

Utilidad diagnóstica de PCR-secuenciación del 16S ADNr en infecciones bacterianas

Zanella, M.E.¹; Merkt, M.¹; Pennini, M.¹; Sucari, A.²; Corio C.¹; Castillo, S.¹

¹Stamboulían Laboratorio; ²Higiene & Seguridad Alimentaria y Ambiental, Stamboulían Servicios de Salud, Buenos Aires, Argentina
E-mail: emiliazanella@hotmail.com

Introducción

El laboratorio de bacteriología clínica utiliza de rutina técnicas fenotípicas para la identificación de agentes etiológicos bacterianos, sin embargo, en numerosas situaciones estas técnicas no revelan el microorganismo causal.

El uso de técnicas moleculares como PCR-secuenciación del 16S ADNr mejoró considerablemente el diagnóstico etiológico, siendo de gran utilidad en pacientes expuestos a tratamiento antibiótico al momento de la toma de la muestra y en la detección de bacterias fastidiosas: intracelulares (no cultivables), de crecimiento lento y con déficit nutricionales.

Objetivo

/ Puesta a punto de un método genotípico basado en la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S a partir de muestras clínicas.

/ Establecer si existe alguna ventaja comparativa del método molecular con respecto a la identificación realizada por los métodos fenotípicos.

Materiales y Métodos

Se analizaron 56 muestras, 14 Líquidos cefalorraquídeo (LCR), 9 líquidos de punción (LP), 17 biopsias (BX), 8 válvulas cardíacas (VC) y 8 controles de calidad externos (CCE), mediante cultivo convencional y el siguiente protocolo de PCR:

/ Extracción de ADN de las muestras pre-tratadas con lisozima y proteinasa K, por el método automatizado Magna Pure (Roche).

/ Amplificación de un fragmento 5' del ADNr 16S.

/ Secuenciación por metodología Sanger en ABI3500.

/ Identificación utilizando las bases de datos GeneBank y RDP-II.

Resultados

En 47 de las muestras analizadas se obtuvo concordancia entre ambos métodos:

/ 21 muestras resultaron positivas (5 BX, 1 LCR, 8 LP y 7 CCE) **Tabla 1**.

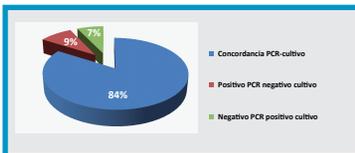
/ 26 muestras resultaron negativas (13 LCR, 9 BX y 4 VC).

Entre los resultados discordantes se observaron:

/ En 4 muestras (3 BX y 1 LP) se obtuvo resultado negativo para PCR y positivo para cultivo luego de siete días de incubación en medio de enriquecimiento, tres casos fueron *Staphylococcus epidermidis* y uno *Corynebacterium* sp.

/ En 5 muestras (4 VC y 1 CCE) se obtuvo resultado positivo para PCR y negativo para cultivo.

Se identificaron *Coxiella burnetti*, *Campylobacter jejuni*, *Corynebacterium pseudodiphthericum* y *Streptococcus agalactiae* (2).



Se calculó la sensibilidad (S) y especificidad (E) del método genotípico frente al fenotípico: S=100%, E=83,9%, valor predictivo positivo (VPP) del 80,8% valor predictivo negativo (VPN) del 100%.

Conclusiones

La metodología desarrollada constituye un aporte al diagnóstico de infecciones bacterianas, otorgando ventajas tanto en su VPP como VPN. Los resultados positivos para PCR y negativos para cultivo se correlacionaron con el diagnóstico clínico, indicando mayor sensibilidad en la detección bacteriana, demostrando su valor diagnóstico en casos de microorganismos no cultivables y/o expuestos a tratamiento antibiótico. Los resultados negativos de PCR con cultivo positivo tardío mostró la utilidad de esta metodología para descartar contaminaciones. Cabe recalcar la reducción en el tiempo de los resultados frente a los cultivos convencionales, siendo de gran utilidad en la toma de decisión clínica frente a una posible infección bacteriana.

Tabla 1: concordancia PCR-16S rDNA y cultivo positivos

Cultivo convencional	PCR 16s RNA BLAST (%Identidad)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (4)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter</i> sp
<i>Serratia marcesens</i>	<i>Serratia marcesens</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> (6)	<i>Staphylococcus aureus/haemoliticus</i>
<i>Enterococcus</i> sp	<i>Enterococcus gallinarum</i>
<i>Providencia stuartii</i>	<i>Providencia stuartii</i>
<i>Moraxella lacunata</i>	<i>Moraxella lacunata</i>
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae/alginolyticus</i>
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	Positivo mezcla
<i>Propionibacterium acnes</i>	Positivo mezcla
<i>Eubacterium</i> sp-flora polimicrobiana	Positivo mezcla
<i>S.capitis-E.coli</i>	Positivo mezcla
<i>C.freundii E.coli-Enterococcus faecalis</i>	Positivo mezcla