Eppendorff estéril, se adicionaron 60 µL de amortiguador de elución precalentado a 80°C, se incubó por un minuto y se centrifugó a 10,000 rpm durante un minuto.

Mediante una prueba cuantitativa *e in vitro* usando el sistema Magicplex[®] Sepsis Real-time (Seegene Inc, Corea) basada en la técnica de amplificación de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un sistema múltiple acoplada a una PCR cuantitativa que detectó el ADN específico usando oligonucleótidos duales (DPO[®]) se monitoreó el producto amplificado a través del incremento en la intensidad de fluorescencia. Este sistema permitió detectar hasta 91 agentes patógenos causantes de sepsis y 3 marcadores principales de resistencia en este grupo de microorganismos y los ensayos se cotejaron con los controles positivos incluidos. Un resultado positivo correspondió a las pruebas con valores de Ct ≤ 15, a excepción de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. aureus* donde el valor de Ct debe ser ≤ 10. Con base en el Ct se puede conocer si la amplificación del fragmento de ADN que identifica a un microorganismo corresponde a un contaminante de la muestra; esto es, si el Ct es > 14; cuando el Ct es > 12 y < 14 se trata de

colonizaciones microbianas o ADNemias; sólo se consideran como los agentes causales de la patología cuando el Ct es mayor de 11.

RESULTADOS

Durante el período entre mayo de 2012 y septiembre de 2013 se atendieron 25 solicitudes en el laboratorio de Medicina Genómica para realizar el diagnóstico molecular y determinar el agente causal de sepsis en pacientes en los que existe sospecha clínica; dicho diagnóstico lo estableció la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital Regional 1° de Octubre del ISSSTE. Se analizaron muestras de sangre total con anticoagulante recién obtenidas de 18 pacientes adultos y 7 pacientes neonatos; se aisló el ADN metagenómico, en cinco casos se identificó a un solo microorganismo como agente causal de sepsis (*Stenotrophomonas maltophilia* en cuatro y *Enterococcus gallinarum* en uno de los cinco casos) (Cuadro 1). En el resto de las muestras fueron determinadas infecciones polimicrobianas y el mayor número de microorganismos observados fue de diez en dos pacientes femeninas, seguido de nueve microorganismos en un paciente masculino, y ocho en dos pacientes, un neonato y un paciente femenino (Figura 1).

También se detectaron los genes que confieren resistencia a vancomicina (*vanA* y *vanB*) y a meticilina (*mecA*); estos marcadores estuvieron ausentes en 17 muestras que detectaron el gen *vanA* sólo en dos pacientes neonatos y un adulto masculino, el gen *van B* sólo en un paciente adulto masculino, los genes *vanA* y *vanB* en un paciente neonato (Cuadro 2). En todas las muestras donde se encontraron genes de resistencia antimicrobiana se identificó más de un microorganismos (Ct ≤ 15) (Cuadro 3).

Todos los resultados obtenidos fueron enviados al servicio de epidemiología del hospital en un máximo de 72 horas después de recibida la muestra.

Cuadro 1. Perfil microbiológico detectado por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en muestras de sangre total de pacientes de la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Regional 1° de Octubre

Bacteria	Neonatos			Adultos			Hongos	Neonatos			Adultos		
	Mujeres			Hombres				Mujeres			Hombres		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	1	0				<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	3	1			
<i>Bacteroides fragilis</i>	0	1	1				<i>Candida albicans</i>	0	1	1			
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	1	0				<i>Candida krusei</i>	2	4	4			
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	3	3				<i>Candida parapsilosis</i>	4	4	3			
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	2	2										
<i>Enterococcus faecium</i>	2	1	2										
<i>Enterococcus gallinarum</i>	2	4	6 (1)*										
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	2	2										
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	3	2										
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0										
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	2	1										
<i>Salmonella typhi</i>	2	3	0										
<i>Serratia marcescens</i>	2	0	1										
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	1										
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5 (1)*	4 (1)*	9 (2)*										
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	1	1										
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	1	0										
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	1	2										

* Dentro del paréntesis se indica el número de casos con un sólo microorganismo en la muestra.

DISCUSIÓN

La urgencia de atender oportunamente al paciente que cursa con un cuadro séptico ha promovido el tratamiento empírico con antibióticos de amplio espectro, incluso por tiempos prolongados; esto ha provocado una mayor presión de selección en cepas microbianas resistentes, la destrucción de la flora microbiana normal, aparición de complicaciones, prolongación de días de hospitalización y la muerte del paciente.⁴⁵ Por lo tanto, las pruebas moleculares son una alternativa confiable y rápida para la identificación de microorganismos presentes en la sangre, así como para la detección de genes que confieren resistencia antes de la confirmación bacteriológica por cultivo. En el caso de neonatos, una limitante significativa para la identificación de agentes patógenos es el volumen de la muestra, la alta sensibilidad de las pruebas moleculares (3-10 UFC/mL) aumenta la posibilidad de de-

tección. El manejo de una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) es relativamente sencilla y los programas incluidos en las pruebas facilitan la identificación de los agentes causales; lo importante es la interpretación de los resultados expresados en los equipos mediante gráficas de amplificación en tiempo real. ¿Cómo se asigna el principal agente causal y cómo se distingue un contaminante de un agente causal real? Una ventaja de la qPCR es precisamente que calcula la carga bacteriana en la muestra de cada uno de los microorganismos identificados y es a través de los Ct obtenidos como se puede conocer la concentración de microorganismos en la muestra. Se ha establecido en la prueba comercial Magicplex™ Sepsis Real-time que un valor ≤ 15 es un agente real (≤ 10 si se trata de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* o *S. Aureus*, principales contaminantes de la piel). Si se requieren de más de 15 ciclos de amplificación para evidenciar a un microorganismo entonces

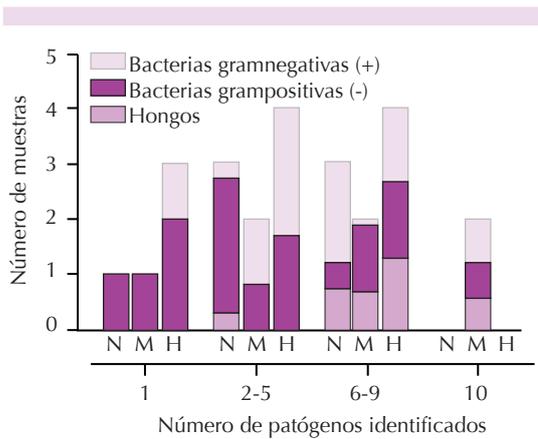


Figura 1. Composición microbiológica identificada en los casos de sepsis analizados. Las muestras se han distribuido en el eje de las abscisas de acuerdo con el número de microorganismos determinados en cuatro bloques: sólo un microorganismo; dos a cinco microorganismos; seis a nueve microorganismos y diez microorganismos, el número máximo de microorganismos determinados en una muestra. Estos bloques a su vez se han clasificado en función de si provienen de neonatos (N), mujeres adultas (M) u hombres adultos (H). Cada barra tiene una distribución en colores que representa el porcentaje de cada tipo microbiano identificado en el número total de casos. 20 de 25 muestras (80%) resultaron ser afectaciones polimicrobianas y en dos mujeres adultas se determinó el mayor número de microorganismos.

éste es un contaminante de la muestra. Otro punto relevante es la distinción entre un agente infeccioso vivo y una ADNemia; gracias a una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa la respuesta se obtiene en cuestión de horas, se inocula un hemocultivo con la muestra y se determina la concentración de ADN al inicio

de la incubación, posteriormente se incuba por 24-48 horas y se determina nuevamente la concentración de ADN; si existe un incremento en la concentración es indicativo de un organismo vivo. Esta estrategia puede también evaluar la eficacia del tratamiento en el paciente. El común denominador que se encontró en los pacientes con la mayor diversidad microbiana identificada fue la complicación del curso clínico. El caso 2 presentado en el cuadro 1 es un neonato que desarrolló enterocolitis necrosante, con la integridad de la mucosa afectada, la constante cateterización del paciente y el aumento en los días de estancia hospitalaria, se aumentaron las infecciones intrahospitalarias y desarrollo de oportunistas; lo mismo ocurrió con las dos pacientes femeninas con diez microorganismos identificados, una llegó al hospital con un cuadro de apendicitis perforada, a causa de esto desarrolló un cuadro de peritonitis y sepsis cuando el diagnóstico molecular se estableció, la paciente se encontraba en coagulación intravascular diseminada en fase de consumo. La tendencia que también se observó es que a mayor diversidad de microorganismos identificados en una muestra, el porcentaje de microorganismos micológicos aumentó. En cuatro de las muestras estudiadas se identificó *Stenotrophomonas maltophilia* como único agente causal, esta bacteria es un microorganismo oportunista gramnegativo aislado de pacientes posquirúrgicos o pacientes inmunocomprometidos, causante de sepsis, neumonía, infecciones del tracto urinario, meningitis, endocarditis, artritis séptica y peritonitis. Poco a poco se le identifica como un microorganismo nosocomial emergente y asociado al

Cuadro 2. Frecuencia de resistencia a vancomicina en *Enterococcus* causales de sepsis. Se analizan los genes VanA y VanB, como marcadores de resistencia a vancomicina

Tipo de paciente	Resistencia	Enterococcus faecium		Enterococcus faecalis		Enterococcus gallinarium	
		vanA	vanB	vanA	vanB	vanA	vanB
Neonatos		2	1	3	1	2	1
Adultos	Hombres	2	0	1	0	0	0
	Mujeres	0	0	0	0	0	0

Cuadro 3. Composición microbiana en las muestras de los pacientes que presentaron identificación polimicrobiana positiva

Caso 1: Neonato		Caso 2: Neonato		Caso 3: Adulto (Masc.)		Caso 4: Adulto (Masc.)		Caso 5: Neonato	
Organismos	Ct*	Organismos	Ct*	Organismos	Ct*	Organismos	Ct*	Organismos	Ct*
<i>Candida krusei</i>	10.96	<i>Enterococcus gallinarum</i>	9.33	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5.91	<i>Enterococcus faecium</i>	11.15	<i>Enterococcus gallinarum</i>	9.49
<i>Staphylococcus agalactiae</i>	11.60	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9.95	<i>Enterococcus faecium</i>	11.17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	11.16	<i>Candida parapsilosis</i>	11.59
<i>Candida parapsilosis</i>	12.10	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	10.17	<i>Streptococcus agalactiae</i>	11.85	<i>Serratia marcescens</i>	14.20	<i>Staphylococcus agalactiae</i>	11.64
<i>Klebsiella oxytoca</i>	14.13	<i>Streptococcus agalactiae</i>	11.09	<i>Enterococcus faecalis</i>	13.69			<i>Candida krusei</i>	11.69
<i>Enterococcus faecalis</i>	14.42	<i>Candida parapsilosis</i>	11.20	<i>Streptococcus pyogenes</i>	14.66			<i>Enterococcus faecalis</i>	13.15
<i>Enterobacter aerogenes</i>	14.83	<i>Enterococcus faecium</i>	12.27					<i>Enterococcus faecium</i>	13.45
		<i>Enterococcus faecalis</i>	13.01						
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	14.72						

* Ct: número de ciclos requeridos para que en una reacción en cadena de la polimerasa se detecte la señal fluorescente; ésta es inversamente proporcional a la cantidad del blanco (fragmento génico) en la muestra, por lo que todos los organismos que requieren de 1-11 ciclos se consideran como los agentes causales de la sepsis, mientras que los que requieren de 12-13 ciclos en la identificación se consideran ADNemias; los que amplifican de 14-15 ciclos son considerados como agentes contaminantes de las muestras.

incremento de morbilidad y mortalidad de los pacientes en las UCI.⁴⁶⁻⁵¹ Se espera que el número de microorganismos de los que no se conoce su patogenicidad en humanos incremente a medida que se extienda el uso de las técnicas moleculares con paneles más amplios, lo que implica reflexionar sobre el papel individual de los microorganismos aislados en una infección polimicrobiana y en los mecanismos de patogenicidad y virulencia de cada uno de ellos durante el desarrollo de un cuadro séptico. Evidentemente las pruebas moleculares son herramientas que están transformando el diagnóstico en las instituciones de salud, especialmente si se incursiona en rapidez, sensibilidad y especificidad que benefician la calidad de vida y la salud de los pacientes al incrementar las posibilidades de éxito terapéutico.

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Rafael Castillo Arriaga, Director Médico del ISSSTE, y a la Dra. Margarita Blanco Cornejo, Directora de Vigilancia Epidemiológica del ISSSTE, por su confianza para que el Laboratorio de Medicina Genómica del Hospital Regional 1° de Octubre instaurara las técnicas de biología molecular para el diagnóstico molecular de sepsis, así como por la gestión realizada para la obtención de recursos financieros para tal fin.

REFERENCIAS

1. Sprung CL, Sakr Y, Vincent JL, et al. An evaluation of systemic inflammatory response syndrome signs in the Sepsis Occurrence in Acutely ill Patients (SOAP) study. *Intensive Care Med* 2006;32:421-427.

2. Dark PM, Dean P, Warhurst G. Bench-to-bedside review: The promise of rapid infection diagnosis during sepsis using polymerase chain reaction-based pathogen detection. *Crit Care* 2009;13:217.
3. Briceño I. Sepsis: Etiología, manifestaciones clínicas y diagnóstico. *Medicrit* 2005;2:203–213.
4. An G, Namas RA, Vodovotz Y. Sepsis: From pattern to mechanism and back. *Crit Rev Biomed Eng* 2012;40:341–351.
5. Mai V, Murgas-Torrazza R, Ukhanova M, et al. Distortions in development of intestinal microbiota associated with late onset sepsis in preterm infants. *PLoS One* 2013;8:e52876.
6. Carrillo-Esper R, Carrillo-Córdova JR, Carrillo-Córdova LD. Estudio epidemiológico de la sepsis en unidades de terapia intensiva mexicanas. *Cir Ciruj* 2009;77:301-308.
7. 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;348:1546-1554.
8. Mancini N, Carletti S, Ghidoli N, et al. The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clin Microbiol Rev* 2010;23:235–251.
9. Danai PA, Moss M, Mannino DM, Martin GS. The epidemiology of sepsis in patients with malignancy. *Chest* 2006;129:1432–1440.
10. Czura CJ. Merinoff Symposium 2010: Sepsis An international call to action. *Mol Med* 2010;16:157-158.
11. Goldstein B, Giroir B, Randolph A, the Members of the International Consensus Conference on Pediatric Sepsis. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 2005;6:2-8.
12. Leal YA, Álvarez-Nemegyei J, Velázquez JR, et al. Risk factors and prognosis for neonatal sepsis in southeastern Mexico: analysis of a four-year historic cohort follow-up. *BMC Pregnancy Childbirth* 2012;12:48.
13. Rodríguez-Weber MA, López-Candiani C, Arredondo-García JL, y cols. Morbilidad y mortalidad por sepsis neonatal en un hospital de tercer nivel de atención. *Salud Publica Mex* 2003;45:90-95.
14. Vergnano S, Sharland M, Kazembe P, et al. Neonatal sepsis: an international perspective. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005;90:F220–F224.
15. Cheng B, Xie G, Yao SL, et al. Epidemiology of severe sepsis in critically ill surgical patients in ten university hospitals in China. *Crit Care Med* 2007;35:2538-2546.
16. Buhimschi CS, Bhandari V, Hamar BD, et al. Proteomic profiling of the amniotic fluid to detect inflammation, infection, and neonatal sepsis. *PLoS Med* 2007;4:e18.
17. Khashu M, Osiovich H, Henry D, et al. Persistent bacteremia and severe thrombocytopenia caused by coagulase-negative *Staphylococcus* in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics* 2006;117:340-348.
18. Bezirtzoglou E, Stavropoulou E. Immunology and probiotic impact of the newborn and young children intestinal microflora. *Anaerobe* 2011;17:369-374.
19. Carrillo Esper R, Peña-Perez C, Mucino-Bermejo J, y cols. Sepsis grave, choque séptico y disfunción orgánica múltiple secundaria a infección por *Kluyvera ascorbata*. *Gac Méd Méx* 2011;147:355-360.
20. Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, et al. Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. *J Clin Microbiol* 2011;49:2252–2258.
21. Connell TG, Rele M, Cowley D, et al. How reliable is a negative blood culture result? Volume of blood submitted for culture in routine practice in a children's hospital. *Pediatrics* 2007;119:891-896.
22. Dark PM, Dean P, Warhurst G. Bench-to-bedside review: The promise of rapid infection diagnosis during sepsis using polymerase chain reaction based pathogen detection. *Crit Care* 2009;13:217.
23. Vincent JL. Clinical sepsis and septic shock—definition, diagnosis and management principles. *Langenbecks Arch Surg* 2008;393:817–824.
24. Anthony RM, Brown TJ, French GL. Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol* 2000;38:781–788.
25. Rantakokko-Jalava K, Nikkari S, Jalava J, et al. Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections. *J Clin Microbiol* 2000;38:32–39.
26. Jordan JA, Butchko AR, Durso MB. Use of pyrosequencing of 16S rRNA fragments to differentiate between bacteria responsible for neonatal sepsis. *J Mol Diagn* 2005;7:105–110.
27. Laakso S, Kirveskari J, Tissari P, Mäki M. Evaluation of high-throughput PCR and microarray-based assay in conjunction with automated DNA extraction instruments for diagnosis of sepsis. *PLoS One* 2011;6:e26655.
28. Tissari P, Zumla A, Tarkka E, et al. Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study. *Lancet* 2010;375:224–230.
29. Loonen AJM, Jansz AR, Stalpers J, et al. An evaluation of three processing methods and the effect of reduced culture times for faster direct identification of pathogens from BacT/ALERT blood cultures by MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:1575–1583.
30. Emmadi R, Boonyaratanakornkit JB, Selvarangan R, et al. Molecular methods and platforms for infectious diseases testing: A review of FDA-approved and cleared assays. *J Mol Diagn* 2011;13:583–604.
31. Loeffler J, Schmidt K, Hebart H, et al. Automated extraction of genomic DNA from medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNA pure LC system. *J Clin Microbiol* 2002;40:2240–2243.

32. Frye JG, Jesse T, Long F, et al. DNA microarray detection of antimicrobial resistance genes in diverse bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 27;2006:138–151.
33. Goldenberg RL, Andrews WW, Goepfert AR, et al. The Alabama preterm birth study: Umbilical cord blood *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* cultures in very pre-term newborns. *Am J Obstet Gynecol* 2008;198:43.e1–43.e5.
34. Lyon E, Wittwer CT. LightCycler technology in molecular diagnostics. *J Mol Diagn* 2009;11:93–101.
35. Murdoch DR, Anderson TP, Beynon KA, et al. Evaluation of a PCR assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in respiratory and nonrespiratory samples from adults with community-acquired pneumonia. *J Clin Microbiol* 2003;41:63–66.
36. Kumar A, Roberts D, Wood KE, 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;34:1589-1596.
37. Lehmann LE, Herpichboehm B, Kost GJ, et al. Cost and mortality prediction using polymerase chain reaction pathogen detection in sepsis: evidence from three observational trials. *Crit Care* 2010;14:R186.
38. Loens K, van Loon AM, Coenjaerts F, et al. Performance of Different Mono- and Multiplex Nucleic Acid Amplification Tests on a Multipathogen External Quality Assessment Panel. *J Clin Microbiol* 2012;50:977–987.
39. Bhat N, O'Brien KL, Karron RA, et al. Use and evaluation of molecular diagnostics for pneumonia etiology studies. *Clin Infect Dis* 2012;54(Suppl 2):S153-S158.
40. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:165-256.
41. Peters RP, van Agtmael MA, Gierveld S, et al. Quantitative detection of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* DNA in blood to diagnose bacteremia in patients in the intensive care unit. *J Clin Microbiol* 2007;45:3641-3646.
42. Carver-Brown RK, Reis AH Jr, Rice LM, et al. Design and construction of a single-tube, LATE-PCR, multiplex endpoint assay with lights-on/lights-off probes for the detection of pathogens associated with sepsis. *J Pathog* 2012;2012:424808.
43. Rice JE, Reis AH Jr, Rice LM, et al. Fluorescent signatures for variable DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 2012;40:e164.
44. Chang SS, Hsieh WH, Liu TS, et al. Multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis – a systemic review and meta-analysis. *PLoS One* 2013;8:e62323.
45. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, et al. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* 2000;118:146-155.
46. Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:57-80.
47. Jumaa PA, Sonnevend A, Pål T, et al. The molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia in a tertiary referral hospital in the United Arab Emirates 2000-2004. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006;5:32.
48. Nseir S, Di Pompeo C, Brisson H, et al. Intensive care unit-acquired *Stenotrophomonas maltophilia*: incidence, risk factors, and outcome. *Crit Care* 2006;10:R143.
49. Looney WJ, Narita M, Mühlemann K. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infect Dis* 2009;9:312-323.
50. Chang JS, Flynn HW Jr, Miller D, Smiddy WE. *Stenotrophomonas maltophilia* endophthalmitis following cataract surgery: clinical and microbiological results. *Clin Ophthalmol* 2013;7:771-777.
51. Chiu LQ, Wang W. A case of unusual Gram-negative bacilli septic arthritis in an immunocompetent patient. *Singapore Med J* 2013;54:e164-168.