

Validez diagnóstica del FilmArray Meningitis/Encephalitis (ME) panel para diagnóstico de infecciones del Sistema Nervioso Central. Revisión sistemática y metanálisis

Autores

Juliana Trujillo Gómez^{1,2}, Catalina Arango Ferreira^{1,2}, Santiago Atehortúa Muñoz³, Maria José Jiménez Villegas^{1,2}, Carolina Serrano Tavares^{1,3}, Javier Mauricio Sierra¹, Iván D. Flórez¹

1. Departamento de pediatría y puericultura, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.
2. Hospital San Vicente Fundación (HSVF), Medellín
3. Clínica Universitaria Bolivariana (CUB), Medellín

Resumen

Introducción: los métodos tradicionales para realizar diagnóstico de neuroinfección aguda son sub-óptimos. El FilmArray Meningitis/Encephalitis panel (BioFire Diagnostics) (FA/ME) aprobado por la FDA en el 2015 trae beneficios en la práctica clínica pero aún no está clara su validez diagnóstica y aplicabilidad.

Métodos: Realizamos una revisión sistemática de la literatura y metanálisis de pruebas diagnósticas. Hicimos búsqueda en Embase, Medline (vía Ovid), y Web of Science hasta octubre de 2019, y en literatura gris. Evaluamos riesgo de sesgo con QUADAS 2. Incluimos estudios de prueba diagnóstica o de corte transversal, que realizaran de manera simultánea la prueba de referencia (cultivo de LCR o hemocultivo para bacterias, y PCR específica o LDT –*Laboratory Developed Test*- para virus) y la prueba FA/ME en pacientes con sospecha de neuroinfección. Realizamos metanálisis de efectos aleatorios y calculamos sensibilidad, especificidad, LR+, LR- y Odds Ratio de diagnóstico, para estudios que usaron como prueba diagnóstica el cultivo bacteriano (Prueba de referencia 1), y para aquellos con diagnóstico de infección según criterios clínicos y/o de laboratorio (prueba de referencia 2).

Resultados: Incluimos 14 estudios con 5197 pacientes. Todos los estudios presentaron riesgo de sesgos. Para el análisis de todas las bacterias con prueba de referencia 1 se incluyeron 12 artículos con 4228 pacientes, se obtuvo sensibilidad combinada de 86% (IC95% 78 a 92), especificidad de 98% (IC 95% 95 a 99), LR+ 43.2 y LR- 0.14. Para el análisis de todas las bacterias con prueba de referencia 2 una sensibilidad combinada del FA/ME de 97% (IC 95% 91 a 99), especificidad de 99% (IC95% 98 a 99), LR+ 286.1 y LR- 0.024. Para un total de 179 bacterias detectadas por FA/ME y/o prueba de referencia, 90 (50.2%) fueron consideradas verdaderos positivos (VP) y 89 (49.7%) falsos positivos (FP) respecto a la prueba de referencia 1; y al aplicar prueba de referencia 2 (método de laboratorio o clínico adicional), 160 (89.3%) se consideraron VP y 19 (10.6%) FP.

Discusión: FA/ME tiene un buen rendimiento diagnóstico para bacterias y enterovirus, aunque los estudios tienen riesgos de sesgos considerables. No fue posible evaluar la validez diagnóstica para

otros virus por falta de prueba de referencia, de una metodología adecuada y/o por información incompleta en los estudios.

Abstract

Introduction: Traditional methods for diagnosing acute neuroinfection are suboptimal. The 2015 FDA-approved Meningitis / Encephalitis FilmArray (BioFire Diagnostics) (FA / ME) panel brings benefits in clinical practice but its diagnostic validity and applicability remain unclear.

Methods: We performed a systematic review of the literature and meta-analysis of diagnostic tests. The search strategy was performed in Embase, Medline (via Ovid), and Web of Science until October 2019, and gray literature was searched. We assessed the risk of bias with the QUADAS 2 tool. Studies with a diagnostic or cross-sectional test design were included, which simultaneously measured the gold standard (CSF culture or blood culture for bacteria, and specific PCR or LDT - Test developed in the laboratory - for viruses) and the FA / ME test in patients with suspected neuroinfection. We performed meta-analyses for calculations of combined measures of validity (Sensitivity, specificity, LR +, LR - and diagnostic Odds Ratio), with the information from studies that used culture of CSF or blood in the diagnostic test (Gold Standard 1), and for those who require, they used the final infection allocation based on clinical and / or laboratory criteria (gold standard 2).

Results: In total we included 14 studies with 5197 patients in the meta-analysis. For the analysis of all the bacteria with gold standard1, 12 articles with 4228 patients are included, and a combined sensitivity of 86% (95% CI 78 to 92), specificity of 98% (95% CI 95 to 99), LR + 43.2 and LR- 0.14. For the analysis of all the bacteria with gold standard 2, a combined sensitivity of the FA / ME of 97% (95% CI 91 to 99), specificity of 99% (95% CI 98 to 99), LR + 286.1 and LR- 0.024. For a total of 179 bacteria detected by FA / ME and / or gold standard, 90 (50.2%) were considered TP (true positive) and 89 (49.7%) FP (false positive) with respect to gold standard 1; and with gold standard2 (additional clinical or laboratory method), 160 (89.3%) were considered TP and 19 (10.6%) FP.

Discussion: FA / ME seems to have good diagnostic performance for bacteria. It is not possible to assess the diagnostic validity of the virus due to a lack of gold standard, an adequate methodology in the studies and / or incomplete information.

Introducción

Las infecciones del sistema nervioso son una causa importante de morbilidad y mortalidad en la población(1). El diagnóstico oportuno y preciso del agente etiológico de estas infecciones es el pilar para realizar tratamientos dirigidos desde el principio que permitan mejores desenlaces clínicos y menor tasa de mortalidad, disminuir las estancias hospitalarias e incluso la reducción de costos(2)(3)(4).

Hacer el diagnóstico etiológico de la meningitis y encefalitis por medio de los métodos microbiológicos tradicionales es difícil debido a su bajo rendimiento diagnóstico, el tiempo que tardan y a la negativización por el uso previo de antibióticos(5). Es por eso que diferentes técnicas de biología moleculares se vienen empleando hace varios años, primero para gérmenes virales y más recientemente para bacterias y hongos(6).

Las pruebas basadas en la reacción en cadena la polimerasa -PCR- tienen varias ventajas como la rapidez con que se puede obtener los resultados, el hecho que no se afectan por el uso previo de antibiótico ni por la refrigeración (pudiendo realizarse en muestras en fresco o congeladas) y la posibilidad de realizar diagnóstico en muestras mínimamente invasivas como el líquido cefalorraquídeo (LCR), a diferencia de muestras invasivas como la biopsia cerebral que era de elección para realizar los diagnósticos virales (7). A su vez, el uso de paneles moleculares para el diagnóstico simultáneo de varios gérmenes por medio de PCR múltiple ha abierto nuevas posibilidades y expectativas, además de nuevos retos(8).

El FilmArray Meningitis/Encephalitis panel (BioFire Diagnostics®) (FA/ME) aprobado por la FDA en el 2015 es un panel que detecta de manera simultánea 14 patógenos en LCR entre los que están siete virus (*cytomegalovirus (CMV)*, *enterovirus (EV)*, *herpes simplex virus 1 (HSV-1)*, *HSV-2*, *human herpes virus 6 (HHV-6)*, *human parechovirus (HPeV)*, *varicella-zoster virus (VZV)*), seis bacterias (*Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli K1*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae*) y un hongo (*Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*).

Un metanálisis reciente reportó que FA/ME tiene una sensibilidad del 90% y especificidad del 97% para la detección de microorganismos en general (9), pero con valores mayores cuando se aplicaron estudios adicionales para resolver discordancias. Sin embargo, dicha revisión presenta varias limitaciones. Primero, los autores, incluyeron estudios en los que no se realizaron de manera simultánea e independiente la prueba de referencia y prueba índice, lo cual altera los resultados de los cálculos de índices de validez diagnóstica en pacientes con sospecha de neuroinfección. Además, los autores no desarrollaron análisis según diferentes subgrupos como niños, neonatos y adultos, poblaciones en las que la incidencia de distintos microorganismos varía considerablemente.

Adicionalmente, al analizar algunos microorganismos específicos, tales como *S.pneumoniae*, *S.agalactiae* y *HSV*, la prueba ha mostrado valores de falsos positivos y negativos considerables. A esto se le suma que hay pocos datos de la validez diagnóstica del FA/ME panel para algunos gérmenes de baja prevalencia como *N.meningitidis* y *L.monocytogenes* debido a los pocos casos encontrados en los reportes. Por ejemplo, Leber et al en un estudio multicéntrico de 1560 muestras y con el cual se hizo la validación de la prueba por la *Food and Drug Administration* (FDA), no encontró casos de infección por estos microorganismos (10).

Debido a los vacíos que aún hay en la literatura y en la práctica diaria respecto al uso de este panel, decidimos realizar esta revisión sistemática de la validez diagnóstica del FA/ME en neonatos, niños y adultos inmunocompetentes con sospecha de meningitis y encefalitis aguda.

Metodología

Este estudio es una revisión sistemática de la literatura y metanálisis de estudios de pruebas diagnósticas. Nuestro protocolo fue registrado en la base de datos internacional de PROSPERO(CRD42020139285). Este reporte sigue las recomendaciones de la colaboración PRISMA-DTA para el reporte de estudios de RSL de pruebas diagnósticas(11)

Búsqueda de la literatura

La estrategia de búsqueda se realizó en bases de datos especializadas: Embase, Medline (vía Ovid), y Web of Science. Igualmente, en buscadores no especializados como Google Scholar, literatura gris y búsquedas manuales con referencias encontradas en artículos. La búsqueda se realizó hasta octubre del 2019. La estrategia de búsqueda se presenta en anexo 1.

Criterios de elegibilidad

Los criterios de elegibilidad de estudios fueron: estudios prospectivos o retrospectivos con diseño de prueba diagnóstica o de corte transversal, que midieran de manera simultánea la prueba de referencia (cultivo de LCR o hemocultivo para bacterias y PCR específica o LDT –*Laboratory Developed Test* para virus) y la prueba diagnóstica (FilmArray Meningitis/Encephalitis (ME) panel en

LCR) en pacientes neonatos, niños y adultos con *sospecha de* neuroinfección. Los estudios, para ser incluidos, debían contar con: 1) Reporte de los gérmenes que fueron detectados y 2) los datos suficientes para que las medidas de sensibilidad y especificidad fuesen calculadas, es decir, las proporciones de verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos y falsos negativos.

Excluimos los estudios que no contaban con información clara de los resultados, en los que el método comparativo fuera diferente al establecido previamente por los investigadores o que tuviera alguno de los criterios de exclusión: estudios realizados solamente en pacientes con diagnóstico de VIH o con otro tipo de inmunosupresión, y estudios de pacientes con derivaciones ventrículo-peritoneales u otros dispositivos intracraneanos.

Selección de estudios

Una vez realizada la búsqueda, dos investigadores (JT y MJ) de forma independiente revisaron las referencias obtenidas por título y *abstract*. Se seleccionaron en esta etapa aquellos que fueron considerados elegibles por al menos uno de los investigadores. Dichos artículos preseleccionados se obtuvieron en texto completo, para una revisión en una segunda etapa. En la segunda etapa se revisó en texto completo los estudios elegibles independientemente y en duplicado por dos revisores (JT y MJ) para confirmar su elegibilidad.

Así mismo se envió correo electrónico en dos ocasiones consecutivas a los autores de los estudios que solo se encontraron como *abstract* o poster solicitando el estudio completo en caso de existir. Cuando no se obtuvo respuesta de los autores y no se contó con la información necesaria para los análisis, los estudios fueron excluidos.

Extracción de los datos

La extracción de los datos de los estudios incluidos fue desarrollada por la investigadora principal (JT) y fue revisada por un segundo investigador (IF). De cada artículo se obtuvo la siguiente información: año de publicación, país, características del estudio (prospectivo/retrospectivo), criterios de inclusión, edad promedio, número de pacientes/número de muestras, características de la población, fuente de financiación, prueba de referencia empleada para evaluar cada uno de los 10 microorganismos objeto del presente trabajo, análisis aplicado por cada estudio cuando hubo diferencia entre FA/ME y el cultivo LCR/hemocultivo(prueba de

laboratorio adicional, citoquímico de LCR y/o contexto-resultado clínico) y los resultados para cada microorganismo:

Definiciones de pruebas y resultados

Los estudios presentaban distintas formas de adjudicar la enfermedad, es decir, de definir la prueba de referencia. Para las bacterias el cultivo ha sido tradicionalmente considerado la prueba de referencia estándar. Sin embargo, los cultivos tienen diversas limitaciones, considerando que se pueden ver afectadas por la calidad de la muestra y por el uso previo de antibióticos(5)(12), que no es infrecuente en pacientes con sospecha de neuroinfección. Por esto, algunos estudios consideraron una combinación de factores para adjudicar la presencia de la infección, en casos de desacuerdo entre el FA/ME panel y el cultivo bacteriano o también la PCR viral, con base a una prueba de laboratorio adicional, a hallazgos en el LCR y/o características clínicas. Por lo tanto, consideramos para nuestros análisis dos tipos de prueba de referencia que se describen a continuación.

Prueba de referencia 1

Para las bacterias se consideró el cultivo de aerobios de LCR y/o hemocultivo con aislamiento de las bacterias incluidas por el FA/ME. Para virus Herpes 1 y 2, la prueba de referencia fue la PCR *Simplexa HSV 1&2 Direct (Focus Diagnostics)* o *MultiCode RTx HSV 1&2 kit (Luminex Corporation)(3)(13)*. Para Enterovirus con *Cepheid Xpert EV (3)(14)* o en su defecto, con las pruebas *PCR LDT* o *PCR in house* para estos tres virus y para VZV que se hayan empleado en los estudios con *primers* previamente validados. Las *PCR in house* son pruebas desarrolladas por los laboratorios, *LDTs* por sus siglas en inglés (*Laboratory Developed Tests*), las cuales emplean diversos métodos para la extracción, purificación y detección de los ácidos nucleicos y no han sido evaluadas por revisiones independientes(13).

Prueba de referencia 2

La segunda prueba de referencia permitió adjudicar diagnóstico en algunos estudios en pacientes que presentaba desacuerdo entre el resultado del FA/ME y la prueba de referencia 1 (cultivo bacteriano o PCR viral). En estos casos se adjudicó por los autores de cada estudio el diagnóstico (infección), en pacientes que presentaban cultivo bacteriano/PCR viral negativo (es decir, los que fueron considerados falsos positivos a la luz de la prueba de referencia 1) pero con base en criterios preestablecidos basados en los hallazgos clínicos de los pacientes y hallazgos del

LCR, o por el resultado de una prueba molecular alterna definieron que el paciente tenía o no la infección. Esta evaluación, secundaria, no fue ciega. La tabla 1 presenta las definiciones y características de las dos distintas formas de evaluar la prueba de referencia

Prueba índice

La prueba índice fue el FA/ME. Esta prueba detecta 14 microorganismos diferentes. En nuestro estudio nos enfocamos en los siguientes microorganismos que cuentan con pruebas de referencia para comparar y son los gérmenes más frecuentes en neuroinfección aguda: *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* K1, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae*, enterovirus (EV), herpes simplex virus 1 (HSV-1), HSV-2, y Varicella-zoster virus (VZV).

Definiciones para ambas pruebas

En los análisis de prueba de referencia 1 (cultivo de LCR o hemocultivo para bacterias, y para los virus las pruebas previamente descritas), se utilizaron las siguientes definiciones.

- *Verdaderos positivos (VP)*: Pacientes con FA/ME positiva y prueba de referencia 1 positiva para el mismo microorganismo
- *Falsos positivos (FP)*: Pacientes con FA/ME positiva y prueba de referencia 1 negativa para el mismo microorganismo
- *Verdaderos negativos (VN)* Pacientes con FA/ME negativa y prueba de referencia 1 negativa para el mismo microorganismo
- *Falsos negativos (FN)* Pacientes con FA/ME negativa y prueba de referencia 1 positiva para el mismo microorganismo

En los análisis de prueba de referencia 2, se utilizaron las siguientes definiciones.

- *Verdaderos positivos (VP)*: Pacientes con FA/ME positiva y prueba de referencia 1 o 2 positiva para el mismo microorganismo
- *Falsos positivos (FP)*: Pacientes con FA/ME positiva y prueba de referencia 1 y 2 negativa para el mismo microorganismo
- *Verdaderos negativos (VN)* Pacientes con FA/ME negativa y prueba de referencia 1 y 2 negativa para el mismo microorganismo
- *Falsos negativos (FN)* Pacientes con FA/ME negativa y prueba de referencia 1 o 2 positiva para el mismo microorganismo

Cuando el resultado del FA/ME y la prueba de referencia 1 coincidían, este es el mismo resultado en prueba de referencia 2. Cuando el resultado del FA/ME y la prueba de referencia 1 no coincidían, la prueba de referencia 2 es la adjudicación final del diagnóstico por medio de un análisis retrospectivo de cada caso particular por los autores con base en prueba molecular adicional y/o los hallazgos y evolución clínica y los resultados del estudio del LCR. La tabla 2 detalla la explicación de VP/FP/FN/VN de prueba de referencia 1 y prueba de referencia 2

Evaluación del riesgo de sesgos en los estudios

La calidad metodológica de los estudios se evaluó acorde al *Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies (QUADAS-2)*(15) por uno de los investigadores (JT) y fue revisado por un segundo investigador (IF). Se evaluó solamente el apartado Riesgo de sesgos con los 4 dominios: selección de pacientes, prueba índice, prueba de referencia y flujo de tiempos con las preguntas guías respectivas y se agregaron preguntas que se consideraron importantes para evaluar la calidad de los estudios respecto a la pregunta PICO del presente estudio (*Anexo 2*). El apartado de los otros criterios se refiere a la validez externa de los estudios, que puede variar según el contexto en que se realice y por esto no se consideró en este análisis.

En el apartado 3 “Prueba de referencia”, en la pregunta guía *¿Es probable que la prueba de referencia valore correctamente la condición diana?*: Consideramos que, en caso de las bacterias, la prueba de referencia 1 (cultivo de LCR o hemocultivo) “valoraba correctamente la condición diana” en caso que se aclarara en el estudio que las muestras se tomaron *antes* del inicio del antibiótico, en caso contrario no.

En el caso de la prueba de referencia 2, aunque el resultado adjudicado puede llegar a ser una alternativa para los casos en que hay desacuerdo con la prueba de referencia 1 y en especial cuando esta es muy limitada (como las bacterias), esta adjudicación no fue ciega al resultado de la prueba índice y por lo tanto fue evaluada como con riesgo de sesgos. Las figuras de riesgo de sesgos se desarrollaron con el software Review manager 5.3 (*Revman 5.3*)

Síntesis de resultados

Se construyeron tablas de contingencia 2x2 de pruebas diagnósticas para cada uno de los microorganismos de cada artículo, siempre y cuando se hubiera empleado

prueba de referencia según lo establecido previamente. En los estudios en los que solo se aplicó cultivo de LCR se analizaron solo las bacterias ya que no hubo prueba de referencia para virus. Igualmente, si en el artículo solo se aclaraban los datos completos para un grupo de pacientes (por ejemplo – grupo prospectivo con toda la información necesaria para realizar los cálculos estadísticos), se hizo el análisis de este subgrupo de pacientes.

Se realizaron dos tipos de análisis, según las pruebas de referencia 1 y 2 para las siguientes poblaciones:

1. Para el grupo “todas las bacterias” para conocer los valores de precisión diagnóstica de detección de cualquier bacteria
2. Para cada una de las 6 bacterias y cada uno de los 4 virus que se eligieron para el presente estudio

Análisis estadístico

Calculamos sensibilidad y especificidad combinados y sus intervalos de confianza del 95% (IC95%). Usando un modelo de efectos aleatorios. Calculamos, posteriormente, las respectivas razones de verosimilitud positiva (LR+), y negativa (LR-) y los Odds ratio de diagnóstico (ORD), con sus IC 95% para todas las bacterias como grupo y para las bacterias y virus individuales para los que había suficiente información.

La heterogeneidad se midió con el índice I^2 . Se consideró una I^2 superior a 50% como heterogeneidad significativa. Para la presentación gráfica utilizamos una curva resumen de características operativas de receptor (SROC), con sus respectivos intervalos de confianza. Desarrollamos análisis de subgrupos según prueba de referencia 1 y 2 como se describió previamente. Los análisis se desarrollaron con el software STATA versión 15.0 (StataCorp LP) con los comandos metandi y midas.

Después de calcular sensibilidad y especificidad combinadas, se calculó el número de VP y FP de cada bacteria en todos los artículos y de manera global, con el fin de identificar de manera clara los aislamientos del FA/ME respecto a las pruebas de referencia 1 y prueba de referencia 2.

Resultados

Selección de estudios

Las búsquedas en las bases de datos arrojaron 1543 referencias. Luego de remover duplicados quedaron 1250 estudios para revisión de título y *abstract*, de los cuáles se incluyeron para revisión en texto completo 40 estudios. Excluimos otros 26 estudios por diferentes motivos (ver figura 1), e incluimos 14 artículos para la síntesis cualitativa y cuantitativa.

Características de los estudios incluidos

En la Tabla 3 describimos las características de los artículos incluidos en el meta-análisis. Los 14 estudios incluyeron 5197 pacientes (10)(16)(17)(18)(19)(20)(21)(22)(23)(24)(25)(26)(27)(28). El artículo de Blaschke (18) toma la subpoblación de 0-3 meses del estudio de Leber(10), por lo cual no se incluye en los análisis donde también está el artículo original, y para el artículo de Tarai(24), solo hay información detallada para análisis de *S.pneumoniae* por lo cual no se incluyó para el análisis de “todas las bacterias”. Cuatro estudios fueron solamente en población pediátrica (incluido Blaschke et al) (17)(18)(25)(26), dos de solo adultos y el resto incluía niños y adultos. Cinco estudios fueron realizados en Estados Unidos, dos en Italia y en España, y de a uno en Alemania, Francia, China, Etiopía, India y Brasil. Cinco artículos (16)(10)(19)(22)(25) emplearon método de laboratorio para resolver el desacuerdo entre el FA/ME y la prueba de referencia 1 -cuando la hubo-; el resto emplearon información clínica y/o resultado del citoquímico del LCR para resolver las diferencias. En el anexo 3 están los 26 estudios que se excluyeron con las respectivas razones.

Riesgo de Sesgos

En la figura 2 está la evaluación del riesgo de sesgos. En 4 artículos (16)(10)(21)(23) hubo “riesgo incierto” en la “*selección de pacientes*”, por quedar dudas respecto a la forma de elegir los pacientes con sospecha de neuroinfección aguda, en 4 estudios (23)(24)(27)(28) riesgo alto en el ítem “*Prueba índice*” porque no hay claridad respecto al adecuado manejo de la muestra, al almacenamiento (recientemente recolectadas, almacenadas o congeladas) y/o procesamiento para el FA/ME. Todos los artículos se calificaron como “riesgo alto” en el apartado “*prueba de referencia*”, por la sensibilidad no óptima del cultivo y que en ninguno aclaran haber realizado la punción lumbar y recolección de la muestra de LCR antes del inicio del antibiótico. Y en ninguno se detectó riesgo importante respecto al “Flujo y tiempos” de la prueba índice y prueba de referencia, con riesgo incierto en 2 (27)(28).

Síntesis de resultados

En el metanálisis “todas las bacterias comparado con prueba de referencia 1” incluimos 12 estudios (4228 pacientes). (10)(16)(17)(19)(20)(21)(22)(25)(26)(27)(28). En la Tabla 4 describimos los valores combinados de sensibilidad, especificidad, LR+, LR-y ORD con su respectivo IC95, y el I². En este metanálisis hubo un total de 153 aislamientos bacterianos (67 *S.pneumoniae*, 20 *E.coli*, 27 *S.agalactiae*, 17 *H.influenzae*, 17 *N.meningitidis* y 5 *L.monocytogenes*). Encontramos una sensibilidad combinada de 86% (IC95% 78 a92), especificidad de 98%(IC95% 95 a 99), LR+ 43.2y LR-0.14. Ver forest plot en figura 3 y curva sROC figura 5.

En el segundo metanálisis “todas las bacterias comparado con prueba de referencia 2” (ver tabla 4) encontramos una sensibilidad combinada del FA/ME de 97% (IC 95% 91 a 99), especificidad de 99% (IC95% 98 a 99), LR+ 286.1 y LR- 0.024. Ver forest plot en figura 4 y curva sROC figura 6. Respecto a la heterogeneidad de los resultados, la mayoría de valores con I² entre 45% a 95%.

En el nomograma bayesiano construido con los valores de LR+ y LR- (figura 7) para el grupo “todas las bacterias comparado con la prueba de referencia 1”, observamos como partiendo de una probabilidad pre-test de 20%, un resultado positivo del FA/ME para bacteria, arroja una probabilidad post test de 93% de tener meningoencefalitis bacteriana. Un resultado negativo de FA/ME por su parte, arroja una probabilidad post test de 3% de tener la enfermedad. En el diagrama de dispersión (figura 8), se muestra los distintos valores de LR+ en contraste con los LR- por cada estudio.

No fue posible realizar metanálisis de cada una de las bacterias por el bajo número de aislamientos para cada uno, que llevaban a muchos valores iguales a cero que impedían el metanálisis con el paquete estadístico.

En la tabla 5 describimos el total de resultados positivos por FA/ME discriminados por cada una de las bacterias del FA/ME y por cada artículo, así como los VP y los FP, tanto al aplicar la prueba de referencia 1 como el resultado definitivo al aplicar prueba de referencia 2. Para un total de 179 bacterias detectadas (13 estudios) por FA/ME y/o prueba de referencia, 90 (50.2%) fueron consideradas VP y 89 (49.7%) FP respecto a la prueba de referencia 1; y al aplicar prueba de referencia 2, 160 (89.3%) se consideraron VP y 19 (10.6%) FP.

Respecto a los falsos negativos de bacterias, hubo 7 resultados negativos del FA/ME y que fueron positivos por la prueba de referencia 1 en los 12 artículos (1 *S.pneumoniae*, 1 *H.influenzae*, 2 *S.agalactiae* y 3 *E.coli*).

Para virus se realizó el análisis de un subgrupo de pacientes del estudio de Blascke para enterovirus(18); como se observa en la figura 9, para una población de 97 pacientes, se reporta una sensibilidad del 100% y especificidad del 97%. Y para VZV en el estudio de Piccirilli(19) con 3 pruebas positivas tanto por FA/ME como por la prueba comparativa, para una S y E 100%.

No fue posible evaluar la validez diagnóstica del resto de virus, por falta de prueba de referencia, de una metodología adecuada y/o por información incompleta en los estudios.

Discusión

En esta RSL incluimos y analizamos 14 estudios que incluyeron 5197 pacientes. Encontramos que la prueba FA/ME tiene sensibilidades y especificidades altas para el diagnóstico de las bacterias incluidas y para enterovirus. En el caso de las bacterias, es mejor la especificidad que la sensibilidad y los valores mejoran aún más al aplicar la “prueba de referencia 2”, es decir el resultado adjudicado por los autores ante desacuerdos con el cultivo de LCR. No obstante, todos los estudios presentaron riesgos de sesgos explicados por los sesgos en la adjudicación de la prueba de referencia (en caso de prueba de referencia 1, por los problemas inherentes al cultivo, y en el caso de prueba de referencia 2 por la falta de uniformidad en los criterios para la adjudicación del diagnóstico en los diferentes estudios y porque la adjudicación no fue ciega), lo que limita la certeza en los resultados. Además, la heterogeneidad encontrada en los estudios fue moderada a alta (I^2 45% a 95%).

A pesar de que la especificidad fue alta, es importante discutir que el tema de FP no es tan irrelevante respecto a las bacterias. En nuestro análisis de los FP encontramos que al aplicar prueba de referencia 1, la mitad fueron FP (49.7%), y con prueba de referencia 2, esto disminuyó a 10.6%, y este porcentaje es mayor para bacterias como *S. pneumoniae* y *S agalactiae*. Es decir, la medida de validez, dada por la especificidad termina siendo muy buena, fundamentalmente por el gran número de pruebas, que hace que los FP sean pocos en proporción, cuando analizamos todas las bacterias. No obstante, el hecho que entre 10% y 50% de las pruebas positivas para bacterias por el FA/ME terminen siendo falsos positivos es

algo importante resaltar para el clínico. Las razones para este alto número pueden estar relacionadas con la contaminación de la muestra por parte del personal de salud que recolecta la muestra o por el personal del laboratorio que la procesa y la reactividad cruzada con otras bacterias(10)(8).

También es importante mencionar que las diferencias importantes en el valor de FP entre “prueba de referencia 1” y “prueba de referencia 2” puede estar relacionado con el desempeño subóptimo de los cultivos, más relevante aún con bacterias como *L.monocytogenes* y con aspectos como el uso previo de antibióticos. También existe la posibilidad de algunas adjudicaciones erróneas por “prueba de referencia 2” teniendo en cuenta los criterios no uniformes empleados para resolver los desacuerdos, y que esta adjudicación no fue ciega y por ende con riesgo de sesgos.

Por otro lado, los resultados falsos negativos bacterianos son pocos en el presente metanálisis, sin embargo de importancia por el impacto clínico que puede tener en la toma de decisiones. Los FN reportados fueron uno para *S.pneumoniae*, uno para *H.influenzae*, dos *S.agalactiae* y tres *E.coli*. Si bien no fue posible análisis por subgrupos de la validez diagnóstica del FA/ME para neonatos y niños en esta RSL, si es necesario tener en cuenta los FN reportados, ya que es bien conocido que tanto *E.coli* como *S.agalactiae* son causa común de sepsis y neuroinfección a esta edad(29), y esto nos demuestra que un resultado negativo del panel no descarta de manera definitiva una infección por estos microorganismos.

Otro punto que debe llamar la atención es el alto número de muestras con resultado negativo para algún microorganismo por el FA/ME. Por ejemplo, los estudios que tenían un mayor número de pacientes (cinco estudios con 436 a 1560 pacientes), solo entre el 5.7% y 12.6% de los casos tuvieron un resultado positivo para alguno de los 14 microorganismos en el FA/ME, es decir fueron negativas entre el 87.4% y 94.3% de las muestras. Y esto se acentúa aún más respecto a las bacterias, con solo 179 bacterias detectadas por el panel en los 5197 pacientes incluidos en los 13 estudios, es decir en el 3.4%. Si bien podría explicarse por la menor prevalencia de neuroinfección bacteriana en los últimos años (5)(29), también podría explicarse por la baja probabilidad pretest de infección y/o selección inadecuada de pacientes. Esto complica aún más el análisis estadístico, y es la razón por la cual no logramos realizar metanálisis específico por bacteria. Además, el número de FP y FN queda minimizado ante un número tan alto de VN y bajo número de VP.

El FA/ME tiene grandes ventajas potenciales tales como la rapidez en que se obtienen resultados, el cubrimiento simultáneo de un amplio número de microorganismos y el hecho de no afectarse por el uso previo de antibióticos. Estos beneficios se pueden traducir en la posibilidad de tratamientos dirigidos y oportunos, ya sea para iniciar, cambiar o desmontar un tratamiento antimicrobiano, lo que a su

vez se puede reflejar en disminución en los efectos adversos de estos y el tiempo de hospitalización(30)(31)(32)(33)(34).

A la fecha, solo existe una RSL sobre la validez diagnóstica del FA/ME(9). En esta, los autores encontraron sensibilidad de 90% y especificidad de 97% para todo el panel, que es similar a los resultados reportados por nuestro trabajo para el grupo de bacterias del FA/ME, y menor que el reportado por nosotros para enterovirus. También reportan tasa de FP de 11.4% y 4% antes y después de la “adjudicación” por el estudio, que son menores a lo reportado por nuestro metanálisis. Esta diferencia ocurre porque en dicha revisión incluyeron estudios que no realizaron prueba índice y de referencia, simultánea e independientemente, lo que afecta las medidas de validez diagnóstica. Adicionalmente, los autores no hicieron análisis por tipo de microorganismos (bacterias/virus), y solo incluyeron 8 estudios en comparación a los 14 que nosotros analizamos.

Los resultados reportados en el presente RSL tienen implicaciones importantes en la práctica clínica. El FA/ME es un test útil para el diagnóstico de neuroinfección aguda con una buena sensibilidad y especificidad para las principales bacterias causales y para enterovirus. Los datos apuntan superioridad sobre el cultivo de LCR en casos de uso previo de antibiótico, si bien se debe recordar que no lo reemplaza (posibilidad de crecimiento de otros gérmenes no cubiertos por el panel y por aportar el antibiograma necesario para dirigir tratamiento). Sin embargo, para la interpretación de los resultados es indispensable integrar el cuadro clínico y las características del citoquímico del LCR y así evitar hacer diagnósticos erróneos basándose exclusivamente en el resultado del panel, por la posibilidad de falsos positivos y falsos negativos como quedó demostrado en esta RSL.

De igual manera se debe recordar que, con pocas excepciones (CMV, *Cryptococcus neoformans/Gatti*) los microorganismos incluidos en el FA/ME son causales principalmente de neuroinfección aguda adquirida en comunidad. Por lo tanto, FA/ME no debería ser el método de detección a usar en pacientes con sospecha de infección subaguda o crónica, ni en pacientes con inmunosupresión. Tampoco en casos como meningitis postquirúrgica o en contexto de derivación ventrículo-peritoneal (DVP) donde gérmenes como *S.aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativo* y bacilos gram negativos juegan un papel preponderante y no están cubiertos por la prueba(35)(36)(37)(38).

Ahora, ante la sospecha de neuroinfección aguda, existe la opción de solicitar el panel FA/ME con base en alteraciones del citoquímico de LCR, o por el contrario solicitarlo independiente del resultado de este, como se ha sugerido en algunos artículos(39). Si bien es cierto que hay algunas ocasiones de encefalitis herpética con citoquímico de LCR normal, especialmente cuando se toma en las primeras 24 horas (40)(41)(42), y también se ha descrito meningitis por enterovirus en neonatos

con LCR no alterado cuando se obtiene la muestra de manera muy temprana (43)(44), se debe ser cauto con la extensión de la recomendación de solicitud del FA/ME ante un citoquímico de LCR sin anomalías ya que son casos poco frecuentes y en unos contextos específicos. Teniendo en cuenta el alcance y las limitaciones del FA/ME, es necesario crear protocolos o algoritmos para definir el grupo de pacientes que pueden beneficiarse de ella y desarrollar estudios de costo-efectividad que permitan identificar la relación costo-beneficio para todos los pacientes con sospecha o para un subgrupo específico.

Futuros estudios interesados en determinar la validez diagnóstica para bacterias, deberían realizar una adjudicación del diagnóstico de forma ciega para disminuir los sesgos asociados a la prueba de referencia y de esta manera aumentar la certeza de los resultados. Y para determinar la validez diagnóstica de los virus se requiere estudios que apliquen la prueba de referencia (PCR específica) para cada uno de ellos de manera independiente al resultado del panel en una población de pacientes con sospecha de neuroinfección, y no en pacientes con resultado positivo por el FA/ME como encontramos en muchos de los estudios. Igualmente se requieren estudios enfocados en subpoblaciones específicas como neonatos, ya que obtuvimos pocos resultados para este grupo. También creemos que es necesario determinar el desempeño de la prueba en subgrupo de pacientes con sospecha clínica de neuroinfección asociado a LCR alterado.

Nuestra RSL tiene varias fortalezas. Hicimos un análisis diferencial por tipo de prueba de referencia (cultivo vs adjudicación del diagnóstico). Adicionalmente, evaluamos el riesgo de sesgos y consideramos que la adjudicación del diagnóstico presenta riesgo de sesgos importantes. Además, nuestro estudio es la primera RSL que evalúa la validez diagnóstica del FA/ME enfocada en estudios de pacientes con sospecha de neuroinfección y no con diagnóstico confirmado. Por último, nuestra RSL cumplió los más altos estándares metodológicos para el desarrollo de este tipo de estudios (búsqueda de literatura extensa, incluyendo literatura gris, sin restricción de idioma, selección de estudios en duplicado, entre otras) y siguió las pautas recomendadas por la colaboración PRISMA-DTA (11) para el reporte de este tipo de estudios.

Entre las limitaciones encontradas están el bajo número de aislamientos bacterianos en los estudios que imposibilitó análisis estadísticos por microorganismo y los diferentes criterios empleados en cada estudio para solucionar los desacuerdos entre el FA/ME y la prueba de referencia 1. Para el presente metanálisis, 5 estudios emplearon otras pruebas microbiológicas para resolver los desacuerdos entre el FA/ME y la prueba de referencia 1, el resto emplearon información clínica y/o resultado del citoquímico del LCR, lo cual puede llevar a un sesgo a la hora de interpretar los resultados de la "Prueba de referencia 2". Otra

limitación es en relación a los pocos artículos que analizan el desempeño del FA/ME para los virus incluidos con las características requeridas para sacar conclusiones respecto a validez diagnóstica

Conclusión

El FA/ME panel tiene una adecuada sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de neuroinfección bacteriana y por enterovirus en pacientes inmunocompetentes. No obstante, la certeza de los resultados no es alta considerando el alto riesgo de sesgos descrito y porque los FP y FN son relevantes y hacen necesario interpretar la prueba en el contexto clínico del paciente. Es necesario crear protocolos para definir el grupo de pacientes que pueden beneficiarse más de esta prueba y realizar estudios de costo-efectividad para optimizar su utilidad y pertinencia en diferentes contextos. De igual manera se requieren estudios con adecuada metodología que permita evaluar la validez diagnóstica del FA/ME para cada uno de los virus.

Referencias

1. Singhi S, Angurana SK. Principles of Management of Central Nervous System Infections. *Indian J Pediatr.* 2018;86:52–9.
2. Burke A Cunha. The clinical and laboratory diagnosis of acute meningitis and acute encephalitis. *Expert Opin Med Diagn.* 2013;7(4):1–21.
3. Binnicker MJ, Espy MJ, Irish CL. Rapid and Direct Detection of Herpes Simplex Virus in Cerebrospinal Fluid by Use of a Commercial Real-Time PCR Assay. *J Clin Microbiol.* 2014;52(12):4361–2.
4. Erdem H, Cag Y, Ozturk-engin D, Defres S, Kaya S, Larsen L, et al. Results of a Multinational Study Suggest the Need for Rapid Diagnosis and Early Antiviral Treatment at the Onset of Herpetic Meningoencephalitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):3084–9.
5. Brouwer MC, Tunkel AR, Van De Beek D. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(3):467–92.
6. Houlihan CF, Bharucha T, Breuer J. Advances in molecular diagnostic testing for central nervous system infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2019 Jun;32(3):244–50.
7. Debiasi RL, Kleinschmidt-demasters BK. Use of PCR for the diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *J Clin Virol.* 2002;25:5–11.
8. Ramanan P, Bryson AL, Binnicker MJ, Pritt BS. Syndromic Panel-Based Testing in Clinical Microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(1):1–28.
9. Tansarli GS, Chapin KC. Diagnostic test accuracy of the BioFire® FilmArray® meningitis/encephalitis panel: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2019;
10. Leber AL, Everhart K, Balada-Illasat J, Cullison J, Daly J, Holt S, et al. Multicenter Evaluation of BioFire FilmArray Meningitis / Encephalitis Panel for Detection of Bacteria , Viruses , and Yeast in Cerebrospinal Fluid Specimens. *J Clin Microbiol.* 2016 Sep;54(9):2251–61.
11. McInnes MDF, Moher D, Thombs BD, McGrath TA, Bossuyt PM, Clifford T, et al. Preferred Reporting Items for a Systematic Review and Meta-analysis of Diagnostic Test Accuracy Studies The PRISMA-DTA Statement. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2018;319(4):388–96.
12. 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(4):726–30.

13. Gonzalez MD, Mcelvania E. New Developments in Rapid Diagnostic Testing for Children. *Infect Dis Clin NA*. 2018;32(1):19–34.
14. Kost CB, Rogers B, Oberste MS, Robinson C, Eaves BL, Leos K, et al. Multicenter Beta Trial of the GeneXpert Enterovirus Assay. *J Clin Microbiol*. 2007;45(4):1081–6.
15. Whitng P, Rutjes A, Marie W, Mallet S, Deeks J, Reitsma J, et al. QUADAS-2: A Revised Tool for the Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies. *Ann Intern Med*. 2011;155:529–36.
16. Hanson KE, Slechta ES, Killpack JA, Heyrend C, Lunt T, Daly JA, et al. Preclinical Assessment of a Fully Automated Multiplex PCR Panel for. Richter SS, editor. *J Clin Microbiol*. 2016 Mar;54(3):785–7.
17. Arora HS, Asmar BI, Salimnia H, Agarwal P, Chawla S, Abdel-Haq N. Enhanced Identification of Group B Streptococcus and Escherichia Coli in Young Infants with Meningitis Using the Biofire Filmarray Meningitis/Encephalitis Panel. *Pediatr Infect Dis J*. 2017 Jul;36(7):685–7.
18. Blaschke AJ, Holmberg KM, Daly JA, Leber AL, Dien Bard J, Korgenski EK, et al. Retrospective evaluation of infants aged 1 to 60 days with residual cerebrospinal fluid (CSF) tested using the FilmArray meningitis/encephalitis (ME) panel. *J Clin Microbiol*. 2018;56(7):1–9.
19. Piccirilli G, Chiereghin A, Gabrielli L, Giannella M, Squarzoni D, Turello G, et al. Infectious meningitis/encephalitis: Evaluation of a rapid and fully automated multiplex PCR in the microbiological diagnostic workup. *New Microbiol*. 2018;41(2):118–25.
20. Bårnes GK, Gudina EK, Berhane M, Abdissa A, Tesfaw G, Abebe G, et al. New molecular tools for meningitis diagnostics in Ethiopia - a necessary step towards improving antimicrobial prescription. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):684.
21. Leli C, Gotta F, Vay D, Calcagno L, Callegari T, Cassinari M, et al. Diagnostic accuracy of a commercial multiplex pcr for the diagnosis of meningitis and encephalitis in an italian general hospital. *Infez Med*. 2019;27(2):141–8.
22. López-Amor L, Escudero D, Fernández J, Martín-Iglesias L, Viña L, Fernández-Suárez J, et al. Diagnóstico de meningitis/encefalitis en UCI con sistema de PCR múltiple. ¿Es tiempo de cambio? *Rev Esp Quimioter*. 2019 Apr 11;
23. Radmard S, Reid S, Ciryam P, Boubour A, Ho N, Zucker J, et al. Clinical Utilization of the FilmArray Meningitis/Encephalitis (ME) Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay. *Front Neurol*. 2019;10:281.
24. Tarai B, Das P. FilmArray® meningitis/encephalitis (ME) panel, a rapid molecular platform for diagnosis of CNS infections in a tertiary care hospital in North India: one-and-half-year review. *Neurol Sci*. 2019;40(1):81–8.
25. Du B, Hua C, Xia Y, Li J, Xie Y, Tao Y, et al. Evaluation of the BioFire FilmArray

meningitis/encephalitis panel for the detection of bacteria and yeast in Chinese children. *Ann Transl Med.* 2019;7(18):437–437.

26. Eichinger A, Hagen A, Meyer-Bühn M, Huebner J. Clinical benefits of introducing real-time multiplex PCR for cerebrospinal fluid as routine diagnostic at a tertiary care pediatric center. *Infection.* 2019;47(1):51–8.
27. Boudet A, Pantel A, Carles MJ, Boclé H, Charachon S, Enault C, et al. A review of a 13-month period of FilmArray Meningitis/Encephalitis panel implementation as a first-line diagnosis tool at a university hospital. *PLoS One.* 2019;14(10):1–14.
28. Domingues RB, Santos MV dos, Leite FBV de M, Senne C. FilmArray Meningitis/Encephalitis (ME) panel in the diagnosis of bacterial meningitis. *Brazilian J Infect Dis.* 2019;23(6):468–70.
29. Agrawal S, Nadel S. Acute bacterial meningitis in infants and children: epidemiology and management. *Paediatr Drugs.* 2011;13(6):385–400.
30. Vikram A, HOLmen J, Neely M, Pia S P, Dien Bardb J. Neonatal Meningitis Caused by *Listeria monocytogenes* Diagnosed by Multiplex Molecular Panel. *J Clin Microbiol.* 2016;54(12):2846–9.
31. Mina Y, Schechner V, Savion M, Yahav D, Bilavsky E, Sorek N, et al. Clinical benefits of FilmArray meningitis-encephalitis PCR assay in partially-treated bacterial meningitis in Israel. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):1–8.
32. Wootton SH, Aguilera E, Salazar L, Hemmert AC, Hasbun R. Enhancing pathogen identification in patients with meningitis and a negative Gram stain using the BioFire FilmArray ®Meningitis / Encephalitis panel. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2016;15(1):26–9.
33. O'Brien MP, Francis JR, Marr IM, Baird RW. Impact of Cerebrospinal Fluid Multiplex Assay on Diagnosis and Outcomes of Central Nervous System Infections in Children: A Before and After Cohort Study. *Pediatr Infect Dis J.* 2018;37(9):868–71.
34. Messacar K, Breazeale G, Robinson CC, Dominguez SR. Potential Clinical Impact of The Filmarray Meningitis Encephalitis Panel In Children With Suspected Central Nervous System Infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017;86(1):118–20.
35. Ryan M, Zimmermann L, Huynh M, Polage C. Diagnostic Approach to Health Care- and Device-Associated Central Nervous System Infections. *J Clin Microbiol.* 2018;31(1):1–28.
36. Vallejo JG, Cain AN, Mason EO, Kaplan SL, Hultén KG. *Staphylococcus aureus* Central Nervous System Infections in Children. *Pediatr Infect Dis J.* 2017;36(10):947–51.
37. Ramos-Martínez A, De Las Heras-Carballo T, Fernández-Mateos C, De Reina L, Álvarez De Espejo-Montiel T, Escamilla-Fernández N, et al. Meningitis

postquirúrgica. Características diferenciales de la meningitis aséptica postquirúrgica. *Neurocirugia*. 2009;20(2):103–8.

38. Blomstedt GC. Infections in neurosurgery: A retrospective study of 1143 patients and 1517 operations. *Acta Neurochir (Wien)*. 1985;78(3–4):81–90.
39. Precit MR, Yee R, Pandey U, Fahit M, Pool C, Naccache SN, et al. Cerebrospinal fluid findings are poor predictors of appropriate filmarray meningitis/encephalitis panel utilization in pediatric patients. *J Clin Microbiol*. 2020;58(3):1–13.
40. Polage CR, Cohen H. State-of-the-Art Microbiologic Testing for Community-Acquired Meningitis and Encephalitis. *J Clin Microbiol*. 2016;54(5):1197–202.
41. Chaudhuri A, Kennedy PGE. Diagnosis and treatment of viral encephalitis. *Postgrad Med J*. 2002;78:575–83.
42. Kneen R, Michael BD, Menson E, Mehta B. National guideline for the management of suspected viral encephalitis in children. *J Infect*. 2011;1–31.
43. Crom SCM De, Furth MAM Van, Obihara CC. Characteristics of pediatric patients with enterovirus meningitis and no cerebral fluid pleocytosis. 2012;795–800.
44. Woon N, Tan H, Lee EY, Mei G, Khoo C, Wen N, et al. Cerebrospinal fluid white cell count: discriminatory or otherwise for enteroviral meningitis in infants and young children? 2016;213–7.
45. Merlin T, Chancey S, Yueli Z, Bowzard B, Fisher L, Al E. Poster How Do Advanced Molecular Tests Compare to Routine Clinical Laboratory Evaluation of CSF in Meningoencephalitis? A Study in 10 Urban Emergency Departments Across the USA. *Open forum Infect Dis*. 2017;4(Suppl 1):348–9.
46. Säll O, Hedberg ST, Neander M, Tiwari S, Dornon L, Bom R, et al. Etiology of central nervous system infections in a rural area of Nepal using molecular approaches. *Am J Trop Med Hyg*. 2019;101(1):253–9.

Tablas y Figuras

Tabla 1. Definición Prueba de Referencia 1 y Prueba de Referencia 2

	Prueba de referencia 1	Prueba de referencia 2 (Adjudicación Diagnóstico)
Bacterias	Cultivo LCR/Hemocultivo	En caso de desacuerdo entre FA/ME y prueba de referencia 1(cultivo LCR/hemocultivo): El adjudicado por el estudio en base a prueba molecular alterna y/o resultado de citoquímico de LCR y/o cuadro clínico del paciente. La adjudicación no se hizo de manera ciega
Virus	Herpes 1 y 2, la prueba: PCR Simplexa HSV 1&2 Direct (Focus Diagnostics) o MultiCode RTx HSV 1&2 kit ([Luminex Corporation. Para Enterovirus con Cepheid Xpert EV o en su defecto, con las pruebas PCR LDT para estos tres virus y para VZV que se hayan empleado en los estudios con <i>primers</i> previamente validados	En caso de desacuerdo entre FA/ME y prueba de referencia 1 (PCR específica descrita): El adjudicado por el estudio en base a prueba molecular alterno y/o resultado de citoquímico de LCR y/o cuadro clínico del paciente. La adjudicación no se hizo de manera ciega

LCR: Líquido cefalorraquídeo; FA/ME: FilmArray Meningits/encephalitis panel

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Tabla 2 Explicación resultado verdaderos positivos/falsos positivos/verdaderos negativos/falsos negativos según Prueba de Referencia 1 y Prueba de Referencia 2

FA/ME	Cultivo LCR/hemoc.	Prueba de referencia 1(a)	Criterios preestablecidos por autores del estudio (b)	Prueba de referencia 2(c)
Positivo	Positivo	VP	NA (d)	VP
Negativo	Negativo	VN	NA(d)	VN
Positivo	Negativo	FP	Positivo	VP
Positivo	Negativo	FP	Negativo	FP
Negativo	Positivo	FN	Positivo	FN
Negativo	Positivo	FN	Negativo	VN

FA/ME: Film Array meningitis/encephalitis panel; LCR: Líquido cefalorraquídeo; Hemoc: Hemocultivo; VP: verdadero positivo; VN: Verdadero negativo; FP: Falso positivo; FN: Falso negativo.

- a. Prueba de Referencia 1: Cultivo/hemocultivo bacterias/ PCR *in house* específica virus
- b. Criterios preestablecidos por autores del estudio cuando hubo diferencia entre FA/ME y el cultivo LCR/hemoc. Fue en base a método de laboratorio adicional y/o citoquímico líquido cefalorraquídeo y/o información clínica
- c. Prueba de Referencia 2: Resultado definitivo adjudicado por el estudio cuando hubo desacuerdo entre FA/ME y prueba de Referencia 1, en base al análisis adicional realizado
- d. Cuando no hubo desacuerdo entre el FA/ME y prueba de referencia 1, no fue necesario aplicar análisis adicional

Tabla 3 Artículos incluidos (n=14)

Estudio	País/tipo de estudio/Financiación	Criterios inclusión	No. Pacientes/ Edad promedio (DE)	No. de pacientes para el metanálisis	Tipo de germen para el metanálisis-/ Prueba de referencia 1	Uso de antimicrobiano previo PL	Método empleado para resolver desacuerdo FA/ME y Pba de Referencia 1
Leber 2016	EEUU/ Prospectivo/ Financ: BioFireDiagnostics	Muestras de pacientes que se hayan tomado para alguna situación clínica que incluya estudio de cultivo y estuviera disponible los 7 días siguientes	1560 pacientes Neonatos, niños y adultos 41% pediátricos y 58 > 18 años	1560 para estudio de bacterias	Bacterias cultivo <i>No se hizo análisis de virus por no quedar claro a cuantos hicieron PCR específica de cada virus</i>	Refieren uso de antimicrobiano previo a PL en 46de los resultados por FA (34% de los positivos)	*Re-testing con film array o método comparativo *Ensayo molecular adicional independiente P.EJE.coliPCR (neuC) H.influenzae 2do target PCR (OMP P6), s.agalactiae PCR (cfb), s.pneumoniae 2nd target PCR (α fucosidase), *Info.clínica adicional, Caract LCR
Hanson 2016	EEUU/ Retrospectivo/ Financ: Instituto Nacional de alergia y enfermedades infecciosas	Muestras congeladas de LCR a las que se les hubiera estudiado con al menos un método convencional y hubiera muestra residual	342 pacientes Niños (145) y Adultos (197)	<u>145</u> para estudio de bacterias	Bacterias: Cultivo <i>No se hizo análisis de virus por no quedar claro a cuantos hicieron PCR específica de cada virus (fueron en total 191 PCR LDT pero entre todos los virus)</i>	No aclaran uso de antibiótico previo	Ensayo molecular adicional independiente - P.EJE.coliPCR (neuC) h.influenzae 2° target PCR (OMP P6), s.agalactiae PCR (cfb), s.pneumoniae
Arora 2017	EEUU/ Prospectivo(no claro) Financ: BioFire Diagnostics yThe Sarnaik Endowment Fund for Fellow Research at the Children's Research Center of Michigan	Neonatos que se les hizo PL por sospecha de sepsis y que tuvieran: bacteriemia, o LCR anormal, o leucocitosis o leucopenia o fiebre	62 pacientes Niños 0-3 meses	62 para estudio de bacterias	Bacterias: cultivo LCR y hemocultivo	A 50 pacientes(80%)	Info clínica, LCR

Blaschke^{aa} 2018	EEUU/ Restrospectivo/ Financ: BioFireDiagnostics	<i>Es un subgrupo del estudio 1 (10) con los niños de 1-60 días</i>	145 pacientes Niños 0-2 meses	145 para estudio de bacterias 97 para estudio de Enterovirus	Bacterias cultivo Virus (enterovirus) PCR LDT	No aclaran	Igual que (10)
Piccirilli 2018	Italia/ Prospectivo y retrospectivo/ Financ: BioFireDiagnostics	Muestras de pacientes con sospecha de infección del SNC Para meta-análisis: 14 pacientes del grupo prospectivo que tuvieron pruebas comparativas para todos los pacientes	77 pacientes: 63 retrospectivo (no incluidos en el meta-análisis por ser muestras seleccionadas) y 14 prospectivo (para meta-análisis) Niños y adultos	14 pacientes del estudio prospectivo bacterias y virus	Bacterias: cultivo LCR, prueba molecular Virus: Prueba molecular específica	No aclaran	Bacterias: EsepScreec y para S.pneumoniae además test inmunocromatográfico No tuvieron desacuerdo con las virales
Barnes 2018	Etiopía/ Prospectivo Financ: Research Council of Norway	Pacientes con sospecha de meningitis que tuvieran disponible LCR	213 pacientes/ Niños y adultos Neonato y niños (promedio 2.2 años), adultos promedio 34.5	213 para estudio bacterias	Bacterias: cultivo LCR y hemocultivos	De los que tuvieron algún tipo de germen aislado en el FA, 5 recibieron antibiótico	Características LCR
Leli 2019	Italia/ Retrospectivo/ Financ: Ninguna-sin dato	Muestras de LCR ya procesadas como parte de cuidado clínico rutinario y que tuvieran citoquímico de LCR	109 pacientes Adultos Edad media 60 años (41.5 a 71)	109 para estudio bacterias	Bacterias: Cultivo LCR	No aclaran	Características LCR
Lopez-Amor 2019	España/ Prospectivo/ Financ: Ninguna-Sin dato	Pacientes ingresados consecutivamente en una UCI de adultos con sospecha clínica de meningitis/encefalitis	21 pacientes/ Adultos. Edad promedio 58.4 años	21 para estudio bacterias	Bacterias: Cultivo LCR y hemocultivo *No virus por no haber claridad a cuantos-cuales le aplicaron PCR específica	Refieren antibiótico "empírico" a 17. No es claro cuántos antes de-PL	Para neumococo que fue con el que hubo desacuerdo, aplicaron también Antígeno urinario y características LCR. PCR del gen codificante de la subun. 16S ribosomal bacteriana
Radmard 2019	EEUU/ Retrospectivo/	Pacientes que se les hizo PL y se le hubiera realizado FA/ME	705 pacientes/ Niños y adultos.	705 para estudio de bacterias	Bacterias: Cultivo LCR **Viral se usó PCR LDT. Pero no se	Refieren antimicrobiano empírico a 414 (59%). No es	Info clínica, características LCR

	Financ: National Institute of Health (NIH)		20 años edad promedio		<i>incluyó en el meta-análisis (solo la hicieron a los FA positivo)</i>	claro cuántos antes de-PL	
20 Tarai^b 2019^b	India/ Prospectivo/ Financ: Ninguna-sin dato	Muestras de pacientes con sospecha de infección SNC	969 pacientes Niños y adultos < 17 años: 157 (16.2%); 18-64 años: 507 52.3% >65 años 305 (31.5%)	969 para bacterias -para el meta-análisis solo Neumococo (único con datos completos)	Bacterias: Cultivo LCR, Ag bacteriano	No aclaran	Características LCR
21 Bailu 2019	China/ Restrospectivo/ -Love Charity Foundation Research Project in Shanghai Children's Medical Center. - Collaborative Innovation Center for Translational Medicine at Shanghai Jiao Tong University	Pacientes con sospecha inicial de meningitis/encefalitis	68 pacientes Niños. Edad promedio: 2.7 años	68 para estudio de bacterias	Bacterias: Gram, cultivo LCR, hemocultivos, antígenos bacterianos;	50 (73.5%)	PCR target y PCR 16S rDNA bacteriano a algunas
23 Eichinger 2019	Alemania/ Retrospectivo/ Financ: Ninguna-sin dato	Pacientes que se les hubiera hecho PL por sospecha de infección no clara o sospecha de infección de SNC	187 pacientes Niños (50% lactantes y 50% niños mayores)	187 para estudio de bacterias	Bacterias: cultivo estándar y hemocultivo	No aclaran antimicro-biano previo a PL	No tuvieron desacuerdos
25 Boudet 2019	Francia/ Retrospectivo/ Financ: Hospital Universitario de Nimes	Muestras de LCR que se les hubiera pedido FA/ME por médico o microbiólogo	708 pacientes Niños y adultos. Edad promedio 44 años (Rango edad 1-98 años)	708 para estudio de bacterias	Bacterias: Cultivo LCR - hemocultivo	A 2 de los que tuvieron desacuerdo: FA positivo y cultivo negativo	Info clínica, Características LCR
26 Barros 2019	Brasil/ Prospectivo?/ Ninguna-sin dato	Casos con sospecha de neuroinfección con LCR alterado (> 10 leucos) en hospitales	436 pacientes Niños y adultos 32.7 ± 29.4 años	436 para estudio de bacterias	Bacterias: cultivo y antígenos bacterianos	No aclaran	Características LCR

		privados de Sao Paulo.					
--	--	------------------------	--	--	--	--	--

No: Número; Pba: Prueba; Financ: Financiación; FA/ME: Film Array/Meningitis encephalitis panel; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; PL: Punción lumbar; LCR: Líquido cefalorraquídeo; Leucos: Leucocitos

- a. Pacientes de este estudio son subgrupo de Leber 2016, por lo cual no se incluyen en el “metanálisis todas las bacterias”
- b. En este estudio solo obtuvimos información para *S.pneumoniae* ya que no había información detallada para las otras bacterias. No fue incluido en el “metanálisis todas las bacterias”, pero si en el análisis Resultados verdaderos positivos/falsos positivos de cada bacteria discriminado por Prueba de referencia 1 Vs Prueba de referencia 2

Figura 1 Diagrama de Flujo artículos incluidos y excluidos

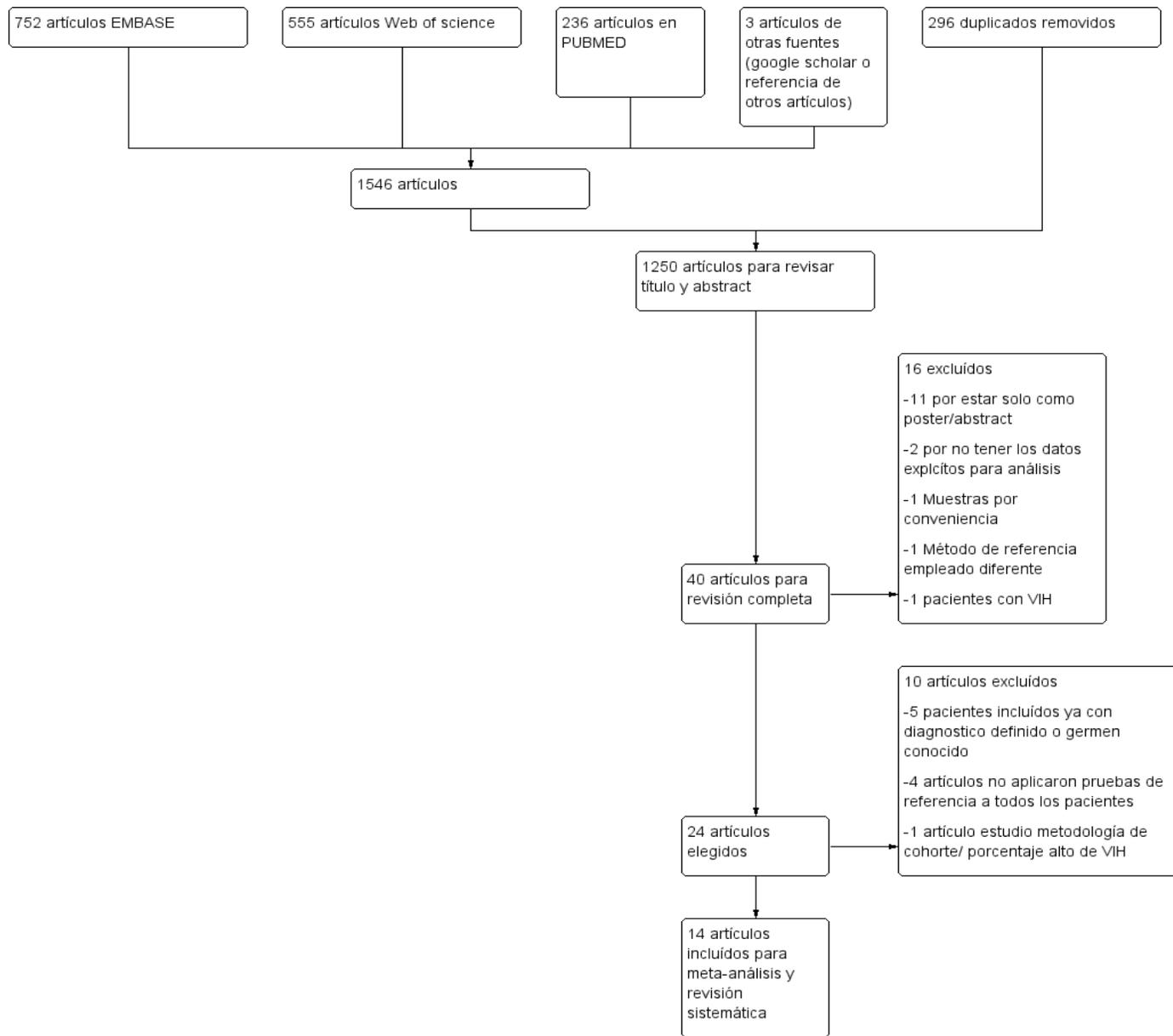


Figura 2. Calificación QUADAS -2 de los estudios



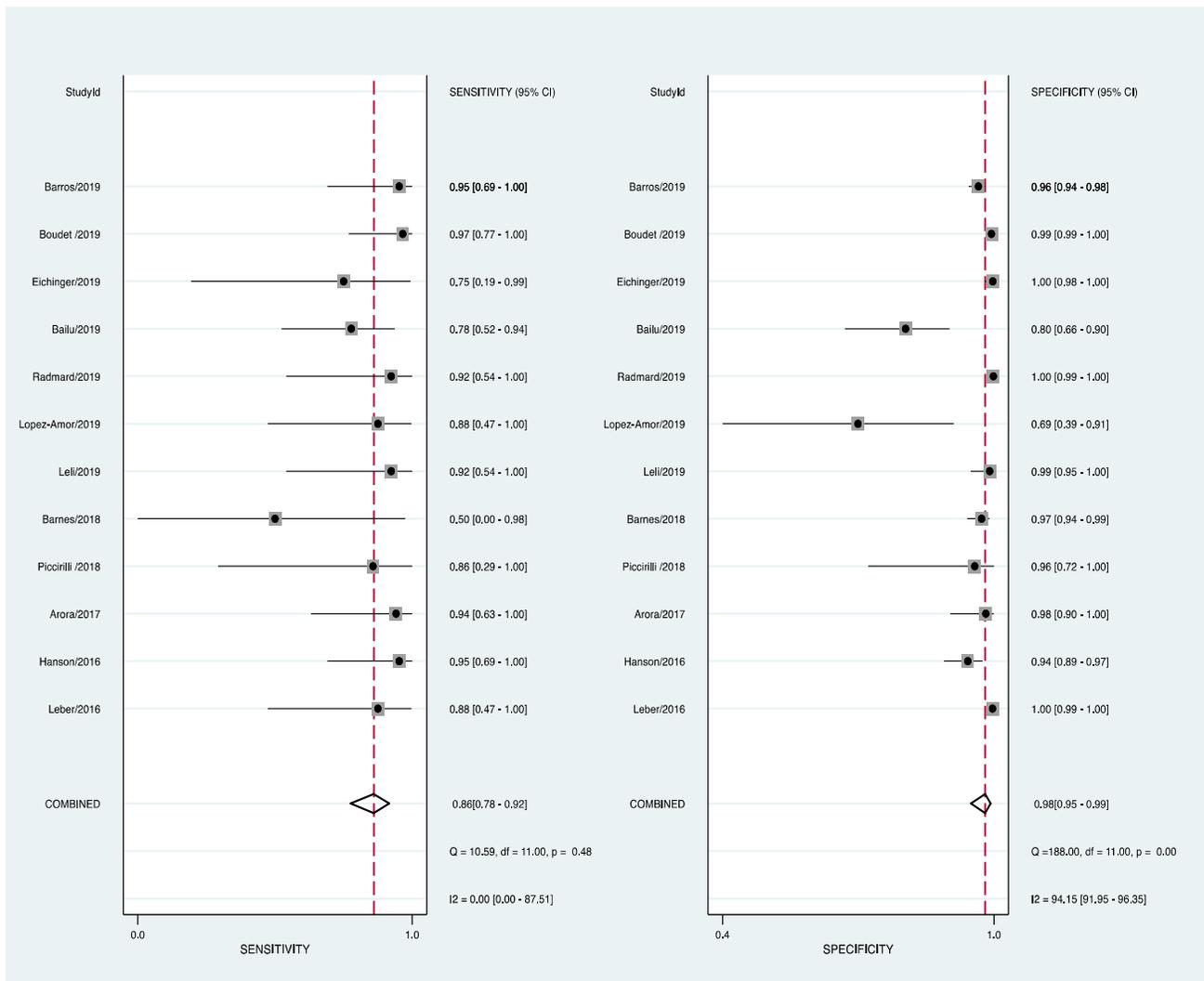
Tabla 4 Metanálisis de “Todas las bacterias por prueba de referencia 1” y “Todas las bacterias prueba de referencia 2

Meta-análisis	No. Estudios incluidos	No. pacientes	Sensibilidad [IC95%]; I²	Especificidad [IC95%]; I²	LR+[IC95%]; I²	LR-[IC 95%]; I²	ORD-[IC 95%];
Todas las bacterias Prueba de referencia 1^a	12	4228	0.86 [0.78-0.92]; 0.00	0.98 [0.95-0.99]; 94.15 %	43.2 [16.0-116.3]; 89.25 %	0.14 [0.09-0.23]; 45.7	302 [89-1028]
Todas las bacterias prueba de referencia 2^b	11	4214	0.97 [0.91-0.99];66.5%	0.99[0.98-0.99];88.04%	286.1[74.1-1103.8];70.9%	0.02[0.007-0.08];73.2	11532.5 [1567.657-84840.3]

No: Número;IC: Intervalo de confianza; LR +: Positive Likelihood Ratio o razón de verosimilitud positiva; LR-: Negative Likelihood Ratio o razón de verosimilitud negativa
ORD: Odds ratio de diagnóstico BBB

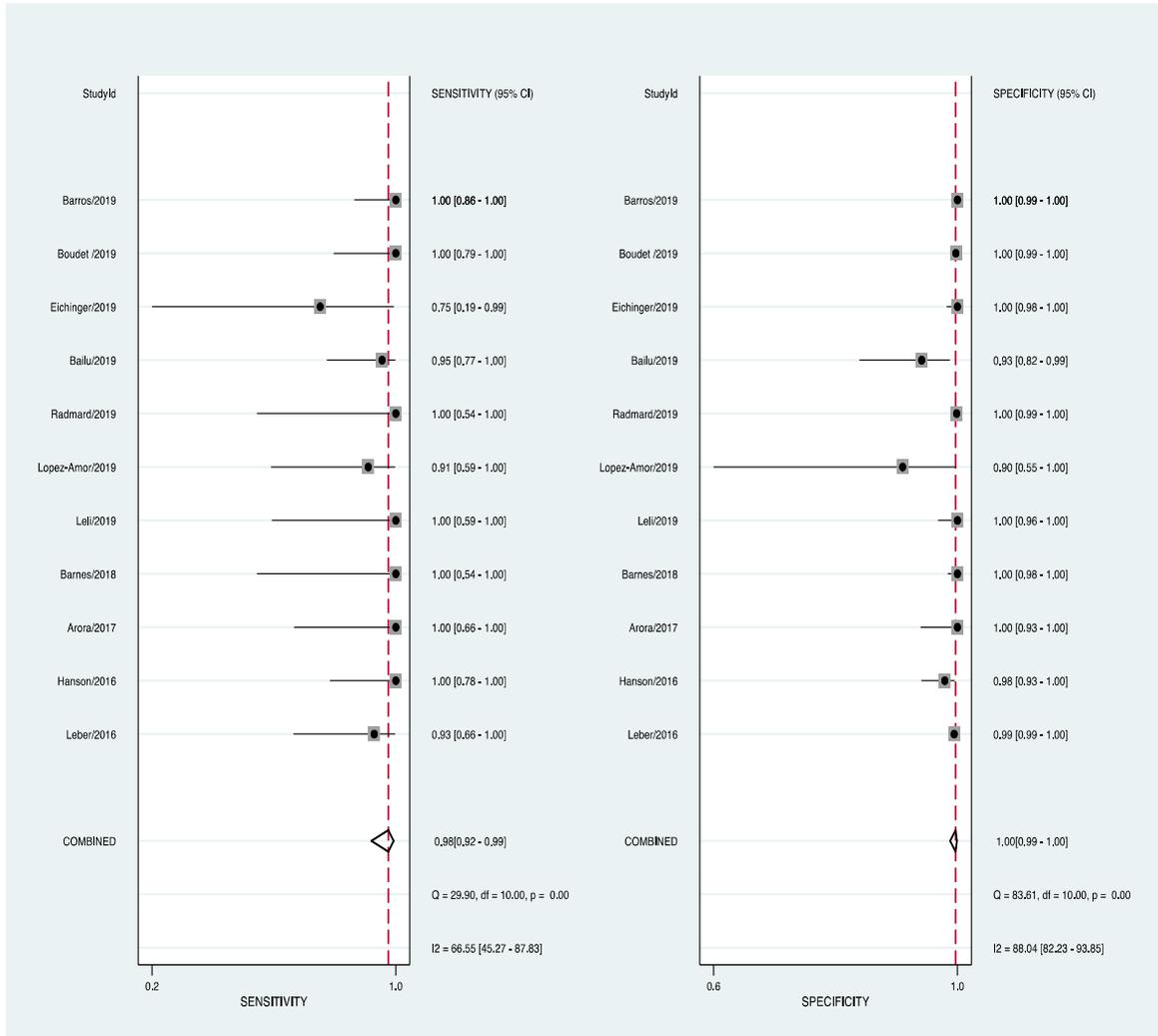
- a. Prueba de referencia 1: Cultivo Líquido cefalorraquídeo/hemocultivo
- b. Prueba de referencia 2: Resultado adjudicado por el estudio cuando hubo desacuerdo entre FA/ME y prueba de referencia 1, en base a método de laboratorio adicional y/o citoquímico líquido cefalorraquídeo y/o información clínica

Figura 3 “Forest plot de sensibilidad y especificidad combinada de FA/ME para la detección de cualquier bacteria- Prueba de referencia 1^a”



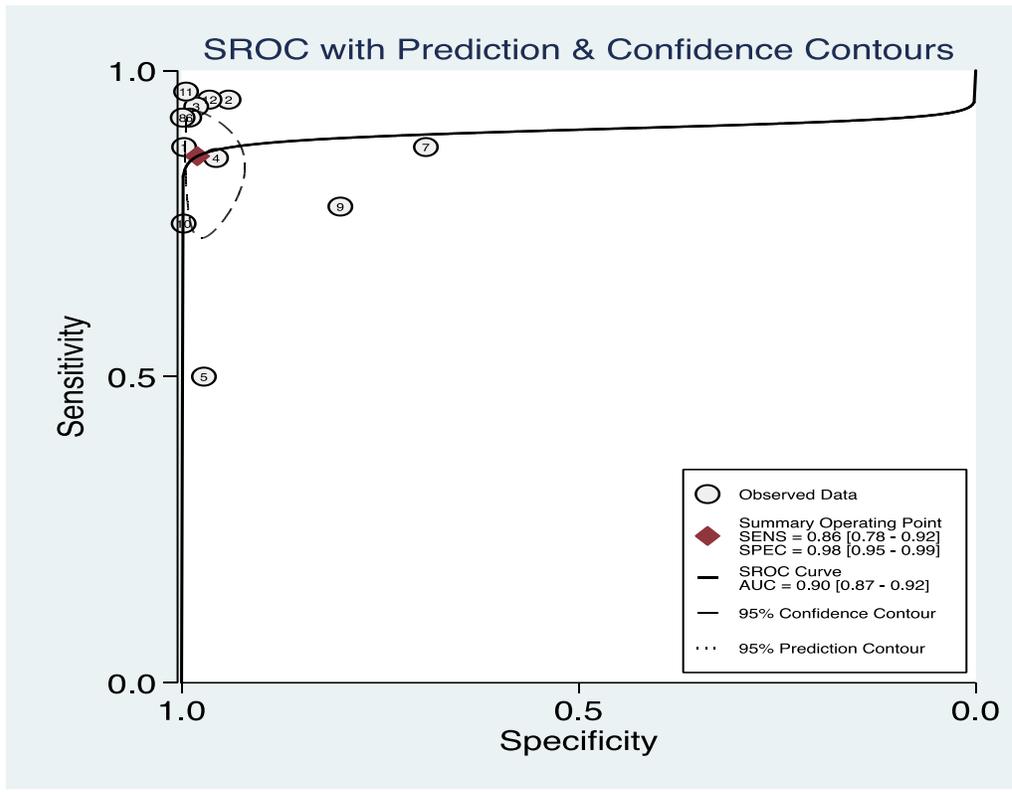
a. Prueba de referencia 1: Cultivo Líquido cefalorraquídeo/hemocultivo

Figura 4 “Forest plot de sensibilidad y especificidad combinada de FA/ME para la detección de cualquier bacteria-Prueba de referencia 2^a”



a. Prueba de referencia 2: Resultado adjudicado por el estudio cuando hubo desacuerdo entre FA/ME y prueba de Referencia 1, en base a método de laboratorio adicional y/o citoquímico líquido cefalorraquídeo y/o información clínica

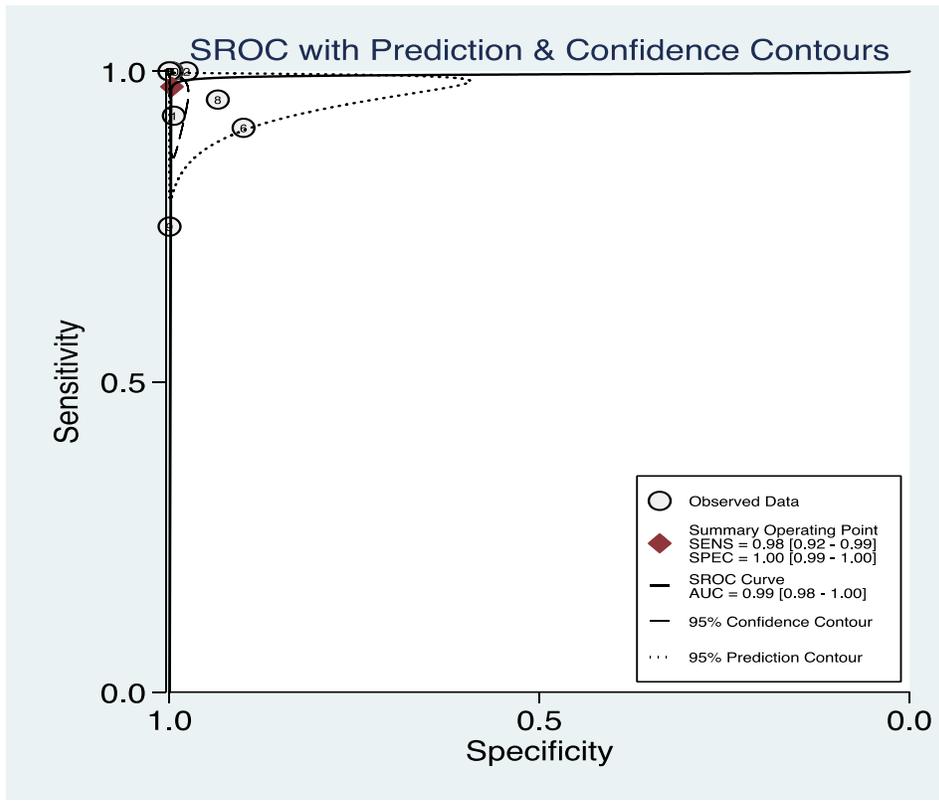
Figura 5 – Curva SROC para la prueba FA/ME para la detección de todas las bacterias. Análisis con prueba de referencia 1^a



sROC Curva resumen de características operativas de receptor

a. Prueba de referencia 1: Cultivo Líquido cefalorraquídeo/hemocultivo

Figura 6 – Curva SROC para la prueba FA/ME para la detección de todas las bacterias. Análisis con prueba de referencia 2^a



sROC Curva resumen de características operativas de receptor

- a. Prueba de referencia 2: Resultado adjudicado por el estudio cuando hubo desacuerdo entre FA/ME y prueba de referencia 1, en base a método de laboratorio adicional y/o citoquímico líquido cefalorraquídeo y/o información clínica

Figura 7 Nomograma Bayesiano

Todas las bacterias vs- prueba de referencia 1

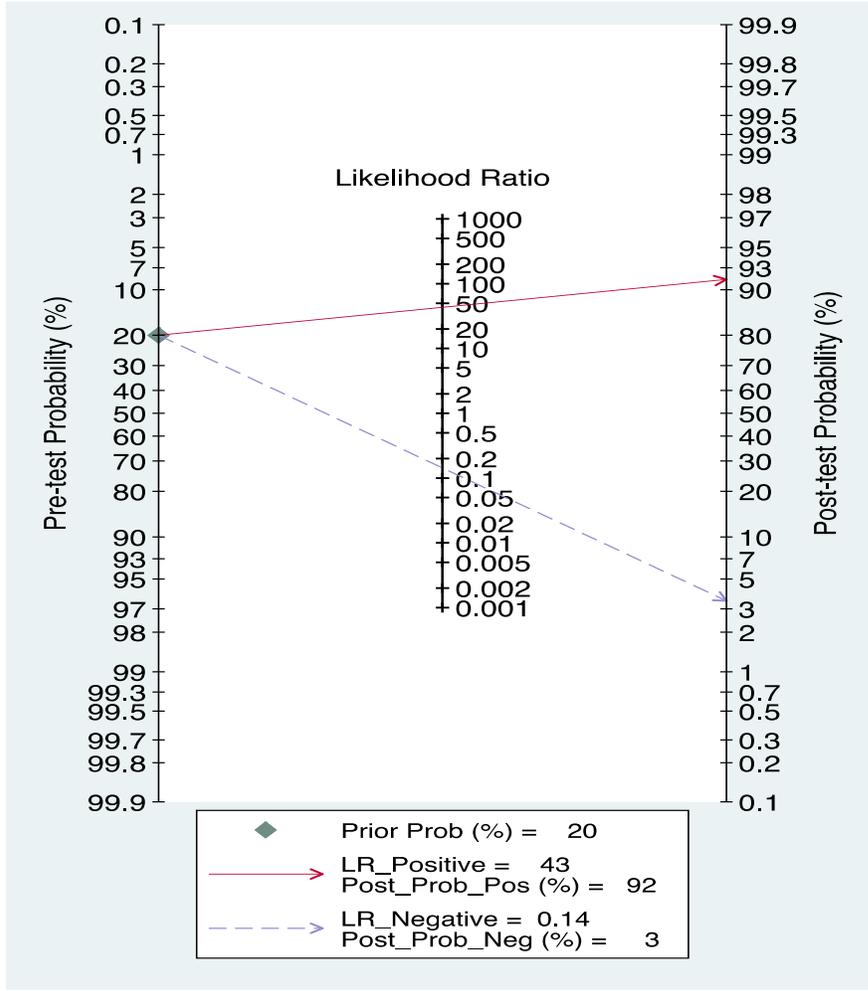


Figura 8 Diagrama de dispersión *Todas las bacterias* vs- prueba de Referencia 1

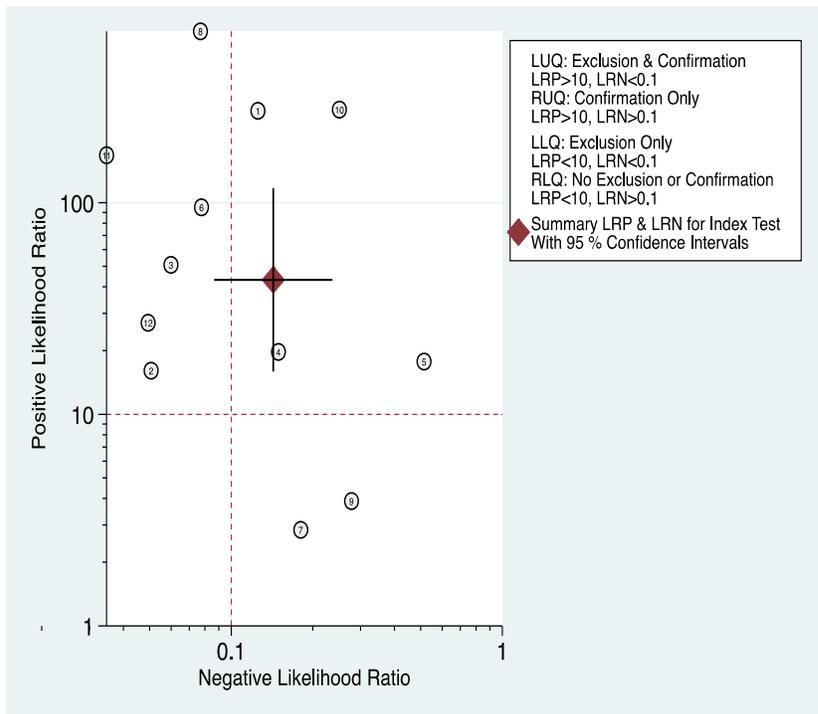


Figura 9 Forest Plot enterovirus

Study	TP	FP	FN	TN	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
5 Blaschke 2018	17	2	0	78	1.00 [0.80, 1.00]	0.97 [0.91, 1.00]		

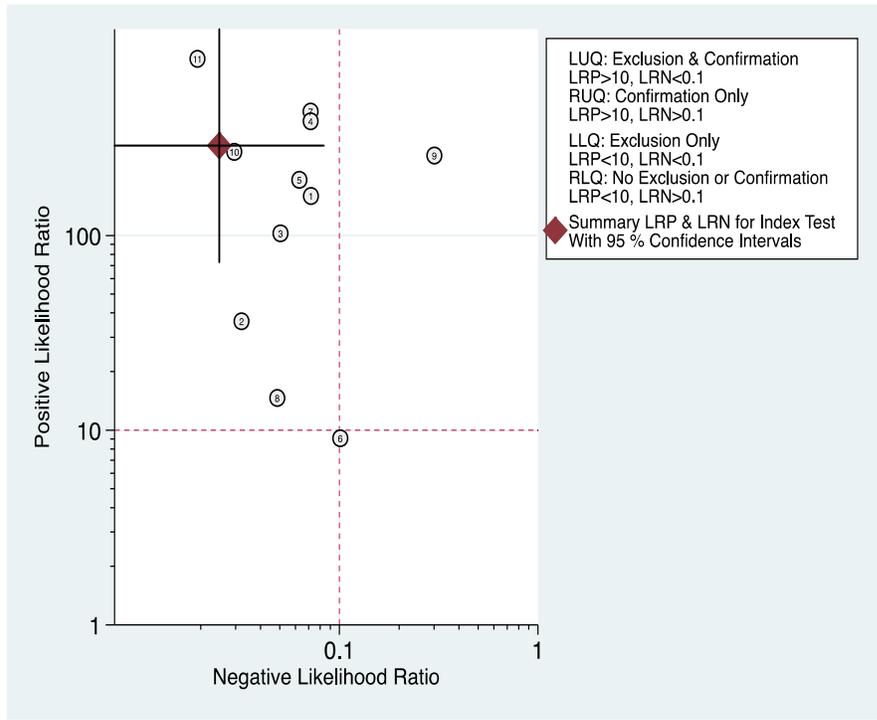


Tabla 5 Resultados verdaderos positivos/falsos positivos de cada bacteria discriminado por Prueba de referencia 1 Vs Prueba de referencia 2

	Estudio	Prueba de referencia 1			Prueba de referencia 2		Análisis adicional para resolver desacuerdo FA/ME y cultivos
		VP	FP	Total positivos	VP	FP	
<i>S.pneumoniae</i>	Leber	4	12	16	9	7	Re-testing, PCR adicional, Info.clínica, Caract LCR
	Hanson	3	3	6	5	1	PCR adicional
	Barnes	0	2	2	2	0	Caract. LCR
	Lopez amor	6	3	9	8	1	Ag urinarioneumoc, PCR adicional
	Radmard	3	1	4	3	1	Info clínica, caract- LCR
	Tarai	1	25	26	26	0	Caract LCR
	Bailu	4	4	8	7	1	PCR adicional
	Barros	4	8	12	12	0	Caract. LCR
	Piccirilli, Leli, Eichinguer, Boudet	10	0	10	10	0	No hubo desacuerdos
Total (%)		35(37.6%)	58(62.3%)	93	82(88.1%)	11(11.8%)	
<i>H.Influenzae</i>	Leber	1	1	2	2	0	Re-testing, PCR adicional, Info.clínica, Caract LCR
	Hanson	4	1	5	5	0	PCR adicional
	Barnes	0	2	2	2	0	Caract. LCR
	Boudet	1	2	3	2	1	Info clínica, Caract. LCR
	Barros	1	3	4	4	0	Caract. LCR
	Lopez Amor	1	0	1	1	0	No hubo desacuerdos
Total (%)		8(47%)	9(52.9%)	17	16(94.1%)	1(5.8%)	
<i>S.agalactiae</i>	Leber	0	1	1	0	1	Re-testing, PCR adicional, Info.clínica, Caract LCR
	Hanson	1	4	5	3	2	PCR adicional
	Arora	6	1	7	7	0	Info clínica, caract. LCR
	Bailu	3	3	6	5	1	PCR adicional
	Boudet	4	1	5	5	0	Caract. LCR
	Leli, Rarmard	3	0	3	3	0	No hubo desacuerdos

Total (%)		17(62.9%)	10 (37%)	27	23 (85%)	4(14.8%)	
<i>N.meningitidis</i>	Barnes	0	1	1	1	0	Caract. LCR
	Leli	1	1	2	2	0	Caract. LCR
	Bailu	0	1	1	1	0	PCR adicional
	Barros	4	3	7	7	0	Caract. LCR
	Hanson,Piccirilli, Boudet	6	0	6	6	0	No hubo desacuerdos
Total (%)		11(64.7%)	6(35.2%)	17	17(100%)	0	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Bailu	0	1	1	1	0	PCR adicional
	Barros	0	1	1	1	0	Caract. LCR
	Piccirilli, Leli, Lopez Amor	3	0	3	3	0	No hubo desacuerdos
Total (%)		3(60%)	2(40%)	5	5(100%)	0	
<i>E.coli</i>	Leber	2	1	3	2	1	Re-testing, PCR adicional, Info.clínica, Caract LCR
	Barnes	0	1	1	1	0	Caract. LCR
	Bailu	7	1	8	7	1	PCR adicional
	Boudet	1	1	2	1	1	Caract. LCR
	Hanson,Arora, Radmard,Eichinguer Barros	6	0	6	6	0	No hubo desacuerdos
Total (%)		16(80%)	4(20%)	20	17(85%)	3(15%)	
Total todas las bacterias y todos los estudios (%)		90 (50.2%)	89 (49.7%)	179	160 (89.3%)	19 (10.6%)	

Caract: Características; Info: Información; LCR: Líquido cefalorraquídeo; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; Pos: Positivo; VP: Verdadero positivo; FP: Falso positivo

