

Mercedes Marín.

Hospital General Universitario Gregorio Marañón

1. ¿Qué procedimientos moleculares de identificación de patógenos en sangre, no basados en cultivo, permiten el diagnóstico de EI en una horas?
¿Existe alguna técnica novedosa reciente?

VIII Congreso
SEICAV
2019 Sociedad Española
de Infecciones
Cardiovasculares

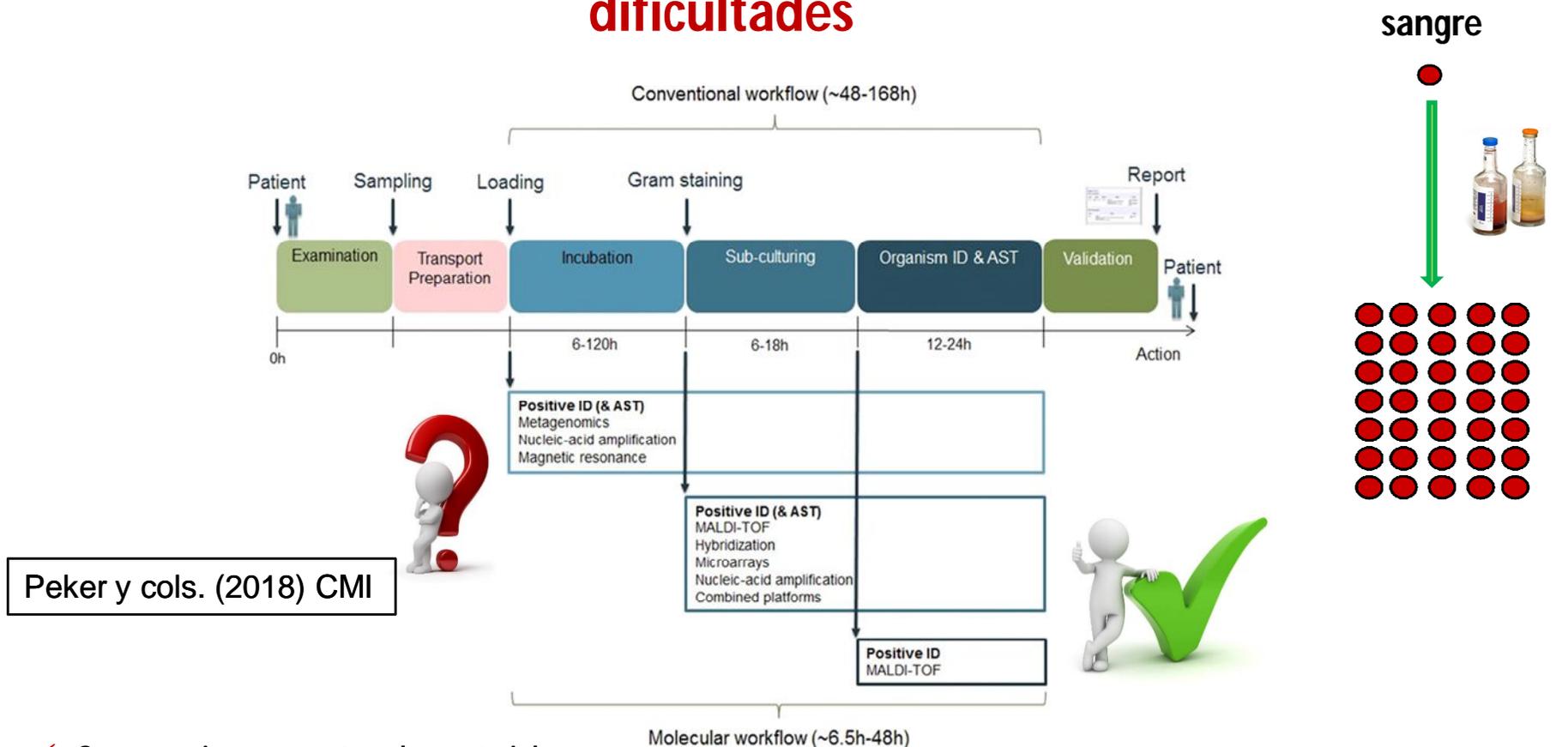


MADRID
15/16 NOVIEMBRE

Salón de Actos del
Hospital General Universitario
Gregorio Marañón

 **SEICAV** Sociedad Española
de Infecciones
Cardiovasculares

La detección de patógenos directamente en sangre plantea dificultades



- ✓ Se requieren métodos rápidos
- ✓ Métodos muy sensibles → Baja carga m.os → Contaminación
- ✓ Bajo volumen sangre (1-5ml). Inhibidores
- ✓ Muchos m.os distintos. Imposible detectar todos. Cuantitativos SCN-*P. acnes*...
- ✓ Métodos "sencillos" adaptables a laboratorios clínicos. Precio

Distintos desarrollos moleculares para sepsis-bacteriemia, aún no han demostrado su utilidad en el diagnóstico.

No hay paneles de EI.



TABLE 1 Emerging molecular diagnostics for pathogen detection from whole blood^a

Assay (manufacturer)	Technique	Sample vol	Sample-to-result time (h)	Detection limit	% sensitivity/% specificity	Breadth of detection and ability to expand	Ability to detect polymicrobial infection	Antimicrobial resistance marker(s)
Iridica Plex ID (Abbott Molecular)	Multiplex broad-range PCR/ESI-MS	5 ml	6	0.25–128 CFU/ml	45–83/69–94	780 bacteria and <i>Candida</i> ; highly expandable	Yes; semiquantification of load	<i>mecA</i> , <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , and <i>bla_{KPC}</i>
SeptiFast (Roche Diagnostics)	Multiplex target-specific real-time PCR/ <i>in situ</i> hybridization/melt analysis	1.5 ml	4–6	3–100 CFU/ml	63–83/83–95	>16 bacteria, <i>Candida</i> , and <i>Aspergillus fumigatus</i> ; low expandability	Yes; semiquantification of load	<i>mecA</i> (after positive test for <i>Staphylococcus aureus</i>)
SepsiTest (Molzyme)	Universal PCR/sequencing	1 ml	8–10	10–80 CFU/ml	11–87/83–96	>345 bacteria and 13 fungi; highly	Yes; no load quantification	None
T2Candida T2 Biosystems	PCR Resonancia Magnética-Hibridación	4 ml	3-5	1 CFU/ml	99%/91%	5 <i>Candida</i> species	Yes	None
MinION (Oxford Nanopore Technologies)	Nanopore sequencing	10 ng high-molecular-wt DNA (bacterium identification is not validated for whole blood)	4–6	~100 copies/ml	NA/97–100	Initial validation on few viruses and bacteria; highly expandable	Potentially yes with load quantification	Can be added in the future
U-dHRM	Digital PCR/high-resolution melt	1 ml	<4	Single cell	Single cell ^b /99.9	37 bacteria; highly expandable to include other bacteria, viruses, and fungi	Yes; absolute load quantification	Can be added in the future
Integrated comprehensive droplet digital detection technology (IC 3D) (Velox Biosystems)	DNAzyme-based sensor droplet microencapsulation 3D particle counter system	Microliters to milliliters	1–4	Single cell	Single cell ^b	No integrated platform for broad-based detection (1 pathogen per sample)	Limited	Can be added in the future; limited by no. of fluorescence channels

^aNA, not applicable.

^bPreclinical studies.

Métodos laboriosos que requieren personal especializado (excepto T2Candida)

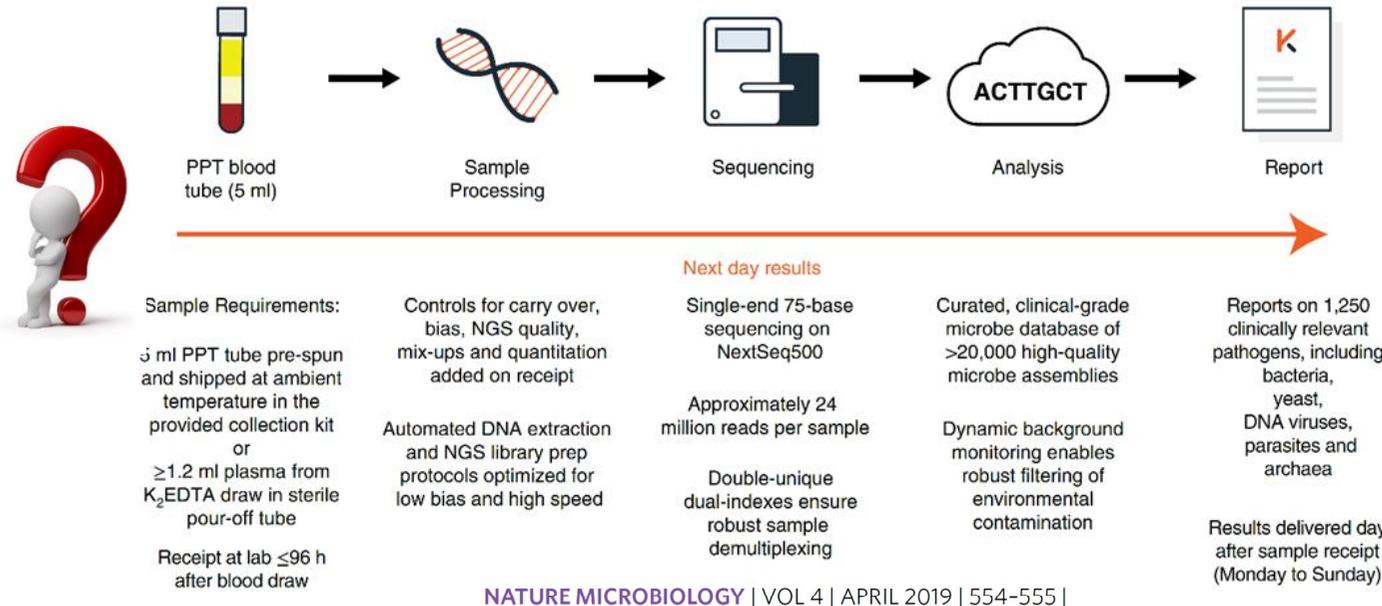


Técnicas de Next Generation Sequencing
PCR digital, PCR en emulsión por gotas..

Peker y cols. (2018) CMI

Sinha y cols. (2018) CMR

Next Generation Sequencing (NGS)



Cell free DNA

Eliminación ADN humano

Captura ADN microbiano

Blawkamp y cols. (2019).

- ✓ Laboriosos. Personal especializado. Pocos estudios con sangre periférica.
- ✓ Muy sensibles. Basados en Metagenómica → 16SrARN
- ✓ Problemas con falsos positivos. Por ahora restringidos a investigación
- ✓ Problemas de “democratización” del análisis bioinformático. Cuantificación

Rutanga y cols. (2018).
ExpRevMolDiag

Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in sepsis (Next GeneSiS-Trial)
 Study protocol of a prospective, observational, noninterventional, multicenter, clinical trial

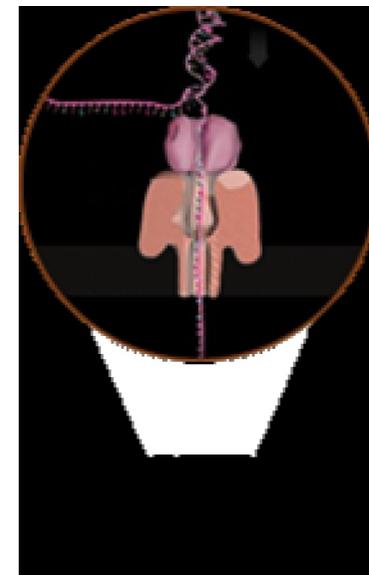
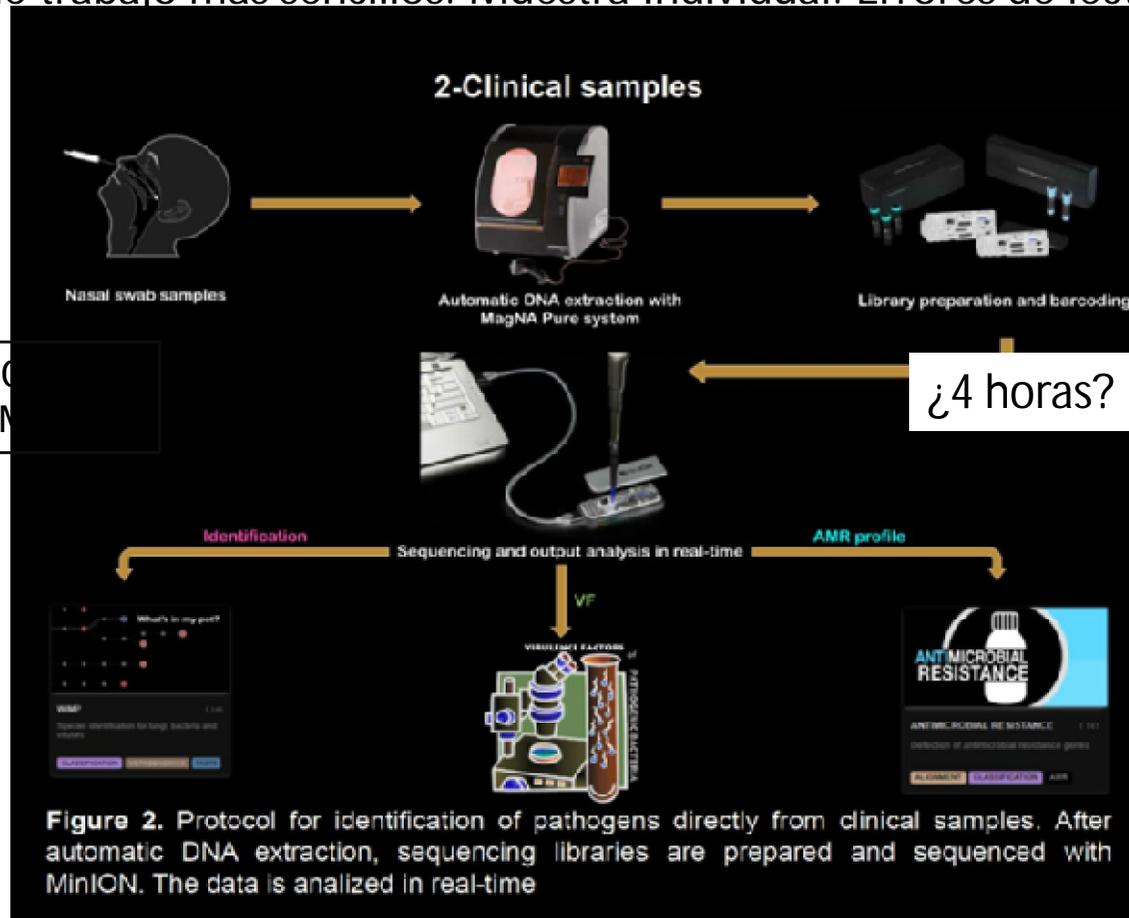
Thorsten Brenner, MD^{a,*}, Sebastian O. Decker, MD^a, Silke Grumaz, PhD^b, Philip Stevens, PhD^c, Thomas Bruckner, PhD^d, Thomas Schmoch, MD^a, Mathias W. Pletz, MD^e, Hendrik Bracht, MD^f, Stefan Hofer, MD^g, Gernot Marx, MD^h, Markus A. Weigand, MD^a, Kai Sohn, PhD^b, for the TIFOnet Critical Care Trials Group



MiniOn (Nanopore Genomic Sequencing)

Secuenciadores rápidos. Baratos. Secuencias largas mejor para identificar.
Metagenómica (16S) o Secuenciación de genoma completo

Esquemas de trabajo más sencillos. Muestra Individual. Errores de lectura de secuencias



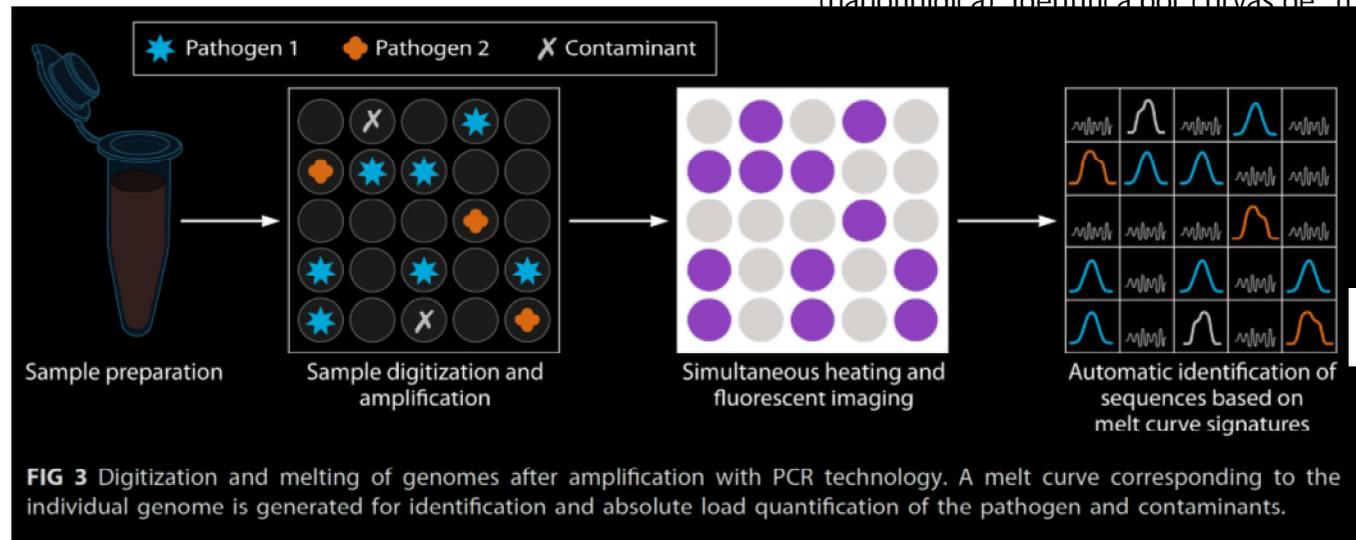
UdHRM (Universal Digital High-Resolution Melting PCR)

Panel de 37 bacterias. Muy sensible (1 ufc/ml). 1 ml sangre completa

Detección cuantitativa. Sepsis neonatal. Está en fase de validación clínica.

Degradación de ADN contaminante

PCR 16S y separación de amplicones individualmente en microchip (nanofluídica). Identifica por curvas de "melting".



¿4 horas?

Sinha y cols. (2018) CMR

Name University of California, San Diego
City La Jolla
State CA
Country United States
Zip Code 92093
Department Engineering (All Types)
Type Schools of Arts and Sciences
DUNS # 804355790

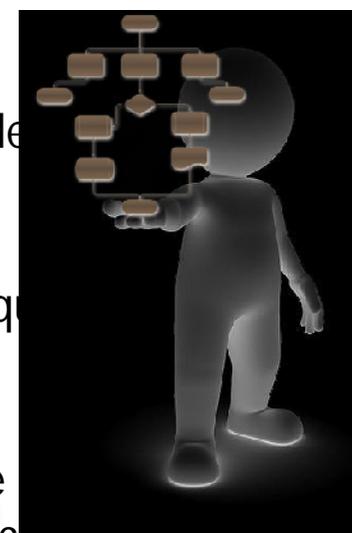
Related projects

NIH 2019 R01 AI Digital High Resolution Melt and Machine Learning for Rapid and Specific Diagnosis in Neonatal Sepsis
Frale, Stephanie Irene / University of California, San Diego



Conclusiones

- ✓ Hay sistemas prometedores que tienen que demostrar su utilidad clínica con estudios adecuados: elevado nº de pacientes y controles. ↑VPP y VPN
- ✓ Deberían ser adaptables al flujo de trabajo del laboratorio clínico y al diagnóstico urgente. Pruebas individuales coste-efectivas
- ✓ Deseable información de R sobre todo si SARM o BGN. Diferenciación de contaminantes y verdaderos patógenos SCN y *P. acnes*
- ✓ Ideal para el diagnóstico de EI si no son paneles cerrados. Importante que puedan detectar m.os que no crecen en cultivo.
- ✓ Futuro cercano: adaptación a point of care. Asociación con BigData que incluya otras muestras, características clínicas, factores del paciente, etc.



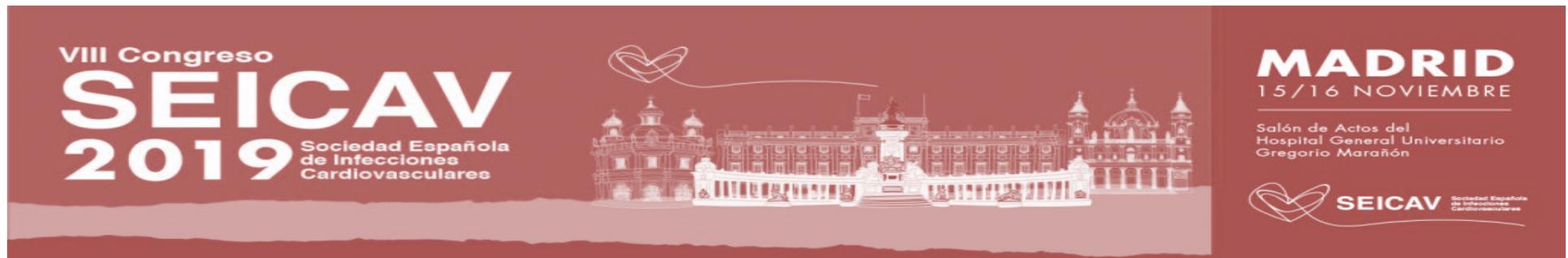
- **Deep sequencing:** is not ready yet for implementation in clinical care and optimization of the workflow for use in routine microbiology laboratories will be required, as well as accessible sequencing facilities and user-friendly data analysis tools designed for BSI diagnosis.

Sinha y cols. (2018) CMR

Rutanga y cols. (2018).
ExpRevMoIDdiag

Mercedes Marín. Hospital General Universitario Gregorio Marañón

2. ¿En que medida, una amplificación 16S y 18S negativas sobre válvula cardiaca, excluyen la endocarditis bacteriana y la fúngica?
¿Cómo son de frecuentes los falsos negativos?



The diagnosis of microorganism involved in infective endocarditis (IE) by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR: A systematic review

Kaohsiung Journal of Medical Sciences (2018) 34, 71–78

Reza Faraji ^a, Mostafa Behjati-Ardakani ^a

Molecular Diagnosis of Infective Endocarditis by Real-Time Broad-Range Polymerase Chain Reaction (PCR) and Sequencing Directly From Heart Valve Tissue

Mercedes Marín, PharmD, PhD, Patricia Muñoz, MD, PhD, Mónica Sánchez, Marina del Rosal, BSc, Luis Alcalá, PharmD, Marta Rodríguez-Créixems, MD, PhD, and Emilio Bouza, MD, PhD, on behalf of the Group for the Management of Infective Endocarditis of the Gregorio Marañón Hospital (GAME)

Medicine • Volume 86, Number 4, July 2007



48 valv EI+, 2FN → 4% valv EI+ son FN

129 valv EI-, 123 VN

11% de las PCR – Totales serán falsas*

2017: GAMES (EI definidas)#

567 valv EI +, 130 FN → 22,9% valv EI+ son FN

No sabemos que papel se da a la PCR para definir EI

Table 2 The validity of PCR and real-time PCR methods were investigated in the studies.

Author/Year	Validity test				n values
	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	
Marín [36] 2007	96%	95.3%	98.4%	88.5%	177
Vollmer [35] 2010	80.6%	100%	100%	71%	357
Kuhn [44] 2011	85%	—	—	—	30
Harris [40] 2014	67%	91%	96%	46%	169
Miller [41] 2016	92%	77.8%	92%	77.8%	68
Vondracek [45] 2009	81%	100%	—	—	57
Voldstedlund [46] 2005	72%	100%	—	—	74
Bosshard [25] 2001	82.6%	100%	100%	76.5%	63
Breitkopf [39] 2004	41.2%	100%	100%	34.8%	52
Guern [47] 2014	72.7%	94.7%	—	—	82
El-Kholy [48] 2010	88.3%	92%	79.1%	95.8%	156
Greub [49] 2002	61%	100%	100%	74%	245

PPV = positive predictive value.
NPV = negative predictive value.

Y en endocarditis fúngica....



Evaluation of noninvasive methods for the diagnosis of fungal endocarditis

Parisa Badiie^{1,*}, Ahmad Ali Amirghofran² and Mohammad Ghazi Nour²

Medical Mycology, 2014, 52, 528–534

27 pac El fúng posible y 8 con probada: 2 *C. albicans* y 6 *Aspergillus* spp.

→ PCR valv 1 FN (*C. albicans*) 12,5% FN. Sens 87,5%, Esp 94,4%, VPP 87,5%, VPN 94,4%

- ✓ Pocos artículos valoran las PCR panfúngicas en válvulas. IFI BAL, Biopsias, etc.
- ✓ Sesgos en criterios y muestras.
- ✓ La mayor parte son de Dx molecular de IFI en otro tipo de muestras
- ✓ Se incluyen junto con las bacterianas
- ✓ GAMES: 2017 43 El probada *Candida* sp. y 6 *Aspergillus* sp. ¿?

