

## Naranja de acridina para el diagnóstico de bacteriemias relacionadas con catéteres

R. QUINTANA, M.F. PRIETO, D.H. BAGILET, M.C. DALMAN Y E. GREGORINI

Segunda Cátedra de Clínica Médica. Hospital Escuela Eva Perón. Granadero Baigorria. Argentina.

**Objetivo.** Estudiar la utilidad de la tinción con naranja de acridina (NDA) de la sangre extraída a través del dispositivo intravenoso (DI) para el diagnóstico de bacteriemia relacionada con catéter (BRC).

**Diseño.** Se trata de un estudio prospectivo y observacional.

**Pacientes.** Se incluyeron pacientes con DI centrales que presentaron clínica compatible con BRC y aceptaron participar. Se excluyeron todos aquellos con confirmación de otro foco infeccioso.

**Intervención.** Ante la sospecha clínica de BRC y antes de retirar el DI, se extraían muestras de sangre periférica y a través del DI para analizarlas con la técnica de la tinción con NDA. El DI se retiraba y era enviado para su análisis mediante las técnicas de Liñares et al y Maki et al. Se consideró BRC el crecimiento del mismo microorganismo en sangre periférica y en el extremo del catéter ( $\text{luz} \geq 10^3$  UFC/ml y/o superficie  $\geq 15$  UFC/ml).

**Variables de interés.** Se calculó la sensibilidad, la especificidad, los valores predictivos y los cocientes de probabilidades de la prueba de NDA para el diagnóstico de BRC.

**Resultados.** Se estudiaron 121 pacientes y se diagnosticaron 4 BRC: 2 por *Staphylococcus aureus*, 1 por *Pseudomonas aeruginosa* y 1 por *Candida albicans*. La sensibilidad de la tinción con NDA fue del 87,5%, la especificidad del 92,7%, el valor predictivo negativo del 99,5%, el cociente de probabilidades positivo 12,04 y el cociente de probabilidades negativo 0,13.

**Conclusiones.** Si bien el bajo número de eventos no permite estimar la eficacia de la tinción con NDA para el diagnóstico de BRC, su alto valor predictivo negativo permitiría descartar con cierta seguridad esta complicación infecciosa.

**PALABRAS CLAVE:** bacteriemia relacionada con catéter, naranja de acridina.

### ACRIDINE ORANGE STAINING METHOD IN THE DIAGNOSIS OF CATHETER-RELATED BLOODSTREAM INFECTIONS

**Objective.** To study if the utility of acridine orange (AO) staining method on blood extracted through intravenous device (ID) is a reliable method to diagnose catheter-related bloodstream infection (CRB).

**Design.** Prospective and observational study.

**Patients.** Patients with central ID and clinical data consistent with CRB who gave their consent to participate. Patients having another infection site were excluded.

**Intervention.** At the moment of the clinical suspicion of CRB and before removing the ID, blood samples were extracted from peripheral veins and through the ID to be analyzed by AO staining. After extracting the samples, the catheter was removed and sent for microbiological analysis with Liñares et al and Maki et al techniques. CRS was defined as development of the same microorganism in the tip of the catheter (endoluminal surface with  $\geq 10^3$  UFC/ml and/or extraluminal surface  $\geq 15$  UFC/ml) and in the peripheral blood.

**Variables of interest.** Sensitivity, specificity, negative and positive and negative predictive values and positive likelihood ratios (LR) were calculated for the diagnosis of CRB.

**Results.** A total of 121 patients were studied and 4 were diagnosed with CRB: 2 infected with *Staphylococcus aureus*, 1 with *Pseudomonas*

Correspondencia: Dr. D. Bagilet.  
Zelaya, 1536.  
2000 Rosario, Argentina.  
Correo electrónico: bagilet@ciudad.com.ar

Manuscrito aceptado el 2-X-2007.

*aeruginosa* and 1 with *Candida albicans*. AO sensitivity was 87.5%, specificity 92.7% and the negative predictive value was 99.5%. Positive likelihood ratio was 12.04 and negative LR 0.13.

**Conclusions.** Although the number of events does not allow for the estimation of the efficacy of AO to diagnose CRB, its high negative predictive value would make it possible to rule out this infectious complication with some degree of safety.

**KEY WORDS:** catheter-related sepsis, acridine orange.

## INTRODUCCIÓN

La bacteriemia relacionada con catéter (BRC) representa el 25% del total de las bacteriemias y es responsable del 15% de las muertes por sepsis en pacientes hospitalizados<sup>1</sup>. Ante la sospecha de BRC es habitual que se retire el dispositivo intravenoso (DI) y se cultive el extremo del mismo para el diagnóstico de infección. Sin embargo, sólo en el 20% de los casos de bacteriemia, el catéter es la causa de la infección<sup>2</sup>.

El gran número de catéteres retirados de forma innecesaria llevó a distintos autores a buscar métodos alternativos de diagnóstico que permitiesen conservar el dispositivo. Uno de los propuestos es el examen directo, en un microscopio de inmunofluorescencia, de la sangre obtenida a través del DI y teñida con naranja de acridina (NDA)<sup>3</sup>. Este método, rápido y sencillo, tiene una sensibilidad del 92% y una especificidad del 98% para excluir la BRC<sup>4</sup>.

El objetivo de este trabajo fue evaluar en nuestro medio la sensibilidad y la especificidad de la tinción con NDA para el diagnóstico de la BRC.

## PACIENTES Y MÉTODOS

Este estudio prospectivo y observacional se realizó en la Unidad de Terapia Intensiva del Hospital Escuela Eva Perón entre el 01/06/2005 y el 28/09/2006 y tuvo la aprobación del Comité de Docencia e Investigación.

Se incluyeron pacientes mayores de 18 años con DI centrales colocados para hidratación parenteral y administración de medicamentos, que presentaron respuesta inflamatoria sistémica definida como: temperatura  $< 36^{\circ}\text{C}$  o  $> 38^{\circ}\text{C}$ ; recuento de leucocitos  $< 4.000/\text{mm}^3$  o  $> 12.000/\text{mm}^3$ ; frecuencia respiratoria  $> 20$  respiraciones/min o presión arterial de  $\text{CO}_2 \leq 32$  mmHg y frecuencia cardíaca  $> 90$  latidos/min. Todos los pacientes aceptaron participar y firmaron el consentimiento informado aprobado por el Comité de Docencia del Hospital.

Se excluyeron los pacientes con catéteres multilumen y aquéllos en los cuales se confirmó la presencia de otro foco infeccioso.

En el momento de la sospecha clínica de BRC y antes de retirar el DI, se extraían con técnica estéril

3 ml de sangre periférica y 3 ml de sangre a través del catéter previa antisepsia del sitio de conexión. Las muestras eran remitidas al laboratorio de microbiología de forma inmediata, en tubos estériles con heparina, y debidamente identificadas. Si el paciente recibía tratamiento antibiótico sistémico, la muestra era extraída 30 minutos antes de la administración de la dosis del antibiótico.

De la muestra de sangre periférica se tomaban 1 ml y 0,1 ml, que eran colocados en sendas placas de Petri con el agregado de 9 ml de Agar fundido. De esta forma eran incubadas durante 72 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  antes de informarse como negativas.

La sangre obtenida a través del catéter era examinada mediante la tinción de NDA. Para ello se tomaban 50  $\mu\text{l}$  de sangre y se colocaba en un tubo de hemólisis al cual se le agregaban 1,2 ml de solución salina hipotónica. Transcurridos dos minutos se neutralizaba con 2,8 ml de solución hipertónica y el producto final se centrifugaba durante 5 minutos a 3.000 rpm, con lo que se descartaba el sobrenadante. El botón celular se colocaba en un portaobjeto, se teñía con NDA (concentración 0,001%) y se observaba en un microscopio de inmunofluorescencia. Tras la extracción de las muestras sanguíneas, el catéter y los 3 cm distales del mismo se retiraban y eran enviados al servicio de microbiología en tubos estériles rotulados. El catéter se estudiaba mediante la técnica propuesta por Liñares et al<sup>5</sup> para la parte endoluminal y por Maki et al<sup>6</sup> para la superficie externa.

Se definió BRC como el crecimiento del mismo microorganismo en el extremo del catéter (luz con  $\geq 10^3$  UFC/ml y/o superficie  $\geq 15$  UFC/ml) y en sangre periférica.

## Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Las cualitativas se expresan mediante frecuencias y porcentajes. Para la evaluación de la técnica de la tinción con NDA se efectuaron cálculos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, y cociente de probabilidad (*likelihood ratio*) positivo y negativo, con sus respectivos intervalos de confianza (IC) utilizando el paquete estadístico StatsDirect<sup>®</sup>. Para el cálculo de dichos valores en la tabla de contingencia se realizó corrección por continuidad.

## RESULTADOS

En el periodo comprendido entre el 1 de junio de 2005 y el 28 de septiembre de 2006 se incorporaron al estudio 121 pacientes ingresados en la Unidad de Terapia Intensiva del Hospital Escuela Eva Perón. La edad de los enfermos fue de 53 años ( $\pm 17$ ) y el APACHE II fue de  $16 \pm 7$  puntos, con un 57% de varones. La patología que motivó el ingreso se detalla en la tabla 1.

Los catéteres Arrow<sup>®</sup> de 14 Ga, 2,2 mm de diámetro y libres de látex fueron colocados para la admi-

**TABLA 1. Principal tipo de patología en los 121 pacientes incluidos en el estudio**

	Frecuencia N (%)
Infecciosa	31 (26%)
Postoperatoria	17 (14%)
Neurológica	16 (13%)
Trauma	15 (12%)
Respiratoria	10 (8%)
Nefrológica	9 (7%)
Shock-Sepsis-FMO	9 (7%)
Cardiovascular	7 (6%)
Digestiva	3 (2%)
Misceláneas	4 (3,3%)

FMO: fracaso multiorgánico.

nistración de soluciones o medicamentos parenterales. Se contabilizaron 1.063 días/catéter con una media de permanencia de 8,78 (± 5,24) días. Los accesos utilizados fueron: vena subclavia en el 45,5% de los casos y vena yugular interna en el 54,5% restante. En el 95% de las ocasiones los dispositivos fueron colocados por un médico residente.

Se aisló el mismo microorganismo en la luz y en la superficie del catéter en presencia de hemocultivos negativos en 6 ocasiones: un *Staphylococcus epidermidis*, tres *Staphylococcus aureus*, una *Pseudomonas aeruginosa* y una *Klebsiella* spp. Se diagnosticaron 4 (3,3%) BRC, dos de ellas por *Staphylococcus aureus*, una por *Pseudomonas aeruginosa* y 1 por *Candida albicans*. Las características de los enfermos con BRC y los hallazgos microbiológicos se detallan en la tabla 2 y los resultados de la tinción con NDA en la tabla 3.

La capacidad de la prueba de la NDA para el diagnóstico de la BRC fue la siguiente: sensibilidad 87,5% (IC 95%: 28,4-100%), especificidad 92,7% (IC 95%: 86,4-96,7%), valor predictivo positivo 29,2% (IC 95%: 7,6-61,2%), valor predictivo negativo 99,5% (IC 95%: 95,8-100%), cociente de probabilidad positivo 12,0 (IC 95%: 4,5-24,1) y cociente de probabilidad negativo 0,13 (IC 95%: 0,01-0,65).

**TABLA 3. Tabla 2 x 2 para el cálculo de la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo de la prueba de naranja de acridina para el diagnóstico de bacteriemia relacionada con catéter**

	BRC (+)	BRC (-)	
NDA (+)	4 (a)	8 (b)	12
NDA (-)	0 (c)	109 (d)	109
	4	117	121

Sensibilidad = a/a + c; especificidad = d/d + b; valor predictivo positivo = a/a + b; valor predictivo negativo = d/c + d; *likelihood ratio* positiva = [a/a + c]/[b/b + d]; *likelihood ratio* negativa = [c/a + c]/[d/b + d]. Estos índices se calcularon aplicando una corrección por continuidad a las frecuencias.

## DISCUSIÓN

La introducción de un DI en la vena cava superior por vía percutánea es uno de los procedimientos invasivos más utilizados en las Unidades de Cuidados Intensivos. Se emplean a diario para la infusión de fluidos, la nutrición parenteral y la medición de la presión venosa central. Este procedimiento no está exento de riesgos y en el 3-6% de los casos pueden surgir complicaciones serias como: neumotórax, hemotórax, hidrotórax, embolismo gaseoso o BRC<sup>7,8</sup>. Las complicaciones infecciosas provocan un aumento significativo de la morbilidad, del coste sanitario y de la mortalidad<sup>9</sup>.

La BRC se produce cuando los microorganismos acceden y colonizan la capa de fibrina que recubre la superficie externa del DI a partir del segundo día de implantado. La vía por la cual los microorganismos acceden a dicha capa depende del tiempo de permanencia del DI<sup>10</sup>. En los de corta duración penetran desde el sitio de inserción y migran por la superficie externa hasta el extremo. En los DI de larga duración la llegada hasta el extremo distal del catéter habitualmente se produce desde los sitios de conexión y la migración a través de la luz. Menos frecuentemente los microorganismos pueden acceder y colonizar el

**TABLA 2. Características de los enfermos con bacteriemia relacionada con catéter y hallazgos microbiológicos**

Paciente	UI	RD	DE	AS
Edad, años	71	55	82	60
Género	Mujer	Mujer	Mujer	Mujer
Patología	Shock-Sepsis-FMO	Digestiva	Respiratoria	Infecciosa
Apache II	11	10	-	23
Días de catéter	7	10	5	17
Acceso	Subclavia	Subclavia	Subclavia	Subclavia
Operador	Residente	Residente	Residente	Residente
Microorganismo en sangre periférica	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Microorganismo en luz del catéter	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Superficie del catéter	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Signos inflamatorios locales	Sí	No	No	No
Prueba de NDA	Cocos	Bacilos	Cocos	Levaduras

C: *Candida*; FMO: fracaso multiorgánico; NDA: naranja de acridina; P.: *Pseudomonas*; S.: *Staphylococcus*.

DI como consecuencia de una bacteriemia originada en un foco distante<sup>11</sup>.

Los microorganismos habitualmente relacionados con la BRC son el *Staphylococcus coagulasa* negativo (39%), el *Staphylococcus aureus* (26%), los bacilos gramnegativos (14%) y la *Candida albicans* (11%)<sup>12</sup>.

Ante la sospecha de BRC, la conducta diagnóstica puede diferir de acuerdo a la necesidad de conservar el DI o no. En el caso de los DI para hemodiálisis, administración de medicación antineoplásica, etc., se emplean técnicas diagnósticas que permiten conservarlos. Una de ellas es la toma de muestras pareadas de sangre periférica y a través del DI para la determinación cuantitativa del número de UFC en cada una de ellas. Un desarrollo entre 3 y 5 veces mayor en la sangre extraída del DI es indicativa de BRC. Este método tiene una sensibilidad del 87% y una especificidad del 98%<sup>13</sup>.

Otra técnica es la que tiene en consideración la diferencia de tiempo para el desarrollo bacteriano. En este caso ambos cultivos son positivos, pero el de la sangre del DI lo es por lo menos dos horas antes que el de la periférica. La sensibilidad es del 85% y la especificidad del 81%<sup>14</sup>.

En los DI de corta duración el diagnóstico y la probable vía de acceso del microorganismo pueden establecerse estudiando la sangre periférica y el extremo del catéter con la técnica de Maki et al<sup>6</sup> para superficie externa y con la de Cleri modificada por Liñares y Brun-Buisson para la superficie interna<sup>5</sup>. El hallazgo del mismo germen en la sangre periférica y en el extremo del catéter confirma el diagnóstico de BRC.

Sin embargo, la evidencia indica que más del 70% de los DI retirados por sospecha de BRC son estériles. La extracción innecesaria del catéter implica la colocación de uno nuevo, un riesgo innecesario para el paciente y un mayor gasto. Para evitar esto diversos autores han propuesto técnicas alternativas de fácil acceso y rápidas para descartar BRC sin la necesidad de retirar el DI. Una de ellas es la tinción con NDA de la sangre obtenida a través del DI. Con esta técnica se ha reportado una sensibilidad de 87-96% y una especificidad de 92-97% para el diagnóstico de BRC<sup>15</sup>.

Para la realización de esta técnica se utilizan 50-100 µl de sangre, las células son lisadas y centrifugadas, después se realiza la tinción y se observa en un microscopio de inmunofluorescencia. La forma de procesar la muestra aumenta el rendimiento diagnóstico cuando el recuento de microorganismos es bajo<sup>15</sup>. Este método diagnóstico es accesible, sencillo, rápido y económico, pero a pesar de ello su utilización en adultos no está ampliamente difundido.

Debido a que no existe evidencia suficiente para que este método pueda recomendarse de manera formal para el diagnóstico o la exclusión de la BRC, decidimos llevar adelante el presente trabajo. Los pacientes incluidos en este estudio tenían mediana edad, gravedad intermedia y la mayoría se encontraban ingresados por patologías médicas. La totalidad de los DI fueron colocados para la administración de soluciones o medicamentos parenterales y la permanencia promedio de los mismos fue de aproximadamente una semana. La tinción con NDA fue positiva

en todos los casos de BRC lo que demostró una sensibilidad del 87,5% y una especificidad del 92,7%. No obstante, debido al bajo número de eventos, no es posible sacar conclusiones válidas al respecto. Es importante destacar que 109 de los 117 pacientes libres de BRC tuvieron NDA negativa. Los resultados obtenidos sugieren que la NDA podría ser un método de diagnóstico accesible, rápido y de bajo coste para excluir la presencia de BRC.

## AGRADECIMIENTOS

A las estadísticas Marta Quaglino y María Isabel Flury por su asesoramiento en el procesamiento de los datos.

## Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## BIBLIOGRAFÍA

- Liñares J, Domínguez MA, Martín R. Current laboratory techniques in the diagnosis of catheter-related infections. *Nutrition*. 1997;3 Suppl 4:10S-4S.
- Siegmán-Igra Y, Anglim A, Shapiro D, Adal K, Strain B, Farr B. Diagnosis of vascular catheter-related bloodstream infections: A meta-analysis. *J Clin Microbiol*. 1997;35:928-36.
- Kit P, Dobbins BM, Wilcox MH, McMahon MJ. Rapid diagnosis of central-venous catheter-related bloodstream infection without catheter removal. *Lancet*. 1999;354:1504-7.
- Tighe MJ, Kite P, Thomas D, Fawley WN, McMahon MJ. Rapid diagnosis of catheter-related sepsis using the acridine orange leukocyte cytospin Test and an endoluminal brush. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1996;20:215-8.
- Liñares J, Sitges-Serra A, Garau J, Pérez JL, Martín R. Pathogenesis of catheter sepsis: a prospective study with quantitative and semiquantitative culture of catheter hub and segments. *J Clin Microbiol*. 1985;21:357-60.
- Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A Semiquantitative culture method for identifying intravenous catheter-related Infection. *N Engl J Med*. 1977;296:1305-9.
- Walters MB, Stanger HA, Rotem CE. Complications with percutaneous central venous catheter. *JAMA*. 1972;220:1455-7.
- Bagilet D, Soriano F, Goiburur J, Fein L, Guercetti E, Valtorta E, et al. Bilateral empyema as a complication of central venous catheterization. *Rev Clin Esp*. 1988;183:502-3.
- Luque Gómez A, Simonet Huertas N, Ramos Viciana MI, Palacios Moreno M, Pardo Hernández PE. Profilaxis de las complicaciones infecciosas de los catéteres venosos centrales. *Rev Esp Anestesiología Reanimación*. 2002;49:17-33.
- León C, Ariza J. Guías para el tratamiento de las infecciones relacionadas con catéteres intravasculares de corta permanencia en adultos: conferencia de consenso SEMIC-SEMICYUC. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22:92-101.
- Safdar N, Fine P, Maki MG. Meta-Analysis: methods for diagnosing intravascular device-related bloodstream infection. *Ann Intern Med*. 2005;142:451-66.
- Soloaga R, Tokumoto M, Fernández A, Ángel C, Gutfraind Z, Procopio A. The clinical microbiology laboratory in the diagnosis of catheter related bacteremia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2000;18:62-5.
- Catton JA, Dobbins BM, Kite P, Wood JM, Eastwood K, Sugden S, et al. In situ diagnosis of intravascular catheter-related bloodstream infection: A comparison of quantitative culture, differential time to positivity, and endoluminal brushing. *Crit Care Med*. 2005;33:787-91.
- Worthington T, Elliott TS. Diagnosis of central venous catheter related infection in adult patients. *J Infect*. 2005;51:267-80.
- Bong JJ, Kite P, Ammor BJ, Wilcox MH, McMahon MJ. The use a rapid in situ test in the detection of central venous catheter-related bloodstream infection: a prospective study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2003;27:146-50.