Evaluación de una PCR multiplex en tiempo real para la detección de patógenos en el tejido valvular de pacientes con endocarditis

Ángel L. Fernández^a, Eduardo Varela^b, Lucía Martínez^b, Amparo Martínez^c, Juan Sierra^a, José R. González-Juanatey^c y Benito Regueiro^b

^aServicio de Cirugía Cardíaca. Hospital Clínico Universitario. Santiago de Compostela. A Coruña. España.

^bServicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario. Santiago de Compostela. A Coruña. España.

^cServicio de Cardiología. Hospital Clínico Universitario. Santiago de Compostela. A Coruña. España.

Un nuevo test multiplex basado en una reacción en cadena de polimerasa en tiempo real LightCycler SeptiFast[®] permite la identificación de 25 especies bacterianas y fúngicas directamente desde la sangre. El test SeptiFast[®] ha sido utilizado para el diagnóstico etiológico rápido de la endocarditis infecciosa, pero no ha sido ensayado directamente sobre las vegetaciones cardíacas de pacientes intervenidos por endocarditis infecciosa. Se realizó un estudio prospectivo para analizar 15 muestras de tejido valvular con endocarditis infecciosa activa utilizando SeptiFast[®] y comparando su sensibilidad con el hemocultivo, el cultivo del tejido valvular y el SeptiFast[®] en sangre. La sensibilidad del SeptiFast[®] del tejido valvular fue del 100%, confirmó el diagnóstico obtenido mediante hemocultivo en 13 casos y proporcionó el diagnóstico etiológico en 2 casos con hemocultivo negativo. La sensibilidad de SeptiFast en el tejido valvular fue superior al cultivo convencional de las vegetaciones y al SeptiFast en sangre.

Palabras clave: Endocarditis. Reacción en cadena de la polimerasa.

Evaluation of a Multiplex Real-Time PCR Assay for Detecting Pathogens in Cardiac Valve Tissue in Patients With Endocarditis

With a novel real-time multiplex polymerase chain reaction test, the LightCycler SeptiFast[®] test, 25 bacterial and fungal species can be identified directly in blood. The SeptiFast[®] test has been used for rapid etiologic diagnosis in infectious endocarditis using blood samples but has not been evaluated directly on cardiac vegetations in patients being treated for infectious endocarditis. We prospectively analyzed 15 samples of heart valve tissue with active infectious endocarditis using the SeptiFast[®] test and compared the test's sensitivity with that of blood culture, valve tissue culture, and the SeptiFast[®] test in blood. The sensitivity of the SeptiFast test in heart valve tissue was 100%. The test results confirmed the diagnosis obtained using blood culture in 13 cases and identified the pathogen in 2 cases where blood culture tested negative. The sensitivity of the SeptiFast[®] test in heart valve tissue was greater than that obtained with conventional culture of vegetations or with the SeptiFast test in blood.

Key words: Endocarditis. Polymerase chain reaction.

Full English text available from: www.revespcardiol.org

INTRODUCCIÓN

El cultivo del tejido valvular de pacientes intervenidos por endocarditis infecciosa (EI) activa puede resultar falsamente positivo por contaminación de la muestra o negativo por el tratamiento antiinfeccioso o por tratarse de microorganismos no cultivables^{1,2}.

Correspondencia: Dr. A.L. Fernández.
Servicio de Cirugía Cardíaca. Hospital Clínico Universitario.
Travesía Choupana, s/n. 15706 Santiago de Compostela. A Coruña.
España.
Correo electrónico: alfg@secardiologia.es

Recibido el 23 de septiembre de 2009.

Aceptado para su publicación el 25 de noviembre de 2009.

La amplificación y la detección del ácido desoxirribonucleico (ADN) microbiano del tejido valvular mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica más sensible que los métodos convencionales de cultivo y su fiabilidad ha sido contrastada en el diagnóstico de la EI y en la identificación de nuevos agentes patógenos²⁻⁶.

Se ha propuesto que la demostración de ADN microbiano en el tejido valvular debiera ser un criterio diagnóstico mayor de EI⁴. En la actualidad, se recomienda el análisis molecular del tejido valvular o del material embólico en la EI con hemocultivo negativo⁷.

Recientemente, se ha introducido un test para el diagnóstico molecular de la septicemia mediante

TABLA 1. Microorganismos detectables mediante el test PCR multiplex LightCycler SeptiFast®⁹

Gram negativo	Gram positivo	Hongos
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Klebsiella (pneumoniae/oxytoca)</i>	CoNS	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Enterobacter (cloacae/aerogenes)</i>	<i>Streptococcus</i> spp.*	<i>Candida glabrata</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		

CoNS: estafilococos coagulasa negativos identificables por el test SeptiFast® (incluyen: *S. epidermidis*, *S. hemolyticus*, *S. hominis*, *S. pasteurii*, *S. warneri*, *S. cohnii*, *S. lugdenensis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. saphrophyticus* y *S. xylois*); PCR: reacción en cadena de polimerasa.

*Los estreptococos identificables por el test SeptiFast® incluyen: *S. agalactiae*, *S. pyogenes*, *S. anginosus*, *S. bovis*, *S. constellatus*, *S. cristatus*, *S. gotdonii*, *S. intermedius*, *S. milleri*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. thermophilus*, *S. vestibularis* y *S. viridans*.

PCR multiplex en tiempo real capaz de identificar en una muestra de 1,5 ml de sangre ADN bacteriano o fúngico de los 25 patógenos más frecuentes causantes de septicemia⁸ (LightCycler SeptiFast® test, Roche Diagnostics, Penzberg, Alemania) (tabla 1)⁹.

SeptiFast® en sangre ha proporcionado resultados prometedores en sepsis^{10,11} y fiebre con neutropenia¹² y ha permitido el diagnóstico etiológico en EI con hemocultivo negativo⁹, si bien no hay datos sobre su aplicación en el tejido valvular. Este trabajo presenta la experiencia preliminar de SeptiFast® para el análisis de las vegetaciones en la EI activa.

MÉTODOS

Entre agosto de 2007 y septiembre de 2009 se estudió a 15 pacientes (11 varones y 4 mujeres) con EI activa sometidos a cirugía valvular. La media de edad fue de 70,2 (intervalo, 57-82) años. Todos presentaban EI definitiva según los criterios de Duke modificados¹³. La EI se localizó sobre válvula nativa izquierda (6 casos), prótesis valvular (8 casos) y válvula tricúspide (1 caso).

Antes de ser remitidos para cirugía se había extraído hemocultivos en otros servicios hospitalarios, que resultaron positivos en 13 casos y negativos en 2. Todos los pacientes habían recibido tratamiento antiinfeccioso entre 24 h y 82 días antes, sin completar una pauta correcta.

Durante la evaluación preoperatoria —realizada entre 1 y 24 días después del hemocultivo— se extrajo sangre para estudio mediante SeptiFast® del modo descrito^{8,10}. Intraoperatoriamente, se introdujo una muestra de tejido valvular con vegetaciones o sólo vegetaciones, en el caso de prótesis, en un recipiente libre de ADN sin aditivos.

El ADN del tejido se obtuvo mediante lisis mecánica (MagNa Lyser, Roche Diagnostics, Penzberg, Alemania) y posterior extracción (MagNa Pure Compact, Roche Diagnostics,

Penzberg, Alemania). El análisis molecular se llevó a cabo con el sistema SeptiFast® según las indicaciones del fabricante⁸; el microbiólogo desconocía el resultado de los hemocultivos previos. El tiempo empleado en el análisis molecular del tejido desde la llegada de la muestra al laboratorio hasta el resultado fue de 3,57 h.

Un fragmento del tejido se cultivó del modo convencional en agar sangre, agar chocolate (5%, CO₂), agar Sabouraud, agar Schaedler y caldo tioglicolato. La identificación de los microorganismos aislados se llevó a cabo mediante el sistema Vitek 2 (BioMérieux, Nancy l'Etoile, Francia).

RESULTADOS

Los resultados de los hemocultivos realizados antes de remitir a los pacientes para cirugía están reflejados en la tabla 2. Los 2 casos negativos habían recibido tratamiento antibiótico oral e intravenoso intermitente en su centro de referencia durante más de 4 semanas antes de extraer las muestras para hemocultivo. SeptiFast® en sangre fue positivo en 8 casos y negativo en 7 (tabla 2).

El cultivo del tejido valvular fue positivo en 5 casos y negativo en 10 (tabla 2). SeptiFast® en el tejido valvular resultó positivo en todos los pacientes y coincidente con el hemocultivo y con SeptiFast® en sangre. Se observó una discrepancia entre el cultivo de la vegetación y SeptiFast® del tejido valvular (caso 10) que se interpretó como posible contaminación de la muestra cultivada (tabla 2).

DISCUSIÓN

Trabajos previos han demostrado que la amplificación del gen 16S del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) mediante PCR utilizando cebadores de amplio intervalo es una técnica más sensible que el hemocultivo y el cultivo de tejido valvular para el diagnóstico etiológico de la EI ya que logra un ras-

TABLA 2. Resultado de los cultivos y de los estudios moleculares en sangre y en tejido valvular

Caso	Días ^a	Hemocultivo ^b	SeptiFast [®] sangre ^c	Cultivo válvula	SeptiFast [®] válvula
1	15	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	–	<i>Streptococcus</i> spp.
2	1	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
3	82	–	<i>E. faecalis</i>	–	<i>E. faecalis</i>
4	35	–	<i>E. coli</i>	–	<i>E. coli</i>
5	9	CoNS	CoNS	–	CoNS
6	18	<i>S. intermedius</i>	–	–	<i>Streptococcus</i> spp.
7	11	<i>S. agalactiae</i>	–	–	<i>Streptococcus</i> spp.
8	39	<i>E. faecalis</i>	–	–	<i>E. faecalis</i>
9	13	<i>S. aureus</i>	–	–	<i>S. aureus</i>
10	10	<i>S. epidermidis</i>	CoNS	<i>S. mitis</i> ^d	CoNS
11	7	<i>S. epidermidis</i>	CoNS	<i>S. epidermidis</i>	CoNS
12	4	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
13	3	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
14	54	<i>S. oralis</i>	–	–	<i>Streptococcus</i> spp.
15	25	<i>S. aureus</i>	–	–	<i>S. aureus</i>

^aNúmero total de días de tratamiento antibiótico continuo o intermitente antes de la intervención quirúrgica.

^bEl hemocultivo se extrajo antes de remitir a los pacientes para tratamiento quirúrgico.

^cLa muestra para SeptiFast[®] se extrajo entre 1 y 24 días después del hemocultivo.

^dSe consideró contaminación de la muestra.

–: negativo; CoNS: estafilococos coagulasa negativos; E: *enterococcus*; S: *streptococcus*.

treo universal, si bien su uso sistemático está restringido a algunos laboratorios debido a su complejidad^{3,4}.

El test SeptiFast[®] amplifica el espaciador transcripcional interno (ITS) en la región del gen ARNr y su ventaja se basa en la simplicidad y el tiempo reducido de respuesta, pero, a diferencia de los cebadores universales, SeptiFast[®] sólo detecta ADN de los microorganismos cuya secuencia diana está incluida y no es capaz de identificar todos los posibles gérmenes causantes de EI.

SeptiFast[®] en sangre de pacientes con EI ha demostrado una sensibilidad similar al hemocultivo para estreptococos, enterococos y *Staphylococcus aureus*¹³. En casos de EI tratados con antiinfecciosos y con hemocultivo negativo, SeptiFast[®] puede detectar ADN bacteriano en circulación¹³, tal como pudimos comprobar en nuestra serie (casos 3 y 4). También es posible que en pacientes con EI activa se obtenga un hemocultivo positivo y días después un SeptiFast[®] en sangre negativo aunque coexistan vegetaciones con ADN bacteriano. Este último fenómeno fue observado en nuestra serie (casos 6-9 y 14-15) cuando el periodo de tratamiento antibiótico transcurrido entre el hemocultivo y el SeptiFast[®] fue de más de 5 días.

Se ha descrito una menor sensibilidad de SeptiFast[®] en sangre frente a estafilococos coagulasa negativos (CoNS) respecto al hemocultivo^{10,12,13}. Esto puede deberse a una baja concentración de ADN bacteriano en sangre secundaria a la liberación entrecada de ADN desde las vegetaciones a la circulación o a la inactivación del ADN¹².

Además, SeptiFast[®] ha sido diseñado para el diagnóstico de sepsis y ha prefijado un punto de corte de sensibilidad relativamente alto para el ADN de los CoNS y estreptococos, de modo que las concentraciones bajas no se consideran positivas. Esta programación del *software* pretende filtrar los casos de bacteriemia transitoria contaminante en relación con técnicas invasivas —catéteres intravenosos, sondas— propias de las unidades de críticos¹¹. En nuestra experiencia, consideramos que los portadores de prótesis valvulares, donde los CoNS son el principal agente etiológico de la EI postoperatoria precoz, cada caso debe ser valorado conjuntamente entre el clínico y el microbiólogo para discriminar entre contaminante o patógeno. En este sentido, nuestros pacientes 5, 10 y 11 presentaban endocarditis precoz sobre prótesis y SeptiFast[®] en sangre detectó ADN de CoNS, pero el *software* de identificación lo interpretó como posible contaminación, mientras que los hemocultivos y SeptiFast[®] del tejido valvular resultaron positivos.

La sensibilidad de SeptiFast[®] en las vegetaciones fue del 100%, mientras que para el cultivo del tejido valvular fue del 30,7%, similar a lo observado con otras técnicas moleculares²⁻⁴. En nuestra serie, pudimos comprobar, al igual que otros autores³, que la sensibilidad de la PCR no se afecta por el tiempo de tratamiento antiinfeccioso administrado antes de la cirugía. Este hecho puede ser debido a que el aclaramiento del ADN procedente de bacterias viables o no viables presentes en la vegetación es lento, y puede persistir ADN bacteriano hasta varios años

después de completar el tratamiento antiinfeccioso¹⁴.

Nuestros resultados confirman que la aplicación de SeptiFast® para el estudio del tejido valvular en la EI es un sistema rápido, sensible y fácilmente reproducible. Por tratarse de una técnica molecular SeptiFast® no identifica gérmenes viables, sino ADN microbiano. Como ya se indicó, SeptiFast® está diseñado para identificar un grupo amplio de especies bacterianas y fúngicas, pero no detecta otros posibles patógenos de la EI, como el grupo HACEK, *Gemella*, *Coxiella* y *Bartonella* y, por consiguiente, un SeptiFast® negativo no descarta EI.

BIBLIOGRAFÍA

- Muñoz P, Bouza E, Marín M, Alcalá L, Rodríguez Créixems M, Valerio M, et al. Heart valves should not be routinely cultured. *J Clin Microbiol*. 2008;46:2897-901.
- Breitkopf C, Hammel D, Scheld HH, Peters G, Becker K. Impact of a molecular approach to improve the microbiological diagnosis of infective heart valve endocarditis. *Circulation*. 2005;111:1415-21.
- Voldstedlund M, Pedersen LN, Baandrup U, Klaaborg KE, Fuursted K. Broad-range PCR and sequencing in routine diagnosis of infective endocarditis. *APMIS*. 2008;116:190-8.
- Marín M, Muñoz P, Sánchez M, Del Rosal M, Alcalá L, Rodríguez-Créixems M, et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis by real-time broad-range polymerase Chain reaction (PCR) and sequencing directly from heart valve tissue. *Medicine*. 2007;86:195-202.
- Lang S, Watkin RW, Lambert PA, Bonser RS, Littler WA, Elliott TS. Evaluation of PCR in the molecular diagnosis of endocarditis. *J Infect*. 2004;48:269-75.
- Kotilainen P, Heiro M, Jalava J, Rantakokko V, Nikoskelainen J, Nikkari S, et al. Aetiological diagnosis of infective endocarditis by direct amplification of rARN genes from surgically removed valve tissue. An 11-year experience in a Finnish teaching hospital. *Ann Med*. 2006;38:263-73.
- Habib G, Hoen B, Tornos P, Thuny F, Prendergast B, Vilacosta I. Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis. *Eur Heart J*. 2009 [Epub ahead of print].
- Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoefl A, et al. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol*. 2008;197:313-24.
- Casalta JP, Gouriet F, Roux V, Thuny F, Habibi G, Raoult D. Evaluation of the LightCycler® SeptiFast test in the rapid etiologic diagnostic of infectious endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28:569-73.
- Lehmann L, Álvarez J, Hunfeld K, Goblio A, Kost G, Louis R, et al. Potencial clinical utility of PCR in microbiological testing for sepsis. *Crit Care Med*. 2009 [Epub ahead of print].
- Westh H, Lisby G, Breysse F, Böddinghaus B, Chomarat M, Gant V, et al. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15:544-51.
- Lilienfeld-Toal M, Lehmann LE, Raadts AD, Hahn-Ast C, Orlopp KS, Marklein G, et al. Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol*. 2009;47:2405-10.
- Li JS, Sexton DJ, Mick N, Nettles R, Fowler VG Jr, Ryan T, et al. Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. *Clin Infect Dis*. 2000;30:633-8.
- Rovero C, Greub G, Lepidi H, Casalta JP, Habib G, Collart F, et al. PCR detection of bacteria on cardiac valves of patients with treated bacterial endocarditis. *J Clin Microbiol*. 2005;43:163-7.