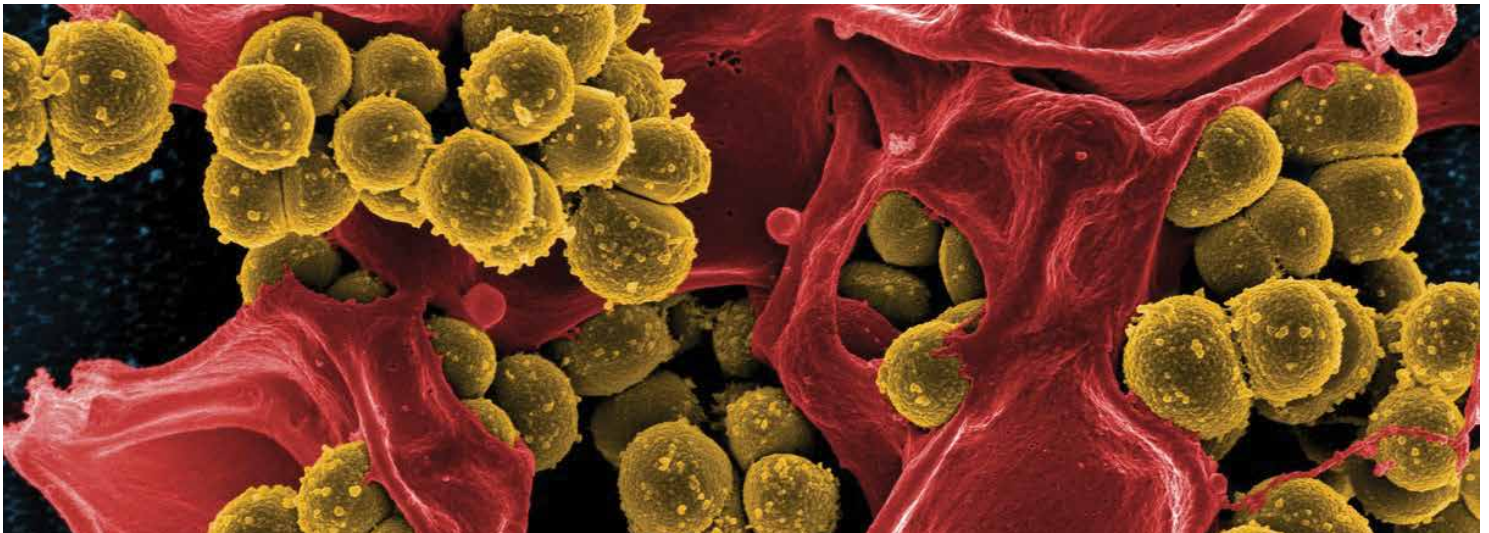


Sepsis PCR en tiempo real



Q.F.B. Sergio Antonio Salazar Lozano M. en C.

La sepsis es una de las principales causas de muerte, a la par con el infarto agudo al miocardio.¹ En los últimos años, en los Estados Unidos, la incidencia de sepsis ha ido en aumento.^{2,3} Los casos sospechosos de sepsis severa en Norteamérica suman más de 500,000 ingresos a Terapia Intensiva anualmente.⁴ En los Estados Unidos, en un año, el costo económico de cuidar a los pacientes sépticos se estima es de aproximadamente \$24,000 millones de dólares.⁵ Lo anterior nos lleva a concluir que el problema no sólo es serio, sino muy frecuente y oneroso.



Debido a que aún no comprendemos a detalle la patogénesis de la sepsis y no existe un tratamiento único para curarla, la identificación temprana de este padecimiento, así como su tratamiento certero oportuno son de la mayor trascendencia. No sólo eso, debemos considerar que cuando se evalúa la supervivencia a la sepsis, típicamente se sigue al paciente por 28 días, mientras que cuando se hace lo mismo para el cáncer, es estándar el seguimiento a 5 años. ¿Qué ocurre a largo plazo con el paciente que sobrevive a la sepsis? Los pacientes que sobreviven a la sepsis despliegan disfunción física y una menor calidad de vida, así como un riesgo aumentado de mortalidad a largo plazo.^{6,7} Ciertamente el seguimiento de laboratorio

tradicional ha sido la evaluación del paciente a través de una Biometría Hemática Completa (que debe ser analizada con reservas, siempre atento a fenómenos confusos, como la pseudosepsis), una triada de Hemocultivos, Tinciones Gram e incluso algunos estudios en orina (Tinción Gram en orina, Examen General de Orina o Urocultivo) si se sospecha urosepsis. Recientemente, los niveles de Procalcitonina han sido incorporados a la práctica del cuidado del paciente séptico en las Terapias Intensivas. A pesar de que todas estas herramientas agregan valor al cuidado del paciente con sepsis, el rápido establecimiento de la identidad y susceptibilidad terapéutica del agente etiológico por cultivo y antibiograma es una característica que dista de ser ideal. Si bien

es posible identificar el agente etiológico y su susceptibilidad antimicrobiana a través de bacteriología automatizada (como la trabajamos nosotros), la naturaleza intrínseca de estos estudios limitan el porcentaje de recuperación (hay un pequeño porcentaje de falsos negativos) y la oportunidad en la respuesta terapéutica (el resultado tarda de 3 a 5 días). Con todo esto en mente, en Lister Alta Especialidad a través de nuestro Departamento de Diagnóstico Molecular hemos hecho un esfuerzo para poner a su disposición la tecnología más avanzada para ayudar al diagnóstico de sepsis. En la actualidad, ofrecemos un estudio de PCR en tiempo real multiplex para más de 90 patógenos causantes de sepsis (bacterias Gram +, bacterias Gram – y hongos). En la

El segundo panel es el panel de identificación y se reportan los siguientes microorganismos:

Identificación	
ID 1 . Streptococcus spp.	ID 2 . Enterococcus spp.
<i>S. agalactiae</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>E. gallinarum</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>E. faecium</i>
Staphylococcus spp.	
<i>S. epidermidis</i>	
<i>S. haemolyticus</i>	
<i>S. aureus</i>	
Gram (-) bacteria-A	Gram (-) bacteria-A
<i>S. marcescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>B. fragilis</i>	<i>A. baumannii</i>
<i>S. typhi</i>	<i>S. maltophilia</i>
Gram (-) bacteria- B	Gram (-) bacteria- B
<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>K. oxytoca</i>
<i>E. aerogenes</i>	<i>P. mirabilis</i>
Hongo	Hongo
<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>C. enusei</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>A. fumigatus</i>

La muestra que se utiliza es sangre total con EDTA y posee una estabilidad corta, de 24 horas. De lunes a viernes, todas las muestras entran a proceso a la 1:00 pm y los resultados se reportan a la 1:00 pm del día siguiente, mientras que el sábado y domingo las muestras entran a proceso a las 10:00 am y los resultados se reportan a la 1:00 pm del día siguiente. Todas las muestras se deben tomar después de la 1:00 pm y deben ser enviadas el mismo día por paquetería. Debido a que los servicios de paquetería (para envío de muestras) no funcionan apropiadamente los fines de semana (lo que

se envía desde el viernes se entrega hasta el lunes y el domingo no ofrecen servicio) y a que la estabilidad de la muestra es de 24 horas, Grupo Lister se ve imposibilitado a enviar muestras los fines de semana, sólo entre semana. Si alguno de nuestros clientes posee los medios para hacernos llegar oportunamente sus muestras sábados o domingos, nosotros diligentemente las procesaremos. Las muestras durante su manejo y traslado deben conservarse refrigeradas de 4 a 8°C, hasta su proceso.

Las muestras se procesan en Lister Alta

Especialidad, sus datos son:
Morelos #3 Nte.,
Zona Centro
Altamira, Tamaulipas
C.P. 89600
Tel. 264-0027, 162-2479

Referencia.

1. Angus DC, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit. Care Med. 29:1303–1310, 2001.
2. Dreier J, et al. Temporal trends in patient characteristics and survival of intensive care admissions with sepsis: a multicenter analysis. Crit Care Med 40: 855–860, 2012.
3. Kumar G, et al. Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000–2007). Chest 140: 1223–1231, 2011.
4. Wang HE, et al. National estimates of severe sepsis in United States emergency departments. Crit Care Med 35:1928–36, 2007.
5. Lagu T, et al. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. Crit Care Med 40: 754–761, 2012.
6. Heyland DK, et al. Long-term health-related quality of life in survivors of sepsis. Short Form 36: a valid and reliable measure of health-related quality of life. Crit Care Med 28: 3599–3605, 2000.
7. Perl TM, Dvorak L, Hwang T, Wenzel RP. Long-term survival and function after suspected gram-negative sepsis. JAMA 274: 338–345, 1995.

TAMPICO

SUC. BENE
URGENCIAS 24 HRS.
Av. Hidalgo #3909 Col. Guadalupe.

SUC. CENTRO
Altamira #104 Ote.
Zona Centro.

SUC. MEDICA PLAZA
Cristóbal Colón #104 Sur
Zona Centro.

SUC. CENTRO MÉDICO
Dr. Carlos Canseco #201 nte.
Zona Centro.

SUC. CFE
Av. Chairrel #100
Col. Jardín

SUC. EJÉRCITO MEXICANO
Av. Ejército Mexicano #1100 L-2
Col. Allende.

SUC. ICEST
Calle E #901
Col. E. Cárdenas González.

SUC. MÉDICA SALVE
Prolongación Av. Hidalgo #6317
Col. Nuevo Aeropuerto.

SUC. MORELOS
Vicente Guerrero #802
Col. Morelos.

SUC. NORTE
Av. Tamaulipas #732-D
Col. Nuevo Rastro Municipal

SUC. NVO. PROGRESO
Josefa Ortiz de Domínguez #204
Col. Progreso.

SUC. NVO. PROGRESO II
Josefa Ortiz de Domínguez #309
Col. Nuevo Progreso.

SUC. PLAZA PALMAS
Paul P. Harris #102
Fracc. Vista Hermosa

SUC. TANCOL
Av. Rivera de Champayan #126-B
Col. Naranjal.

SUC. UNIDAD MODELO
Av. Norte #101
Col. Ampl. Unidad Modelo.

MADERO

SUC. ZONA CENTRO MADERO
G. Rivas Guillén Local 2
Edificio B #318
Zona Centro.

SUC. IMSS
Blvd. A. López Mateos #821
Col. Esfuerzo Nacional.

SUC. MADERO
1ro. de Mayo #510 Pte.
Col. 1ro. de Mayo.

SUC. UNIDAD NACIONAL
Av. Tamaulipas #212 Nte
Col. Unidad Nacional.

SUC. UNIDAD NACIONAL II
Calle 7ª #101
Col. Jardín 20 de Noviembre.

SUC. UNIDAD NACIONAL III
Av. Tamaulipas #217-101
Col. Unidad Nacional.

SUC. UNIMEDEM
Morelia #103 Sur.
Col. Primero de Mayo.

ALTAMIRA

SUC. ALTAMIRA
Morelos #3 Nte.
Zona Centro.

SUC. ARBOLEDAS
Av. P.D. Lote 24 Mzn. 1 #151
Fracc. Arboledas IV

SUC. DUPONT
Av. Cuarta #306
Col. Miramar.

SUC. MASECA
Francisco I. Madero #400.
Francisco I. Madero.

SUC. MORITA
Calle 2 #114
Col. La Morita.

MATAMOROS

SUC. HOSPITAL CMI 24/hrs
Sergio Martínez Calderoni #20
Col. Victoria, Sección Fiesta.
Tel. (868) 817-5296
y (868) 811-0000 ext #010

SUC. HOSPITAL GUADALUPE
Calle 6ta. #72 entre Rayón y Victoria
Zona Centro.
Tel. (868) 813-9415

CENTRO MÉDICO SPEED MED
Calle Norte 4 # 1,
Av. Lauro Villar y Ote.2 (consultorio 5)
Col. Cd. Industrial
Tel. (868) 149-0927

CD. VICTORIA

SUC. HOSPITAL REGIONAL DE ALTA ESPECIALIDAD
Libramiento Naciones Unidas S/N
Fracc. Área Pajaritos entre
Carr. Matamoros y Blv. Praxedis Balboa
Tel. (834) 153-6100 ext. #1563

SUC. OCHO CARRERA
Ocho Juan B. Tijerina #876
Col. Morelos.
Tel. (834) 316-2032

SUC. PROVIDENCIAL
Av. Norberto T. Zapata #4835
Col. Fracc. Ampliación Villarreal.
Tel.: (834) 112-0580

SUC. BENEFICENCIA S.L.P.
Av. Carranza #1076
Col. Tequisquiapan.
Tel. (444) 833-8740
(444) 813-4048 ext.150, 204

SUC. MÉDICA ARISTA
Calle Mariano Arista #931-L
Col. Tequisquiapan.
Tel. (444) 808-4071
(444) 822-4258

CARDEL

SUC. CARDEL
Av. Emiliano Zapata #70 int 2
Col. Centro.

COATZINTLA

SUC. COATZINTLA
Av. A. López Mateos #23-D
Col. Adolfo Ruíz Cortínez.
Tel. (833) 800.16.44 al 47

SUC. OLMECAS
Calle Cazones #8
Fracc. Olmecas.
Tel. (833) 800.16.44 al 47

CD. CUAUHEMOC

SUC. CASA BLANCA
Geranio S/N Depto. #7
Cong. Anáhuac.
Tel. (833) 800.16.44 al 47

VILLA CUAUHEMOC

SUC. VILLA CUAUHEMOC
Fco. I. Madero S/N
Zona Centro.
Tel. (833) 800.16.44 al 47

POZA RICA

SUC. ARCANGELES
Blvd. Lázaro Cárdenas #715
Col. Morelos.
Tel. (833) 800.16.44 al 47

SUC. ICHANTE
Av. Independencia #1307 Local 1
Col. Manuel Ávila Camacho.
Tel. (833) 800.16.44 al 47

SUC. LÁZARO CÁRDENAS
Blvd. Lázaro Cárdenas #821
Col. Morelos.
Tel. (833) 800.16.44 al 47

TAMPICO ALTO

SUC. TAMPICO ALTO
Blvd. Rafael Murillo Vidal #116
Zona Centro.
Tel. (833) 800.16.44 al 47

TUXPAN

SUC. CENTRO MÉDICO TUXPAM
Av. Cuahtemoc #82 Int. Q
Col. Del Valle.
Tel. (833) 800.16.44 al 47

VERACRUZ

SUC. CLÍNICA SAN LUIS
Av. Cristóbal Colón #520
Fracc. Reforma.
Tel. (229) 100-2424 ext.103
(229) 100-2424

SUC. ICAZO
Icazo #1301 A y B
Col. Formando Hogar.
Tel. (229) 939-4206

SUC. HOSPITAL ESPAÑOL DE VERACRUZ
URGENCIAS 24 HRS.
Av. 16 de Sep. #955
Zona Centro.
Tel. (229) 931-2865
y (229) 931-2993

PCR en tiempo real, al igual que en la PCR de punto final (la PCR tradicional), se amplifica una o varias regiones de DNA genómico que son específicas del organismo de interés o son importantes para identificar características relevantes –como, en el caso de bacterias, su resistencia terapéutica genéticamente codificada. La PCR en tiempo real es una técnica que permite la cuantificación de los productos de amplificación durante la fase exponencial de la reacción de PCR. Esta característica sobre la PCR de punto final permite detectar y cuantificar el blanco molecular a medida que la reacción se lleva a cabo, y en su culminación, evita las manipulaciones posteriores a la PCR tradicional. El estudio que ofrecemos no cuantifica al agente patógeno, porque como veremos, la PCR para sepsis es anidada y cuantificar en estas circunstancias con certeza es prácticamente imposible. Sin embargo, esta metodología acorta el tiempo que dura el estudio y la velocidad a la que se conocen los resultados.

Se dice que la prueba es multiplex porque posee la característica de incorporar simultáneamente múltiples reacciones en



cadena específicas para diferentes blancos. De esta forma, con un sólo programa de reacción –que comparten las múltiples reacciones simultáneas- amplificamos todos los blancos de interés que se encuentren en la muestra. En este caso hablamos de numerosos patógenos, así como de la resistencia a algunos antibióticos (resistencia a vancomicina [VanA y VanB] y a meticilina [MetB]). Una vez más, una solución de este tipo permite acortar de forma importante la identificación de patógenos y sus resistencias terapéuticas, ya que es posible obtenerlas en una sola reacción. Por ende, los resultados pueden entregarse en menos tiempo.

Cada reacción de este tipo cuenta con controles internos, esto es, iniciadores específicos para regiones genómicas humanas que deben amplificar en toda reacción si ésta se ha llevado a cabo cumpliendo con todos los requisitos. Si un control interno no amplifica no deberíamos obtener ningún producto de reacción y esto es indicativo de que la extracción de ácidos nucleicos o la reacción no resultó funcional y debe repetirse el procedimiento (eliminamos falsos negativos por mala extracción o reacción deficiente).

Adicionalmente, en una segunda reacción anidada, ofrecemos la opción de identificar de manera precisa 27 de los patógenos más comunes. La reacción se dice que es anidada porque la materia prima de ésta no es la muestra, sino los productos amplificados en la primera reacción, es una reacción

secuencial. Esto permite identificar con mucho más detalle los organismos detectados en la primera reacción.

Como ya se adelantó, nuestra prueba se encuentra dividida en dos paneles, en el primero se realiza un chequeo general de la muestra que se despliega en la siguiente tabla.

Sepsis Screening

Bacterias Gram +

Streptococcus spp.
Enterococcus spp.
Staphylococcus spp.

Resistencia a antibióticos

VanA
VanB
MecA

Bacterias Gram – grupo A

P. aeruginosa
A. baumannii
S. maltophilia
S. marcescens
B. fragilis
S. typhi

Bacterias Gram – grupo B

K. pneumoniae
K. oxytoca
P. mirabilis
E. coli
E. cloacae
E. aerogenes

Hongos