

ORIGINAL

La reacción en cadena de la polimerasa en el diagnóstico de la enfermedad meningocócica invasiva

C. Fernández-San José^a, F.A. Moraga-Llop^{a,*}, G. Codina^b, P. Soler-Palacín^a,
M. Espiau^a y C. Figueras^a

^a Unidad de Patología Infecciosa e Inmunodeficiencias de Pediatría, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona, España

^b Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona, España

Recibido el 28 de octubre de 2013; aceptado el 4 de marzo de 2014

PALABRAS CLAVE

Infección por meningococo;
Meningitis por meningococo;
Enfermedad meningocócica;
Reacción en cadena de la polimerasa

Resumen

Introducción objetivos: La enfermedad meningocócica invasiva (EMI) constituye un grave problema de salud pública. A pesar de que el cultivo es la técnica de referencia para su diagnóstico, la administración previa de antibiótico altera su sensibilidad. Los objetivos de este estudio son el análisis epidemiológico de la EMI en nuestro medio, evaluar la utilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para incrementar el diagnóstico de confirmación de la EMI y valorar la asociación de la administración de antibiótico con el resultado negativo del cultivo. **Pacientes y métodos:** Estudio retrospectivo de los pacientes menores de 16 años diagnosticados de EMI mediante cultivo, PCR o ambos, que ingresaron en nuestro centro en el periodo 2004-2012.

Resultados: Se incluyó a 75 pacientes, de los cuales el 52% presentó sepsis, el 30,7% meningitis y el 17,3% sepsis con meningitis. La PCR fue positiva en todas las muestras de sangre y líquido cefalorraquídeo analizadas, mientras que el cultivo tuvo una positividad muy inferior (50,7%). Recibieron antibiótico antes de la extracción de las muestras 40 pacientes (53,3%) y el 40% de ellos fueron confirmados por la PCR.

Conclusiones: Gracias a la PCR se obtuvo un diagnóstico de confirmación de EMI en el 38,7% de los casos y del serogrupo, hecho relevante para la vigilancia epidemiológica y el estudio de la efectividad vacunal.

© 2013 Asociación Española de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fmoraga@acmcb.es (F.A. Moraga-Llop).

KEYWORDS

Meningococcal infections;
Meningococcal meningitis;
Meningococcal disease;
Polymerase chain reaction

The use of polymerase chain reaction in the diagnosis of invasive meningococcal diseases

Abstract

Introduction and objectives and aims: Invasive meningococcal disease (IMD) remains a serious public health problem. Although culture is the gold standard, previous antibiotic therapy reduces its sensibility. The aim of this study is the epidemiological analysis of IMD in our area, to assess the usefulness of polymerase chain reaction (PCR) to increase its diagnostic accuracy, and to show the association of antibiotic administration with the negative result of the culture.

Patients and methods: A retrospective study was conducted on all children younger than 16 years with microbiologically (positive culture and/or PCR) confirmed IMD, admitted to our hospital between 2004-2012.

Results: Seventy-five patients were included, of whom 52% had sepsis, 30.7% meningitis, and 17.3% with both of them. PCR was positive in all samples, whereas a positive was seen 50.7% of the cultures. Previously administered antibiotic was documented in 40 patients (53.3%), and 40% of them were confirmed by PCR only.

Conclusions: PCR was the only test providing evidence for IMD diagnosis and serogroup determination in almost 39% of cases.

© 2013 Asociación Española de Pediatría. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La enfermedad meningocócica invasiva (EMI) constituye un grave problema de salud pública en todo el mundo, con un gran impacto social y una alta tasa de morbimortalidad en todos los grupos de edad. A pesar de los avances en el conocimiento de la enfermedad, su diagnóstico y su tratamiento, y de la aplicación de nuevas estrategias de prevención, la EMI es endémica en muchos países del mundo, incluso en los más desarrollados, con tasas de ataque entre 1 y 5 por 100.000 habitantes¹.

En España, según los datos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica para el periodo comprendido entre 2004 y 2011, se observa una tasa de incidencia global de EMI de 0,92 a 1,67 casos por 100.000 habitantes²⁻⁴. En el niño, la mayor incidencia ocurre en los menores de un año, con tasas de 13 casos por 100.000 en la temporada 2009-2010³. Los serogrupos B y C han sido los causantes de más del 90% de los casos de EMI en nuestro medio^{2,3,5}. La introducción de la vacuna antimeningocócica C conjugada, en el año 2001, ha reducido la incidencia de la EMI por este serogrupo hasta un 88%⁶, a pesar de lo cual continúa siendo una enfermedad grave por las secuelas (11-19%)^{2,3} y la mortalidad que produce (5-14%)¹⁻³.

La confirmación diagnóstica de la EMI se realiza demostrando la presencia de *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) en sangre o líquido cefalorraquídeo (LCR), o en ambos, mediante cultivo o detección del ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano^{5,7}, o por las 2 técnicas. El cultivo continúa siendo el método de referencia para el diagnóstico microbiológico y, además, permite la realización de pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos y de estudios de tipificación de la cepa aislada. Sin embargo, no está exento de limitaciones, entre las que destaca su baja rentabilidad cuando las muestras provienen de enfermos que han recibido tratamiento antibiótico previo^{5,8-11}.

A pesar de la realización del cultivo, los casos declarados de EMI sin confirmación microbiológica representan un

porcentaje importante, lo cual limita el análisis de la evolución epidemiológica y del impacto de las vacunaciones.

La introducción de las técnicas de detección de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) ha supuesto un avance en el diagnóstico de confirmación y diversos estudios y guías de práctica clínica recomiendan su realización sistemática^{5,8,12-14}.

Los objetivos de este estudio son el análisis epidemiológico de la EMI en nuestro medio, evaluar la utilidad de la PCR para el diagnóstico de la EMI y correlacionar la negatividad de los cultivos en los casos confirmados con la administración previa de antibiótico.

Pacientes y métodos

Se realizó un análisis retrospectivo de las historias clínicas de los pacientes menores de 16 años con diagnóstico clínico de EMI, confirmado por cultivo, PCR o ambos métodos, que ingresaron en el Hospital Universitari Vall d'Hebron en el periodo comprendido entre enero del 2004 y diciembre del 2012. Todos los casos se seleccionaron a partir de los registros de resultados de los cultivos y de la PCR del Servicio de Microbiología.

Los datos recogidos incluyeron variables demográficas, clínicas y de laboratorio; además, se documentó si hubo administración de antibiótico previa a la extracción de la muestra.

Se obtuvieron muestras de sangre, LCR o ambas de los pacientes para la realización de cultivo y PCR (las 2 técnicas realizadas con la misma muestra), que fueron procesadas y analizadas en los laboratorios de diagnóstico molecular, de hemocultivos y de cultivos generales del Servicio de Microbiología. Para la PCR se analizaron las muestras de más de 100 µl. Se extrajeron los ácidos nucleicos de las muestras mediante el sistema automatizado *EasyMag*[®] (bioMérieux, Marcy, l'Etoile, Francia) y posteriormente se

Tabla 1 Características demográficas y clínicas de los 75 pacientes con enfermedad meningocócica invasiva

<i>Edad media</i>	3,1 años	Cuadro clínico	
<i>Menores de un año</i>	21 (28%)	Sepsis	39 (52%)
<i>Sexo</i>		Meningitis	23 (30,7%)
Hombre	46 (61,3%)	Sepsis con meningitis	13 (17,3%)
Mujer	29 (38,7%)	Estancia media hospitalaria	10,9 días
<i>Serogrupos</i>		Ingreso en UCI	56 (74,7%)
B	66 (88%)	Mortalidad	4 (5,3%)
C	3 (4%)	Secuelas	
Y	1 (1,3%)	Sordera	6 (8%)
No serogrupable	5 (6,7%)	Otras	2 (2,7%)
<i>Vacunación incompleta frente a serogrupo C</i>	3 (4%)	Déficit complemento (C5)	1 (1,3%)

C5: fracción C5 del complemento; UCI: unidad de cuidados intensivos.

amplificaron mediante PCR multiplex para *N. meningitidis* (región *ctrA*, *capsular transport gene*), *Haemophilus influenzae* serogrupo b (*bexA*, *capsulation gene*) y *Streptococcus pneumoniae* (*ply*, *pneumolysin gene*) con sondas fluorescentes tipo *TaqMan*[®] en un termociclador *Smartcycler*[®] (Cepheid, Sunnyvale, EE. UU.)¹⁵. Para determinar el serogrupo de *N. meningitidis* se aglutinó la muestra con antisueños específicos, en los casos en que se disponía de la cepa; en el resto, se determinó mediante PCR según la descripción de Mölling et al.¹⁶. Para la realización del hemocultivo, se utilizó la botella pediátrica con el sistema *BacT/ALERT*[®] 3D (Biomérieux, Marcy, l'Etoile, Francia). Para la realización del cultivo del LCR, se centrifugó la muestra a 1.500rpm durante 15 min, y el sedimento se inoculó en una placa con agar sangre y en medio de enriquecimiento LAN.

Se realizó un análisis descriptivo de la muestra para la detección de valores extremos o erróneos y, a continuación, se describieron las variables mediante el cálculo de frecuencias y sus correspondientes proporciones en el caso de variables discretas, y mediante las medias (o medianas) con sus desviaciones estándar (o rango intercuartílico) para las variables continuas. Se utilizó el test de la ji al cuadrado para valorar la significación estadística de la asociación entre la administración de antibiótico previa a la obtención de las muestras y el resultado negativo de los cultivos. Se consideró como punto de corte para la significación estadística una $p < 0,05$. El análisis estadístico se llevó a cabo con el paquete *SPSS*[®] versión 20.0 (SPSS, Chicago, EE. UU.).

Para la realización del estudio se obtuvo la aprobación del comité ético del hospital.

Resultados

Entre enero del 2004 y diciembre del 2012, ingresaron en nuestro centro 75 pacientes con diagnóstico clínico de EMI confirmado mediante cultivo, PCR o ambos. La distribución de los casos en los 9 años del estudio fue homogénea, a excepción de un aumento de la incidencia en los años 2009 y 2010 (29/75, 38,7%) (fig. 1). En la tabla 1 se resumen los datos demográficos y clínicos más relevantes de los pacientes.

Los datos microbiológicos se recogen en la tabla 2. En 8 de los 36 pacientes con el diagnóstico clínico de meningitis (23 con meningitis y 13 con sepsis con meningitis), la

confirmación fue solo mediante cultivo, ya que no se realizó el estudio molecular. En los 28 pacientes restantes se pudo estudiar el LCR mediante cultivo y PCR. La PCR fue positiva en el 100% de los casos y el cultivo en el 50%, es decir, el diagnóstico se obtuvo mediante PCR en la mitad de los pacientes (14 casos).

En 5 de los 52 pacientes con el diagnóstico de sepsis (39 con sepsis y 13 con sepsis con meningitis), la confirmación fue solo mediante cultivo, ya que no se realizó el estudio molecular. En los 47 pacientes restantes se pudo realizar cultivo y PCR. La PCR fue positiva en el 100% de los casos y el cultivo en el 51,1%, es decir, el diagnóstico se obtuvo mediante PCR en el 48,9% de los pacientes (23 casos).

El serogrupo de meningococo pudo determinarse en el 88,6% de las muestras (78/88). La PCR permitió conocerlo en el 81,6% (31/38) de las muestras: el 95,8% de las de sangre periférica (22 B y un C) y el 57,1% de las de LCR (8 B) (tabla 3).

Un 53,3% de los pacientes (40/75) habían recibido alguna dosis de antibiótico antes de la extracción de las muestras, y de ellos el 40% (16) solo pudo ser diagnosticado por PCR. No se halló significación estadística en el cálculo de la asociación entre la administración previa de antibiótico y la negatividad de los cultivos ($p = 0,53$).

Discusión

La EMI presenta formas clínicas de gravedad variable, como sepsis y meningitis. La progresión clínica puede ser rápida y los casos fulminantes cursan con púrpura, coagulación

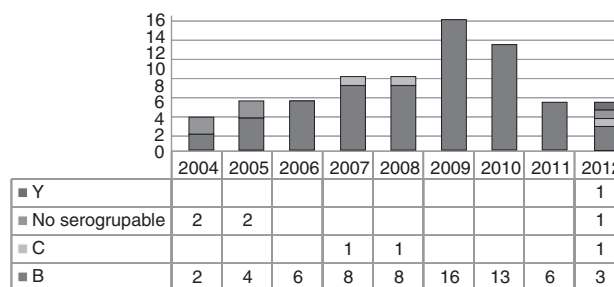


Figura 1 Distribución anual y por serogrupos de los 75 casos de enfermedad meningocócica invasiva.

Tabla 2 Características microbiológicas de los 75 pacientes con enfermedad meningocócica invasiva

	Muestras incluidas ^a		Muestras excluidas
	N total = 88	LCR (N = 28)	Sangre (N = 47), LCR (N = 8), sangre (N = 5)
Diagnóstico confirmado por PCR		14/28 (50%)	23/47 (48,9%)
Diagnóstico confirmado por cultivo y PCR		14/28 (50%)	24/47 (51,1%)
Diagnóstico confirmado por cultivo ^b		8/36 (22,2%)	5/52 (9,6%)

LCR: líquido cefalorraquídeo; N: número de muestras; PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

^a Muestras con cultivo y PCR realizadas simultáneamente.

^b PCR no realizada y muestra insuficiente para PCR.

intravascular diseminada, *shock* y coma, muchas veces a pesar de un diagnóstico y un tratamiento precoces y apropiados^{1,5}.

Los resultados clínicos y microbiológicos obtenidos en nuestra serie coinciden con lo descrito en la literatura, con un predominio de la incidencia de la enfermedad en los menores de un año, el serogrupo B como el más frecuente, y una tasa de secuelas asociadas y un porcentaje de letalidad importantes²⁻⁴.

El desarrollo de técnicas moleculares ha supuesto un avance en el diagnóstico microbiológico de la EMI. Estos métodos se utilizan cada vez más en los centros de referencia y tienen una serie de ventajas con respecto al cultivo: son más sensibles, específicos y rápidos, y su capacidad de detección no se ve afectada por la administración previa de antibiótico^{5,8,10-12}; sin embargo, no están exentos de inconvenientes, como el alto coste y la necesidad de personal cualificado para llevarlos a cabo^{5,8,13}. Los últimos datos publicados en el informe de la European Invasive Bacterial Diseases Surveillance Network¹⁷ de la temporada 2008-2009 muestran que, a pesar de que el cultivo sigue siendo la técnica de referencia para el diagnóstico de EMI (47,9% en 2008 y 44,7% en 2009), la proporción de casos confirmados solo por PCR es de un 25%, y aún mayor es en países como Grecia (42,7%), Reino Unido (51,6%) e Irlanda (58,3%). Además, recientemente, el Ministerio de Sanidad ha publicado una guía de práctica clínica para el tratamiento de la EMI en la cual se recomienda la utilización sistemática de la PCR en el diagnóstico, aunque la técnica de referencia continúa siendo el cultivo^{5,13}. Esta guía, tras analizar la literatura, afirma que el incremento de casos de EMI con diagnóstico confirmado por PCR oscila entre el 30 y el 40%⁵. La introducción de la PCR multiplex en nuestro medio ha permitido el diagnóstico del 38,7% de los casos de EMI que no hubieran

podido confirmarse, porcentaje similar al hallado en otros estudios^{5,13}. Además, gracias a la PCR se ha podido conocer el serogrupo del 81,6% de aquellas muestras en que no disponía de la cepa de *N. meningitidis*, hecho relevante para la vigilancia epidemiológica y el estudio de la efectividad vacunal.

Son diversos los trabajos que han evaluado la sensibilidad de la PCR en comparación con el cultivo^{5,9,10,12,13}. Las guías del National Institute for Health and Care Excellence de Reino Unido¹³ incluyen 4 estudios sobre la PCR que avalan su utilización sistemática. Los resultados muestran que tiene una sensibilidad del 87 al 88%, mientras que la del cultivo oscila entre el 17 y el 58%. Otro estudio incluido en la guía de práctica clínica del Ministerio de Sanidad⁵ evalúa el uso de la PCR en muestras de LCR para el diagnóstico de confirmación de EMI y encuentra una sensibilidad para la PCR del 92% y para el cultivo del 64%.

En nuestro estudio, en los pacientes en que se pudo comparar el resultado de ambas pruebas diagnósticas, la PCR fue positiva en el 100% de las muestras analizadas, mientras que el cultivo tuvo una positividad muy inferior (50,7%), lo que confirma la mayor sensibilidad de la PCR en comparación con el método de referencia. Hay que señalar que nuestro estudio no fue diseñado para el cálculo de la sensibilidad o el valor predictivo de las 2 técnicas microbiológicas, y que en el mismo no se han podido analizar los resultados de muestras por su escaso volumen recogido.

Además, otra importante limitación de nuestro trabajo es que la selección de la muestra parte de casos con diagnóstico de EMI ya confirmado microbiológicamente, y no incluye los casos sospechosos.

La asociación entre la negatividad de los cultivos y la administración de antibiótico previa a la recogida de las muestras es bien conocida^{5,8,10-13}, aunque en nuestro estudio

Tabla 3 Distribución por serogrupos de las muestras de LCR y sangre periférica

Total muestras (88)	Cepa disponible		Cepa no disponible ^a	
	LCR (N = 22)	Sangre (N = 28)	LCR (N = 14)	Sangre (N = 24)
<i>Serogrupo</i>				
B	20	24	8	22
C	-	2	-	1
Y	-	1	-	-
No serogrupable	2	1	6	1

LCR: líquido cefalorraquídeo.

^a El serogrupo de las cepas no disponibles se estableció por reacción en cadena de la polimerasa.

no ha tenido significación estadística probablemente debido al bajo tamaño muestral.

La introducción de técnicas moleculares microbiológicas ha supuesto un avance importante en el diagnóstico de la EMI, con un importante aumento de los casos confirmados. La PCR, a pesar de su alta sensibilidad y de las otras ventajas ya comentadas, no puede sustituir al cultivo como técnica de referencia. La recomendación de la realización simultánea de las 2 pruebas se basa en que ambas aportan beneficios destacables, como son la mayor sensibilidad gracias a la disminución de los falsos negativos y la determinación del serogrupo; además, la posibilidad de realizar un estudio de la resistencia antibiótica y la tipificación solo puede considerarse en las cepas aisladas en el cultivo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. American Academy of Pediatrics. Meningococcal infection. En: Pickering LK, Baker CJ, Kimberlin DW, Long SS, editores. Red book: 2012 report of the Committee on Infectious Diseases. Elk Grove Village: American Academy of Pediatrics; 2012. p. 500-9.
2. Centro Nacional de Epidemiología. Comentario epidemiológico de las enfermedades de declaración obligatoria y Sistema de Información Microbiológica. España. Año 2011. Bol Epidemiol Sem. 2012;20:124-39.
3. Cano Portero R, Garrido Estepa M. Enfermedad meningocócica en España. Análisis de la temporada 2009-2010. Bol Epidemiol Sem. 2011;19:233-46.
4. Martínez AI, Domínguez A, Oviedo M, Minguell S, Jansà JM, Codina G, et al. Epidemiology of the meningococcal disease in Catalonia before and after vaccination against serogroup C. Rev Esp Salud Pública. 2009;83:725-35.
5. Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre el Manejo de la Enfermedad Meningocócica Invasiva. Guía de práctica clínica sobre el manejo de la enfermedad meningocócica invasiva. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud; 2013. Guías de Práctica Clínica en el SNS: IACS N° 2011/01.
6. Vázquez JA. Situación actual de la epidemiología de la enfermedad meningocócica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006;24:14-8.
7. Abad R, Vázquez JA. Diagnóstico bacteriológico de la enfermedad meningocócica. En: Moraga Llop FA, editor. La enfermedad meningocócica. Pasado, presente y futuro. Sant Hilari Sacalm: Grafiques Montseny; 2013. p. 143-64.
8. Codina G, de Cueto M, Echevarría J, Vicente D. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del sistema nervioso central. Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2010. [consultado 10 Sep 2013] Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap36.asp>
9. Cummings KC, Louie J, Probert WS, Killoran PB, Schechter R, Mohle-Boetani JC, et al. Increased detection of meningococcal infections in California using a polymerase chain reaction assay. Clin Infect Dis. 2008;46:1124-6.
10. Drew RJ, Ó Maoldomhnaigh C, Gavin PJ, O'Sullivan N, Butler KM, Cafferkey M. The impact of meningococcal polymerase chain reaction testing on laboratory confirmation of invasive meningococcal disease. Pediatr Infect Dis J. 2012;31:316-8.
11. Nigrovic LE, Malley R, Macias CG, Kanegaye JT, Moro-Sutherland DM, Schremmer RD, et al. Effect of antibiotic pretreatment on cerebrospinal fluid profiles of children with bacterial meningitis. Pediatrics. 2008;122:726-30.
12. Codina Grau MG, Tórtola Fernández MT. Utilidad diagnóstica de la detección de ácidos nucleicos mediante reacción en cadena de la polimerasa realizada en tiempo real. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006;9:539-40.
13. National Institute for Health and Clinical Excellence. Bacterial meningitis and meningococcal septicaemia. Management of bacterial meningitis and meningococcal septicaemia in children and young people younger than 16 years in primary and secondary care; 2010. [consultado 10 Sep 2013]. Disponible en: www.nice.org.uk/guidance/CG102
14. Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, et al. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. Clin Infect Dis. 2004;39:1267-84.
15. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. J Clin Microbiol. 2001;39:153-8.
16. Mölling P, Jacobsson S, Bäckman A, Olcén P. Direct and rapid identification and genogrouping of meningococci and porA amplification by LightCycler PCR. J Clin Microbiol. 2002;40:4531-5.
17. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of invasive bacterial diseases in Europe 2008/2009. Stockholm: ECDC; 2011. [consultado 10 Sep 2013]. Disponible en: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1107>