

Diagnóstico precoz de la sepsis y su implicación en el manejo clínico de los
pacientes

M^a Dolores Quesada Fernández

UNIVERSIDAT AUTÓNOMA DE BARCELONA
Departamento de Genética y Microbiología
Facultad de Biociencias

Memoria presentada por M^a Dolores Quesada Fernández
para optar al grado de Doctora en Medicina por
la Universidad Autónoma de Barcelona.

V^o B^o de los directores de la tesis

Dr. Vicente Ausina Ruiz
Catedrático de Microbiología
Profesor Titular UAB
Departamento de Genética y Microbiología

Dra. Montserrat Giménez Pérez
Facultativa Especialista de Microbiología
Profesora Asociada UAB
Departamento de Genética y Microbiología

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Resumen.....	4
Introducción.....	7
1. El síndrome clínico de la sepsis.....	10
1.1. Evolución histórica y conceptual del término.....	10
1.2. Definición actual.....	12
2. Patogenia.....	14
2.1. Factores de patogenicidad.....	14
2.2. Mecanismos de defensa del huésped.....	15
2.3. Fisiopatología de la sepsis	16
3. Etiología.....	19
3.1. Evolución de los microorganismos causantes de sepsis	19
3.2. Microorganismos según lugar de adquisición y foco de origen	21
3.2.1 Bacteriemia adquirida en la comunidad	22
3.2.2 Bacteriemia adquirida en el hospital	22
3.2.3 Bacteriemia relacionada con la asistencia sanitaria	23
4. Diagnóstico microbiológico.....	24
4.1. Obtención de la muestra de sangre.....	24
4.2. Métodos para el cultivo de la sangre.....	25
4.2.1 Métodos manuales	25
4.2.1.1 Convencionales	25
4.2.1.2 Medios Bifásicos	26
4.2.1.3 Lisis-centrifugación.....	26
4.2.2 Sistemas automáticos	27
4.2.2.1 Radiométrico y no radiométrico.....	27
4.2.2.2 Sistemas automáticos de monitorización continua	27
4.3. Procesamiento de los hemocultivos positivos por métodos convencionales	28
4.3.1 Método estándar	28
4.3.2 Métodos de identificación directos de hemocultivo según microorganismo.....	30
4.3.2.1 Identificación directa de cocos grampositivos	30
4.3.2.2 Identificación directa de bacilos gramnegativos	31
4.3.3 Métodos de identificación y estudio de sensibilidad directos.....	32
4.3.3.1 Para bacilos gramnegativos	32
4.3.3.2 Para cocos grampositivos	34
4.3.3.3 Ventajas e Inconvenientes del método directo	35
4.4. Procesamiento de los hemocultivos positivos por métodos moleculares	36
4.4.1 Detección de proteínas	37
4.4.1.1 Espectrometría de masas.....	37
4.4.2 Detección de material genético sin amplificación previa de ácidos nucleicos	38
4.4.2.1 Hibridación fluorescente in situ (FISH).....	38

4.4.3	Detección de material genético con amplificación previa de ácidos nucleicos.....	39
4.4.3.1	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica	39
4.4.3.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple.....	39
5.	Perspectivas de futuro	40
5.1.	Métodos moleculares para identificación y estudio de sensibilidad de sangre directa.....	40
5.1.1	SepsiTest ® (Molzym, Alemania)	41
5.1.2	Magicplex Sepsis Real-time Test ® (Seegene, Corea).....	41
5.1.3	VYOO ® (SIRLS-Lab, Alemania).....	42
5.1.4	SeptiFast Test ® (Roche molecular, Alemania).....	42
5.1.5	IRIDICA ® (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, EEUU).....	43
5.2.	Ventajas e inconvenientes de los métodos moleculares de sangre directa	43
5.3.	Modelo de futuro.....	44
6.	Importancia del diagnóstico clínico precoz en el manejo clínico de los pacientes	45
7.	Impacto clínico de la información rápida del resultado de los pacientes al clínico	48
	Objetivos	50
	Material y Métodos.....	52
Objetivo 1.....		53
Objetivo 2		57
Objetivo 3		62
Objetivo 4		65
	Resultados	67
Objetivo 1.....		68
Objetivo 2		73
Objetivo 3		79
Objetivo 4		84
	Discusión.....	88
Objetivo 1.....		89
Objetivo 2		94
Objetivo 3		100
Objetivo 4		105
	Conclusiones	109
Objetivo 1.....		110
Objetivo 2		111
Objetivo 3		112
Objetivo 4		113
	Referencias Bibliográficas.....	114
	Anexos	133

Abreviaturas

ACCP	American College of Chest Physicians
BD	Becton Dickinson
BGNMF	Bacilos gramnegativos no fermentadores
bla_{CTX-M}	Gen de resistencia a β -lactámicos
bla_{KPC}	Gen de resistencia a β -lactámicos
bla_{SHV}	Gen de resistencia a β -lactámicos
BLEE	Betalactamasas de espectro extendido
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CVC	Catéter venoso central
DAMPs	Danger associated molecular patterns
DNA	Ácido desoxirribonucleico
em	errores menores
Em	errores graves
EM	errores muy graves
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FISH	Fluorescent in situ hybridization
ID	Identificación
IL	Interleuquina
LPS	Lipopolisacárido
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight
meca	Gen de resistencia a la meticilina
PAMPs	Pathogen-associated molecular pattern
PCR (biomarcador)	Proteína C reactiva
PCR (molecular)	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR/ESI-MS	PCR/electrospray ionization mass spectrometry

PCT	Prueba de la coagulasa en tubo
PROA	Programas de optimización de uso de antibióticos
PRP	Pattern-recognition receptors
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SIRS	Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica
TLR	<i>Toll-Like receptors</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
vana	gen de resistencia a la vancomicina
vanB	gen de resistencia a la vancomicina

Resumen

La sepsis es la respuesta inflamatoria del organismo frente a la invasión del torrente circulatorio de un patógeno, que desemboca en una disfunción orgánica. En las dos últimas décadas, se ha observado un incremento en la incidencia, probablemente atribuido al envejecimiento de la población, así como, a la aplicación de maniobras diagnósticas y terapéuticas cada vez más complejas y agresivas. Sigue presentando una elevada mortalidad, a pesar de las continuas mejoras que se han producido en la asistencia sanitaria, superando otras enfermedades de gran impacto social, como las neoplasias o el infarto agudo de miocardio.

El diagnóstico clínico de la sepsis es de vital importancia para el correcto manejo y evolución del paciente. Pero también es imprescindible disponer de métodos de laboratorio que nos permitan detectar y aislar, lo más rápidamente posible, el microorganismo responsable del proceso infeccioso y estudiar su sensibilidad a los antibióticos, ya que la administración y adecuación precoz de la cobertura antibiótica empírica reduce la mortalidad en un 10%, en pacientes con sepsis grave o shock séptico.

Actualmente, la técnica de referencia para el diagnóstico microbiológico de la sepsis es el hemocultivo, seguido de los métodos convencionales de identificación y antibiograma. Todo este proceso puede tardar hasta 48-65 horas, lo que implica un retraso en el inicio de una terapia antibiótica precoz y efectiva. Esto conlleva la necesidad de mejorar los procedimientos de tal manera que se acorten significativamente los tiempos requeridos para la emisión de los informes sobre el agente causal de la sepsis.

En esta tesis se han evaluado dos nuevos protocolos que permiten la inoculación directa de los paneles del sistema Vitek-2 compact para identificación y antibiograma de bacilos gramnegativos y cocos grampositivos, a partir de inóculos bacterianos obtenidos directamente de frascos de hemocultivo positivo, que contienen carbón activado. Con estos métodos, la concordancia global en el estudio de la sensibilidad antibiótica ha sido superior al 95% con respecto al método convencional. Además, proporciona resultados precisos de identificación y antibiograma en un tiempo medio de unas 6 horas para bacilos gramnegativos y 9 horas para cocos grampositivos. Con esta información podemos dar resultados definitivos en sólo 24 horas desde la extracción del hemocultivo.

El mismo protocolo se ha evaluado aplicado a los hemocultivos pediátricos, obteniendo una concordancia, respecto al método de referencia, superior al 99% sin obtenerse ningún error muy grave.

Otro objetivo ha sido estudiar el impacto clínico que supone la información rápida y personalizada de los resultados obtenidos por el sistema Vitek-2 directamente de hemocultivo positivo, tanto en la población adulta como pediátrica. Este hecho, comportó un cambio en las decisiones terapéuticas por parte del clínico, en más del 50% de los episodios de bacteriemia en adultos, y en el 65'6% de los pacientes pediátricos, ya fuese por el inicio de un tratamiento antibiótico o por el cambio a un tratamiento adecuado.

Probablemente, debido al aumento progresivo de la resistencia microbiana a los antibióticos, durante el período de estudio se ha observado un descenso en el porcentaje de episodios de sepsis en que el tratamiento empírico podía considerarse el de elección, y paralelamente se ha producido un incremento en el porcentaje en que la información rápida y personalizada ha permitido cambiar un tratamiento que no cubría al microorganismo implicado, por uno efectivo. Por lo que el sistema Vitek-2 compact ha permitido adelantar la toma de decisiones y modificar conductas terapéuticas o las relacionadas con la aplicación de medidas de control de infección.

Por lo tanto, la transmisión inmediata y personalizada al médico responsable del paciente, de la información obtenida del hemocultivo positivo, tanto de la tinción de Gram como de los resultados de identificación y antibiograma, permite orientar de forma rápida y adecuada el tratamiento antibiótico, evitando las consecuencias de una terapia incorrecta y/o tardía.

Introducción

Las infecciones del torrente sanguíneo son una causa importante de morbilidad y mortalidad, especialmente en pacientes críticos. La incidencia de la sepsis sigue siendo significativa i representa un reto en la medicina mundial a pesar de disponer, en la actualidad, de potentes agentes antimicrobianos y de los logros alcanzados en el campo del diagnóstico microbiológico [1, 2]. Por ello, la instauración rápida del tratamiento adecuado disminuye la mortalidad atribuible a estas infecciones y es un factor de gran relevancia en el pronóstico del enfermo.

La incidencia de bacteriemia y sepsis es difícil de estimar dada la heterogeneidad en cuanto a definición de caso que se ha utilizado y además, dependerá en gran parte del tipo de población estudiada [3,4]. Así, la incidencia será diferente si estudiamos la población general, o sólo la población de pacientes ingresados en un hospital, o incluso si sólo estudiamos una de las salas del hospital. Afecta aproximadamente al 2% de todos los pacientes hospitalizados y hasta al 70% de los pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos[5].

En las últimas décadas se ha observado un incremento de las bacteriemias con una incidencia entre 3 y 28 episodios por cada 1000 ingresos hospitalarios. La sepsis está considerada entre las 10 principales causas de muerte, con una mortalidad directamente relacionada que se encuentra entre el 10-30%[6]. La actual incidencia de casos y muertes relacionados con sepsis grave superan las provocadas por el cáncer de próstata, el cáncer de mama y el VIH/SIDA juntos.

Actualmente el número de casos de sepsis en Estados Unidos es de aproximadamente 750.000 al índice de mortalidad del 20-50%, aunque la gravedad de las enfermedades subyacentes asociadas a la sepsis hace que probablemente se subestime este porcentaje.[8]. En España, el número de casos de sepsis anual es de aproximadamente unos 50.000 al año. En un estudio realizado en un hospital de tercer nivel reveló una incidencia de 24,3 episodios/1000 admisiones durante el periodo de estudio[9].

Al igual que en las conclusiones de Martin *et al*, [7] los resultados de otros estudios epidemiológicos constatan un aumento de la incidencia anual de la sepsis grave [10]. El estudio realizado por Bouza *et al* [11] demuestra el notable aumento de las tasas de incidencia de la sepsis grave en España entre los años 2006-2011, pasando de 63,91 casos/100.000 habitantes en el 2006 a 105,51 casos /100.000 habitantes en el 2011. También en Cataluña, según el “Registre del Conjunt Mínim Bàsic de Dades” (CMBD) del servei Català de la Salut, la incidencia hospitalaria de la sepsis grave ha aumentado a tasas anuales del 6% durante el período del 2008 al 2012, pasando de 12.809 casos de sepsis en el 2008 a 20.228 en el 2012. (Clèries M. 2013. Epidemiologia de la sèpsia greu a Catalunya. Jornada tècnica sobre el Continu Assistencial en el Maneig de la Sèpsia Greu).

Según estudios realizados en Estados Unidos, las hospitalizaciones por sepsis han aumentado más del doble en los últimos años superando las provocadas por infarto de miocardio[12]. También sigue aumentando la prevalencia de la sepsis en las unidades de cuidados intensivos[13]. El aumento progresivo de la incidencia no se explica fácilmente por un solo factor, sino que son varias las causas implicadas. Es un reflejo tanto del aumento de las comorbilidades de la población, del envejecimiento de la misma, con grupos de pacientes que reciben tratamientos agresivos e inmunosupresores, así como de la mayor frecuencia, complejidad e invasividad de las maniobras diagnósticas y terapéuticas [14]. Estos factores han favorecido que el aumento de la incidencia sea, sobre todo, a expensas de las sepsis de origen nosocomial. Por tanto, este aumento de incidencia observado se ha acompañado de cambios en el patrón de la bacteriemia, en cuanto a microorganismos aislados, al origen de la infección, a si la adquisición es comunitaria o nosocomial, o a la resistencia a los antimicrobianos, entre otros [15].

Cuando un organismo patógeno invade el torrente circulatorio se producen una serie de manifestaciones clínicas que reflejan la gravedad de esta situación (sepsis, shock séptico, fallo multiorgánico) y que pueden conducir, con relativa frecuencia, a la muerte del paciente si no se instaura de forma precoz un tratamiento adecuado [16]. En estas situaciones, es indispensable, además del diagnóstico clínico, disponer de unos métodos de laboratorio que nos permitan detectar y aislar, lo más rápidamente posible, el microorganismo responsable del proceso infeccioso y estudiar su sensibilidad a los antibióticos. Esto redundará, en primer lugar, en un beneficio para el paciente, con la disminución de la morbilidad y mortalidad asociadas y secundariamente, en un considerable ahorro de los costes por proceso, tanto en reducción de los días de estancia hospitalaria como en gastos de farmacia.

1. El síndrome clínico de la sepsis

1.1. Evolución histórica y conceptual del término

La definición y las manifestaciones clínicas de la sepsis han supuesto un motivo de controversia a lo largo de los años. En gran parte, debido a la necesidad de poder llegar a una definición más precisa de sepsis, que la que surge de la aplicación de los criterios del Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS), criterios altamente inespecíficos y que pueden estar presentes en otros muchos procesos clínicos no infecciosos. De ahí, la importancia de obtener una definición consensuada, que permita realizar un diagnóstico certero y establecer un tratamiento adecuado lo más precoz posible. Esto evitará la evolución del paciente a fallo multiorgánico, de peor pronóstico y difícil tratamiento.

Se han utilizado muchas terminologías para definir la “Sepsis”, en 1914 Schottmüller estableció por primera vez una relación de causalidad entre la presencia de microorganismos viables circulantes en sangre que provienen de un foco de infección local y el desarrollo de manifestaciones clínicas sistémicas por afectación a otros órganos remotos[17].

Los estudios publicados en los años 80 mostraban cifras muy dispares sobre la mortalidad de los pacientes con sepsis, debido en parte a las diferentes definiciones que se empleaban en cada estudio y a la ausencia de datos epidemiológicos fiables. Durante muchos años, la frecuencia del uso indiscriminado de términos como la infección, la septicemia, bacteriemia, “síndrome de sepsis”, etc para referirse al concepto de sepsis llevó a cierta confusión. Para unificar criterios en relación a las definiciones, se reunió en 1992 una Conferencia de Consenso auspiciada por el *American College of Chest Physicians (ACCP)* y la *Society of Critical Care Medicine (SCCM)*, en la que se propusieron nuevas definiciones con el objetivo de facilitar el reconocimiento de los síntomas, el manejo de los pacientes y facilitar el estudio de la sepsis y los procesos relacionados[18].

En esta conferencia se introdujo el novedoso término del Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS), definido como las manifestaciones clínicas de la respuesta inflamatoria ocasionada por causas infecciosas y no infecciosas (por ejemplo quemaduras, daño por isquemia/reperfusión, trauma múltiple, pancreatitis, cirugía mayor e infección sistémica). Mientras que el SIRS es la respuesta del organismo a una variedad de estímulos, incluyendo el infeccioso, la sepsis es la respuesta del organismo a la infección. (Figura 1)

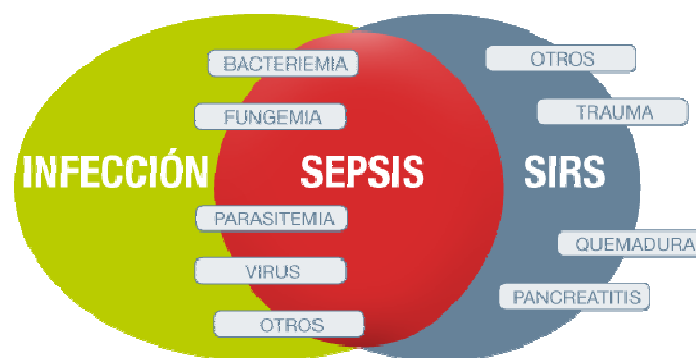


Fig. 1 Causas de SIRS. Adaptado de *Bone et al. Chest 1992; 101:1644-55*

Sin embargo, algunos investigadores criticaron la definición de SIRS del Consenso por su alta sensibilidad y baja especificidad no proporcionando una definición clara de Sepsis[19].

Ante la necesidad de ampliar y redefinir los conceptos establecidos en la conferencia de 1992, en el año 2001 se celebró una segunda conferencia de consenso en la que se modificaron los criterios diagnósticos de SIRS y se adicionaron variables que representaban mejor la respuesta clínica a la infección. No obstante, las conclusiones obtenidas no permitieron establecer un pronóstico preciso de la respuesta del huésped a la infección. Un concepto importante que se introdujo fue el de sepsis y sus secuelas (disfunción y fracaso multiorgánico) como un espectro continuo de gravedad, por lo que los distintos síndromes sépticos se consideran estadios de la sepsis. Así encontramos sepsis, sepsis grave y shock séptico, teniendo cada uno una morbilidad y mortalidad mayores que el anterior.

La definición consensuada de 1992 es la que ha estado vigente hasta ahora, siendo ampliamente utilizada para establecer un diagnóstico precoz. Según el estadio evolutivo del síndrome, se aplicarán diferentes pautas de tratamiento, todas encaminadas a disminuir la morbilidad y mortalidad de esta patología.

Bacteriemia

Es la presencia de bacterias viables en la sangre. La presencia de virus, hongos o parásitos recibe el nombre de viremia, fungemia y parasitemia respectivamente.

Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS)

Corresponde a una reacción inflamatoria generalizada que puede ser de causa infecciosa, pero que también puede darse en procesos inflamatorios como: pancreatitis, isquemia, grandes quemaduras, hemorragias, enfermedades autoinmunes o politraumatismos. El SIRS se manifiesta con dos o más de los siguientes signos:

- Temperatura corporal > de 38°C o < de 36°C
- Frecuencia cardíaca > 90 puls/min

- Frecuencia respiratoria >20 respiraciones por minuto o $\text{PaCO}_2 < 32\text{mmHg}$
- Leucocitos en sangre >12.000 cels/mm³ o <4.000 cels/mm³ o $>10\%$ formas inmaduras

Sepsis

Se define como el SIRS causado por una infección documentada o supuesta.

Sepsis grave

Se añade al cuadro de sepsis una alteración de la perfusión orgánica con uno o más de los siguientes signos:

- $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2 \leq 280$,
- aumento del nivel de lactato,
- oliguria durante al menos una hora
- alteración del estado mental.

Shock séptico

Definido como el cuadro de sepsis con hipotensión arterial a pesar de llevar asociada la restitución de líquidos, requiriendo el uso de drogas vasopresoras. Se asocia a alteraciones de la perfusión que pueden incluir, acidosis láctica, oliguria o una alteración del estado mental.

Shock refractario o síndrome de disfunción multiorgánica

Es el shock séptico de más de una hora de duración que no responde a la intervención terapéutica convencional de restitución de fluidos intravenosos ni al farmacológico. Se admite que el término de una hora es arbitrario.

1.2. Definición actual

Estos son los criterios clínicos que permitieron a los investigadores identificar a los pacientes que podían participar en los ensayos clínicos de sepsis y fueron adoptados rápidamente. Sin embargo, en la actualidad siguen siendo motivo de controversia. En primer lugar, estos criterios son tan sensibles que hasta el 90% de los pacientes ingresados en una unidad de cuidados intensivos los cumple y no necesariamente presentan una infección, ya que también pueden estar ocasionados por muchos procesos clínicos no infecciosos; y tampoco todos los pacientes con infección tienen sepsis. Casi cualquier infección, incluso una enfermedad vírica menor, se asocia con fiebre y otras alteraciones como la taquicardia, cierto grado de hiperventilación y leucocitosis. En segundo lugar, entre la respuesta del huésped a la infección inicial y la respuesta a la inflamación estéril de

los traumas graves, las quemaduras, la pancreatitis etc, no existen diferencias apreciables. En ambas, las defensas inmunitarias innatas y adaptativas actúan de forma combinada y por tanto, los signos clínicos por sí solos no logran distinguir la inflamación estéril de una inflamación originada por la infección. Por otro lado, Kaukonen *et al* [20] en un estudio reciente sugieren que el requisito de SIRS para la definición de sepsis excluye a un grupo considerable de pacientes con infección y disfunción multiorgánica.

En la actualidad, la comunidad científica considera que la sepsis debe ser definida como una respuesta sistémica a la infección no resuelta, que conduce a algún grado de disfunción de órganos. En general, el término sepsis es reservado a los pacientes con una infección lo suficientemente severa para requerir un ingreso en la unidad de cuidados intensivos o que exigen cuidados clínicos especiales [21].

Esta definición debe ser capaz de detectar una mayor proporción de pacientes con infecciones graves y valorar de forma individualizada el riesgo de muerte en cada caso. Esto debería permitir que la identificación de los pacientes con sepsis sea lo más clara y precoz posible. El objetivo final es el inicio rápido y adecuado del tratamiento antibiótico y de soporte, para prevenir la evolución a fracaso multiorgánico. Una vez el huésped ha eliminado el patógeno, el resultado clínico probablemente dependerá de la eficacia del control de las complicaciones de la infección residual o el SIRS.

La *Global Sepsis Alliance* (GSA) , fundada por la Federación Mundial de Sociedades de Medicina Intensiva y Cuidados Críticos (WFSICCM), la Federación Mundial de Intensivos Pediátricos y las Sociedades de Cuidados Críticos (WFPICCS), el Foro Internacional de Sepsis (ISF), y la Alianza Sepsis (SA) reunió a un Grupo de expertos en el “Merinoff Simposio 2010: Sepsis” con el fin de lograr unos objetivos específicos que incluyen: el compromiso de atender las necesidades de los pacientes con sepsis tanto pediátricos como adultos, ya sean de países desarrollados o de países en desarrollo; conseguir una definición de sepsis más consistente, con una mayor sensibilidad y especificidad, para la identificación rápida de la sepsis y evitar el shock, fallo multiorgánico y la muerte; y por otro lado, conseguir una población más homogénea de estudio, con la que poder investigar, con el propósito de erradicar la sepsis[22].

“La sepsis es una condición que amenaza la vida y aparece cuando la respuesta corporal a una infección daña a sus propios tejidos y órganos”

2. Patogenia

La sepsis es la consecuencia de una respuesta inmunológica frente a una infección. Varios factores determinan o favorecen la aparición de bacteriemia y sepsis. Por un lado, las características relacionadas con el patógeno, como el tamaño del inóculo bacteriano, los factores de virulencia o el tipo de microorganismo, y por otro las características del huésped. Factores como la edad, la genética, el ambiente, enfermedades de base y los tratamientos recibidos, condicionan un elevado riesgo de presentar infección y por tanto, el desarrollo de una disfunción orgánica. La progresión hacia los estadios más graves es el resultado de un desequilibrio entre los factores de virulencia del patógeno y los mecanismos de defensa del huésped[23].

2.1. Factores de patogenicidad

La invasión por parte del agente infeccioso de las barreras naturales, como la piel, las mucosas, el epitelio ciliado, el ácido gástrico y la bilis, constituye el requisito inicial en el desarrollo de una infección. La mayoría de los microorganismos que logran evadir estas barreras y producir infección, son destruidos en pocas horas por mecanismos de defensa no específicos de inducción rápida (inmunidad innata). Sin embargo, si un agente infeccioso es capaz de superar esas primeras líneas de defensa, se activará, en la mayoría de los casos, un tipo de respuesta de defensa (inmunidad adaptativa), altamente especializada y específica. En condiciones normales la respuesta inmune del huésped es correctamente controlada y funciona de forma efectiva para limitar los efectos de la infección produciendo una mínima lesión de los tejidos. Sin embargo, en algunos casos el no control de la respuesta inflamatoria puede originar una inflamación sistémica severa con el consecuente desarrollo de una sepsis grave, y shock séptico.

Históricamente se había minimizado el papel del patógeno frente a las características del huésped; sin embargo, actualmente hay evidencias que sugieren un papel mucho más importante del patógeno que lo que se había creído hasta ahora[24].

Los microorganismos disponen de mecanismos específicos (factores de virulencia) que le confieren la capacidad de superar las defensas del huésped y proliferar en los tejidos[25]. Entre estos mecanismos encontramos:

- a. Mecanismos de adherencia. Existencia de estructuras de naturaleza proteica o polisacárida que se encuentran fuera de la membrana externa y que promueven la colonización de las superficies epiteliales permitiendo su posterior invasión dentro de las células del huésped.

Son los **pili o fimbrias y las adhesinas** entre otros, que contribuyen al establecimiento y persistencia de una infección que inicialmente puede estar localizada, pero que posteriormente puede acompañarse de invasión bacteriana esporádica, intermitente o continua del torrente sanguíneo.

b. Mecanismos de evasión de las defensas del huésped.

- b.1. Las bacterias con cápsulas polisacáridas **resisten la fagocitosis**, por lo que son más virulentas que las cepas homólogas no capsuladas (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*, entre otras).
- b.2. Mecanismos de **inhibición del complemento o inactivación de sus productos**. La inhibición de la activación de la vía alterna del complemento retrasa la respuesta inflamatoria del huésped. Las cápsulas de muchas bacterias grampositivas y gramnegativas contienen ácido siálico, que inhibe la activación del complemento por vía alternativa; la proteína M de *Streptococcus pyogenes* impide la activación de la vía alterna del complemento.

c. Factores de virulencia

Existen una gran variedad de toxinas que causan un daño al huésped, tanto por los efectos de la toxina en sí como por la respuesta autoinmune que provocan. La **endotoxina o Lipopolisacárido (LPS)** es el principal componente estructural de la membrana externa de los bacilos gramnegativos. El lípido A es la porción tóxica de la molécula, siendo un importante inductor de la respuesta inflamatoria, contribuyendo así en la etiopatogenia de la sepsis. Las **exotoxinas** son proteínas de alto peso molecular, elaboradas por ciertas bacterias y que se excretan al medio donde se desarrolla la bacteria. Las que dañan una gran variedad de tipos celulares se llaman citotoxinas, otras se designan en función del órgano afectado, como por ejemplo, neurotoxina, hepatotoxina... También pueden denominarse dependiendo de las especies que las producen, como la toxina colérica producida por *Vibrio cholerae* o la toxina tetánica, producida por *Clostridium tetani*. Son también importantes la exotoxinas pirógenas A y B producidas por *S.pyogenes*, o las exotoxinas TSST-1 del *Staphylococcus aureus* causantes del síndrome del shock tóxico.

2.2. Mecanismos de defensa del huésped

El huésped posee múltiples mecanismos eficaces contra la invasión de los microorganismos. Estos mecanismos de defensa pueden ser clasificados en **innatos o inespecíficos y específicos**. Los primeros comprenden la integridad de la barrera cutáneo mucosa, el contenido de ácidos grasos de la piel, el pH ácido del estómago y ciertas enzimas presentes en las lágrimas, la saliva y otros fluidos corporales. La flora autóctona de cualquier territorio del organismo humano también es un factor que modula la relación huésped-patógeno y que contribuye en la defensa del huésped. Otra barrera, más elaborada, es la respuesta inmune innata que induce la activación del complemento, la fagocitosis y la activación de la respuesta inflamatoria. Por último, hemos de considerar la respuesta inmune adaptativa que es un mecanismo de defensa específico y también

inducible, que comprende la inmunidad humoral y las inmunoglobulinas, y la inmunidad celular representada por los linfocitos activados en forma específica y sus productos.

2.3. Fisiopatología de la sepsis

La fisiopatología de la sepsis es un proceso complejo que involucra diversos elementos del sistema inmune que se autopotencian y actúan en las diferentes etapas de la evolución natural de la enfermedad. Esta respuesta considerada benigna y adecuada en tanto el proceso inflamatorio sea correctamente regulado, tiene componentes pro-inflamatorios y anti-inflamatorios de tal forma que regulan la respuesta del huésped a la infección. El equilibrio entre ambas respuestas es vital para la subsiguiente resolución del proceso inflamatorio y por tanto del éxito de la respuesta del huésped ante la sepsis. Sin embargo, la respuesta inflamatoria descontrolada puede originar una inflamación sistémica severa, conduciendo a un rápido deterioro y en ocasiones, a la muerte del paciente[26].

Básicamente, la secuencia de fenómenos que conducen a la sepsis se pone en marcha cuando los microorganismos o sus componentes muy conservados, denominados patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*), son reconocidos por los receptores de las células del sistema inmune innato, como los monocitos/macrófagos y las células endoteliales. Estas células tienen una gran variedad de receptores llamados receptores de reconocimiento de patrones o PRR (*pattern-recognition receptors*), entre los que destacan los tipo *Toll* o TLR (*Toll-like receptors*), que presentan una localización celular específica y son capaces de reconocer determinados PAMPs. La interacción entre ambos produce la activación de la respuesta inflamatoria, la producción de citoquinas y otros mediadores[27]. En el caso de las bacterias gramnegativas, la endotoxina presente en el lipopolisacárido (LPS) es el componente mayoritario de la pared celular y el desencadenante de la activación de la respuesta inflamatoria. La sepsis debida a grampositivos puede desencadenarse por la producción de exotoxinas que actúan como superantígenos (TSST-1 en *Staphylococcus aureus* ó exotoxinas pirógenas A y B en *Streptococcus pyogenes*), o también a partir de componentes de la membrana celular.

Los PRR también pueden reconocer moléculas endógenas liberadas durante el proceso inflamatorio (por ejemplo por quemaduras, trauma, y necrosis de los tejidos), advirtiendo así al sistema inmune del huésped de un peligro inminente. Estas moléculas son llamadas alarmitas o DAMPs (*danger associated molecular patterns*) [1].

El resultado final, como se ha comentado anteriormente, es la activación del sistema inmune. En la fase temprana de la infección se produce una respuesta pro-inflamatoria con el objetivo de erradicar los patógenos. Casi simultáneamente tiene lugar una respuesta anti-inflamatoria, con el

fin de regular la respuesta inmune, reduciendo la inflamación y evitando así el daño tisular [28]. (Figura 2)

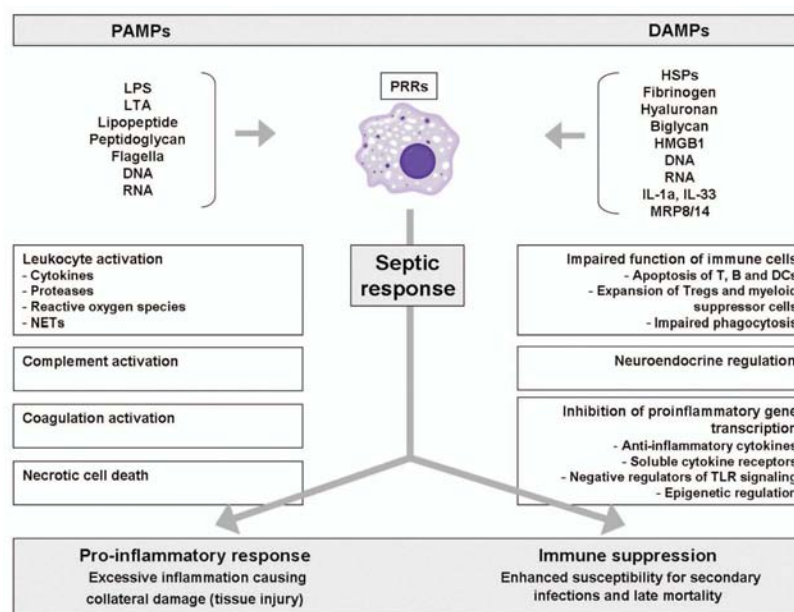


Fig.2. Fuente: *Willem Joost Wiersinga et al. Host innate immune responses to sepsis. Virulence 5:1, 36–44; 2014*

Citocinas pro-inflamatorias, tales como TNF- α , IL-1 producen la activación de las células endoteliales y son capaces de activar las células diana e inducir la producción de más mediadores inflamatorios[26]. Otra citoquina de reconocida importancia es la IL-6, que tiene tanto una propiedad pro-inflamatoria como anti-inflamatoria. En esta etapa se presentan los signos clínicos y de laboratorio que ponen de manifiesto la activación de la cascada inflamatoria (SIRS). Puede presentarse fiebre, aumento de reactantes de fase aguda, tales como la proteína C reactiva (PCR) y el fibrinógeno, entre otros.

Esta respuesta de fase aguda es estrictamente controlada por la liberación simultánea de **citocinas antiinflamatorias** como la IL-10, el antagonista del receptor IL-1, e inactivadores del complemento, cuya función es frenar el exceso de inflamación regulando la respuesta inmune y restaurando la homeostasis para evitar el fallo multiorgánico.

La magnitud de las dos respuestas dependerá de múltiples factores, incluyendo la virulencia y la carga del patógeno, del sitio de la infección, de la genética y las comorbilidades del huésped, así como del tiempo transcurrido desde la infección inicial.

El proceso natural de la sepsis, inicialmente, se caracteriza por un estado de inflamación que se desarrolla en respuesta a un patógeno, con un aumento controlado de los mediadores pro-inflamatorios, seguido de una respuesta antiinflamatoria adecuada y no sostenida en el tiempo con el fin de restaurar la homeostasis del sistema inmune. (Figura 3B)

En ocasiones, como por ejemplo, en un paciente sano con una sepsis meningocócica, puede producirse una fase pro-inflamatoria descontrolada para intentar erradicar el patógeno, pero, a la

vez, dando lugar a un gran daño de los tejidos y consecuentemente una disfunción multiorgánica. (Figura 3A). En ocasiones, cuando la sepsis se hace persistente, y en un intento de regular la fase de inflamación, se puede producir una fase anti-inflamatoria pronunciada, dando lugar a un estado de inmunoparálisis, caracterizado por la incapacidad para eliminar la infección, predisposición para desarrollar infecciones nosocomiales e incluso con un mayor riesgo de muerte[29]. (Figura 3C)

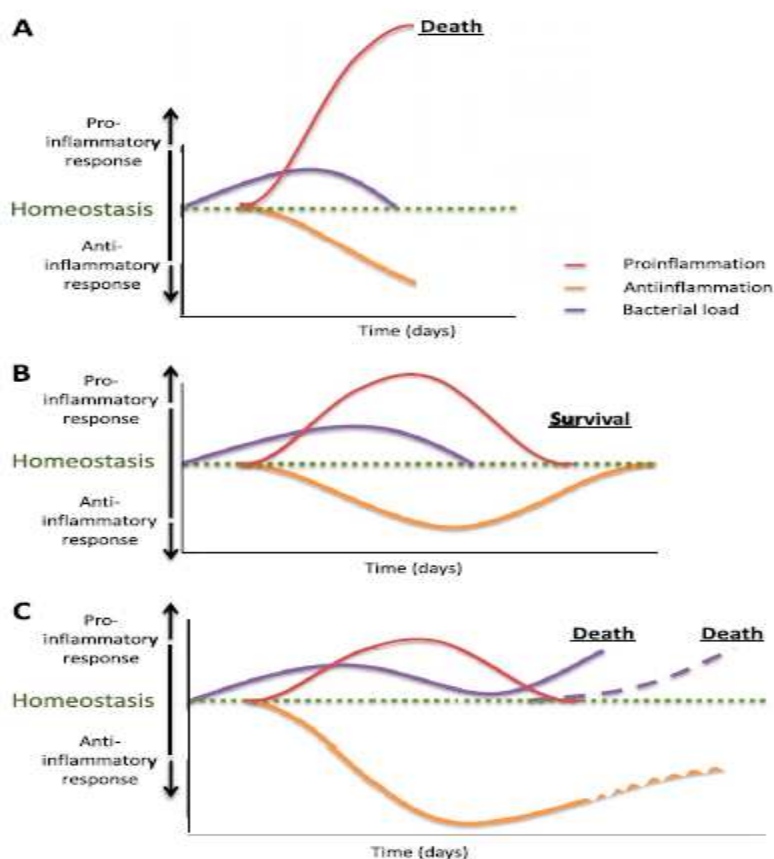


Fig.3. Representación de las diferentes respuestas inmunológicas en los pacientes con sepsis. Fuente: Leentjens *et al.* Immunotherapy for the Adjunctive Treatment of Sepsis: From Immunosuppression to Immunostimulation Time for a Paradigm Change

A pesar de todos estos avances en el conocimiento de la fisiopatología, aún se desconoce en parte, la manera en la que cada uno de estos elementos contribuye al desarrollo de la sepsis; además, es indispensable caracterizar los biomarcadores que permitan identificar claramente que individuos se encuentran en fase proinflamatoria y cuáles presentan características de inmunosupresión inducida por la sepsis. Cuando esto suceda, y tal como comentan muchos autores, la inmunomodulación se podría utilizar en un futuro como una herramienta terapéutica dirigida a mejorar o inhibir la respuesta inmune del paciente, con la finalidad de disminuir tanto la mortalidad como la comorbilidad en los pacientes con sepsis.

3. Etiología

3.1. Evolución de los microorganismos causantes de sepsis

La incidencia de bacteriemia por microorganismos grampositivos y gramnegativos ha ido variando a lo largo de los años. Hasta la década de 1980, los bacilos gramnegativos fueron los microorganismos predominantes causantes de sepsis; de hecho se pensaba que la sepsis era producida por una respuesta a una endotoxina que era relativamente específica de los bacilos gramnegativos[14]. Sin embargo, en los últimos 25 años se ha producido un cambio, y la incidencia de sepsis por cocos grampositivos ha ido aumentando de manera constante superando claramente a otros agentes etiológicos. Así, en un amplio estudio realizado en EEUU en el año 2000, los cocos grampositivos representaron el 52,1% de los casos de sepsis, los bacilos gramnegativos el 37,6%, 4,7% fueron infecciones polimicrobianas, 1% causados por anaerobios y 4,6% producidas por hongos[7] (Figura 4).

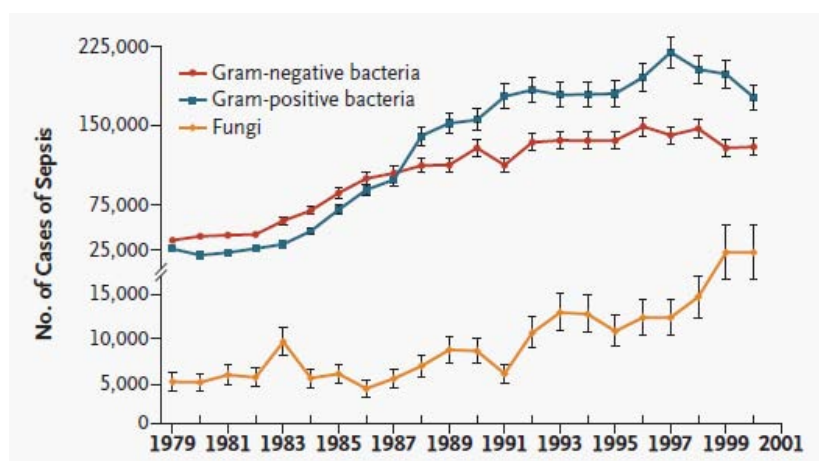


Fig. 4. N° de casos de Sepsis en EEUU en función del organismo acusante, 1979-2000

Fuente: Martín GS et al. *The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000*. N. Engl. J. Med. 2003

Datos muy similares son los publicados por M. Rodríguez-Créixems *et al.*, [30] en un estudio realizado en España entre 1985 y 2006, donde, además, se argumenta que el resurgir de los cocos grampositivos, es una consecuencia de una masiva instrumentalización de los pacientes (catéteres intravasculares y otros dispositivos), de un aumento de la utilización de procedimientos invasivos y de la utilización de antibióticos de amplio espectro, entre otros. De todos modos, en este mismo trabajo, se muestra un aumento progresivo de la incidencia de bacteriemia por bacilos gramnegativos, sobre todo por *E.coli*. Una de las posibles razones podría deberse a la aparición, a partir de 1995, de un aumento de los aislamientos de *E.coli* productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) hasta llegar a un incremento considerable durante los años 2003-2006. Este hecho queda reflejado en la Figura 5 donde se observa una tendencia al equilibrio entre las bacteriemias producidas por grampositivos y gramnegativos.

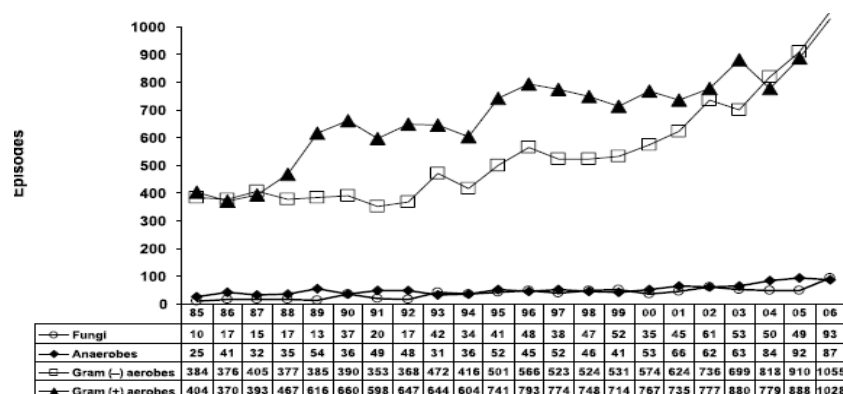


Fig.5. Evolución de la etiología de las bacteriemias (1985-2006). Fuente: M. Rodríguez-Crèixems *et al.* Medicine. 2008

Otros trabajos recientes también constatan este aumento progresivo de los bacilos gramnegativos en la etiología de las bacteriemias. En un estudio internacional, en el 62 % de los pacientes con sepsis grave y cultivo positivo se aislaron bacilos gramnegativos, mientras que los grampositivos representaron un 47% y los hongos el 19% [31]. Según datos presentados por Rodríguez-Baño *et al.* [32] las bacteriemias por *E.coli* BLEE hasta el 2001 representaban <1%, y progresivamente han ido aumentando hasta llegar a una proporción preocupante del 9% en el 2006.

Si nos referimos a poblaciones de estudio más específicas, la utilización de profilaxis con quinolonas, la detección cada vez más frecuente de bacteriemia por enterobacterias productoras de BLEE y el consecuente aumento en la administración de antibióticos de amplio espectro, serían algunos de los factores implicados en este nuevo cambio en la etiología. También es de especial preocupación el aumento de incidencia de la sepsis producida por hongos, ya que estos pacientes presentan una mayor tasa de mortalidad con respecto a los pacientes con sepsis producida por otros microorganismos [7, 33].

Resultados similares son los obtenidos de los datos del Servicio de Microbiología del Hospital Germans Trias i Pujol. En la revisión de la etiología de las bacteriemias durante el periodo del 1983 al 1997, ya se observó una tendencia al equilibrio entre las bacteriemias por grampositivos y gramnegativos, en los resultados presentados en la tesis doctoral de la Dra. Montserrat Gimenez [34]. Posteriormente, en el período comprendido entre 2001-2014 ya se observa un claro aumento de las bacteriemias por gramnegativos (Figura 6).

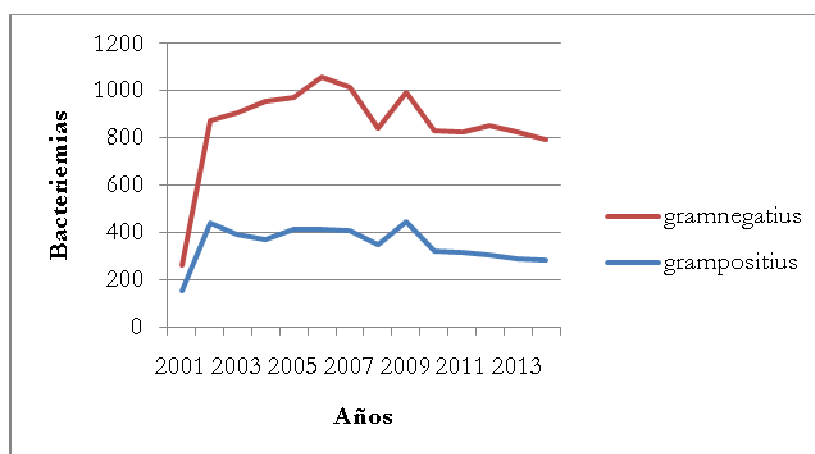


Fig.6: Evolución de la etiología de las bacteriemias en H.U.G.TiP (2001-2014)

En nuestro hospital, este aumento podría estar en relación a un brote de *K.pneumoniae* BLEE declarado en el 2005 que posteriormente habría dejado una situación de endemia y a la drástica disminución del porcentaje de bacteriemias de origen en el catéter a partir del año 2010, lo que ha llevado a un descenso de los aislamientos de estafilococos coagulasa negativa. Esta reducción de las bacteriemias por catéter se ha producido a raíz de la implementación de una estrategia de prevención i control de la infección nosocomial en todo el hospital.

Los cocos grampositivos involucrados más frecuentemente en este síndrome son *Staphylococcus aureus*, los estafilococos coagulasa negativa, *Enterococcus* spp y *Streptococcus pneumoniae*. Entre los gramnegativos, encontramos *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, las enterobacterias (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, etc.) y *Pseudomonas* spp. Tal como comentábamos anteriormente, los anaerobios y los hongos, principalmente *Candida* spp, pueden ser también causa de shock séptico, y mucho más raro, también las micobacterias y los virus.

De todos modos, los microorganismos causantes de bacteriemia variaran en función de la población de estudio, es decir, del lugar de adquisición, de las enfermedades subyacentes del paciente, del foco de origen, de la exposición previa a los antibióticos y la epidemiología local. Son todos estos factores los que pueden modificar el pronóstico de la infección.

3.2. Microorganismos según lugar de adquisición y foco de origen

Se recomienda clasificar la bacteriemia según el lugar de adquisición. Así encontramos: bacteriemia adquirida en la comunidad, bacteriemia relacionada con la asistencia sanitaria y bacteriemia adquirida en el hospital o nosocomial. Es muy importante la diferenciación entre ellas, entre otras cosas, para poder realizar un correcto tratamiento empírico, considerando que

los agentes etiológicos van a ser diferentes y, por tanto, también su espectro de sensibilidad antibiótica [35, 39].

3.2.1 Bacteriemia adquirida en la comunidad

La bacteriemia comunitaria es aquella donde la infección ocurre en un paciente antes del ingreso en el hospital o cuando el episodio ocurre dentro de las primeras 48 h de ingreso y no está relacionada con ningún procedimiento realizado después del ingreso. En cuanto a la etiología, existe un predominio claro de las bacterias gramnegativas sobre las grampositivas. Los microorganismos más comúnmente aislados son *E.coli*, seguido de *S.pneumoniae* y *S.aureus*. Esta etiología, está en relación con los principales focos de las bacteriemias de estos pacientes, como son la infección del tracto urinario, seguida de la neumonía y de la infección intraabdominal.

En los últimos años se ha observado un aumento significativo de la bacteriemia comunitaria por *E.coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), lo que supone un reto a la hora de instaurar un tratamiento antibiótico empírico correcto [40, 41].

3.2.2 Bacteriemia adquirida en el hospital

Se trata de aquel episodio de bacteriemia que ocurre en un paciente que lleva ingresado más de 48 horas en el hospital. Las bacterias grampositivas son las predominantes, siendo las más comunes estafilococos coagulasa negativa, *S.aureus* y *Enterococcus spp.* En general, el origen más frecuente de la bacteriemia nosocomial es el catéter vascular, seguido de la infección del tracto urinario, la neumonía y la infección intraabdominal. Sin embargo, en la mayoría de ocasiones el origen dependerá del tipo de hospital y del cumplimiento de las medidas de control de infección. Así, a partir de los datos del Servicio de Microbiología recogidos de manera prospectiva en cada caso de bacteriemia, el foco de origen de la bacteriemia nosocomial ha variado en los últimos años. En el año 2009 el origen más frecuente de la bacteriemia nosocomial fue el catéter vascular seguido del foco abdominal. Sin embargo, en los últimos años el número de bacteriemias por catéter ha ido disminuyendo, siendo, en el 2014, la segunda causa por detrás de la bacteriemia de foco abdominal (Figura 7). Este hecho, pone en evidencia la importancia de la implantación y seguimiento de las estrategias de prevención y control de infección, basadas en la aplicación de un conjunto de medidas o “bundles”, que se aplican fundamentalmente en las técnicas de colocación y durante el mantenimiento y manipulación de los catéteres intravasculares.

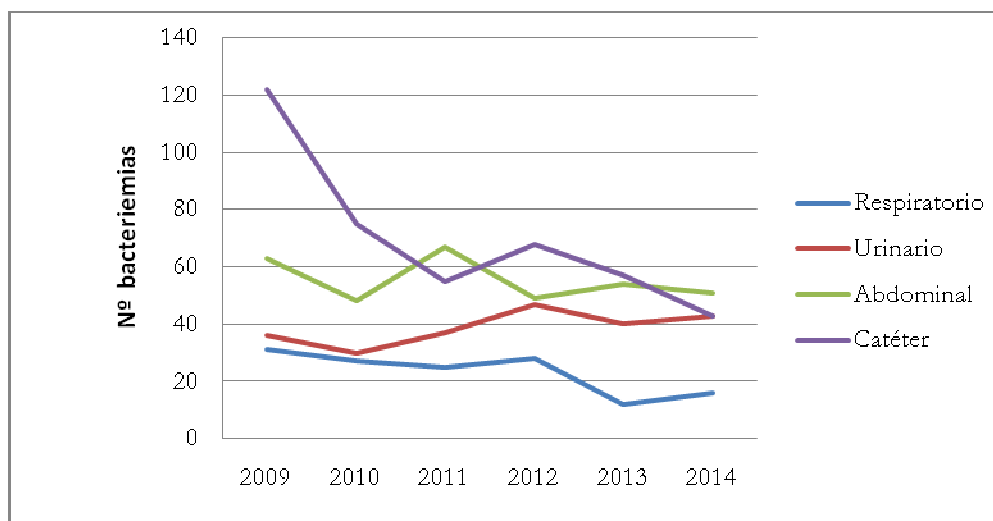


Fig.7. Foco de origen de la bacteriemia nosocomial en HUGTiP (2009-2014)

En el medio hospitalario es frecuente encontrar un mayor porcentaje de resistencia en los diferentes microorganismos aislados, por lo que es importante conocer la epidemiología y el patrón de sensibilidad local para poder seleccionar de manera adecuada el tratamiento antibiótico empírico. (Figura 8)

Adquisición de la bacteriemia	Incidencia*	Etiología (%)				Microorganismos principales	Polimicrobiana (%)	Origen** (%)	Mortalidad (%)
		Gram+	Gram-	Hongos	Anaerobios				
Comunitaria	6-10	31	68	0	1	<i>E. coli</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>S. aureus</i>	5-6	Urinario (46-53) Respiratorio (12-27) Desconocido (9)	11-16
Asociada a cuidados sanitarios	-	32	64	0,3	3	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>K. pneumoniae</i>	7-8	Urinario (17-43) Catéter vascular (12-42) Desconocido (12)	20-34
Nosocomial	6	65	25	9,5	0-2	ECN <i>S. aureus</i> Enterococos	13-53	Catéter vascular (26-52) Urinario (18-33) Desconocido (16)	27-37

*Expresada en n° episodios por 1.000 ingresos.

**Origen de la bacteriemia por orden de frecuencia. Finalmente porcentaje de bacteriemias de origen desconocido.

ECN: estafilococos coagulasa negativa.

Fig.8. Principales características de las bacteriemias agrupadas según el lugar de adquisición.

Fuente: *Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia*. José Miguel Cisneros et al- *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007 [42-44]

3.2.3 Bacteriemia relacionada con la asistencia sanitaria

Incluye aquellas bacteriemias detectadas en el momento del ingreso o en las primeras 48 horas, en un paciente que cumple alguno de los siguientes requisitos: paciente atendido en la unidad de hospitalización a domicilio

(terapia intravenosa, cura de las heridas, etc) en los 30 días previos al episodio, que acude al hospital para hemodiálisis o quimioterapia en los 30 días previos, que ha estado ingresado en un hospital de agudos durante más de 2 días en los 90 días previos al episodio, que vive en una residencia o centro sociosanitario, que ha sido sometido a manipulación de la vía urinaria o es portador de sonda urinaria permanente.

Etiológicamente predominan los bacilos gramnegativos, siendo los microorganismos principalmente aislados: *E.coli*, *S.aureus* y *K.pneumoniae*. A pesar de producirse en pacientes que residen en la comunidad, al tener un contacto periódico con algún tipo de asistencia sanitaria, presentan características similares a las infecciones intrahospitalarias, aspecto que hay que considerar en el momento de iniciar un tratamiento empírico.

4. Diagnóstico microbiológico

4.1. Obtención de la muestra de sangre

La detección y la identificación de los microorganismos causantes de la sepsis es, sin duda, una de las funciones más importantes del laboratorio de microbiología clínica. Actualmente, la técnica de referencia para su diagnóstico sigue siendo el hemocultivo, seguido de la realización de métodos microbiológicos convencionales de identificación y el estudio de la sensibilidad antibiótica [45].

El hemocultivo como prueba de diagnóstico está influenciada por muchos factores, incluyendo el momento de la extracción de la muestra, el método de obtención, la preparación de la piel, el número de hemocultivos, y el más importante, la cantidad de sangre obtenida.

En cuanto a la extracción, debe realizarse lo antes posible después de la aparición de los síntomas (fiebre, escalofríos...) y siempre que sea posible, antes de la administración de los antibióticos, ya que éstos, disminuyen la sensibilidad del hemocultivo[46].

La extracción de la muestra no debe realizarse a través de catéteres intravenosos por el riesgo de contaminación, salvo en los casos de sospecha de bacteriemia asociada a catéter. Del mismo modo, para evitar contaminaciones y facilitar la interpretación de los resultados, debe realizarse una antisepsia meticulosa de la piel antes de la realización de los hemocultivos. El número de extracciones considerado óptimo para la detección de un episodio de bacteriemia es de 2 a 3, utilizando siempre lugares diferentes en la punción. Con esto, no sólo se aumenta la sensibilidad del hemocultivo sino que también permite diferenciar una bacteriemia verdadera de una contaminación. De todos modos, la variable más crítica en el aumento de positividad de los hemocultivos es el volumen de sangre cultivado. Dado que la mayoría de las bacteriemias son de baja magnitud (< 1 a 10 ufc/ml), a mayor volumen de muestra obtenido, mayor es la sensibilidad del hemocultivo. Se recomienda un volumen por toma en adultos de 20-30ml, y en el caso de niños dependiendo de la edad, en mayores de 2 años 4-5 ml, de 2 a 3 ml para menores de 2 años y 1-2 ml para recién nacidos[47-49]. Una vez extraídos, los frascos de hemocultivos deben enviarse cuanto antes al laboratorio.

4.2. Métodos para el cultivo de la sangre

Más del 95% de los potenciales patógenos responsables de bacteriemia se aíslan durante la primera semana, la mayoría entre las 18-72 horas, por lo que se considera que el tiempo de incubación adecuado es de 5 días. Se ha descrito en la literatura que la incubación durante un periodo más prolongado aumenta las contaminaciones [50, 51].

A lo largo de la historia se ha producido un gran avance en la metodología utilizada para el cultivo de sangre. Así, los métodos para hemocultivos se pueden clasificar en manuales, semiautomatizados o automatizados.

4.2.1 Métodos manuales

4.2.1.1 *Convencionales*

- a) Método de Schottmüller: la técnica incorporaba la sangre del paciente a un recipiente con agar fundido. El contenido se vertía en placas de Petri, solidificándose y observándose las colonias en la masa del medio. Esta técnica fue universalmente substituida, en la segunda mitad de los años setenta, por los cultivos en frascos con medios líquidos bifásicos.
- b) Medios líquidos: Es un método técnicamente muy simple basado en la observación macroscópica de los signos de crecimiento en una pareja de frascos con medio de cultivo líquido a los que se les ha inoculado sangre del paciente. Debido al escaso número de microorganismos presentes en la sangre de los pacientes con bacteriemia o fungemia, los medios de cultivo deben contener los nutrientes necesarios para favorecer su multiplicación y posterior aislamiento en un tiempo mínimo.

Un medio de cultivo se considerará ideal si contiene los nutrientes y las condiciones fisicoquímicas adecuadas para el crecimiento del mayor número posible de microorganismos. Todos los medios de cultivo, sean líquidos o bifásicos, deben contener una base que permita el crecimiento de los microorganismos aerobios y anaerobios facultativos (caldo Trypticase de soja o caldo cerebro-corazón) y para el cultivo de microorganismos anaerobios (caldo Columbia o caldo Schaedler). Los frascos de hemocultivo llevan incorporado un anticoagulante, la mayoría SPS (polianetol sulfonato de sodio) a una concentración del 0,006 al 0,50 %, que inhibe la actividad bactericida del suero humano y de algunos antibióticos como los aminoglucósidos. Sin embargo, al mismo tiempo, puede dificultar el crecimiento de algunos microorganismos como *Neisseria* spp. La mayoría llevan también incorporadas resinas para neutralizar los antimicrobianos cuando el paciente está recibiendo tratamiento antibiótico previo.

El medio de cultivo se embotella al vacío con una atmósfera determinada. Los frascos aerobios deben contener una mezcla de oxígeno y CO₂, el primero evita la necesidad de ventilar los frascos

de hemocultivo antes de su incubación y el segundo favorece el crecimiento de *Brucella* spp, *Neisseria* spp, *Haemophilus* spp, *Streptococcus* spp y *Campylobacter* spp. Los frascos anaerobios contienen un 10% de CO₂ y un 90% de nitrógeno. Una vez inoculada la muestra de sangre en los frascos de hemocultivo, éstos se incuban a 35-37°C durante 5-7 días.

Los frascos se observan diariamente para detectar signos visibles de crecimiento bacteriano tales como hemólisis, enturbiamiento, producción de gas, formación de colonias bacterianas, etc.

El problema de la detección macroscópica, además del retraso diagnóstico, estriba en la presencia de falsos positivos y falsos negativos. Hay causas ajenas al crecimiento bacteriano que pueden enturbiar el medio o hemolizar los hematíes y, por el contrario, hay microorganismos que pueden crecer sin producir ningún signo macroscópico de crecimiento. Ello hace necesario que realicemos un subcultivo sistemático o resiembra de todos los hemocultivos, muestren o no evidencia macroscópica de crecimiento bacteriano. Estos subcultivos o pases a “ciegas” son de especial utilidad en la recuperación de cepas de *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., algunos estreptococos, *Bacteroides* spp., *Pseudomonas* spp. y levaduras. Se recomienda la práctica de una resiembra ciega precoz al cabo de 24 horas de incubación y otra tardía a los 5-7 días.

Este procedimiento supone un trabajo laborioso y un retraso en el aislamiento del agente causal de la bacteriemia.

4.2.1.2 Medios Bifásicos

Castañeda, en los años 40, introdujo un frasco con medio bifásico compuesto de una fase sólida y otra líquida, de manera que permite detectar el crecimiento de los microorganismos al formar colonias visibles en el medio sólido, sin necesidad de abrir la botella. Este medio supuso un significativo avance en el rendimiento de los aislamientos de *Brucella* spp.

Posteriormente se han introducido variaciones de este sistema como el Septi-Check® (Roche, Becton- Dickinson), en los cuales es necesario abrir la botella para inocular la sangre y colocar un cilindro roscado que contiene distintas superficies con diferentes tipos de agar. Una vez fijado se invierte el frasco para hacer que la sangre y el caldo bañen el agar y realizar así un subcultivo.

Con este procedimiento la detección de bacterias y hongos es tan buena o mejor que con el método convencional y más rápido. Por el contrario tiene el inconveniente de no permitir un adecuado aislamiento de anaerobios al tener que abrir la botella para colocar el citado cilindro. Necesita, por tanto, ser complementado con un frasco con atmósfera anaerobia.

4.2.1.3 Lisis-centrifugación

Con el método de lisis-centrifugación o lisis-filtración (Isolator ®) la sangre se recoge en un tubo que contiene un reactivo de lisis (saponina), un anticoagulante (SPS) y agua destilada. La sangre se lisa y se centrifuga (o filtra), se desecha el sobrenadante y se siembra el sedimento en distintos

medios de cultivo. Esta técnica se ha demostrado más sensible que la de los hemocultivos en medio líquido para el aislamiento de micobacterias y hongos, y permite realizar hemocultivos cuantitativos que son útiles para el diagnóstico de la bacteriemia relacionada con catéter venoso central (CVC). Sus mayores inconvenientes derivan de la laboriosidad de su manipulación, con el consecuente riesgo para el personal, y de la alta incidencia de contaminaciones que genera. El sistema es caro y todo ello no ha facilitado su introducción regular en los laboratorios, utilizándose en ocasiones como método complementario por las ventajas citadas anteriormente.

4.2.2 Sistemas automáticos

Desde finales de los años 80, aunque el concepto sigue siendo el mismo, el procesamiento de los hemocultivos sufrió modificaciones muy importantes. Se desarrollaron diferentes sistemas automáticos que han permitido incrementar el número de bacteriemias verdaderas diagnosticadas, ya que disminuyen la posibilidad de contaminación del hemocultivo, además de acortar los tiempos de detección del crecimiento bacteriano a partir de muestras de sangre. Por otro lado, estos sistemas han mejorado todos los aspectos relacionados con la bioseguridad del personal del laboratorio, disminuyendo el riesgo de pinchazos accidentales como consecuencia de las manipulaciones que implican las resiembras a ciegas, además de agilizar el trabajo diario.

Estos sistemas se basan en la detección del CO₂ producido por el crecimiento bacteriano por diferentes métodos, radiométricos, espectrofotométricos, fluorométricos y/o colorimétricos.

4.2.2.1 *Radiométrico y no radiométrico*

El Bactec 460 ® radiométrico fue el primer sistema comercial de hemocultivos semiautomático que utilizaba un sustrato marcado con carbono radioactivo (C14). Los microorganismos presentes en la muestra de sangre metabolizaban este sustrato liberando CO₂ marcado que era detectado por el sistema. Su principal ventaja fue la mayor rapidez en la detección de los hemocultivos positivos respecto a los métodos tradicionales; sin embargo, el inconveniente más importante era el manejo y posterior eliminación de los residuos radiactivos, por lo que en la actualidad ha sido superado por otros sistemas.

Los sistemas Bactec NR-660® y NR-730® no radiométricos, muy parecidos al anterior, detectan el CO₂ por espectrofotometría de infrarrojos obviando los inconvenientes de los radioisótopos.

4.2.2.2 *Sistemas automáticos de monitorización continúa*

Los sistemas anteriores han sido desplazados por los sistemas de monitorización continua, que eliminan toda manipulación, realizan agitación continua de los frascos, monitorización continua con notificación inmediata de los resultados positivos y utilizan técnicas no invasoras para la lectura. Se basan en la detección de la producción de CO₂ por los microorganismos y entre ellos

difieren en el método de detección de éste, en la capacidad de los frascos, en el tipo de medio de cultivo utilizado, en la frecuencia de lectura y en la capacidad máxima de los incubadores. La mayoría de los sistemas disponibles han demostrado una buena eficacia en la detección de la bacteriemia [52].

Así, el sistema Bactec (Becton-Dickinson) realiza lecturas cada 10' y la detección de la producción de CO₂ la realiza mediante una técnica fluorométrica; el sistema BacT/Alert (bioMérieux) también realiza lecturas cada 10' y para la detección del CO₂ producido utiliza un sensor colorimétrico. El sistema Vital ®, que actualmente ya no se encuentra en el mercado, difiere de los anteriores en que incorpora un indicador fluorescente en el medio de cultivo. Esta fluorescencia se lee cada 15'. Y por último, el ESP® es un sistema que monitoriza el frasco cada 12' y el crecimiento se mide por un método manométrico que detecta el consumo y/o la producción de gas [53].

Como se ha comentado anteriormente, todos los medios de cultivo comerciales contienen una serie de sustancias para mejorar la recuperación de los microorganismos, entre ellas, una serie de aditivos dirigidos principalmente a la inactivación de los antibióticos. En nuestro país, los más utilizados son los medios con resinas del sistema Bactec (Becton-Dickinson) y los medios con carbón activado del sistema BacT/Alert (bioMérieux). En estudios comparativos ambos medios ofrecen resultados similares, aunque uno de los inconvenientes del carbón activado radica en la dificultad de la interpretación de las tinciones de Gram de los frascos positivos [54] y la interferencia a la hora de realizar técnicas de identificación y estudio de sensibilidad directas de hemocultivo positivo.

La sustitución de las técnicas convencionales de hemocultivo por los sistemas automáticos de lectura continua, supuso una gran mejora en la detección del hemocultivo positivo, con un aumento de la velocidad de detección, una disminución del tiempo de respuesta y un aumento de la sensibilidad de los hemocultivos. De manera que, han permitido mejorar el diagnóstico microbiológico de la sepsis y como consecuencia hacer un uso más racional de la terapia antimicrobiana [55, 56].

4.3. Procesamiento de los hemocultivos positivos por métodos convencionales

4.3.1 Método estándar

Actualmente, con los sistemas automáticos de monitorización continua, el tiempo de positividad de los hemocultivos suele ser de 12 a 36 horas de media, excepto para algunas bacterias de crecimiento lento, anaerobios y hongos [57].

De manera convencional, una vez detectado el hemocultivo positivo se realiza una tinción de Gram, y subcultivos en distintos medios sólidos que se incubarán mínimo durante 18-24h a 35-37°C. La tinción de Gram es una técnica sencilla y rápida que puede orientar el diagnóstico microbiológico de forma muy precoz, además de orientar en el inicio o adecuación, si fuese necesario, del tratamiento antibiótico, hasta que los resultados de identificación y antibiograma estén disponibles[58].

A partir del aislamiento del microorganismo en cultivos sólidos, se procede a la identificación y al estudio de la sensibilidad antibiótica por los diferentes métodos existentes en el mercado, por lo general en las siguientes 24-48 horas.

En general los esquemas tradicionales de identificación fenotípica se basan en las características microscópicas (tinciones, examen en fresco), características macroscópicas (morfología de la colonia y crecimiento en los medios de cultivo) y por último en las pruebas bioquímicas que permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación.

Dentro de las pruebas bioquímicas, las hay que son rápidas, de lectura inmediata como la catalasa y la oxidasa, cuyo objetivo es diferenciar entre grandes familias de bacterias para poder ir más dirigidos en la elección de las siguientes pruebas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo, con una incubación previa de 18 a 48 horas. Estas pruebas manuales pueden ser largas y complejas, ya que algunas bacterias requieren varias pruebas para su identificación.

En el mercado existen baterías comerciales de pruebas agrupadas para cada tipo de microorganismo, que pueden ser manuales o automatizadas, y cuyas ventajas son la rapidez en la manipulación, la homogeneidad de los resultados y la disposición de bases de datos para la identificación automática.

Entre los sistemas manuales disponibles en el mercado: API (bioMérieux), RapID Systems y MicroID (Remel), Enterotube (Becton-Dickinson, etc. De los sistemas comerciales automáticos como: Vitek-2[®] (bioMérieux), MicroScan WalkAway (Beckman), BD Phoenix (Becton-Dickinson), Wilder (Soria Melguizo), son los más utilizados. La mayoría de estos paneles permite, además de la identificación, la realización simultánea del antibiograma del microorganismo objeto de estudio.

Todos los sistemas automáticos actuales son parecidos, con diferencias en la forma de preparar los paneles, unos son más laboriosos que otros, con diferencias en la incubación y en el tiempo de obtención de los resultados. La lectura de los paneles se suele realizar de forma automática, incorporándose los datos obtenidos en un ordenador, el cual proporciona un índice alto de fiabilidad en la identificación; en cuanto al estudio de sensibilidad, la lectura de los valores de la

concentración mínima inhibitoria (CMI) y la interpretación de los resultados se realizan de forma automática, utilizando un sistema experto que aplica al resultado final una serie de reglas programadas siguiendo las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* y/o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)* permitiendo además la detección rápida de resistencias.

Por tanto, al final existe un retraso significativo de 72-96 horas desde la toma del hemocultivo hasta la información del resultado final. Debido a la importancia que supone para el pronóstico del paciente con sepsis, la información precoz del resultado del hemocultivo, en los últimos años ha habido un gran interés en buscar métodos que permitan reducir los tiempos de emisión de los resultados. Así, la combinación de sistemas de monitorización continua de hemocultivos con un sistema de identificación y antibiograma rápido directamente del hemocultivo positivo, permite obtener resultados en tiempos inferiores a las 24 horas desde la toma de los hemocultivos para microorganismos de crecimiento rápido [59, 60].

4.3.2 Métodos de identificación directos de hemocultivo según microorganismo.

El tiempo de información de los resultados se podría reducir con la utilización de pruebas diagnósticas rápidas, realizadas directamente del frasco del hemocultivo positivo.

4.3.2.1 *Identificación directa de cocos grampositivos*

En el caso de los estafilococos, dada la importancia clínica de establecer un tratamiento correcto y de evitar el uso inadecuado de antibióticos, resulta fundamental diferenciar en el menor tiempo posible, si los cocos grampositivos en racimos que visualizamos en la tinción de Gram realizada del hemocultivo positivo, corresponden a un Estafilococo coagulasa negativa (ECN) o un *Staphylococcus aureus*. Algunas de las técnicas que se han aplicado son:

- Evaluación de la morfología de los cocos grampositivos observados en la **Tinción de Gram**. Según el trabajo realizado por Murdoch *et al*, [61-64] sugieren que *S.aureus* se puede identificar con un alto grado de precisión, directamente del frasco de hemocultivo positivo. Utilizaron una serie de criterios basados en las diferencias en las características morfológicas de la observación directa de la tinción de Gram, llegando a una sensibilidad global del 89% y una especificidad del 98%.
- **Prueba de la coagulasa en tubo (PCT)**

La PCT es una técnica sensible, rentable y rápida que permite, por su alto valor predictivo positivo, asegurar casi con certeza a las 4 horas que los cocos grampositivos en racimos observados en el hemocultivo, corresponden a *S. aureus*. Múltiples estudios han evaluado el uso de esta prueba para la detección de *S.aureus* directamente de hemocultivo positivo

obteniendo una especificidad cercana al 100% y diferentes porcentajes de sensibilidad que se encuentran entre el 65% y el 87%, según las series [65, 66]. En el trabajo realizado por Speers y colaboradores [67] se obtuvo una sensibilidad del 92%, correspondiendo al valor más alto encontrado en los estudios revisados.

- **Aglutinación de látex**

Para neumococos y estreptococos existen pruebas de aglutinación de látex para su diferenciación a nivel de especie, que realizadas directamente de hemocultivo positivo tienen un elevado valor predictivo positivo [68]. Las diferentes especies de estreptococos, a pesar de que presentan una morfología muy similar en la tinción de Gram, producen patologías diferentes y tienen un patrón de sensibilidad a los antibióticos distinto. Debido a ello, disponer de métodos rápidos y fiables de identificación directamente del hemocultivo positivo, es fundamental para poder orientar el tratamiento empírico.

- **Aglutinación de látex para la detección de antígeno de *Streptococcus pneumoniae*.**

En general, los diferentes trabajos realizados, presentan una sensibilidad del 80 % y una especificidad del 98%, por lo que, esta técnica se puede utilizar de manera rápida y fiable directamente de hemocultivo positivo [69, 70]. Sería de gran ayuda, sobre todo, en los casos en que el hemocultivo positivo presenta una hemólisis visible y en la tinción de Gram no se observen microorganismos, o bien, ante la observación de estreptococos alterados morfológicamente [71]. Esta información preliminar contribuye de manera importante al diagnóstico rápido de infección neumocócica bacteriémica y a la optimización del tratamiento.

- **Aglutinación látex para la detección de antígeno de estreptococos de los grupos de**

Lancefield A, B, C, D y G. En el trabajo realizado por Wetkowski *et al* [72], en el 86 % de los casos se obtuvo una identificación correcta. En otro trabajo realizado por Fontanals *et al*, [73] en el caso de *Streptococcus agalactiae* la sensibilidad y especificidad obtenida directamente de hemocultivo positivo, fue del 100% y 99,4% respectivamente, mientras que en el caso de los enterococos se obtuvo una baja sensibilidad, probablemente debido a que sólo el 80% de los enterococos tienen el antígeno D en su cápsula. Ambas técnicas de látex pueden proporcionar una identificación preliminar 18-24 horas antes que la visualización del cultivo en agar.

4.3.2.2 Identificación directa de bacilos gramnegativos

Como ya se ha expuesto en apartados anteriores los **sistemas comerciales automáticos** como: Vitek-2[®] (bioMérieux), MicroScan WalkAway[®] (Beckman), BD Phoenix[®] (Becton-Dickinson), utilizados para la identificación a partir de subcultivo, tienen un alto grado de fiabilidad. Estos

mismos sistemas pueden utilizarse para la identificación directa a partir de hemocultivo positivo, aplicando diferentes protocolos de centrifugación para conseguir una suspensión óptima. De esta manera, se puede disponer de la identificación de forma más rápida, sin necesidad de esperar el desarrollo del subcultivo. Desde los trabajos que son objetivo de esta tesis, diferentes autores presentan resultados comparables, utilizando estas técnicas, a los obtenidos con los métodos convencionales, con concordancias de superiores al 90% [74-76].

La inoculación directa en paneles de identificación automáticos, ha permitido reducir en casi 24 horas el tiempo necesario para la obtención de resultados de identificación, lo que supone un cambio importante en el manejo de los pacientes con sepsis.

4.3.3 Métodos de identificación y estudio de sensibilidad directos

Según los métodos de referencia, tanto para la identificación como para el estudio de la sensibilidad antibiótica, es necesario el subcultivo en agar, que puede tardar hasta 24 horas. Una alternativa al subcultivo, son las técnicas de inoculación directa a partir de hemocultivo positivo. Consiguen reducir en un día, el tiempo necesario para la obtención de los resultados tanto de identificación como de antibiograma, siendo esto fundamental para la rápida optimización de la terapia antimicrobiana.

Distintos estudios han evaluado el rendimiento de estos métodos directos. Las comparaciones entre los resultados son difíciles, ya que en la literatura se han utilizado diferentes sistemas de hemocultivo como BACTEC® (Becton Dickinson), BacT/ALERT® (bioMerieux), junto con diferentes sistemas de identificación (Vitek-2®, MicroScan WalkAway®, BD Phoenix®...), sin existir estudios comparativos entre los diferentes métodos. También se han evaluado varios protocolos para la obtención del inóculo necesario. Algunos autores, realizan diferentes centrifugaciones para eliminar los eritrocitos, otros utilizan tubos separadores de suero y otros utilizan detergentes como la saponina, para mejorar la recuperación de microorganismos[77, 78].

4.3.3.1 *Para bacilos gramnegativos*

Según los criterios propuestos por Jorgensen *et al* [79], un método para estudio de la sensibilidad antibiótica, será aceptado si la concordancia con el método de referencia es >89,9%, la tasa de errores graves es $\leq 3\%$ y la tasa de errores muy graves $\leq 1,5\%$.

En este sentido, la mayoría de los estudios realizados en bacilos gramnegativos, tanto de identificación como de estudio de sensibilidad antibiótica, han mostrado una buena correlación, comparados con los métodos convencionales. Algunos de los trabajos que han utilizado el sistema Bactec 9240® (Becton Dickinson), que contiene resinas que no interfieren con los

métodos rápidos, y el sistema Vitek-2 compact (bioMérieux) para la identificación y estudio de sensibilidad antibiótica directa, son:

Bruins et al [80-83], en el que analizaron 311 bacilos gramnegativos entre los cuales había 33 *Pseudomonas aeruginosa*. La identificación fue correcta en el 93% comparado con el método de referencia. La concordancia en el antibiograma a nivel de categoría fue del 99%, obteniendo solamente un 0,1% de errores muy graves. La obtención del inóculo bacteriano a partir del hemocultivo positivo, se obtuvo utilizando un tubo de suero separador para la realización de la centrifugación.

Cueto et al [84, 85], utilizó un protocolo parecido al anterior, con tubo de suero separador, obtuvo resultados no tan favorables. Analizaron 50 bacilos gramnegativos enterobacterias, obteniendo solamente un 62% de identificaciones correctas, y una baja correlación en el estudio de sensibilidad con un 6% de errores totales, de los cuales un 24% correspondieron a errores muy graves.

Dos estudios anteriores al nuestro, también han sido realizados con el sistema Vitek-2 compact (bioMérieux), a partir de hemocultivos positivos incubados en el sistema BacT/ALERT® 3D (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France):

Ling et al [86,74] analizaron 281 bacilos gramnegativos de los que 85 fueron bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNNF). La obtención del inóculo bacteriano fue a partir de la utilización de tubo de suero separador. En un 822% la identificación fue correcta, aunque inferior a la encontrada en los trabajos anteriores. La concordancia en la sensibilidad antibiótica fue sin embargo similar a otros trabajos, del 97%.

Blanco et al [38, 87, 88] utilizando también el sistema Vitek-2 compact (bioMérieux) con frascos FAN del sistema BacT/ALERT® 3D (bioMérieux) obtuvieron resultados muy similares. Analizaron 97 hemocultivos con bacilos gramnegativos de los que 26 eran BGNNF. Utilizaron tubo de suero separador para la obtención del inóculo bacteriano, obteniendo una concordancia en la identificación del 86% para enterobacterias y un 923% para bacilos gramnegativos no fermentadores. La concordancia global en la categoría clínica fue del 927%.

Los dos últimos trabajos no obtuvieron tan buenos resultados como los anteriores, sobre todo en la identificación, debido a que los frascos FAN del sistema BacT/ALERT® 3D (bioMérieux) contienen partículas de charcoal, como quelante de los antibióticos, lo que supone una dificultad añadida para la técnica directa del hemocultivo positivo.

4.3.3.2 Para cocos grampositivos

Lamentablemente, el procesamiento de los cocos grampositivos (tanto estafilococos como enterococos), ha presentado mayores dificultades que en el caso de los bacilos gramnegativos, normalmente relacionadas con la obtención de un bajo inóculo bacteriano. Sin embargo, la aplicación de técnicas de centrifugación y/o adición de detergentes como la saponina, Tween 20 o Triton-X-100, mejora la obtención de un inóculo adecuado.

Inoculación directa a partir de hemocultivos positivos del sistema Bactec 9240® (Becton Dickinson):

En los primeros trabajos que realizaron técnicas de inoculación directa utilizando estos sistemas, el porcentaje de identificación no llegaba al 65% y el total de errores encontrados era inaceptable [85, 74].

Diederer et al [89-95] analizó 68 muestras, entre las que había 37 *Staphylococcus aureus*. Antes de la inoculación utilizó varias centrifugaciones en tubo de suero separador obteniendo una concordancia en la sensibilidad antibiótica de un 99'6% y con sólo un 0'1% de errores muy graves. Pero no consiguió obtener resultados fiables en el caso de la identificación.

Lupetti et al, [42, 77, 96, 97] con la adición de saponina antes de la inoculación en los paneles del sistema Vitek-2(bioMerieux), obtuvo un porcentaje de identificaciones correcta del 89% de las 55 muestras analizadas. Obteniendo una concordancia en el antibiograma del 97'7% con sólo un 1% de errores muy graves. Aunque el número de muestras analizadas fue escaso y además sólo incluían 4 *Staphylococcus aureus* y 3 *Enterococcus* spp. En un trabajo posterior, [98-101] aplicando el mismo procedimiento pero incluyendo también bacilos gramnegativos, obtuvo resultados similares al primer trabajo, un 87% de identificaciones correctas y una concordancia global de sensibilidad del 95%, pero igualmente un número bajo de *Staphylococcus aureus* (13) y de *Enterococcus* spp (9).

Beuving et al, [78] utilizando tubo con suero separador para la obtención de un mejor inóculo bacteriano, obtuvieron una concordancia en cuanto a sensibilidad mayor del 90%, con el sistema Phoenix® (Becton-Dickinson, Sparks, MD), pero descartó realizar la identificación directa del hemocultivo debido a los malos resultados obtenidos en ensayos preliminares.

Gherardi et al, [102] comparó los sistemas Vitek-2 (bioMerieux) y Phoenix (BD), obteniendo identificaciones aceptables con el sistema Vitek-2®, concretamente un 75%, y sólo un 43,7% con el sistema Phoenix. Con ambos sistemas la concordancia en la sensibilidad fue similar, 96,2 % y 99,5% respectivamente.

Inoculación directa a partir de hemocultivos positivos del sistema BacT/ALERT[®] frascos FAN (bioMérieux):

Barreales *et al* [35, 103, 104] añadiendo al protocolo de trabajo una incubación con saponina, utilizó el sistema Vitek-2 (bioMérieux) para la identificación y antibiograma directa de hemocultivo positivo. El número de muestras analizadas es muy escaso, sólo 49, de las que además sólo se incluyen 13 *Staphylococcus aureus* y 5 *Enterococcus* spp. Se obtuvo una concordancia en la identificación del 82% y en la determinación de la sensibilidad antibiótica, la tasa de concordancia fue del 97% con sólo 0.5% de errores muy graves.

4.3.3.3 *Ventajas e Inconvenientes del método directo*

Ventajas:

1. Acelera el tiempo necesario para la disponibilidad de los resultados de sensibilidad. El tiempo medio es de 6h y 9h, en bacilos gramnegativos y cocos grampositivos, respectivamente. Una excepción es la utilización de MicroScan WalkAway, pues requiere 18-24 h de incubación. Por otro lado, el hecho de disponer de los resultados de forma rápida, implica que un microbiólogo debe estar presente las 24 horas, para informar de los resultados obtenidos al clínico, y de esta manera aportar un beneficio real al tratamiento del paciente.
2. Su utilización, no implica cambios en el flujo de trabajo habitual. No existen costes adicionales.
3. Es capaz de detectar los mecanismos de resistencia más habituales (BLEE, SARM). De esta forma, la adecuación del tratamiento antibiótico y la aplicación de las políticas de aislamiento de contacto se pueden realizar antes que con los métodos convencionales.

Inconvenientes:

1. La existencia de los cultivos mixtos, es decir la pureza del inóculo directo, es una fuente de error sabida, ya que esto no lo podemos ratificar hasta tener el crecimiento del subcultivo al día siguiente. La tinción de Gram, permite en estos casos, determinar que los hemocultivos pueden ser polimicrobianos y no ser procesados por el método rápido. Sin embargo, según algunas publicaciones, hay un 6-10% de los hemocultivos que aparecen como monomicrobianos en la tinción de Gram, observándose a las 24 horas, en los medios de cultivo convencionales, que se trata de una infección polimicrobiana [105, 60]. Aún y así, según nuestra experiencia, (datos no publicados) los resultados del antibiograma podrían ser igualmente utilizados de forma preliminar para ajustar el tratamiento. Sobre todo en el caso de que el antibiótico que se está utilizando sea resistente.

2. Conseguir un adecuado inóculo estandarizado según escala Mc Farland, es a veces complicado. En ocasiones el inóculo obtenido es muy bajo, a veces, debido a los restos de sangre o incluso del propio medio de cultivo. Es precisamente este punto, el que puede explicar los bajos porcentajes de concordancia y mayor porcentaje de errores, publicados por algunos autores, cuando se realiza el método directo[85].
3. Algunos microorganismos, como *S. pneumoniae*, estreptococos del grupo *viridans*, estreptococos del grupo A y B de Lancefield y bacterias de crecimiento lento, necesitan medios con requerimientos específicos para el crecimiento, por lo que no es posible la realización del antibiograma directo con los paneles disponibles hoy en día.

4.4. Procesamiento de los hemocultivos positivos por métodos moleculares

La identificación rápida y precisa del agente etiológico es crucial para poder iniciar la terapia con antibióticos óptimos contra el patógeno, y así disminuir las tasas de mortalidad. Los métodos convencionales, citados hasta ahora, son considerados como el “gold standard” para la detección e identificación de los patógenos causantes de las infecciones del torrente sanguíneo, y al mismo tiempo para la determinación del patrón de sensibilidad antibiótica.

Como ya hemos comentado, cuando se detecta un hemocultivo positivo, se realiza la tinción de Gram, se subcultiva en medios sólidos, y posteriormente, con pruebas bioquímicas, manuales o semiautomáticas, se realiza la identificación del microorganismo/s implicado/s. Por último, se realiza el estudio de la sensibilidad antibiótica completa, lo que permitirá el inicio de la terapia con antibióticos dirigidos hacia los patógenos causantes. Este flujo de trabajo convencional, es extremadamente lento y puede tardar un mínimo de 24-72 horas. Además, microorganismos exigentes y de crecimiento lento, así como, la administración previa antibióticos, pueden conducir a resultados falsos negativos. Desde hace algunos años, se están desarrollando diferentes métodos cuya finalidad es mejorar y cubrir las limitaciones del diagnóstico convencional con el hemocultivo [106, 107].

Trabajar con técnicas moleculares a partir de hemocultivo positivo ofrece una serie de ventajas como son trabajar con un inóculo elevado de microorganismo y que los resultados pueden estar disponibles en pocas horas a partir del hemocultivo positivo, lo que reduce el tiempo de respuesta con respecto a los métodos convencionales. Sin embargo, también comparten algunas de las limitaciones de los métodos convencionales como son el retraso de las 15-17 horas hasta que el hemocultivo sea positivo, la baja sensibilidad para la detección de microorganismos que no crecen en medios habituales o cuando el paciente ha recibido antibiótico previo.

Tal como se resume en la Figura 9 de las técnicas que disponemos actualmente, algunas basan su identificación en la detección de proteínas por espectrometría de masas, MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight*), y otras en la detección del material genético, ya sea por fluorescencia de hibridación in situ (FISH) o por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

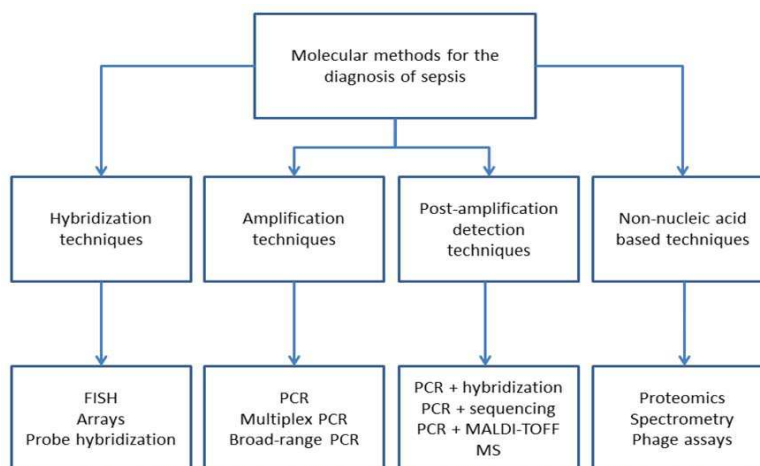


Fig.9. Técnicas para el diagnóstico de sepsis.
Fuente: modificado de Venkatesh et al. [108-110]

4.4.1 Detección de proteínas

4.4.1.1 *Espectrometría de masas*

La espectrometría de masas por MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight*) es una tecnología que ofrece una alternativa rápida y fiable, para la identificación de gran variedad de bacterias y levaduras, basándose en su perfil proteico[111-113]. Cada microorganismo contiene un perfil único de proteínas (huella digital) que permite la identificación de los microorganismos a nivel de especie [114].

La principal ventaja de la utilización del MALDI-TOF, es que los resultados pueden estar disponibles en cuestión de minutos y en la mayoría de los casos no se necesita preparación de la muestra.

Una limitación de la técnica es que, para encontrar un perfil proteico fiable, necesita al menos 10^5 - 10^7 ufc/mL. Por lo que siempre será necesario un pre-cultivo de la muestra para obtener resultados óptimos, ya sea a partir de cultivo sólido o del pellet de un cultivo líquido, como puede ser un hemocultivo. Otra limitación, es la dificultad en la identificación de las infecciones mixtas y de los estreptococos del grupo *viridans*. En el primer caso, será fundamental la observación de la tinción de Gram, que puede orientar sobre la presencia de más de un tipo de microorganismo. Para la mejora de la identificación de los estreptococos del grupo *viridans*, se recomienda la utilización de una solución de alcohol-ác.fórmico, para la extracción previa de proteínas [115, 116].

En los últimos años, se han publicado muchos trabajos sobre la utilización de MALDI-TOF para la identificación directa desde hemocultivo positivo. En la mayoría se recomienda realizar una extracción previa, que permitirá eliminar sustancias, ya sean del medio de cultivo o de la propia sangre, y que pueden interferir en el proceso de análisis. En este sentido, son varios los protocolos descritos, algunos basados en diferentes centrifugaciones, otros en aplicación de varios lavados, etc. Todos ellos con excelentes resultados de concordancia comparados con el método de referencia, pero precisando un tiempo y coste adicional para el laboratorio [117-121]. Recientes publicaciones, revelan la identificación rápida y fiable a partir de hemocultivos positivos, sin tiempos adicionales ni aumentos de los costes, utilizando solamente un corto periodo de incubación en un medio sólido durante una media de 4 horas. Este método proporciona resultados correctos en >80% de los episodios de bacteriemia. Permite la identificación casi en el mismo momento de la detección de la positividad del hemocultivo, lo que es esencial para la rápida optimización del tratamiento antibiótico [122, 123].

Actualmente aún no es posible utilizar MALDI-TOF para el estudio de la sensibilidad antibiótica, aunque se han llevado a cabo los primeros pasos en este sentido, con la detección de algunos mecanismos de resistencia, pero sin poder proporcionar un perfil de sensibilidad completo [124-126].

4.4.2 Detección de material genético sin amplificación previa de ácidos nucleicos

4.4.2.1 *Hibridación fluorescente in situ (FISH)*

Se encuentra entre las técnicas comerciales más estudiadas para la detección de patógenos directamente de hemocultivo positivo. En sólo, 2,5-3 horas, puede identificar >95% de las bacterias y levaduras que se encuentran comúnmente en la sangre [127-129]. Para ello se utilizan sondas de nucleótidos marcadas con fluorescencia que hibridan con secuencias específicas, generalmente 16 rRNA, específicas del microorganismo a identificar. La observación de fluorescencia en el microscopio indica la presencia del microorganismo. Una versión mejorada de esta técnica utiliza sondas llamadas *peptide nucleic acid* (PNA), que ofrecen la ventaja de tener una carga neutra y permitir hibridaciones más robustas. Así, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, bacilos gramnegativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) y *Candida albicans*, pueden ser identificados en menos de 3 horas usando el Kit comercial AdvanDX (Woburn, MA, USA), con una sensibilidad y especificidad de > 95% [130, 131].

En nuestra publicación sobre la detección de *Staphylococcus aureus* directamente de hemocultivo positivo, los resultados obtenidos mostraron una sensibilidad y una especificidad del 100% y 99,4% respectivamente [132].

Aunque es una técnica prometedora, la colección de sondas es limitada, por lo que la identificación de especies específicas para todos los patógenos causantes de bacteriemia, no es factible hasta la fecha. Por otro lado, esta técnica no permite la detección de genes de resistencia.

4.4.3 Detección de material genético con amplificación previa de ácidos nucleicos

4.4.3.1 *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica*

La utilidad clínica de este tipo de PCR es limitada, ya que un elevado número de microorganismos pueden estar implicados en la etiología de la sepsis. Sería particularmente útil cuando en el diagnóstico diferencial, son pocos los patógenos implicados, como podría ser el caso de una sospecha de infección fúngica o por micobacterias [133]. La identificación rápida también es importante para patógenos invasivos, asociados a una alta morbilidad y mortalidad, como es *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Los resultados de la identificación y antibiograma convencionales tardarían unas 24-48 horas, pero mediante estas técnicas el tiempo podría reducirse a 2 horas mediante la detección simultánea de *Staphylococcus aureus* y del gen *mecA* [134, 135].

Actualmente, existen algunas plataformas, como por ejemplo GeneXpert (Cepheid, Sunyvale, CA, EEUU) o GenomEra (Abacus Diagnostica, Turku, Finlandia) totalmente automatizadas, donde la muestra se añade a un cartucho que contiene todos los reactivos necesarios, tanto para la extracción y la amplificación como para la detección de los ácidos nucleicos. Se trata de técnicas rápidas, con una sensibilidad y especificidad superiores al 95% [136, 137].

4.4.3.2 *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple*

Las tecnologías de PCR multiplex permiten identificar, de forma simultánea, la mayor parte de los microorganismos implicados en la sepsis. Uno de los primeros ensayos comercializados fue el Prove-it Sepsis® (Mobidiag, Helsinki, Finlandia). Es una PCR con plataforma basada en microarray diseñada para detectar 73 microorganismos, entre bacterias y hongos, y el gen *mecA*, a partir de hemocultivos positivos, aunque no detectan otros genes de resistencia. Los resultados pueden estar disponibles en 3,5 horas y varios estudios avalan una sensibilidad y especificidad superior al 95% [138, 139]. Recientemente, se ha comercializado un nuevo ensayo, el FilmArray Blood Culture Identification® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Es una PCR en tiempo real, donde la extracción de DNA, la amplificación y la detección se realizan en el mismo cartucho, reduciendo significativamente los riesgos de contaminación. Es una técnica fácil, rápida (resultados en 1 hora), y con una alta sensibilidad y especificidad, 83-88% y superior al 98%, respectivamente [140].

En general, las tecnologías descritas permiten que los resultados de la identificación de los patógenos, estén disponibles en cuestión de pocas horas desde que el hemocultivo es detectado positivo por los sistemas automáticos. En los pacientes con sepsis y bacteriemia documentada, esta disminución en el tiempo necesario para el diagnóstico microbiológico, se traduce en un aumento de la supervivencia, pues la administración del antibiótico adecuado en el menor tiempo posible es esencial para una evolución favorable del paciente.

5. Perspectivas de futuro

5.1. Métodos moleculares para identificación y estudio de sensibilidad de sangre directa

En las últimas décadas se han realizado avances significativos, tanto en los sistemas de cultivo de sangre como en los métodos de identificación y antibiograma. Uno de ellos ha sido la aplicación de técnicas moleculares directamente del hemocultivo, tal como acabamos de comentar. Siendo una de sus mayores ventajas, con respecto a los métodos convencionales, la posibilidad de obtener resultados en pocas horas a partir del hemocultivo positivo. Sin embargo, a pesar de estos avances tecnológicos, existe aún una gran desventaja, y es, que el tiempo que tarda el hemocultivo en positivizarse, es aún demasiado largo para permitir a los médicos tomar decisiones en cuanto a tratamientos inmediatos.

El desarrollo más prometedor hasta la fecha, es la detección de microorganismos en sangre directa. Precisamente una de las principales ventajas de trabajar con métodos moleculares directamente de la sangre, es la eliminación de la etapa previa del cultivo. Esto supone una reducción sustancial en el tiempo del informe del resultado, comparado tanto con métodos convencionales, como con la identificación por métodos moleculares a partir de hemocultivo positivo. Estas nuevas técnicas, además, pueden superar otras limitaciones asociadas a los métodos convencionales, como son, la disminución de la sensibilidad en los microorganismos exigentes o de crecimiento lento, y en los pacientes tratados con antibióticos previamente.

Uno de los pasos cruciales para el diagnóstico molecular de la sepsis directamente de sangre, es precisamente, la obtención de un DNA microbiano puro para aumentar la sensibilidad[106]. Se debe tener en cuenta, que la sangre total es una muestra que contiene diversos componentes que pueden inhibir la PCR (por ejemplo, la hemoglobina). También la presencia de DNA contaminante en los reactivos comerciales y en el ambiente, y el riesgo de contaminación por arrastre entre las muestras, son otros de los problemas a tener presentes[141, 142]. Otro factor que puede interferir en la amplificación del DNA microbiano, es la interferencia de una elevada concentración del DNA humano, con la consecuente extracción de una menor cantidad de DNA microbiano[143]. En la interpretación clínica de los resultados, también se debe tener en cuenta

que la PCR es una técnica que detecta todo el DNA bacteriano presente en la sangre, incluyendo no sólo el de las bacterias vivas, sino también el de bacterias muertas e incluso DNA de microorganismos fagocitados[144].

Así, las técnicas moleculares realizadas directamente de sangre, permiten, en primer lugar, disminuir notablemente el tiempo de respuesta al eliminar la etapa de cultivo previo. Y en segundo lugar, y como ya se ha comentado anteriormente, proporcionan un aumento de la sensibilidad en comparación con el cultivo de sangre convencional, ya que permiten identificar microorganismos exigentes o de crecimiento lento, e incluso detectar microorganismos aunque el paciente haya recibido antibiótico previamente. Muchas veces, esto último, supone también una de sus principales limitaciones, ya que, debido a la elevada sensibilidad, estas técnicas pueden detectar contaminantes, ya sea del ambiente, de los reactivos o incluso de la manipulación de la muestra.

Por tanto, la interpretación clínica de estos métodos es todavía muy complicada. Antes de poder dar un resultado definitivo, debe tenerse en cuenta, por un lado, todas las consideraciones comentadas anteriormente, y por otro, la clínica del paciente. De ahí la importancia de la valoración conjunta de los resultados entre el microbiólogo y el clínico.

En el diagnóstico de la sepsis, algunos de los ensayos comercializados hasta el momento para la identificación rápida del microorganismo a partir de sangre directa son:

5.1.1 SepsiTest® (Molzym, Alemania)

Es un ensayo de PCR en tiempo real, en el que se amplifican los genes ribosomales 16S y 18S, seguido de la secuenciación del producto amplificado para la identificación del microorganismo. Utilizando 2 mL de sangre, es capaz de detectar más de 300 bacterias y hongos en un tiempo de 8-12 horas. Según el estudio realizado por Wellinghausen *et al.* [145] la sensibilidad y especificidad diagnóstica de este ensayo, fueron del 87% y 85,8% respectivamente, obteniéndose una concordancia del 86% con respecto al hemocultivo. En otro estudio más reciente, Grif y colaboradores [146] han confirmado la sensibilidad y especificidad diagnósticas (88% y 83%) de esta técnica. Por el contrario, se han publicado otros estudios, realizados con un menor número de muestras, con porcentajes de sensibilidad en torno al 40% [147, 148].

5.1.2 Magicplex Sepsis Real-time Test® (Seegene, Corea)

En este ensayo, durante una primera etapa de cribado por una PCR convencional, se detectan hasta 91 microorganismos (73 grampositivos, 12 gramnegativos y 6 hongos), así como tres marcadores de resistencia (a la metilicina *mecA* y a la vancomicina *vanA* y *vanB*). Después de este paso inicial, se realizan dos PCR a tiempo real para la detección de los microorganismos

presentes en sangre total y su identificación a nivel de género y especie. Se utiliza 1 mL de sangre y el tiempo hasta la obtención de los resultados es de aproximadamente unas 6 horas. Hasta el momento, se han publicado pocos estudios sobre los resultados analíticos y/o clínicos, obteniéndose en ellos una baja sensibilidad [149].

5.1.3 VYOO® (SIRLS-Lab, Alemania)

Se basa en una PCR multiplex que detecta simultáneamente 34 especies bacterias y 6 especies de hongos, así como 5 de los marcadores de resistencia más comunes (a la meticilin [150, 151] *vanA* y *vanB*, y a β -lactámicos *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M}). Después de la amplificación, los productos obtenidos se visualizan mediante una electroforesis en gel convencional. El tiempo hasta el resultado es de unas 8 horas. Este ensayo utiliza 5 mL de sangre, y permite la eliminación selectiva de DNA humano, enriqueciendo así la muestra clínica con el DNA microbiano mediante una columna de cromatografía de afinidad. En un reciente estudio realizado por Fitting *et al.* [151] la concordancia en la identificación entre el hemocultivo y el ensayo VYOO fue del 46,2%, concluyendo en la necesidad de mejorar del procedimiento según los autores.

5.1.4 SeptiFast Test® (Roche molecular, Alemania)

Es un ensayo de PCR multiplex a tiempo real diseñado para detectar 25 microorganismos, incluyendo 5 especies de *Candida* spp y *Aspergillus fumigatus*. Posteriormente, la identificación se realiza mediante sondas fluorescentes, utilizando el instrumento LightCycler 2 [152]. El volumen de sangre utilizado es 3 mL o 1,5 mL dependiendo si la extracción de DNA es manual o automatizada, y el tiempo total hasta la obtención del resultado es inferior a 6 horas. Existen más de 60 publicaciones sobre SeptiFast, ya que es una técnica que ha sido ampliamente evaluada en diferentes poblaciones de pacientes, como son pacientes con endocarditis infecciosa, pacientes inmunodeprimidos y recién nacidos, variando el rendimiento de la técnica en función del grupo de pacientes analizado [153, 154]. En general, los diferentes estudios muestran una tasa de positividad para SeptiFast® que oscila entre 25-35%, significativamente mayor que para el cultivo convencional, que se encuentra entre el 13-21% [155]. En el estudio realizado por von Lilienfeld *et al.*, [156] en pacientes con neutropenia febril, se obtuvieron resultados muy similares, con una tasa de positividad del 33% frente a un 20,4% del cultivo convencional. En el meta-análisis realizado por P. Dark *et al.*, [157, 158] la sensibilidad y especificidad total del SeptiFast en comparación con el hemocultivo, fue del 68% y 86% respectivamente.

5.1.5 IRIDICA® (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, EEUU)

La tecnología PCR/ESI-MS se basa en una PCR de amplio espectro, seguida de una espectrometría de masas de ionización por electrospray. Permite la identificación de > 750 bacterias y hongos a partir de muestra directa en unas 6 h. Esta técnica ha sido evaluada en nuestro Servicio en una población mixta proveniente de los Servicios de Urgencias y por otra parte en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). Los resultados obtenidos fueron una sensibilidad y una especificidad del 74.8% i 78.6% respectivamente en la población mixta. Y si sólo se incluyen los resultados de los pacientes ingresados en la UCI, la sensibilidad y especificidad fueron del 90.5% y 87.2% respectivamente [159, 117]. Estos resultados están en concordancia con otros estudios publicados sobre la evaluación de esta tecnología para el diagnóstico de la sepsis. Por un lado, A. Baconni *et al.* [160, 161, 75] analizó muestras de pacientes que provenían de Urgencias y describió una sensibilidad del 83 al 91% cuando se comparaba con el hemocultivo. Recientemente se ha publicado un estudio multicéntrico que incluye UCIs de 6 países europeos y la sensibilidad obtenida fue del 81% [157, 162].

5.2. Ventajas e inconvenientes de los métodos moleculares de sangre directa

La principal ventaja de la utilización de las técnicas moleculares directamente de sangre, es la notable disminución en el tiempo de obtención de los resultados. Esta disminución es debida, principalmente, a la eliminación del tiempo necesario para el cultivo, el cual es necesario en los métodos tradicionales. Además, esta ventaja, va asociada a un aumento de la sensibilidad, pues la detección de microorganismos por estos ensayos, es independiente de que la bacteria no sea cultivable, de la administración previa de antibióticos, y de la interferencia con otros factores inhibidores presentes en el medio de cultivo.

Estas técnicas, cuyo papel clínico es principalmente proporcionar sensibilidad y rapidez, deben estar disponibles las 24 horas en el laboratorio de microbiología para la obtención de ventajas. Como consecuencia, su disponibilidad no sólo aumentará los costes y dedicación de personal cualificado, sino que provocará una modificación en la organización del laboratorio. En la bibliografía no existen aún muchos trabajos prospectivos que valoren el beneficio clínico que supondría la incorporación de esta nueva tecnología tan cara. Por tanto, es importante estudiar la relación coste-eficacia que tendría la introducción de estas técnicas en la práctica clínica.

Por otro lado, la interpretación clínica de los resultados es aún muy complicada debido a varios factores ya comentados anteriormente, como son los falsos positivos de las bacteriemias o fungemias transitorias, la detección de no sólo DNA de bacterias vivas, sino también muertas o

degradadas, la falta de un *gold standard*, y el mayor riesgo de contaminación en el laboratorio. Por ello, todos los resultados de PCR deben ser evaluados en el contexto clínico del paciente.

Tanto la obtención rápida de la sensibilidad antibiótica, para ajustar el tratamiento antibiótico empírico a uno adecuado o dirigido, como la detección rápida de los mecanismos de resistencia de las bacterias, son fundamentales para las políticas de control de infección y para el buen uso de los antibióticos. Estas técnicas detectan algunos mecanismos de resistencia, pero aún siguen siendo limitados e insuficientes.

En este sentido, un inconveniente muy importante de las técnicas moleculares, es la imposibilidad de realizar el estudio completo de sensibilidad antibiótica. De manera que algunos de los problemas más importantes, actualmente, en cuanto al tratamiento antibiótico, no quedarían resueltos con las técnicas moleculares:

- Las altas tasas de resistencia a ciertos antibióticos condicionan cada vez más una limitación en las opciones terapéuticas; no se podrían realizar estudios anuales de sensibilidad a nivel local, muy importantes para poder adaptar los tratamientos empíricos.
- No permiten disponer de la concentración mínima inhibitoria (CMI). La CMI es importante para establecer las pautas de dosificación más eficaces, existe una buena correlación con el fracaso terapéutico, y ayuda en la detección de cepas con mecanismos de bajo nivel de resistencia.

El coste elevado y la necesidad de un personal formado en técnicas moleculares, junto con la no detección de todos los potenciales patógenos, suponen otras desventajas importantes.

5.3. Modelo de futuro

El desarrollo de nuevos sistemas de diagnóstico es continuo, y pueden tener un impacto significativo en el diagnóstico y manejo de las sepsis. El estado de viabilidad del patógeno y el estudio de la sensibilidad antibiótica, continúan siendo los principales problemas de los métodos moleculares, por lo que el cultivo convencional sigue siendo necesario hoy en día.

Nuevas tecnologías emergentes, como la plataforma de amplificación-espectrofotometría de masas (PCR/ESI-MS), permite la detección universal de uno o varios patógenos (bacterias, virus, hongos) directamente de la sangre. Esta técnica, utilizada para el diagnóstico de sepsis, permite la identificación de todas las bacterias conocidas, de las principales familias de hongos y virus que son patógenos en el ser humano, y la detección de cuatro genes de resistencia en menos de 6 horas. Otras técnicas como la hibridación en microarray o la secuenciación masiva pueden permitir no sólo la rápida identificación de microorganismos, sino también el estudio de las características de estos, tales como la virulencia y la sensibilidad a ciertos antibióticos. También

es interesante la capacidad de cuantificar las cargas bacterianas, que podría ser utilizado como seguimiento de la respuesta al tratamiento [62, 109].

Para el manejo de los pacientes con sospecha de sepsis, las líneas de futuro van dirigidas a utilizar métodos de diagnóstico rápido, pero siempre formando parte de un algoritmo diagnóstico estandarizado. En este algoritmo también se encuentran los métodos convencionales, los biomarcadores, y una estrecha interacción entre clínico y microbiólogo, además de un cumplimiento riguroso de los protocolos de prevención y control de la infección, así como de programas de optimización del uso de antibióticos [163, 91].

Desafortunadamente, el marcador ideal no existe. Incluso los biomarcadores mejor validados en la actualidad sólo se utilizan como pruebas adicionales en el diagnóstico de la sepsis. Debido al elevado coste que supondría la introducción de estas nuevas técnicas en el diagnóstico de los pacientes con sospecha de sepsis, los biomarcadores podrían tener un importante papel como herramienta de preselección de los pacientes que se beneficiarían de una prueba rápida molecular además del hemocultivo convencional.

Por lo tanto, las nuevas tecnologías no pueden sustituir al hemocultivo, éste sigue siendo clave en el diagnóstico y confirmación microbiológica de la sepsis. Las líneas de futuro deben centrarse en un enfoque global e integrado, asociando al hemocultivo tanto las técnicas diagnósticas moleculares como los biomarcadores, para conseguir aumentar la sensibilidad y disminuir el tiempo de respuesta.

6. Importancia del diagnóstico clínico precoz en el manejo clínico de los pacientes

En la evolución clínica del paciente con sepsis, intervendrán diferentes factores como son: las características del microorganismo (inoculo, virulencia), el estado inmunitario del huésped (patología de base, factores genéticos) y, el diagnóstico microbiológico precoz. Este último, de vital importancia para el manejo correcto del paciente séptico.

La instauración precoz de un tratamiento adecuado, tanto antibiótico como de soporte, disminuye la mortalidad atribuible a estas infecciones y es un factor de gran relevancia en el pronóstico del enfermo [164, 165].

La incidencia, la gravedad y la mortalidad de la sepsis, la convierten en un importante problema sanitario, que requiere la adopción de estrategias específicas para mejorar el pronóstico de estos pacientes. Con estas premisas, en el año 2002 se inició *la Surviving Sepsis Campaign*, cuyo objetivo principal consistía en conseguir una reducción de la mortalidad de la sepsis grave.

De este modo, se desarrollaron paquetes concretos de medidas o *bundles*, para facilitar la implementación de pautas de actuación y recomendaciones para el manejo de estos pacientes.

Pues se ha demostrado que consiguen mejores resultados que si se realizan por separado. Así, las principales acciones para el correcto manejo del paciente con sepsis [166, 167] incluyen:

- **Reanimación hemodinámica.** Uno de los aspectos más importantes del tratamiento de la sepsis reside en la rapidez de la expansión de volumen y en la administración de fármacos vasoactivos e inotrópicos en las primeras 6 horas.
- **Control del foco de infección.** Es muy importante establecer, lo antes posible, el foco anatómico de la infección. El objetivo principal, es la eliminación de los microorganismos responsables, mediante la actuación médica y quirúrgica sobre el foco de la sepsis. El drenaje de las colecciones purulentas o abscesos, y la liberación de la obstrucción, especialmente en vía urinaria o biliar, contribuyen también a resolver la infección. El material protésico intravascular colonizado puede ser causa de bacteriemia continua, por lo que también debe ser retirado.
- La **administración del tratamiento antibiótico correcto y precoz** es esencial para aumentar la supervivencia y garantizar la buena evolución del paciente. Idealmente, se debería administrar durante la primera hora desde el reconocimiento de los síntomas. Es muy importante la obtención de cultivos del foco de infección y hemocultivos, a poder ser antes de iniciar tratamiento antibiótico.

Cuando aún no se dispone de información sobre el microorganismo causal y su sensibilidad, la antibioticoterapia inicial debe ser empírica. El conocimiento del tipo de microorganismos que puedan estar implicados, del foco de la infección, del estado inmunitario del paciente, de si la infección es comunitaria o nosocomial y del perfil de resistencias a nivel local, facilitará la elección del antibiótico empírico más efectivo. Como norma general, la recomendación es emplear antibióticos de amplio espectro, adecuándose posteriormente, en función de los resultados de los cultivos.

Dos importantes factores en la terapia antibiótica, se asocian de manera significativa a un aumento de la morbilidad y mortalidad en los pacientes con sepsis. Estos son: el inicio de un tratamiento antibiótico inadecuado [159, 35] y el retraso del tratamiento antibiótico, sobre todo, a partir de las 3 horas tras el diagnóstico de sepsis [168, 38, 169]. De manera que, el diagnóstico precoz y la intervención terapéutica rápida y específica han demostrado ser cruciales en la recuperación de los pacientes con sepsis.

El estudio realizado por Kumar *et al*, [168, 35] pudo demostrar que el inicio de una terapia antibiótica inadecuada disminuye en 5 veces la tasa de supervivencia de los pacientes. También observó que el tiempo de inicio de la terapia es un punto crítico y determinante en el pronóstico de los pacientes con sepsis. Al igual que Kumar, diferentes estudios han demostrado que cada hora de retraso en la instauración del tratamiento adecuado aumenta la mortalidad [170, 171].

La terapia empírica inadecuada no es nada despreciable, presentándose en aproximadamente un 20-30% de los casos [172, 35], siendo una de las principales causas, que los agentes etiológicos de la sepsis sean microorganismos multirresistentes. Las enterobacterias productoras de BLEE, actualmente extendidas por todo el mundo, se han convertido en un verdadero problema sanitario [81, 42, 44]. También, la bacteriemia por bacterias grampositivas resistentes, como *S.aureus* MRSA, se han asociado a un aumento del riesgo de mortalidad, debido muchas veces a una terapia inicial inadecuada, entre otros factores [85, 59].

En la actualidad, el uso indiscriminado de antibióticos, tanto en la comunidad como a nivel hospitalario, ha generado la aparición de bacterias multirresistentes. Las consecuencias han sido, la dificultad aún mayor para el correcto manejo y tratamiento de las infecciones. Las infecciones producidas por bacterias multirresistentes, sin casi opciones terapéuticas, se asocian a un aumento de la mortalidad, siendo actualmente una amenaza inminente [173, 61, 63, 64].

Así, la mejora en el tiempo de respuesta de los resultados microbiológicos, y sobre todo la detección rápida y precisa de las bacterias multirresistentes, es doblemente importante. Es necesaria por razones terapéuticas, como guía en la elección del tratamiento antibiótico adecuado. Pero también, para la aplicación precoz de las políticas de aislamiento. Las prácticas dirigidas a controlar la diseminación de las bacterias multirresistentes, son un factor clave para reducir la transmisión horizontal de la infección en los hospitales, con el fin de evitar brotes epidémicos o situaciones de endemia [174, 80, 82, 83].

La monitorización de las resistencias debe ser prioritaria en cualquier institución hospitalaria ya que resulta imprescindible para el establecimiento de guías locales de tratamiento empírico. En este aspecto, el laboratorio de microbiología tiene un papel crítico ya que proporciona la identificación de los patógenos implicados en el proceso infeccioso y realiza las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos de los mismos. Para una terapia eficaz se recomienda el inicio con un tratamiento empírico de amplio espectro, basado en los datos de vigilancia de la resistencia local. Una vez identificado el agente etiológico, optimizar el tratamiento antibiótico cuanto antes, mediante la suspensión de los antibióticos innecesarios, y, si es posible, la modificación del antibiótico por otro con menor espectro, para reducir la presión selectiva de los microorganismos resistentes [78, 84].

El control de las resistencias pasa por mejorar el uso de antibióticos. Por lo que diferentes publicaciones proponen varias estrategias entre las cuales está el establecimiento de programas de optimización de uso de antibióticos (PROA). Sus objetivos consisten en: 1/ mejorar los resultados clínicos, 2/ reducir los efectos adversos relacionados con la utilización de antibióticos, incluyendo la resistencia, y 3/ garantizar una terapia coste-efectiva [175, 86]. Es bien conocido

que el tratamiento antimicrobiano inadecuado es causa de aumento de la mortalidad en los pacientes con sepsis [176, 38, 88]. Sin embargo, existen evidencias de los beneficios que suponen la instauración de estos programas y el impacto directo sobre el pronóstico de los pacientes. Por ello, el interés en la implantación de estos programas PROA, para el uso racional de los antibióticos, está aumentando [60, 89, 91-95].

Los trabajos revisados demuestran que la resistencia antibiótica tiende a comprometer los tratamientos de las infecciones, junto con un aumento de la mortalidad, de la estancia hospitalaria y por tanto, de los costes sanitarios, en comparación con las infecciones por bacterias sensibles. [79, 42, 96, 97].

Aunque no existen muchos estudios, los servicios de microbiología también contribuyen a los beneficios clínicos y económicos en los hospitales. En este sentido, la disminución del tiempo necesario en la respuesta de los resultados microbiológicos, permite el inicio y /o optimización del tratamiento antibiótico mucho antes, dando lugar a una reducción en los días de hospitalización, disminución del consumo de antibióticos, utilización de antibióticos de menor espectro, aislamiento precoz de bacterias multirresistentes, y en consecuencia reducción significativa de los costes económicos totales [60, 98, 100, 101].

7. Impacto clínico de la información rápida del resultado de los pacientes al clínico

Inicialmente, las bacteriemias, y en general la mayoría de infecciones graves, se tratan de manera empírica hasta conocer los agentes etiológicos implicados y su perfil de sensibilidad antibiótica. Generalmente los antibióticos utilizados en la terapia empírica son antibióticos de amplio espectro, de alto coste y numerosos efectos adversos, además debido al aumento de la prevalencia de microorganismos multirresistentes, la terapia empírica inicial puede ser inadecuada. Cuando los datos microbiológicos están disponibles, el tratamiento antibiótico puede ser ajustado a un tratamiento adecuado. Está bien documentado, que cada hora de retraso en la instauración del tratamiento correcto, aumenta la mortalidad [60, 35, 104]. Por lo que acortar el periodo transcurrido entre el tratamiento empírico y el tratamiento adecuado, es crucial para la evolución del paciente.

Si disponemos de métodos de diagnóstico rápido para la identificación, pero sobre todo para el antibiograma, es de esperar que la modificación a una terapia adecuada se pueda realizar mucho antes. Sin embargo, no siempre ocurre así, sino que en muchas ocasiones a pesar de tener un resultado microbiológico, los clínicos son reticentes a cambiar la terapia si el paciente ha experimentado una clara mejora clínica o la información llega con retraso, ya sea porque el laboratorio no dispone de atención continuada o por una mala comunicación entre el clínico y el

microbiólogo. Por lo que, además de disponer de métodos de diagnóstico rápido, es igual o más importante la manera de cómo se informan al clínico los resultados de los hemocultivos, para el buen manejo del paciente.

La notificación activa de los resultados microbiológicos comporta un cambio a un tratamiento adecuado en un periodo de tiempo menor, por lo que la comunicación entre el clínico y el microbiólogo es básica, suponiendo un factor de gran relevancia en el pronóstico del enfermo. Existen diferentes publicaciones que demuestran los beneficios derivados de una información precoz y activa del resultado del hemocultivo al clínico. Permiten la elección de antibióticos de menor espectro, las dosis adecuadas y el cambio a terapia oral mucho antes que si los resultados no se informan personalmente. A la vez, se limitarán las consecuencias adversas de la mala utilización de los antibióticos, y en particular, la selección de microorganismos resistentes y los costes excesivos derivados de los tratamientos de amplio espectro [81, 108, 85, 110, 74, 78, 175].

E. Bouza *et al*, [176, 117, 119] realizaron un estudio donde se evaluaba el impacto positivo en el manejo del paciente según el procedimiento por el cual se informaba los resultados microbiológicos al clínico: A) Informar telefónicamente del resultado de la tinción de Gram y dar un informe completo una vez la identificación y el antibiograma estaban disponibles; B) Igual que en el punto A, pero escribiendo directamente en la historia clínica del paciente una opinión basada en el cuadro clínico actual del paciente e incluyendo recomendaciones terapéuticas; C) este grupo incluía las acciones de los grupos A y B y además, se informaba verbalmente al clínico responsable.

Este estudio pone de manifiesto la importancia de la disponibilidad de la información microbiológica para mejorar el resultado de los pacientes con sepsis, sobre todo por los beneficios tanto clínicos como económicos obtenidos ante la estrecha coordinación entre el laboratorio y los clínicos para la interpretación correcta de los informes microbiológicos y la toma de decisiones en cuanto a la terapia adecuada.

En nuestro hospital, todos los hemocultivos se informan personalmente al médico responsable, primero del resultado de la tinción de Gram y posteriormente, el informe completo de identificación y antibiograma, tanto del hemocultivo como de otros cultivos. Esta información permite orientar de forma rápida y adecuada tanto el foco más probable de la bacteriemia como el tratamiento antibiótico, así como la instauración del aislamiento de contacto, en caso de detectarse un microorganismo multiresistente.

Objetivos

Objetivo 1

Estudiar comparativamente la eficacia de los sistemas automáticos, Vitek-2 Compact (bioMérieux, France) y MicroScan (Beckman Coulter, EEUU) para identificación y estudio de la sensibilidad antibiótica de bacilos gramnegativos directamente de hemocultivo positivo (sistema BacT/ALERT FA y FN) mediante el diseño de un protocolo de inoculación.

Objetivo 2

Evaluar la eficacia del sistema Vitek-2 Compact (bioMérieux, France) para identificación y estudio de la sensibilidad antibiótica de cocos grampositivos directamente de hemocultivo positivo (sistema BacT/ALERT FA y FN), mediante el diseño de un protocolo modificado de inoculación.

Objetivo 3

Estudiar la eficacia de Vitek-2 Compact (bioMérieux, France) para la identificación y determinación de la sensibilidad directamente de frascos de hemocultivo positivo pediátricos, así como el impacto clínico de la información rápida en esta población.

Objetivo 4

Cuantificar el impacto sobre el tratamiento antibiótico, de la información rápida y personalizada de la identificación y antibiograma, obtenidos directamente de hemocultivo positivo.

Material y Métodos

Objetivo 1

Estudiar comparativamente la eficacia de los sistemas automáticos, Vitek-2 Compact (bioMérieux, France) y MicroScan (Beckman Coulter, EEUU), para identificación y estudio de la sensibilidad antibiótica de bacilos gramnegativos directamente de hemocultivo positivo (sistema BacT/ALERT FA y FN) mediante el diseño de un protocolo de inoculación.

Muestras analizadas

Estudio prospectivo de los episodios significativos de bacteriemia monomicrobiana por bacilos gramnegativos en el Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona.

Se incluyeron 113 hemocultivos positivos consecutivos, procedentes de pacientes, tanto adultos como pediátricos, con sospecha de bacteriemia o sepsis. El sistema automático de lectura continua utilizado para los hemocultivos fue el BacT/ALERT (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) en frascos FAN (FA y FN) y para pediatría el frasco PF, con medios de cultivo que contienen carbón activado. Sólo los hemocultivos en los que en la tinción de Gram se observaron bacilos gramnegativos y que parecían contener un solo microorganismo, se incluyeron en el estudio. Fueron excluidos aquellos en los que en la tinción de Gram se observaba más de un tipo de microorganismo o aquellos en los que tras una incubación de 18-24 horas, el subcultivo resultaba ser polimicrobiano.

Sistemas utilizados

En el estudio se compararon dos sistemas automáticos para la identificación y determinación de la sensibilidad antibiótica directamente del hemocultivo positivo. Se consideró el gold standard o método de referencia la aplicación de ambos sistemas a partir de colonia siguiendo las instrucciones del fabricante.

Sistema MicroScan (Beckman Coulter, EEUU), en el que se utilizaron los paneles Combo orina 1S para la identificación y estudio de sensibilidad antibiótica

Sistema Vitek-2 Compact (bioMérieux, France), en el que se utilizaron las tarjetas ID-GN y AST-N 020 para la identificación y estudio de sensibilidad antibiótica respectivamente.

Procesamiento de las muestras

Sistema MicroScan

Método de inoculación convencional o método de referencia

Los hemocultivos positivos se subcultivaron en placas de agar y se incubaron en la estufa a 37°C durante 18-24 horas. Al día siguiente, se procesaron los paneles según las indicaciones del fabricante y se incubaron en la estufa durante 18-24 horas a 37°C. Una vez efectuada la lectura de los paneles de forma automática mediante el sistema autoScan, los resultados se comprobaron también visualmente.

Método de inoculación directa a partir de hemocultivo positivo

Para la inoculación directa a partir de hemocultivos positivos, previamente se realizó una centrifugación de 5 mL de sangre a 3000 rpm (900g) durante 10 minutos. A partir del sobrenadante se obtuvo una turbidez equivalente a un Mc Farland de 0'5. Posteriormente se inocularon los paneles siguiendo las instrucciones del fabricante y se incubaron en la estufa durante 18-24 horas a 37°C. La lectura de los paneles se realizó de forma automática mediante el sistema autoScan, y los resultados se comprobaron visulamente.

Sistema Vitek-2 Compact (bioMérieux, France)

Método de inoculación convencional o de referencia

Los hemocultivos positivos se subcultivaron en placas de agar y se incubaron en la estufa a 37°C durante 18-24 horas. Al día siguiente, a partir del aislamiento en medio de cultivo, se inocularon las tarjetas ID-GN para identificación y AST-N 020 para antibiograma, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las tarjetas se introdujeron en el sistema de lectura automático Vitek-2 compact(bioMérieux, France).

Método de inoculación directa a partir de hemocultivo positivo

Para la inoculación directa a partir de hemocultivos positivos, se ideó un protocolo simplificado, de tan sólo dos centrifugaciones, con una duración total de sólo 20 minutos y con la finalidad de eliminar las partículas de charcoal y concentrar los microorganismos.

Se centrifugaron 5 ml de sangre a 800 rpm (60g) durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante transfiriéndose a otro tubo, y volviéndose a centrifugar a 3000 rpm (900g) durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó, y a partir del sedimento obtenido utilizando un escobillón, se realizó una suspensión bacteriana equivalente a un Mc Farland de 1. (Figura 10) Para la inoculación de las tarjetas, se siguieron las mismas intrucciones indicadas por el fabricante que para la inoculación a partir de subcultivo. Posteriormente, se introdujeron las tarjetas en el instrumento para su procesamiento. De cada uno de los hemocultivos, a partir de la misma suspensión, se realizaba un antibiograma por disco difusión para la detección de resistencia a betalactámicos, como las β -lactamasas de espectro extendido o BLEE, mediante la prueba de sinergia de doble disco [175, 127, 99].

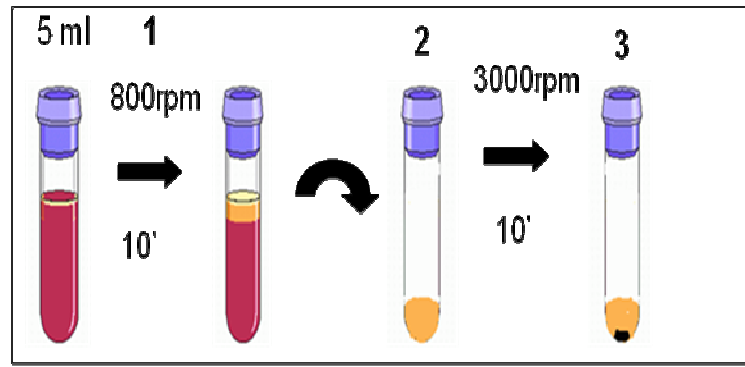


Fig. 10 Protocolo de centrifugación para inoculación directa de hemocultivos positivos con bacilos gramnegativos

Para la interpretación final de los resultados de sensibilidad, el sistema Vitek-2 compact (bioMérieux, France). dispone de un sistema experto que, además, informa de los posibles mecanismos de resistencia presentes: betalactamasa de espectro extendido, betalactamasa de tipo AmpC Cefalosporina adquirida, Penicilinas resistente a inhibidores, etc.

Los mecanismos de resistencia fueron confirmados posteriormente por métodos fenotípicos, mediante las técnicas de sinergia de doble disco y Epsilon-test [177, 150, 170].

Método de referencia

El método de referencia o “gold standard” utilizado, fue la identificación y estudio de la sensibilidad antibiótica mediante MicroScan y Vitek-2 Compact (bioMérieux, France), a partir de subcultivo según métodos estandarizados.

Cuando se halló una discrepancia en la identificación de los microorganismos o en los resultados de sensibilidad, se utilizó el sistema API (bioMérieux). Para resolver las discrepancias en los resultados de sensibilidad se empleó el método Epsilon test (E-test, bioMérieux).

Control de calidad

Durante el tiempo de realización del estudio se evaluaron semanalmente ambos sistemas con la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

Análisis de los datos

Los resultados de identificación y antibiograma obtenidos mediante la inoculación directa de los paneles MicroScan, se compararon con los obtenidos a partir de colonia mediante el método estandarizado. Del mismo modo, los resultados obtenidos de la inoculación directa de las tarjetas del Vitek-2 Compact (bioMérieux, France) se compararon con los obtenidos con el método estándar a partir de colonia.

Se compararon los tiempos de demora en la emisión de los resultados de identificación y sensibilidad obtenidos por ambos sistemas, tanto los obtenidos directamente del hemocultivo como los obtenidos a partir de subcultivo.

Para la interpretación de los resultados de sensibilidad antibiótica se siguieron los criterios de los *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* [178, 157, 179]

Definiciones

Los resultados de la identificación con el método directo se agruparon en tres categorías: (i) correctamente identificados, cuando la ID directa y la ID de colonia dieron la misma identificación; (ii) mal identificados (ya sea en género o especie) cuando se observaron resultados discordantes entre la ID directa y la ID de colonia; y (iii) no identificados, cuando la ID directa no dio ninguna identificación con el sistema Vitek-2.

Para los resultados de sensibilidad, según la terminología internacional aceptada para este tipo de estudios, se consideró que había concordancia de categoría si el resultado de la interpretación de la CMI obtenida por ambos sistemas coincidía con el método de referencia y los criterios interpretativos del CLSI: sensible, intermedio o resistentes. Error muy grave si el resultado de los dos sistemas obtenidos a partir de método directo era sensible y el obtenido a partir de colonia (método de referencia) era resistente. Error grave cuando el resultado del método directo era resistente y el del método de referencia era sensible. Y finalmente, se consideró error menor si el resultado del sistema directo era intermedio y con el método de referencia era sensible o resistente, o a la inversa, sensible o resistente con el método directo e intermedio con el método de referencia.

Objetivo 2

Evaluar la eficacia del sistema Vitek-2 Compact(bioMérieux, France) para identificación y estudio de la sensibilidad antibiótica de cocos grampositivos directamente de hemocultivo positivo (sistema BacT/ALERT FA y FN), mediante el diseño de un protocolo modificado de inoculación.

Pacientes y diseño del estudio

Estudio prospectivo de los episodios significativos de bacteriemia monomicrobiana por cocos grampositivos en el Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona.

Durante el periodo de estudio, el método utilizado para el diagnóstico de las bacteriemias, tanto en pacientes adultos como pediátricos, fue el sistema BacT/ALERT System (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) con los frascos FAN (FA y FN) y el pediátrico PF. Todos los medios de cultivo utilizados contenían carbón activado.

A los hemocultivos detectados como positivos por el sistema, se les realizó la tinción de Gram, y se subcultivaron en medios de cultivo sólidos. De todos ellos, se separaron 5 ml de sangre para la realización de la identificación y el estudio de sensibilidad por inoculación directa utilizando el sistema Vitek- 2 Compact (bioMérieux, France).

En el estudio sólo se incluyeron los hemocultivos positivos en los que, en la microscopía, se observaron cocos grampositivos agrupados en racimos con sospecha de tratarse de estafilococos, o cocos grampositivos en cadena con la posibilidad de ser enterococos. Fueron excluidos el resto de microorganismos, al igual que las muestras donde los subcultivos fueron mixtos tras 18-24 horas de incubación.

De cada paciente, se estudiaron todos los frascos positivos para la identificación y sólo en el primer frasco positivo de cada paciente se realizó el estudio de sensibilidad.

Muestras analizadas

Se analizaron un total de 199 hemocultivos positivos, de los cuales 36 fueron enterococos y 163 estafilococos. A los 199 hemocultivos se les realizó la identificación mediante inoculación directa por Vitek-2 Compact. El estudio de sensibilidad antibiótica directa se realizó en 133, de los cuales 26 eran enterococos y 107 estafilococos.

El sistema vitek-2 Compact (bioMérieux, France), también se utilizó tanto para la identificación como para el estudio de sensibilidad a partir de subcultivo, excepto, en el caso de los estafilococos en los que la prueba de la coagulasa en porta fuese positiva.

Métodos de laboratorio

Sistemas utilizados

El sistema automático de lectura continua utilizado para los hemocultivos, fue el sistema BacT/ALERT® 3D (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) en los frascos FAN (FA, FN y PF). Estos medios contienen partículas de carbón activado que potencialmente pueden interferir en los procedimientos realizados directamente del hemocultivo positivo.

Para la identificación y el estudio de la sensibilidad se utilizó el sistema Vitek-2 Compact (bioMérieux, France). Las tarjetas utilizadas para la identificación fueron las ID GP. Para el estudio de sensibilidad se utilizaron las tarjetas AST-P626, en el caso de los estafilococos y las AST-P589 en los enterococos. La elección de la tarjeta de antibiograma, en el caso de procesamiento de hemocultivo por inoculación directa, se realizó en función de la tinción de Gram.

Procesamiento de las muestras

Método de inoculación convencional

Los hemocultivos positivos se subcultivaron en placas de agar y se incubaron en la estufa a 37°C durante 18-24 horas. Al día siguiente, a partir del aislamiento en medio de cultivo, se realizaba la identificación y el antibiograma, utilizando las tarjetas adecuadas y siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el caso de los enterococos, se utilizaron las tarjetas ID GP para la identificación y las AST-P589 para el estudio de sensibilidad. En el caso de los estafilococos, primero se realizaba la prueba de la coagulasa en porta (Diamondal Staph Plus®) y en el caso que ésta fuese positiva no se realizaba identificación por Vitek-2, al considerarse la coagulasa en el método de referencia. Por el contrario, si la coagulasa era negativa se realizaba la identificación utilizando las tarjetas ID GP. Para el antibiograma de estafilococos se utilizaron las tarjetas AST-P626.

Método de inoculación directa a partir de hemocultivo positivo

Para la inoculación directa a partir de hemocultivos positivos, se realizaron algunas modificaciones del protocolo anteriormente descrito para bacilos gramnegativos [180, 159, 181]. En el caso de los cocos grampositivos, y sobre todo si se trataba de estafilococos, no fue suficiente el método con centrifugaciones para obtener un sedimento valorable para el procesamiento de las muestras, por lo que se realizaron algunos cambios. El primero fue añadir al protocolo anterior, la sonicación, para intentar romper la adhesión entre los cocos grampositivos, con el objetivo de evitar la formación de acúmulos que interfieren en la obtención de una suspensión homogénea y el segundo, aumentar la velocidad de la

centrifugación para conseguir una mayor concentración del microorganismo. Así, el protocolo final fue el siguiente: Se sonicaron los 5 mL del hemocultivo durante 10 minutos para intentar disgregar los microorganismos entre sí y del charcoal que contiene el medio de cultivo. Se centrifugaron 5mL a 750g durante 2 minutos, para eliminar el charcoal. El sobrenadante obtenido se transfirió a otro tubo y se volvió a sonicar sólo 5 minutos para deshacer las adhesiones entre los cocos grampositivos. Posteriormente, se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó, y a partir del sedimento obtenido, y utilizando un escobillón, se realizó una suspensión bacteriana equivalente a un Mc Farland de 1⁷-2 (Figura 11) Para la inoculación de las tarjetas, se siguieron las mismas intrucciones indicadas por el fabricante que para la inoculación a partir de subcultivo. Posteriormente, se introdujeron las tarjetas en el instrumento para su procesamiento.

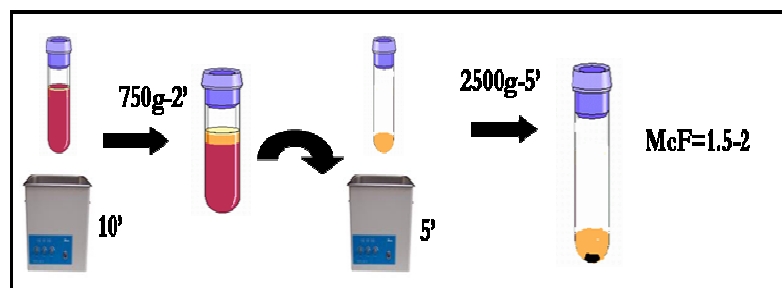


Fig. 11 Protocolo de centrifugación para inoculación directa de hemocultivos positivos con cocos grampositivos

En los hemocultivos en los que en la tinción de Gram se observaban cocos grampositivos tipo estafilococos, se realizó además la prueba de la coagulasa en tubo (STAPH-ASE®, bioMérieux) directamente del hemocultivo positivo según el siguiente procedimiento. Se centrifugaron 5 ml del hemocultivo a 2000 rpm durante 10'. Recoger con una pipeta Pasteur de la parte más profunda del sobrenadante, e inocular 3-5 gotas en un tubo estéril que contenga 0,5 ml de plasma de conejo (STAPH-ASE®, bioMérieux). Se incubó a 36 ± 2 °C, realizándose una primera lectura a la 4 horas. Si a las 4 horas se observaba la presencia de coágulo la prueba era considerada como positiva. Si al contrario, no se observaba coágulo, se incubaba a temperatura ambiente hasta el día siguiente (18-24 horas).

Método de referencia

El método de referencia o “gold standard” utilizado, fue la identificación y estudio de la sensibilidad antibiótica mediante Vitek-2 Compact (bioMérieux, France), a partir de subcultivo según métodos estandarizados. Se utilizó este sistema como método de referencia ya que otros estudios lo han evaluado ampliamente llegando a la conclusión de que se trata de un sistema

fiable y preciso [182, 160, 183, 75]. En el caso de *S.aureus*, el método de referencia en la identificación fue la prueba de la coagulasa en porta (Diamondal Staph Plus®).

Cuando se halló una discrepancia en la identificación de los microorganismos, se utilizó el sistema API (bioMérieux), API ID 32 C si se trataba de un enterococo y API ID 32 STAPH en el caso de estafilococos. Para resolver las discrepancias en los resultados de sensibilidad se empleó el método Epsilon test (bioMérieux).

Control de calidad

Durante el tiempo de realización del estudio se evaluó semanalmente el sistema Vitek-2 con las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Análisis de los datos

Los resultados de identificación y antibiograma obtenidos mediante la inoculación directa de las tarjetas del Vitek-2 Compact (bioMérieux, France), se compararon con los obtenidos con el método estándar a partir de colonia.

Se compararon los tiempos de demora en la emisión de los resultados de identificación y sensibilidad obtenidos directamente del hemocultivo con los obtenidos a partir de subcultivo.

Para la interpretación de los resultados de sensibilidad antibiótica se utilizaron los puntos de corte recomendados por los *Clinical and Laboratory Standards Institute* [184, 157].

Definiciones

Los resultados de la identificación con el método directo se agruparon en tres categorías: (i) correctamente identificados, cuando la ID directa y la ID de colonia dieron la misma identificación; (ii) mal identificados (ya sea en género o especie) cuando se observaron resultados discordantes entre la ID directa y la ID de colonia; y (iii) no identificados, cuando la ID directa no dio ninguna identificación con el sistema Vitek-2.

A todos ellos se les realizó estudio de sensibilidad. Para los microorganismos no identificados, el sistema Vitek-2compact permite la introducción manual de la identificación correcta, de manera que el software ajusta automáticamente los valores de corte de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a las especies identificadas. Así, en nuestro estudio, en los microorganismos no identificados por el método directo, se introdujo manualmente la identificación basada en las características de la tinción de Gram directa [185, 62, 74, 176] y el resultado de la PCT, o incluso con la identificación obtenida al día siguiente a partir del subcultivo.

Para los resultados de sensibilidad, según la terminología internacional aceptada para este tipo de estudios, se consideró que había concordancia de categoría si el resultado de la interpretación de la CMI obtenida por ambos sistemas y el método de referencia coincidía con los criterios interpretativos de los CLSI: sensibles, intermedios o resistentes. Error muy grave si el resultado de los dos sistemas obtenidos a partir de método directo era sensible y el obtenido a partir de colonia (método de referencia) era resistente. Error grave cuando el resultado del método directo era resistente y el del método de referencia era sensible. Y finalmente se consideró error menor si el resultado del sistema directo era intermedio y con el método de referencia era sensible o resistente, o a la inversa, sensible o resistente con el método directo e intermedio con el método de referencia [85, 163, 76, 90, 145].

Objetivo 3

Estudiar la eficacia de Vitek-2 Compact para la identificación y determinación de la sensibilidad directamente de frascos de hemocultivo positivo pediátricos, así como el impacto clínico de la información rápida en esta población

Para la realización de este objetivo, se siguió el mismo procedimiento metodológico explicado en el primer y segundo objetivos, aunque con dos consideraciones:

- El número de frascos a realizar y al volumen de sangre inoculado en cada frasco de hemocultivo. Para este punto se siguieron las guías establecidas en nuestro hospital para pacientes pediátricos, que especifican el volumen de sangre que debe extraerse según la edad (Fig. 12).



Figura 12. Procedimiento de Extracción de Hemocultivos en Pediatría

- Como consecuencia, para la realización del protocolo en la inoculación directa a partir de hemocultivo positivo, la alícuota de trabajo no fue de 5ml como en adultos, sino de 2 mL

A continuación se explica el protocolo de inoculación directa para los hemocultivos pediátricos:

Se realizó un estudio prospectivo que incluyó un total de 35 muestras de hemocultivos positivos pediátricos de pacientes con sospecha de sepsis. Sólo se incluyeron en el estudio aquellos hemocultivos en los que la tinción de Gram mostraba bacilos gramnegativos, cocos grampositivos estafilococos o cocos grampositivos estreptococos con morfología de enterococo. Los frascos de hemocultivos pediátricos utilizados, fueron los PF que contienen medio con carbón activado. Fueron incubados en el sistema automático de monitorización continua BacT/ALERT (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Se excluyeron aquellos frascos en los que en

la tinción de Gram se observaba más de un tipo de microorganismo, o aquellos con subcultivos mixtos tras la incubación durante toda la noche.

Tal como se describe en el apartado de material y métodos de los objetivos uno y dos, a partir de un hemocultivo positivo, se utilizó una alícuota para inocular las tarjetas en el sistema Vitek-2 compact (bioMérieux, France), y otra para realizar un subcultivo en placas de medio sólido. Previo a la inoculación directa de las tarjetas se aplicó un procedimiento simple y rápido validado previamente para los frascos de hemocultivos adultos FAN BacT/ALERT, con bacilos gramnegativos en la tinción de Gram [77, 159, 99, 175, 78]. Debido a que las bacterias grampositivas, especialmente los estafilococos, se adhieren fuertemente a las partículas de carbón, se diseñó otro protocolo, que incluía un tratamiento previo con sonicación, además de las centrifugaciones aplicadas para los bacilos gramnegativos. A partir del sedimento obtenido se realizaron la identificación y estudio de sensibilidad directos de hemocultivo positivo PF tal y como se refiere en los objetivo 1 y 2 para adultos.

En los hemocultivos en los que en la tinción de Gram se observaban bacilos gramnegativos, a partir de la misma suspensión, se realizaba un antibiograma por disco difusión para la detección de resistencia a betalactámicos, como las β -lactamasas de espectro extendido o BLEE, mediante la prueba de sinergia de doble disco [150, 127]. En el caso que se observaran cocos grampositivos tipo estafilococo, además de la inoculación directa en el sistema Vitek-2, se realizó la prueba de la coagulasa en tubo (STAPH-ASE®, bioMérieux) directamente del hemocultivo positivo.

El método de referencia o “gold standard” utilizado, fue la identificación y estudio de la sensibilidad antibiótica mediante Vitek-2 Compact (bioMérieux, France), a partir de subcultivo según métodos estandarizados. Cuando se halló una discrepancia en la identificación de los microorganismos o en los resultados de sensibilidad, se utilizó el sistema API (bioMérieux) y para resolver las discrepancias en los resultados de sensibilidad se empleó el método Epsilon test (E-test, bioMérieux).

Los resultados de identificación y antibiograma obtenidos mediante la inoculación directa de las tarjetas del Vitek-2 Compact (bioMérieux, France), se compararon con los obtenidos con el método estándar a partir de colonia. Para ello, se siguieron las mismas definiciones citadas que en el apartado de Material y Métodos del Objetivo 1 y 2. También se compararon los tiempos de demora en la emisión de los resultados de identificación y sensibilidad obtenidos por ambos sistemas, tanto los obtenidos directamente del hemocultivo como los obtenidos a partir de subcultivo. Al igual que en los adultos, se llevó a cabo un seguimiento prospectivo de todos los pacientes con hemocultivo positivo, valorándose de forma conjunta por el pediatra y el

microbiólogo. Toda la información de los hemocultivos positivos, siempre es verbal y personalizada, desde los resultados de la tinción de Gram hasta los resultados definitivos de la identificación y del antibiograma. Esta información permite orientar de forma rápida y adecuada no sólo el tratamiento antibiótico, sino también el foco más probable de la sepsis. Todo ello se realiza en un horario de 8:00 a 22 h todos los días del año.

En una base de datos Acces se registraron de manera prospectiva todas las variables clínicas de los pacientes, los resultados microbiológicos obtenidos, así como el impacto sobre el tratamiento antibiótico de la información rápida y personalizada por parte del microbiólogo.

En el servicio de Pediatría, los niños que acuden a urgencias y durante su estancia presentan buena evolución, son dados de alta con la premisa de reconsultar ante la persistencia de los síntomas, y en el caso que presenten una mejoría clínica, igualmente reconsultar en 24 horas para control clínico e información sobre los resultados de las pruebas solicitadas. Por lo que, la información rápida de la tinción de Gram del hemocultivo positivo, así como, la realización de la identificación y antibiograma directamente del caldo de cultivo, permite disponer, en la mayoría de casos, de los resultados microbiológicos definitivos para la visita de control a las 24 horas, e incluso en algunas ocasiones, cuando los pacientes aún están en observación en el servicio de urgencias.

Objetivo 4

Cuantificar el impacto sobre el tratamiento antibiótico, de la información rápida y personalizada de la identificación y antibiograma obtenidos directamente de hemocultivo positivo.

El objetivo fundamental de los sistemas automáticos introducidos en los laboratorios, ya sea para el procesamiento de hemocultivos o para la identificación y antibiograma de los microorganismos aislados, es ofrecer al clínico, con la mayor rapidez posible, una información fiable sobre el agente etiológico de la bacteriemia y su sensibilidad antibiótica.

En el Servicio de Microbiología del Hospital Germans Trias i Pujol (H.U.G.TiP) desde el año 1993 se lleva a cabo un seguimiento prospectivo de todos los pacientes con hemocultivo positivo, valorándose de forma conjunta por el clínico y el microbiólogo. Toda la información de los hemocultivos positivos, siempre es verbal y personalizada, desde los resultados de la tinción de Gram hasta los resultados definitivos de identificación y antibiograma. Además se registra en el sistema informático del hospital como una interconsulta que permite cuantificar las intervenciones realizadas. Esta información permite orientar de forma rápida y adecuada no sólo el tratamiento antibiótico, sino también el foco probable de la sepsis. Cuando es necesario, también se asesora sobre la realización de pruebas de diagnóstico microbiológico o de exploraciones complementarias adicionales para la confirmación del foco de la sepsis. Todo ello se realiza en un horario de 8:00 a 22 h todos los días del año.

En una base de datos Acces se registran de manera prospectiva las siguientes variables clínicas:

- edad, sexo, servicio hospitalario.
- Factores de riesgo intrínseco de infección: enfermedades subyacentes, comorbilidades (diabetes, cirrosis hepática, enfermedad neoplásica activa, trasplante, neutropenia, etc.)
- Factores de riesgo extrínseco de infección: presencia de catéteres endovenosos, material protésico, sonda vesical.
- Lugar de adquisición de la bacteriemia: comunitaria, nosocomial o relacionada con la asistencia comunitaria. Ver definiciones en el apartado 1.3.2 de la introducción.
- Foco de origen.
- Microorganismo/s aislado/s.
- Evolución del paciente (curación, éxitus relacionado con la bacteriemia, éxitus no relacionado)
- Terapia con antibióticos. Se registraron los antimicrobianos administrados antes y después de disponer de los resultados del hemocultivo positivo. Se introdujo una variable que recogía la decisión clínica tomada ante la información microbiológica.

- Tratamiento antibiótico empírico. Tratamiento iniciado después de recoger el cultivo de sangre y otros cultivos.
- Tratamiento antibiótico post información microbiológica. Incluye el período desde que se da la información de la tinción de Gram del hemocultivo positivo, hasta la obtención de los resultados definitivos del antibiograma.
- Actitud clínica ante la información microbiológica. Las diferentes decisiones médicas se clasificaron como sigue:
 - Tratamiento inicial correcto. En este caso, el tratamiento empírico es el de elección.
 - Cambio al tratamiento de elección (tratamiento dirigido), por su menor espectro y/o coste económico.
 - Cambio a un tratamiento efectivo, cuando el empírico no cubría al microorganismo implicado en la bacteriemia.
 - Inicio del tratamiento antibiótico.
 - Ningún seguimiento de las recomendaciones.

En nuestro trabajo, se ha revisado el impacto sobre el tratamiento antibiótico de la información rápida y personalizada por parte del microbiólogo, en el período comprendido desde el 1 de enero del 2002 hasta el 31 de diciembre del 2014.

Resultados

Objetivo 1

Estudiar comparativamente la eficacia de los sistemas automáticos, Vitek-2 Compact y MicroScan, para identificación y estudio de la sensibilidad antibiótica de bacilos gramnegativos directamente de hemocultivo positivo (sistema BacT/ALERT FA y FN) mediante el diseño de un protocolo de inoculación.

Identificación bacteriana directa de hemocultivo positivo

Del total de 113 hemocultivos positivos con bacilos gramnegativos en la tinción de Gram, en 104 las cepas aisladas pertenecían a la familia *Enterobacteriaceae* y nueve se identificaron como *Pseudomonas aeruginosa*. Las enterobacterias aisladas fueron: *Escherichia coli* 56, *Klebsiella pneumoniae* 23, *Salmonella* spp 4, *Enterobacter* spp 13, *Morganella morganii* 2 y *Serratia marcescens* 6.

Los dos sistemas evaluados, MicroScan y Vitek-2 compact, mostraron una concordancia superior al 90% en la identificación bacteriana. De las 113 muestras evaluadas, MicroScan realizó la identificación correcta a nivel de género y especie, directamente de los frascos de hemocultivo en 106 (93.8%). De las 7 muestras con errores de identificación, 3 lo fueron por la no identificación de *P.aeruginosa*., en 3 casos la identificación fue incorrecta, un *Enterobacter* spp, un *E.coli* y una *K.pneumoniae*, por débil discriminación o baja probabilidad de identificación, y una cepa de *K.pneumoniae* no fue identificada a nivel de especie.

Tabla 1. Comparación entre los resultados de identificación obtenidos por el sistema MicroScan por inoculación directa y a partir de subcultivo

Microorganismo	Número de aislamientos			
	Ensayados	Identificados correctamente	Mal identificados	No identificados
<i>Escherichia coli</i>	56	55	1**	0
<i>K. pneumoniae</i>	23	21	2**	
<i>Salmonella</i> spp	4	4		
<i>Enterobacter</i> spp	13	12	1**	
<i>Morganella morganii</i>	2	2		
<i>Serratia marcescens</i>	6	6		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	6		3
Total (%)	113(100%)	106 (93,8)	4 (3,5)	3 (2,6)

* No identifica especie

** Débil discriminación

El sistema Vitek-2 compact identificó correctamente 109 de las 113 muestras realizadas directamente de los frascos de hemocultivo (96.5%). De las cuatro discrepancias, tres fueron por

no identificación de una cepa *Enterobacter* spp, otra de *E.coli* y una de *P.aeruginosa*. Y finalmente, una cepa de *Enterobacter* spp que fue identificada incorrectamente como *Raoultella ornithinolytica*.

Tabla 2. Comparación entre los resultados de identificación obtenidos por el sistema Vitek-2 compact por inoculación directa y a partir de subcultivo

Microorganismo	Número de aislamientos			
	Ensayados	Identificados correctamente	Mal identificados	No identificados
<i>Escherichia coli</i>	56	55		1
<i>K. pneumoniae</i>	23	23		
<i>Salmonella</i> spp	4	4		
<i>Enterobacter</i> spp	13	11	1*	1
<i>Morganella morganii</i>	2	2		
<i>Serratia marcescens</i>	6	6		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	8		1
Total (%)	113(100%)	109 (96,5%)	1 (0,8%)	3 (2,6%)

* Identificado como *Raoultella ornithinolytica*

Sensibilidad a los antibióticos

De las 2373 combinaciones de antibióticos analizadas por el sistema Vitek-2 compact y de las 2825 combinaciones de antibióticos obtenidas por el sistema MicroScan, y comparadas con los métodos de referencia, la concordancia global a nivel de categoría fue superior al 95% para los dos sistemas.

Para el cálculo del porcentaje de los errores se siguieron las recomendaciones de Murray *et al.* [103, 168, 169]

La comparación de los errores asociados a ambos sistemas automáticos con respecto al método de referencia se muestran en la Tabla 3. Para el sistema MicroScan, el porcentaje global de error fue del 1.4%; 4/779 (0.5%) errores muy graves, 28/2825 (0.9%) errores menores y no mostró ningún error mayor. El sistema Vitek-2 compact obtuvo un 1.75 % de errores en general; 2/550 (0.36%) errores muy graves, 1/1718 (0.05%) errores graves y 32/2373 (1.3%) errores menores. Si analizamos los datos de concordancia por categorías, éstos fueron muy similares entre ambos sistemas. En la categoría de sensible, el porcentaje de concordancia en ambos sistemas fue de 99.2% para el sistema Vitek-2 compact y 99.5% para el MicroScan. En la categoría de resistente, el porcentaje de concordancia fue ligeramente mayor en el sistema MicroScan (99.5%), con respecto al sistema Vitek-2 compact (98.7%). Finalmente, en la categoría intermedia, MicroScan mostró un 74% de concordancia, mientras que el sistema Vitek-2 compact mostró un 85.7%.

Tabla 3. Concordancia en la categoría entre Vitek-2 compact y MicroScan system versus el método convencional

Categoría Interpretativa	Vitek-2 compact					MicroScan system				
	Nº antibióticos testados	Nº muestras concordantes (%)	Nº em (%) ^a	Nº Em (%) ^a	Nº EM (%) ^a	Nº antibióticos testados	Nº muestras concordantes (%)	Nº em (%) ^a	Nº Em (%) ^a	Nº EE (%) ^a
Sensible	1718	1705 (99,2)				1977	1967 (99,5)			
Intermedio	105	90 (85,7)				69	51 (74)			
Resistente	550	543 (98,7)				779	775 (99,5)			
Total	2373	2338 (98,5)	32 (1,3)	1^b (0,05)	2^c (0,36)	2825	2793 (98,8)	28 (0,9)	0	4^d (0,5)

em: errores menores Em: errores graves EM: errores muy graves

^a El denominador para los errores graves es el total de nº de bacterias susceptibles determinadas por el método convencional, para los errores muy graves es el total de las bacterias resistentes determinadas por el método convencional. Para los errores menores, el denominador es el total de nº total de combinaciones de antibióticos.

^b *Escherichia coli*

^c *Pseudomonas aeruginosa, Morganella morganii*

^d *Klebsiella spp, E. coli, Morganella morganii*

La distribución de los errores según los antibióticos de ambos sistemas, comparando el método de inoculación directa con el método convencional se muestran en la Tabla 4. Los resultados de falsa sensibilidad para el sistema Vitek-2 compact se observaron sólo para la piperacilina en dos aislados correspondientes a una *Pseudomonas aeruginosa* y una *Morganella morganii*. Y sólo hubo un resultado de falsa resistencia, detectado en la cefalotina en un aislado de *Escherichia coli*. En el sistema MicroScan hubo cuatro resultados de falsa sensibilidad en diferentes antibióticos. Se observaron dos en la cefalotina, en aislados de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*; uno en la amoxicilina-ácido clavulánico en un aislado de *Morganella morganii*, y por último en la amikacina en un aislado de *Klebsiella pneumoniae*.

Tabla 4. Distribución de los errores en el estudio de sensibilidad por el sistema Vitek-2 y MicroScan por inoculación directa comparados con el método convencional

Antibiótico	Vitek-2 Compact			MicroScan system		
	Errores menores	Errores graves	Errores muy graves	Errores menores	Errores graves	Errores muy graves
<i>Ampicilina</i>				2		
<i>Amoxicilina-clavulánico</i>	1			9		1
<i>Piperacilina</i>	10		2	4		
<i>Piperacilina-tazobactam</i>	-			1		
<i>Cefalotina</i>	9	1		4		2
<i>Cefuroxima</i>	1			3		
<i>Ceftazidima</i>	1			1		
<i>Cefotaxima</i>	2			-		
<i>Cefepime</i>	2			-		
<i>Aztreonam</i>	-			2		
<i>Gentamicina</i>	1			-		
<i>Tobramicina</i>	2			1		
<i>Amikacina</i>	-			0		1
<i>Ciprofloxacina</i>	3			1		
Total	32	1	2	28		4

De 104 enterobacterias evaluadas, siete fueron productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), cuatro fueron detectadas en *K.pneumoniae* y tres en *E.coli*. El sistema MicroScan alertó sobre la posibilidad de producción de BLEE en los siete aislados. El sistema Vitek-2 compact detectó la producción de BLEE en cinco de los aislados. En dos de las cuatro *K.pneumoniae* BLEE, se detectó un patrón de antibiograma resistente para betalactámicos, aunque no era compatible, totalmente, con el perfil de BLEE según el software del Vitek-2.

Tiempo de obtención de resultados

El tiempo promedio requerido para la obtención de los informes de identificación y antibiograma por el sistema Vitek-2 compact realizado directamente de hemocultivo positivo fue de 4.57 ± 1.37 horas y 6.52 ± 1.64 horas, respectivamente. No se detectaron diferencias cuando se compararon los resultados del tiempo promedio requerido, entre la utilización del método directo y el método convencional con el sistema Vitek-2 compact, excepto si se consideran las 18-24 horas de incubación necesarias para realizar la técnica a partir de subcultivo.

Este sistema proporciona una identificación y antibiograma final en menos de 6 horas para el 80% de las muestras analizadas. El tiempo necesario para obtener una identificación final junto con el resultado de sensibilidad antibiótica con el sistema MicroScan fue de 18-24 horas para ambos protocolos de inoculación, directo y de subcultivo.

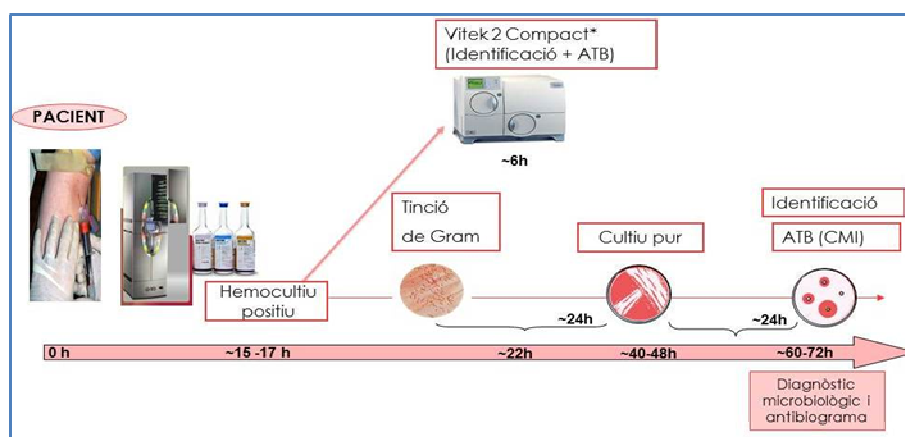


Figura 13. Protocolo de trabajo según procedimientos convencionales y mediante inoculación directa a partir de hemocultivo. Fuente: Imagen cedida por Elena Jordana (tesis doctoral)

Objetivo 2

Evaluar la eficacia del sistema Vitek-2 Compact para identificación y estudio de la sensibilidad antibiótica de cocos grampositivos directamente de hemocultivo positivo (sistema BacT/ALERT FA y FN), mediante el diseño de un protocolo modificado de inoculación.

Durante el periodo del estudio, se evaluaron 199 hemocultivos positivos monomicrobianos. En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos de la identificación bacteriana utilizando el sistema Vitek-2 compact mediante inoculación directa a partir de hemocultivo positivo y el método convencional. La concordancia en la identificación bacteriana fue del 86.4% (172/199) en género y especie del total de cocos grampositivos estudiados.

Identificación bacteriana directa de hemocultivo positivo

Analizando por separado los géneros *Staphylococcus* y *Enterococcus*, los resultados obtenidos fueron los siguientes: de 163 especies de estafilococos, 107 (65%) correspondieron a *Staphylococcus aureus*, 39 (23.9%) a *Staphylococcus epidermidis*, 16 (9.8%) a Estafilococos coagulasa negativa, y uno fue identificado como *Micrococcus luteus*. De las 36 especies de enterococos estudiadas, 27 (75%) correspondieron a *Enterococcus faecalis* y 9 (25%) a *Enterococcus faecium*.

La concordancia total en la identificación dentro del grupo de los estafilococos, fue del 87.7%. Si analizamos las identificaciones correctas según las especies la coincidencia con el método de referencia fue: *Staphylococcus aureus* 89/107 (83.2%), *Staphylococcus epidermidis* 37/39 (94,8%) y Estafilococos coagulasa negativa (ECN) 15/16 (93.75%). La concordancia global para las especies de enterococos fue del 83.3%. Y por especies, *Enterococcus faecalis* 26/27 (96,3%) y *Enterococcus faecium* 4/9 (44%) (Tabla 5).

En cinco de los 163 estafilococos (3%), el sistema Vitek-2 compact no dio ningún resultado en la identificación. De los *Staphylococcus aureus*, catorce (13%) fueron mal identificados, ya sea por dar un resultado incorrecto a nivel de especie o por baja discriminación, tal como podemos observar en la Tabla 5. En la mayoría de los casos, pudo ser debido a que el número de bacterias en la suspensión utilizada para la inoculación de la tarjeta del Vitek-2 compact fue demasiado baja para una identificación precisa, ya que no se pudo conseguir un Mc Farland >1.5.

De los 36 enterococos, tal como observamos en la Tabla 5, seis fueron mal identificados a nivel de especie. La mayor parte correspondieron a *Enterococcus faecium* que fueron incorrectamente identificados como *Enterococcus gallinarum*.

Tabla 5. Rendimiento del Vitek-2 compact para la identificación de cocos grampositivos directamente de hemocultivo positivo

Especies	N° aislamientos			
	Identificación correcta	No identificados	Mal identificados	
Estafilococos (163)				
<i>S. aureus</i>	107	89 (83.2%)	4	14 ^a
<i>S. epidermidis</i>	39	37 (94.8%)	0	2 ^b
Otros coagulasa negative	16	15	1	0
<i>Micrococcus luteus</i>	1	1	0	0
Enterococos (36)				
<i>E. faecalis</i>	27	26(96.3%)	0	1 ^c
<i>E. faecium</i>	9	4 (44%)	0	5 ^d
Total	199	172 (86.4%)	5	22

^a *S.intermedius* 5), *Kocuria* spp.(2), *Aerococcus* sp.(1), *S.cromogenes* (2), débil discriminación *S.caprae* /*S.aureus*(3),*S.lentus* (1)

^b *Kocuria* sp.

^c *E.gallinarum*

^d *E. faecalis* (1), *E. gallinarum* (4)

Estudio de la sensibilidad antibiótica directamente del hemocultivo positivo

El estudio de la sensibilidad antibiótica no se realizó de todos los aislamientos, sólo fue analizado el primer frasco positivo de cada paciente. Del total de 199 hemocultivos positivos, se incluyeron 133 que correspondieron a 107 estafilococos (66 *Staphylococcus aureus*, 27 *Staphylococcus epidermidis* y 14 Estafilococos coagulasa negativa) y 26 enterococos (18 *Enterococcus faecalis* y 8 *Enterococcus faecium*).

Para el género *Staphylococcus*, se analizaron un total de 2036 combinaciones de antibióticos. Globalmente, la concordancia de categoría, de los resultados obtenidos de la comparación entre el sistema Vitek-2 compact directo de hemocultivo y por el método convencional, fue del 98.18 %. El porcentaje total de errores fue del 1.82 % y su distribución según el tipo, 1.04% (4/383) correspondían a un error muy grave, 0.18 % (3/1614) a un error grave y 0.36% (13/2036) a errores menores. (Tabla 6).

Para el cálculo del porcentaje de los errores se siguieron las recomendaciones de Murray *et al* [159, 168]. La distribución de los errores según el antibiótico, comparando el método de inoculación directa con el método convencional se muestran en la Tabla 7. Se obtuvo una concordancia >95% para todos los antibióticos probados excepto para levofloxacino (94%). La mayoría de los resultados de falsa sensibilidad se observaron con el cotrimoxazol, 3 de los 4 errores muy graves, uno de ellos en un aislamiento de *Staphylococcus aureus*.

De los 66 *Staphylococcus aureus* evaluados en el estudio de sensibilidad, 15 fueron resistentes a la meticilina. El sistema Vitek- 2 detectó por el método directo, todos los casos de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), excepto uno. Este aislamiento presentó para la oxacilina una categoría de sensible por el método directo y resistente por el método convencional. Aunque de todas maneras, el sistema Vitek-2 alertó de que se trataba de un fenotipo incoherente, ya que el pocillo de la cefoxitina para la detección del gen *mecA*, era positivo. El sistema Vitek-2 mediante inoculación directa, detectó correctamente los 51 *Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina (MSSA).

Para el género *Enterococcus*, de las 520 combinaciones de antibióticos analizadas por el sistema Vitek-2, la concordancia de categoría fue del 98.3% al comparar el método de inoculación directa con el método convencional. El porcentaje global de errores fue del 1.67% y su distribución según errores muy graves, graves y menores fue del 0.3% (1/280), 0.8% (2/225) y 0.57% (3/520) respectivamente. (Tabla 6). Se obtuvo una concordancia >95% para todos los antibióticos. La mayoría de los errores se detectaron en *Enterococcus faecalis* (5 de 6), pero ninguno afectó a la ampicilina. En *Enterococcus faecium* sólo se detectó un error que afectó a la vancomicina. (Tabla 8)

Tabla 6. Concordancia en la categoría interpretativa entre Vitek-2 compact directo y el método de referencia

Categoría interpretativa	No. de antibióticos ensayados	No. de antibióticos concordantes (%)	No. de errores muy graves (%) ^a	No. de errores graves (%) ^a	No. de errores menores (%) ^a
Estafilococos					
Sensible	1614	1611(99,8%)			
Intermedio	39	35 (89,74%)			
Resistente	383	370 (96,6%)			
Total	2036	2016 (98,1%)	4^b (1,04%)	3^c (0,18%)	13 (0,6%)
Enterococos					
Sensible	225	223 (99,1%)			
Intermedio	15	13 (86,6%)			
Resistente	280	278 (99,3%)			
Total	520	514 (98,3%)	1^d(0,3%)	2^e (0,8%)	3 (0,57%)

^a El denominador para los errores graves es el total de n° de bacterias susceptibles determinadas por el método convencional, para los errores muy graves es el total de las bacterias resistentes determinadas por el método convencional. Para los errores menores, el denominador es el total de n° total de combinaciones de antibióticos.

^b *Staphylococcus aureus* (2), *Staphylococcus epidermidis* (1), ECN (1)

^c *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* , ECN

^d *Enterococcus faecalis*

^e *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*

Tabla 7. Errores y concordancias en el análisis de las discrepancias del estudio de sensibilidad por el método directo en *Estafilococos*

Antibiótico	Concordancia Categoría (%)	N° errores muy graves (%)	N° errores graves (%)	N° errores menores
Penicil.lina	100			
Oxacil.lina	98,1	1* (0,9)	1 (0,9)	
Gentamicina	98,1			2 (1,8)
Tobramicina	97			3 (2,8)
Ciprofloxacino				1 (0,9)
Levofloxacino	94			6 (5,6%)
Eritromicina	100			
Clindamicina	100			
Quinopristina/Dalfopristina	100			
Telitromicina	100			
Linezolid	100			
Teicoplanina				1(0,9)
Vancomicina			1(0,9)	
Tetraciclina	100			
Fosfomicina			1(0,9)	
Nitrofurantoína	100			
Ac. Fusídico	100			
Rifampicina	100			
Cotrimoxazol	97	3** (2,8)		
Total 2036		4	3	13

* *S. aureus*

** *S. aureus*, *S. epidermidis*, ECN

Tabla 8. Errores y concordancias en el análisis de las discrepancias del estudio de sensibilidad por el método directo en *Enterococos*

Antibiótico	Concordancia Categoría (%)	Nº errores muy graves (%)	Nº errores graves (%)	Nº errores menores
Bencilpenicilina	100			
Ampicilina	100			
Cefuroxima	100			
Cefuroxima axetil	100			
Imipenem	100			
Gentamicina alto nivel	96	1(3,8) *		
Kanamicina alto nivel	100			
Estreptomycin alto nivel	96		1(3,8%)*	
Ciprofloxacino	100			
Levofloxacino	100			
Eritromicina	96			1 (3,8) *
Clindamicina	100			
Quinupristina/Dalfopristina	96			1 (3,8) *
Linezolid	96			1(3,8) *
Teicoplanina	100			
Vancomicina	96		1(3,8) **	
Tigeciclina	100			
Nitrofurantoína	100			
Cloranfenicol	100			
Total 520		1	2	3

* *E.faecalis*

** *E.faecium*

Tiempo de obtención de los resultados

El tiempo promedio requerido para la obtención de los informes de identificación y antibiograma por el sistema Vitek-2 Compact realizado directamente de hemocultivo positivo, fue de $5,5 \pm 1,5$ h y $9,4 \pm 1,7$ h respectivamente, para el género *Staphylococcus*, y de $3,6 \pm 1,2$ h y $9,47 \pm 3,1$ h para el género de *Enterococcus*. No se detectaron diferencias cuando se compararon los resultados del tiempo promedio requerido, entre la utilización del método directo y el método convencional con el sistema Vitek-2 compact, excepto si se consideran las 18-24 horas de incubación necesarias para realizar la técnica a partir de subcultivo.

Tabla 9. Tiempo medio del resultado de identificación y antibiograma utilizando Vitek-2 compact directo de hemocultivo positivo

Vitek-2 directo de hemocultivo	Identificación (horas)	Antibiograma (horas)
Estafilococos	$5,5 \pm 1,5$	$9,4 \pm 1,7$
Enterococos	$3,6 \pm 1,2$	$9,5 \pm 3$

Objetivo 3

Estudiar la eficacia de Vitek-2 Compact para la identificación y determinación de la sensibilidad directamente de frascos de hemocultivo positivo pediátricos, así como el impacto clínico de la información rápida en esta población

De los 35 hemocultivos positivos incluidos en el estudio, 23 correspondían a bacilos gramnegativos y 12 a cocos grampositivos estafilococos. Los bacilos gramnegativos aislados fueron: 9 *Escherichia coli*, 6 *Klebsiella* spp, 4 *Salmonella* spp, 3 *Enterobacter* spp, 1 *Serratia marcescens*. En cuanto a los estafilococos, 7 aislamientos correspondieron a *Staphylococcus aureus* y 5 a Estafilococos coagulasa negativa. La concordancia global del sistema Vitek-2 compact en la identificación bacteriana fue del 85,7% (30/35) del total de muestras pediátricas analizadas. En el grupo de los estafilococos todas las identificaciones resultaron concordantes, excepto dos de los 7 aislamientos de *Staphylococcus aureus* que no fueron correctamente identificados. En el grupo de las enterobacterias, hubo una *Salmonella enterica* serovar *Typhi* y una *Salmonella* entérica que el Vitek-2 no identificó, y un *Enterobacter* spp mal identificado como *Raoutella ornithinolytica*.

Tabla 10. Rendimiento del vitek-2 para la identificación directamente de hemocultivo positivo

Microorganismo	Numero de aislamientos			
	Total	Identificados correctamente	No identificados	Mal identificados
Estafilococos (12)				
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	5	0	2 ^a
<i>Estafilococo coagulasa negativa</i>	5	5	0	0
Enterobacterias (23)				
<i>Salmonella</i> spp	4	2	2 ^b	0
<i>Klebsiella</i> spp.	6	6	0	0
<i>E.coli</i>	9	9	0	0
<i>Enterobacter</i> spp	3	2	0	1 ^c
<i>S. marcescens</i>	1	1	0	0
Total	35	30 (85,7%)	2	3

a *Kocuria* sp / *S. lentus*

b *Salmonella Typhi* / *Salmonella* spp

c *Raoutella ornithinolytica*

De las 618 combinaciones de antibióticos analizadas por el sistema Vitek-2 compact, y comparadas con el método de referencia, la concordancia completa a nivel de categoría fue

>99%. Si analizamos por separado los antibióticos estudiados en los bacilos gramnegativos y en los grampositivos, la concordancia observada fue del 99,56% y 99,4% respectivamente. Utilizando el método de inoculación directa para el estudio de la sensibilidad antibiótica mediante el sistema Vitek-2 compact, no se detectó ningún error muy grave. El porcentaje de errores graves y errores menores que ocurrieron en comparación con el método de referencia fueron, 0,2% (1/499) y 0,16% (1/618) respectivamente. El error grave fue observado en el grupo de los estafilococos, concretamente se detectó en un Estafilococo coagulasa negativa en la oxacilina. En las enterobacterias también se produjo un solo error, correspondiendo a un error menor que afectó a la piperacilina en un aislamiento de *Escherichia coli*.

Tabla 11. Concordancia en la categoría interpretativa entre el Vitek-2 compact directo y el método de referencia

Categoría interpretativa	Nº de antibióticos testados	Nº de muestras concordantes (%)	Nº errores muy graves (%) ^a	Nº errores mayores (%) ^a	Nº errores menores (%) ^a
Estafilococos					
Sensible	147	146			
Intermedio	2	2			
Resistente	43	43			
Total	192	191 (99,4%)	0	1 (0,6)^b	0
Enterobacterias					
Sensible	352	352			
Intermedio	5	4			
Resistente	69	69			
Total	426	425 (99,8%)	0	0	1 (0,2)^c
Estafilococos y Enterobacterias	618	616 (99,56%)	0	1 (0,2)	1 (0,16%)

^a El denominador para los errores graves es el total de nº de aislamientos sensibles determinados por el método convencional, para los errores muy graves es el total de aislamientos resistentes determinados por el método convencional. Para los errores menores el denominador es el total de aislamientos analizados por el método convencional.

^b ECN (oxacilina)

^c *E. coli* (piperacilina)

Del total de enterobacterias analizadas, dos aislamientos que correspondían a un *Enterobacter cloacae* y una *Salmonella* spp. fueron productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). El sistema vitek-2 compact directo alertó de la posibilidad de BLEE en los dos casos. Todos los

aislamientos de *Staphylococcus aureus* fueron sensibles a oxacilina, siendo correctamente detectados por el sistema Vitek-2 que no mostró ninguna falsa resistencia, en este grupo de microorganismos.

En cuanto a los tiempos necesarios para la obtención de un resultado de identificación y antibiograma mediante inoculación directa, la media del tiempo de detección fue de $5 \pm 1,7$ y $7,7 \pm 1,8$ para gramnegativos y grampositivos respectivamente, es decir, de 24 a 48 horas antes que utilizando los métodos convencionales.

Los 35 aislamientos estudiados correspondían a 32 pacientes. Tres bacteriemias por estafilococo coagulasa negativa fueron consideradas contaminantes, después de una valoración conjunta entre el pediatra y el microbiólogo. La edad media de los pacientes fue de 2,7 años, con un rango comprendido entre los 4 días y los 17 años.

La mitad de los episodios de sepsis fue de adquisición en el hospital. En cuanto al foco de origen de los diferentes episodios de bacteriemia, 16 tuvieron un origen primario, 6 fueron de foco urinario, 6 de foco en el catéter y 4 de foco osteoarticular.

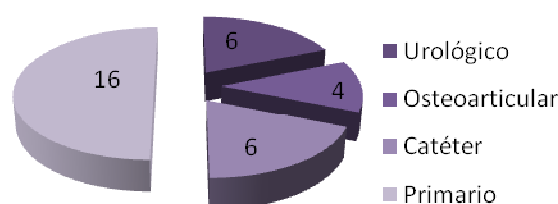


Figura 14. Focos de origen de la bacteriemia

En la siguiente tabla se muestra el listado de microorganismos más frecuentemente aislados según el foco de la bacteriemia.

Tabla 12. Microorganismos aislados según foco de la bacteriemia

Foco primario (16)	Foco urinario (6)	Foco en el catéter (6)	Foco osteoarticular (4)
<i>Klebsiella</i> spp (6)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (3)	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Salmonella</i> spp (4)		<i>Staphylococcus epidermidis</i> (3)	
<i>Enterobacter</i> spp (3)			
<i>Escherichia coli</i> (2)			
<i>Serratia marcescens</i> (1)			

En el grupo de bacteriemias de foco primario, la mayoría fueron de adquisición en el hospital. De los seis pacientes con bacteriemia por *Klebsiella* spp, cuatro eran prematuros, los pacientes con sepsis por *Enterobacter* spp presentaban como factor de riesgo, uno prematuridad y el otro una

neoplasia hematológica con neutropenia, y en el caso de las dos bacteriemias por *Escherichia coli*, una se trató de una sepsis neonatal precoz, y en la otra, el paciente presentaba una neoplasia hematológica con neutropenia. En las bacteriemias por estafilococo, tanto *Staphylococcus aureus* como *Staphylococcus epidermidis*, se relacionaron con la presencia de catéter intravascular, por lo que se consideraron bacteriemias de foco en el catéter.

Los microorganismos aislados con más frecuencia según el origen de adquisición de la bacteriemia se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Microorganismos aislados según origen de la bacteriemia

Comunitaria (16)	Nosocomial (16)
<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella</i> spp
<i>Salmonella</i> spp	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Enterobacter</i> spp	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Enterobacter</i> spp
	<i>Serratia marcescens</i>

De los 32 pacientes, 18 (56'25%) no presentaban ninguna enfermedad de base subyacente. Del resto de pacientes, nueve eran niños prematuros y cinco tenían una neoplasia hematológica con neutropenia. En cuanto a la presencia de factores de riesgo extrínsecos de infección, 8 eran portadores de catéter, 2 presentaban una neutropenia grave y 19 no presentaban ningún factor de riesgo.

Se revisó la actitud del pediatra ante la información personalizada por parte del microbiólogo de los resultados obtenidos por el sistema Vitek-2 compact directo de hemocultivo positivo y los resultados se presentan en la Tabla 14. En 21 de los 32 pacientes estudiados (65'62%), el resultado del hemocultivo positivo determinó cambios precoces en el tratamiento antibiótico. En 8 pacientes la información proporcionada dió lugar al inicio de la terapia antibiótica, en un paciente la terapia empírica fue cambiada a una terapia efectiva, y en 12 a un antibiótico dirigido, de menor espectro y por lo tanto, con menos reacciones adversas y menor coste. En 10 (31'25%) de los pacientes no supuso ningún cambio en la terapia, ya que el tratamiento empírico inicial cubría el agente etiológico de la bacteriemia y era el de elección. Por último, en sólo un caso no se siguieron las recomendaciones indicadas por el microbiólogo (Datos presentados en ICAAC, Boston, September 12-15, 2010 (D-1538).

Tabla 14. Actitud clínica ante la información rápida y personalizada del laboratorio de microbiología

Recomendaciones	Nº (%)
Inicio del tratamiento antibiótico	8 (25%)
Tratamiento inicial correcto	10 (31'25%)
Cambio a un tratamiento efectivo	1 (3'1%)
Cambio al tratamiento de elección	12 (37'5%)
Ningún seguimiento de las recomendaciones	1 (3'1%)

Objetivo 4

Cuantificar el impacto sobre el tratamiento antibiótico, de la información rápida y personalizada de la identificación y antibiograma obtenidos directamente de hemocultivo positivo

Del total de 12.268 bacteriemias estudiadas durante el periodo comprendido entre el año 2002 y el año 2014, se revisó la actitud del clínico tras la información personalizada por parte del microbiólogo. La evolución de estos resultados se presentan en la Figura 15 y en la Tabla 15 los porcentajes actuales sobre la actitud clínica presentada.

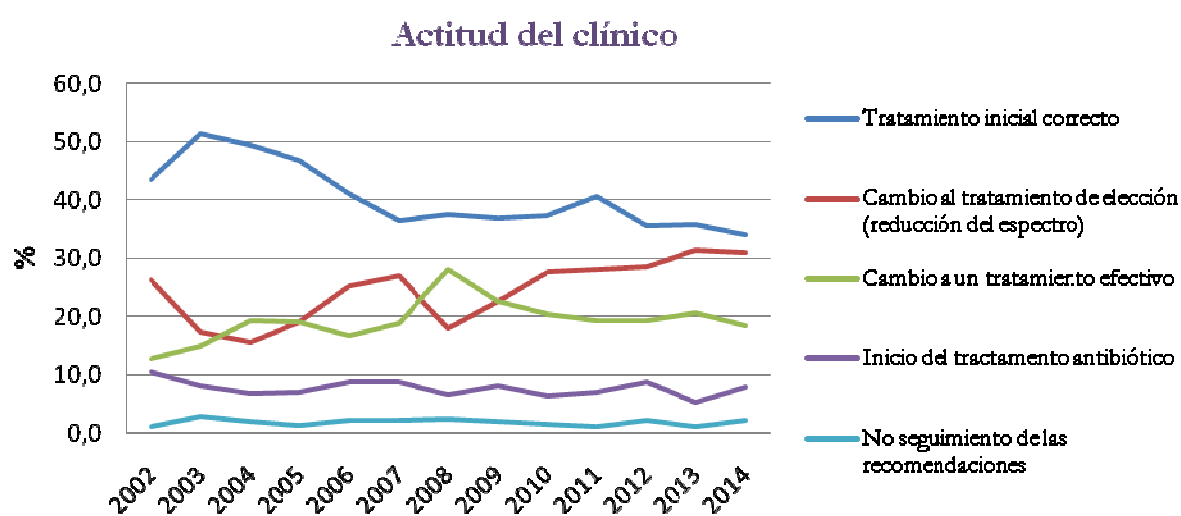


Fig. 15. Evolución de la actitud clínica ante la información rápida y directa por parte del laboratorio de microbiología en el periodo de 2002-2014

Tabla 15. Actitud clínica ante la información rápida y personalizada del laboratorio de microbiología en el año 2014

Recomendaciones	N° (%)
Inicio del tratamiento antibiótico	7.9%
Tratamiento inicial correcto	34%
Cambio a un tratamiento efectivo	18.5%
Cambio al tratamiento de elección	31%
Ningún seguimiento de las recomendaciones	2.2%
Acción desconocida	6.4%

Durante este periodo, en un porcentaje entre el 34-50%, de los pacientes se había iniciado un correcto tratamiento antibiótico empírico, tras la extracción del hemocultivo y antes de la información microbiológica. Durante el periodo del 2002 al 2005, este porcentaje se situó entre el 40-51%, disminuyendo posteriormente. En el 2014, el porcentaje de pacientes con el **tratamiento inicial correcto** antes de la información de los resultados microbiológicos fue del 34%. Coincidiendo con la disminución del porcentaje de tratamientos empíricos correctos, en el año 2004 se detectó un brote de *Klebsiella pneumoniae* BLEE que afectó a todo el hospital, y que provocó un aumento de los aislamientos clínicos de este microorganismo. Éstos llegaron a ser el 50% de todos los aislados de *Klebsiella* spp. durante tres años consecutivos como se puede observar en la Figura 16.

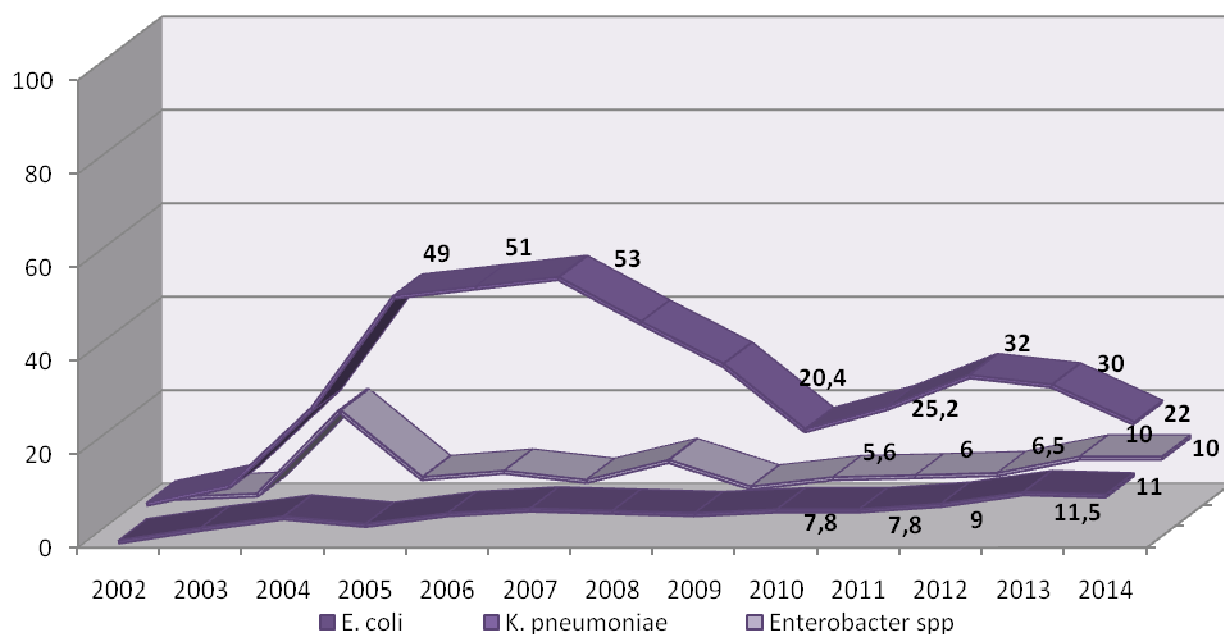


Figura 16. Evolución de las betalactamasas de espectro extendido en el Hospital Germans Trias i Pujol (2002-2014)

Y desde entonces, el hospital se encuentra en una situación de endemia, al igual que sucede con los aislamientos de *Staphylococcus aureus* SARM tal y como muestra la Figura 17.

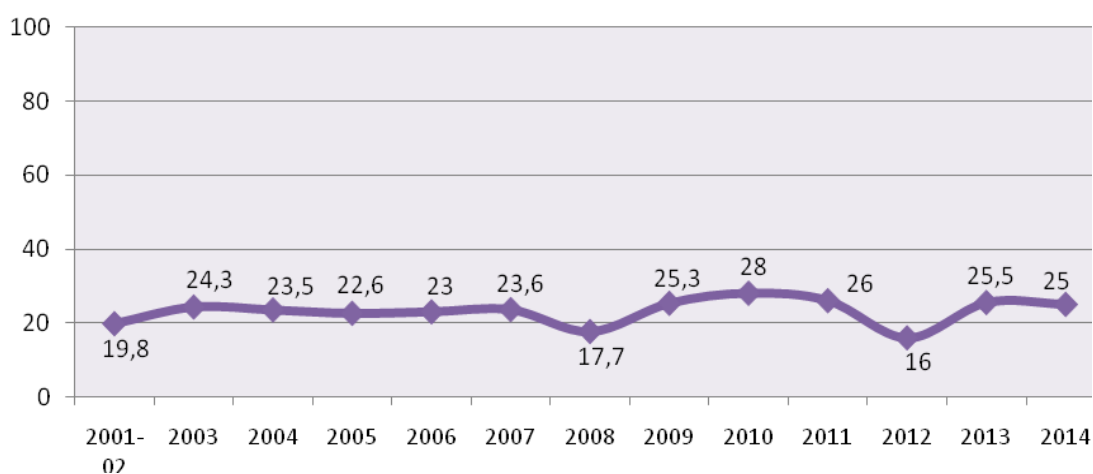


Figura 17. Evolució % *Staphylococcus aureus* resistent a metilicilina (SARM) 2001-2014

Esto provocó que cada vez hubiese más limitaciones y dificultades en la elección de un tratamiento empírico adecuado. En los años posteriores, se observa un claro aumento del porcentaje de pacientes en los que hubo que **cambiar a un tratamiento efectivo**, porque el antibiótico pautado no cubría el espectro de sensibilidad del microorganismo aislado, llegando a ser este porcentaje del 28% en el 2008. Actualmente este porcentaje corresponde a un 18,5%. Durante el periodo del 2005 al 2007, en un 25-28% de los pacientes, el médico responsable del paciente cambió el tratamiento empírico por el **tratamiento de elección**, es decir, un antibiótico de menor espectro, con menor repercusión en la selección de la flora multirresistente, y con menor coste. Posteriormente, a partir del 2009, continúa observándose una clara tendencia en el aumento del porcentaje de cambios de tratamiento, al de elección, situándose actualmente en un 31%. Durante todo el periodo revisado, en un 10% de los casos la información microbiológica ha comportado el **inicio del tratamiento antibiótico**, porcentaje que se sigue manteniendo actualmente. Finalmente, destacar que sólo el 2% de los clínicos **no siguieron las recomendaciones** del microbiólogo, continuando el paciente con un tratamiento inadecuado para el microorganismo causal de la bacteriemia.

En la Figura 18 podemos observar que el impacto global que supone la información rápida y personalizada del microbiólogo en nuestro hospital es superior al 50%, ya sea como consecuencia del inicio del tratamiento antibiótico, de la disminución de su espectro de acción o del cambio a un tratamiento efectivo.

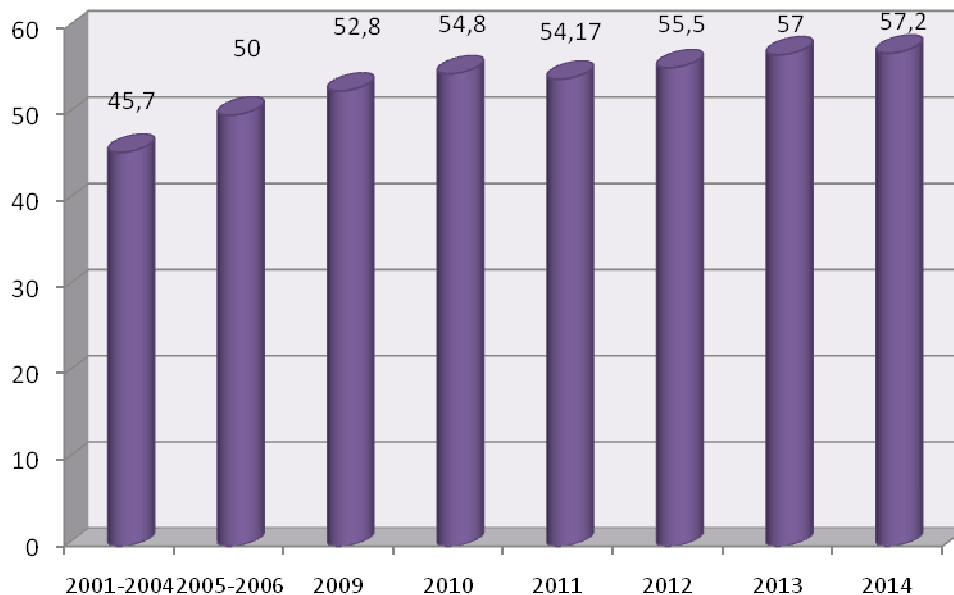


Figura 18. Impacto global de la información rápida y personalizada

Discusión

Objetivo 1

Estudiar comparativamente la eficacia de los sistemas automáticos, Vitek-2 Compact y MicroScan, para identificación y estudio de la sensibilidad antibiótica de bacilos gramnegativos directamente de hemocultivo positivo (sistema BacT/ALERT FA y FN) mediante el diseño de un protocolo de inoculación.

Utilizando el método de inoculación directo, ambos sistemas identifican correctamente más del 90% de los aislamientos de la familia *Enterobacteriaceae* incluidos en el estudio y el 89% de los aislamientos de *P. aeruginosa*. Concretamente Vitek-2 realizó la identificación correcta a nivel de especie en el 96.5% de los aislamientos del estudio, lo que indica una buena precisión del sistema, si se tienen en cuenta los criterios indicados en la 9^{va} Edición del Manual of Clinical Microbiology [77, 172], que señalan que cuando la identificación correcta es superior al 95% en los aislamientos comunes, el sistema de identificación es preciso.

Esta tasa de correlación para bacilos gramnegativos es muy similar o incluso mejor que la obtenida en estudios anteriores Bruins *et al* [175,81] describe una correcta identificación bacteriana del 93% en su publicación, que incluía 311 aislamientos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y 33 a bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNNF). Sin embargo, Cueto *et al* [90, 85, 78] sólo encontró un 62% de concordancia en las identificaciones en su trabajo, que incluía 41 cepas de enterobacterias y nueve cepas de BGNNF. La correlación en la identificación entre el método directo de hemocultivo y estándar para Hansen *et al* [103, 173] fue de 74,5% en un estudio que incluyó 160 cepas de enterobacterias y nueve cepas de *P. aeruginosa*. En 2001, Ling *et al* [65, 174] encontraron un acuerdo de identificación del 95% entre las 281 cepas incluidas en su estudio, en el que se encontraban 85 BGNNF. En este punto, destacar que todos los estudios descritos hasta el momento se realizaron utilizando, como nosotros, el sistema Vitek-2 compact, para identificación y estudio de la sensibilidad antibiótica directamente de hemocultivo positivo. Aunque a diferencia de nuestro trabajo, se utilizaron los frascos del sistema BACTEC 9240 (Becton Dickinson), que no contienen charcoal en el medio de cultivo, y por lo tanto no se enfrentaron a las dificultades que supone la obtención de un inóculo bacteriano correcto para la realización de la identificación y antibiograma directos. En estudios posteriores al nuestro, también con el sistema Vitek-2 compact y frascos del sistema BACTEC, la correlación de la identificación fue del 95,2% para Beuving *et al*, [62, 78] aunque sólo analizó 49 bacilos gramnegativos correspondiendo 7 a *Pseudomonas aeruginosa* y en el trabajo de Prod'hom *et al*, [79, 175] del 97,7% en 87 bacilos gramnegativos analizados, ninguno de ellos bacilos gramnegativos no fermentadores.

El único trabajo publicado con los frascos FAN del sistema BacT/ALERT® 3D (bioMerieux), pero posterior al nuestro, es el de Muñoz-Dávila *et al*, [103, 176], que utilizando también el sistema Vitek-2 compact, obtuvo una identificación correcta en el 97'9%. A diferencia de nuestro trabajo, incluyó un número ligeramente superior de bacilos gramnegativos, 142, pero con un mayor número de BGNNF, además de un mayor número de enterobacterias productoras de BLEE siendo todas ellas detectadas por el sistema Vitek-2 compact.

En el caso del sistema MicroScan, la correlación en cuanto a la identificación fue del 93'8 %. Este menor porcentaje con respecto al sistema Vitek-2 fue debido, por una parte, a la no identificación de 3 de los 9 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* y de una débil discriminación a nivel de especie en cuatro aislamientos de enterobacterias, que sí identificó a nivel de género. Existen escasos trabajos publicados sobre la evaluación del sistema MicroScan directamente de hemocultivo positivo. En un estudio anterior al nuestro, Waites *et al*, [78,60,175], comparó el sistema MicroScan a partir de subcultivo y directo de hemocultivo positivo utilizando BacT/Alert, obteniendo datos muy similares a los nuestros. La identificación fue correcta en el 99%, si sólo se tiene en cuenta la de las enterobacterias, disminuyendo hasta un 93% si se incluyen todos los bacilos gramnegativos, ya que, al igual que en nuestro trabajo, la identificación de BGNNF presentó mayor dificultad.

En cuanto a los resultados del estudio de la sensibilidad antibiótica, otras evaluaciones comparativas entre diferentes sistemas han sugerido, que los errores muy graves deben ocurrir en <1,5%, los errores graves en <3% de todas los antibióticos analizados, y que la coorcondancia global entre el sistema analizado y el método de referencia debe ser superior al 95% [77, 79, 60, 85].

En nuestro estudio, todos los aislamientos, independientemente de si fueron o no correctamente identificados, se incluyeron en la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana, ya que en caso contrario podrian subestimarse las tasas de error. Al igual que en el trabajo de Waites *et al*, [186, 60, 187], la mayor parte de los errores encontrados fueron errores menores acumulados en la categoría intermedia. El porcentaje de errores muy graves obtenidos por ambos sistemas fue muy inferior al fijado como óptimo, 0.36% para el sistema Vitek-2 y 0.5% para el sistema MicroScan. El porcentaje de errores mayores fue del 0'05 % en el sistema Vitek-2, no obteniéndose ninguno en el caso del MicroScan. En cuanto al porcentaje de concordancia en la categoría clínica fue superior al 98% en ambos sistemas. Por tanto, ambos sistemas resultan fiables para el estudio de la sensibilidad antimicrobiana directamente del hemocultivo positivo.

Sin embargo, en el caso del trabajo realizado por Waites *et al*, [77, 60, 78], la conclusión fue que el sistema Microscan no era un sistema fiable por el método de inoculación directa, ya que si bien

la concordancia de categoría a nivel de sensibilidad antibiótica fue de un 94,7%, el porcentaje de errores muy graves fue del 2,7%, por encima de lo permitido según los criterios aceptados. De manera que, los resultados de sensibilidad debían comprobarse siempre, pues presentaban un alto porcentaje de falsas sensibilidades.

En cuanto al sistema Vitek-2, la mayoría de estudios citados en el apartado de identificación, obtuvieron resultados similares cuando analizaron el estudio de sensibilidad antibiótica con el sistema Vitek-2 mediante la inoculación directa de frascos de hemocultivo positivos a partir del sistema BACTEC [188, 81, 85, 74, 78, 175]. Sin embargo, en nuestro estudio, se utilizan frascos de hemocultivo positivos incubados en el sistema BacT/ALERT® 3D (bioMérieux) que contienen charcoal, lo que supone una gran dificultad para la identificación y estudio de la sensibilidad por inoculación directa mediante el sistema Vitek-2. Posteriormente a nuestro trabajo, Muñoz-Dávila *et al*, [104, 176, 171] también utilizaron frascos FAN con charcoal obteniendo resultados muy similares, aunque con un ligero porcentaje mayor de errores. La tasa de errores encontrados fue, del 0,6% para errores muy graves, 0,1% para errores graves, y un 2% de errores menores.

Nuestro protocolo de inoculación, que como ya hemos descrito, consiste en dos etapas de centrifugación de sólo 20' de duración, es sencillo y rápido de realizar, permitiendo eliminar el carbón activado sin utilizar tubos y/ o incubaciones con detergentes adicionales que retrasan y encarecen los costes de la técnica. Como es el caso de Prod'hom y Lupetti [121, 175, 189, 99, 123] que incuban el hemocultivo durante 15-20' con un detergente antes de las centrifugaciones, lo que implica más tiempo en la realización de la técnica.

Varios estudios han demostrado que el retraso en el inicio de una terapia antibiótica efectiva está directamente relacionado con la evolución clínica y la supervivencia de los pacientes [190, 177, 191, 170]. Por lo tanto, las pruebas de sensibilidad directa pueden contribuir a disminuir la morbilidad y la mortalidad relacionadas con la sepsis.

En nuestro hospital, las enterobacterias productoras de BLEE se han convertido en endémicas, sobre todo tras la producción de un brote nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* en el año 2004-2005. Esto ha supuesto, entre otros factores, que actualmente casi el 20% de todos los aislamientos con enterobacterias, de las muestras clínicas analizadas en el laboratorio sean productoras de BLEE. Como consecuencia, en un porcentaje no despreciable, concretamente un 18%, el tratamiento empírico de las bacteriemias revisadas durante el año 2014 fue inadecuado, siendo necesario cambiar a un tratamiento efectivo (este dato se analizará más detenidamente en el objetivo 4).

El sistema Vitek-2 proporciona los resultados de identificación y sensibilidad antibiótica directamente de hemocultivos positivos FAN BacT / ALERT, obteniendo datos fiables de identificación de manera rápida, en un tiempo de sólo en $4,57 \pm 1,37$ h, y de sensibilidad en sólo $6,52 \pm 1,64$ h, permitiendo la reducción en el tiempo de emisión de los resultados en aproximadamente 36-48 horas con respecto a los métodos convencionales. Esto significa que tras la información de la tinción de Gram del hemocultivo positivo, en aproximadamente unas 4-5 horas podremos disponer del microorganismo etiológico y sólo en 6-7 horas del antibiograma. Por lo tanto en la mayoría de los casos podremos informar de resultados definitivos en 24 horas desde la extracción del hemocultivo.

Después de una exhaustiva búsqueda bibliográfica, no hemos podido encontrar ningún trabajo en que se analice el número de horas hasta la obtención de los resultados finales de identificación i antibiograma, mediante el sistema Vitek-2 compact, directamente del hemocultivo positivo. En la discusión de los artículos, los diferentes autores sólo hacen constar que los resultados de identificación y antibiograma, directamente de hemocultivo, se pueden obtener un día antes que cuando se utilizan los métodos convencionales.

El disponer lo antes posible de la identificación y sensibilidad del agente etiológico de un episodio de bacteriemia, permitirá modificar un tratamiento empírico inadecuado y el inicio de las medidas de aislamiento de contacto, en el caso que fuesen necesarias, antes que si se utilizan los métodos diagnósticos convencionales [11, 178, 179]. Otra ventaja del sistema Vitek-2 utilizado directamente del hemocultivo positivo es que permite consultar el estado de los resultados de sensibilidad, concretamente, la concentración mínima inhibitoria (CMI), a medida que van siendo emitidos por el sistema, sin necesidad de que finalice el período de incubación de todos los antibióticos. De esta manera, podemos tener acceso a los resultados de algunos antibióticos incluso antes de las 6 horas. Esta ventaja no está presente con el sistema Microscan, ya que los resultados de los antibióticos se emiten cuando finaliza el proceso de incubación de todos ellos, con una duración de 18-24 horas.

En este estudio, se demuestra la utilidad del protocolo para la identificación y estudio de susceptibilidad de la familia *Enterobacteriaceae* directamente de hemocultivos BacT / ALERT FA y FN que contiene partículas de carbón. La identificación de bacilos gramnegativos no fermentadores fue menos fiable con un 88% de los aislamientos, aunque sólo se procesaron 9 hemocultivos positivos para este grupo de microorganismos. En cuanto al estudio de sensibilidad de estos nueve aislados de *Pseudomonas aeruginosa*, sólo se obtuvo un error muy grave detectado en la piperacilina, que es un antibiótico no utilizado en la práctica clínica. Por lo tanto, los resultados

obtenidos en BGNNF son muy favorables, aunque deben interpretarse con precaución, debido al bajo número de aislamientos incluidos.

Los hemocultivos positivos polimicrobianos se descartaron para la evaluación de la eficacia de los dos sistemas ya que pueden ser una fuente de error.

Sin embargo, la técnica actual ha demostrado, en nuestra rutina diaria, (datos no mostrados), que puede ser utilizado para proporcionar datos preliminares de susceptibilidad directamente del hemocultivo positivo, aunque el hemocultivo sea mixto.

Como el principal objetivo del laboratorio de microbiología es proporcionar de manera rápida, resultados fiables y clínicamente relevantes, la inoculación directa de tarjetas en el sistema Vitek-2 compact a partir de hemocultivos positivos, puede contribuir al inicio precoz del tratamiento adecuado. Sin embargo, el uso de este procedimiento puede implicar inexactitudes derivadas de errores menores en la determinación de la sensibilidad o también en la identificación, si el cultivo es polimicrobiano.

Por lo tanto, un microbiólogo clínico debe estar disponible durante un horario de 24 horas. Ofreciendo una atención continuada para poder revisar e informar los resultados cuanto antes, aprovechando al máximo la rapidez que nos aporta el sistema Vitek-2 compact. Por otro lado, el panel MicroScan también podría ser una buena opción. Ya que sus resultados son muy similares a los obtenidos por el sistema Vitek-2 compact, en cuanto a identificación y estudio de sensibilidad antibiótica. La única diferencia está en los tiempos de obtención de los resultados, ya que son necesarios 18-24 horas de incubación, por lo que en laboratorios donde no exista la posibilidad de horario continuado del servicio de Microbiología podría ser una opción muy válida.

Destacar que la evaluación del sistema MicroScan se realizó con los paneles Combo orina 1S, pero durante el período del estudio también existían en el mercado paneles de lectura rápidos fluorogénicos. Aunque en nuestro caso no los pudimos evaluar debido a que el charcoal presente en el medio del hemocultivo, interfería en la lectura de los resultados. Actualmente no existen en el mercado paneles de lectura rápidos, para identificación y antibiograma a la vez, aunque están en vías de desarrollo.

Durante el período de evaluación se pudieron constatar los beneficios que ofrece el sistema Vitek-2 y se procedió a su implementación en el laboratorio, debido a que los resultados indicaron que se trata de un sistema fiable, para la identificación y antibiograma directamente de hemocultivos positivos.

Objetivo 2

Evaluar la eficacia del sistema Vitek-2 Compact para identificación y estudio de la sensibilidad antibiótica de cocos grampositivos directamente de hemocultivo positivo (sistema BacT/ALERT FA y FN), mediante el diseño de un protocolo modificado de inoculación.

Aunque en los últimos años se ha detectado un aumento progresivo de la incidencia de bacteriemia por bacilos gramnegativos, las bacteriemias producidas por microorganismos grampositivos continúan siendo un problema importante en el manejo clínico de los pacientes. Como consecuencia de los avances en la medicina, se ha producido un aumento en el número de pacientes con factores de riesgo para desarrollar una infección nosocomial tanto por *Staphylococcus aureus* como por *Enterococcus* spp (ingreso en UCI, inmunosupresión, uso previo de antibióticos, uso de catéteres, etc)

Staphylococcus aureus es una causa frecuente de bacteriemia tanto nosocomial como de origen extrahospitalario, y a menudo asociada a una elevada morbilidad y mortalidad. Con una elevada frecuencia, los pacientes pueden desarrollar complicaciones graves inmediatas (endocarditis, abscesos metastásicos, etc) o tardías (especialmente manifestaciones osteoarticulares) [192, 180, 181]. Además, la aparición cada vez más frecuente de cepas de *Staphylococcus aureus* SARM ha complicado el tratamiento, siendo en estos casos la vancomicina el tratamiento de elección. Pero, debido al incremento en la utilización de glicopéptidos, están apareciendo cepas de *Staphylococcus aureus* SARM con sensibilidad disminuida a la vancomicina.

La bacteriemia por *Enterococcus* spp ha adquirido un papel relevante en los últimos años, principalmente a nivel nosocomial. Esto es debido a la dificultad de tratamiento condicionada por su resistencia intrínseca a la mayoría de los antibióticos, entre los que destacan las cefalosporinas, ampliamente utilizadas en la práctica clínica. De las especies de enterococo, *Enterococcus faecalis* es la especie más frecuentemente aislada seguida de *Enterococcus faecium*, y otras, mucho menos frecuentes, como *Enterococcus gallinarum* y *Enterococcus durans*. En los últimos años, se ha descrito un importante aumento en el número de infecciones causadas por *Enterococcus faecium*, que al presentar mayores problemas de multirresistencia que *Enterococcus faecalis*, supone una gran limitación en el tratamiento [193, 182, 194, 183]. Al igual que las infecciones invasivas causadas por SARM, las producidas por enterococos multirresistentes se han asociado a una peor respuesta clínica [184].

De ahí la importancia y necesidad del diagnóstico etiológico y la realización del estudio de sensibilidad antibiótica en las infecciones por grampositivos, especialmente en las causadas por cepas multirresistentes, lo más precoz posible. La terapia empírica inadecuada se asocia a tasas de mortalidad más altas, estancias hospitalarias más prolongadas, y un aumento de los costes económicos.

Una clara ventaja de los actuales sistemas automáticos como Vitek-2, es el poder realizar de forma simultánea identificación y antibiograma, pero desde hace unos años, además, se pueden realizar directamente desde el hemocultivo positivo, obteniendo los resultados un mínimo de 24 h antes que con los métodos convencionales. Este procedimiento se ha aplicado para bacilos gramnegativos sin demasiados problemas, obteniendo resultados de identificación que van del 62-93% dependiendo del protocolo de trabajo para la obtención del inóculo bacteriano y del sistema automático utilizado [185,74, 176]. Desafortunadamente, los resultados de la inoculación directa para cocos grampositivos no han sido tan satisfactorios [85, 76, 90, 145]. Una de las principales fuentes de error con la que se han encontrado los diferentes autores, ha sido el bajo inóculo bacteriano conseguido cuando se aplicaban los mismos protocolos que para bacilos gramnegativos. En los últimos trabajos publicados sobre el tema, todos ellos realizados utilizando el sistema BACTEC, la adición de detergentes como la saponina, el cloruro de amonio y la utilización de tubo separador en las centrifugaciones entre otros, ha conseguido mejorar los resultados [77, 99, 175, 78]. Sólo se describe un trabajo con el sistema BacT/ALERT a partir de frascos FAN con charcoal, en el que los autores utilizan también varias centrifugaciones, pero con una incubación previa con saponina [103].

En nuestro estudio, añadimos una pequeña variación al protocolo de centrifugación antes descrito para bacilos gramnegativos [159], y un paso de sonicación para conseguir descartar el charcoal y obtener por tanto, una mayor concentración de microorganismo. Aplicando este simple procedimiento, el sistema Vitek-2 compact identifica correctamente el 86'4% de las especies de estafilococos y enterococos analizadas. Estos resultados son comparables al 89% obtenido por Lupetti *et al* [77], pero utilizando un protocolo más largo, consistente en una incubación de 20' con saponina y posterior centrifugación antes de la inoculación en el sistema Vitek-2 compact, aunque destacando que el número de muestras fue muy reducido, sólo 55 entre las cuales sólo había 3 *Staphylococcus aureus* y 3 *Enterococcus spp.* Resultados más bajos de concordancia han sido obtenidos por otros estudios, como el de Prod'hom *et al* [175], donde se incluyeron sólo 77 muestras, entre las que no había ningún enterococo, obteniéndose una concordancia de sólo el 74% y además utilizando un protocolo más laborioso y largo comparado con el nuestro, varias centrifugaciones del hemocultivo seguidas de incubación con cloruro de

amonió. Otros autores, incluso deciden realizar la identificación por otro método que no sea un sistema automático debido a los malos resultados obtenidos [90, 78]. En el único trabajo realizado en hemocultivos con charcoal, Barreales et al [103] obtienen una concordancia del 82% pero sólo analizan 55 muestras entre las que únicamente se incluyen 13 *Staphylococcus aureus* y 4 *Enterococcus sp.*

En nuestro caso, para la identificación de estafilococos directamente del hemocultivo positivo también se utilizó la prueba de la coagulasa en tubo, ya evaluada por otros autores [65], con lectura a las 4 y 24 horas. El resultado de esta prueba, leída a las 4 h junto con la tinción de Gram [62], fue utilizada para los casos en los que el sistema Vitek-2 compact directo no fue capaz de identificar la especie de estafilococo. En la mayoría de los casos en los que *Staphylococcus aureus* fue mal identificado o no identificado, se pudo comprobar que el número de bacterias en la suspensión bacteriana utilizada para la inoculación de la tarjeta, fue inferior a la requerida para una identificación correcta, con un Mc Farland inferior a 1'5.

Con respecto al análisis de sensibilidad antibiótica en el grupo de los estafilococos, nuestros resultados han sido comparables a los obtenidos con el Vitek-2 compact a partir de subcultivo, que fue el método utilizado de referencia. La concordancia a nivel de categoría clínica fue del 98.18%, con un porcentaje de errores muy graves y graves bajos, del 1.04% y 0.18% respectivamente, cumpliendo con las normas propuestas por Jorgensen *et al* [79]. Son porcentajes de concordancia a nivel de categoría, muy similares a los obtenidos por otros autores, sin embargo, en el trabajo de Lupetti *et al*, [77] el porcentaje de errores muy graves fue mucho mayor, de un 1'5%, la mayoría en el cotrimoxazol y la eritromicina. Al igual que Prod'hom *et al*, [175] que con un porcentaje de errores muy graves, del 0'7%, la mayoría se obtuvieron en el cotrimoxazol. Kerremans *et al*, [76] obtuvo un porcentaje de errores muy graves de 0'8%, levemente inferior al nuestro, pero la mayoría de errores ocurrieron en la oxacilina con mayores repercusiones a nivel clínico. En el caso de Barreales *et al*, [103], utilizando el sistema BacT/Alert, los errores muy graves obtenidos fueron del 0'5% pertenecientes principalmente al cotrimoxazol y oxacilina.

Destacar que se obtuvo un acuerdo categórico de >95% para todos los antibióticos, excepto para levofloxacino (94%), aunque por encima de los porcentajes propuestos por Jorgensen. Sin embargo, otros autores, como ya hemos comentado, han encontrado frecuentemente porcentajes de concordancia más bajos del 90% para este antibiótico, de entre el 86-88%, [78, 175] Varios trabajos también coinciden con la presencia de altos porcentajes de errores en el cotrimoxazol, [77, 60, 85] aunque esto no sucedió en nuestro estudio, en que la concordancia categórica del cotrimoxazol fue del 97% con respecto al método de referencia. Es importante destacar que los 3 errores que se detectaron, fueron errores mayores, uno de ellos en un aislamiento de

Staphylococcus aureus. Esta falsa resistencia a cotrimoxazol implica que se confirme el resultado mediante el método de referencia, ya que en el caso de *Staphylococcus aureus* el porcentaje de cepas resistentes a cotrimoxazol, según nuestros datos es muy bajo, inferior al 2%. Para la oxacilina sólo se detectó un error, pero fue un error muy grave, de falsa sensibilidad, en un aislamiento de *Staphylococcus aureus*. En este caso, destacar que el pocillo de la cefoxitina que incorpora el sistema Vitek-2 para la detección del gen *mecA*, fue positiva. Según varios autores, la cefoxitina resulta un mejor predictor de la presencia del gen *mecA* que la CMI de la oxacilina [186, 187]. Por lo que este resultado no se hubiese informado sin confirmarlo con el método de referencia. El resto de *Staphylococcus aureus* SARM fueron detectados correctamente, al igual que la sensibilidad a la oxacilina en los *Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina. De todas maneras y con el objetivo de evitar errores y no retrasar el resultado, decidimos añadir al procedimiento directo del hemocultivo un antibiograma con E-test de oxacilina y disco-difusión de cefoxitina, utilizando Mueller Hinton-Sal, realizado al mismo tiempo que inoculábamos las tarjetas.

En cuanto a los enterococos, los trabajos publicados sobre la identificación y estudio de sensibilidad antibiótica de este microorganismo directamente de hemocultivo positivo [77, 78], son muy escasos y además incluyen un número reducido de muestras, como ya hemos comentado anteriormente, por lo que resulta difícil comparar los resultados.

En nuestro trabajo, de los 27 *Enterococcus faecalis* analizados, 26 fueron correctamente identificados a nivel de género y especie, sólo en un caso hubo una buena identificación de género pero la especie fue mal identificada como *Enterococcus faecium*. La concordancia obtenida en la identificación de *Enterococcus faecalis* fue >95%. No fue el caso de la mayoría de *Enterococcus faecium*, que de los nueve, cinco fueron mal identificados a nivel de especie como *Enterococcus gallinarum*. En todos los casos, el sistema experto del Vitek-2 compact alertó de que se trataba de un fenotipo incoherente, ya que *Enterococcus gallinarum* suelen ser sensibles a ampicilina y resistentes a vancomicina, y el perfil de sensibilidad que se mostraba era justo el contrario. En estos casos, en los que la identificación final a las 6 horas aproximadamente, no era correcta, realizamos unas sencillas pruebas para diferenciar *Enterococcus faecium* del resto de enterococos y que fueron, mupirocina y furazolidona [188]. De esta manera, en 18-24 h, se dispone de la identificación correcta y se puede introducir en el Vitek-2.

En general, la concordancia de categoría fue >95% para todos los antibióticos analizados en nuestro trabajo. Se detectaron muy pocos errores, sólo 0.3% de errores muy graves y un 0.8% de errores graves, que son porcentajes totalmente aceptables según la bibliografía. En el caso del error muy grave obtenido, ocurrió en un *Enterococcus faecalis* en la gentamicina de alto nivel, y los dos errores graves, uno en la estreptomina de alto nivel en un *Enterococcus faecalis* y otro en la

vancomicina en un *Enterococcus faecium*. Este último, obligará siempre a confirmar el resultado con el método de referencia, debido a la baja resistencia que presentamos a nivel local ya la dificultad de los sistemas automáticos para detectar resistencias de bajo nivel a los glicopéptidos. La comparación con otros trabajos, en cuanto a la sensibilidad en este grupo de microorganismos, no es posible por lo ya comentado anteriormente, el número de muestras analizadas son muy escasas, inferior a 10, y además los resultados se analizan conjuntamente con el grupo de estafilococos.

El sistema Vitek-2 proporciona los resultados de identificación y sensibilidad antibiótica directamente de hemocultivos positivos FAN BacT / ALERT, obteniendo datos fiables y rápidos de identificación de manera rápida, en un tiempo de sólo $5'5 \text{ h} \pm 1,5 \text{ h}$, en el caso de los estafilococos y de $3'6 \pm 1'2$ en el caso de los enterococos. Los tiempos de demora en el caso del estudio de la sensibilidad antibiótica para estafilococos fueron de $9'4 \text{ h} \pm 1,7 \text{ h}$ y en el caso de los enterococos de $9'5 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$. Este amplio rango de la desviación estándar para el antibiograma en enterococos, fue debido al retraso en el resultado de los aminoglicósidos de alto nivel, que no serían prioritarios en el tratamiento inicial.

De los trabajos revisados en la bibliografía, ninguno de ellos analiza el tiempo exacto que emplea el sistema Vitek-2 compact en informar los resultados finales de la identificación y de la sensibilidad antibiótica. En la discusión, los diferentes autores sólo comparan los resultados de identificación y antibiograma directamente de hemocultivo con los obtenidos por técnicas convencionales a partir de subcultivo, haciendo constar solamente que los métodos directos adelantan el resultado en unas 24 horas con respecto a los métodos convencionales.

Los resultados del estudio demuestran que el método desarrollado para la inoculación directa de las tarjetas Vitek-2 compact para antibiograma, presenta una excelente precisión tanto para estafilococos como enterococos. La precisión en la identificación fue algo inferior, aunque con mejores resultados que los trabajos publicados hasta ahora, y teniendo en cuenta que el carbón presente en el medio de cultivo es un factor muy limitante. El método de inoculación directa, precisa solamente de un simple procedimiento de menos de 30' de duración desde que se detecta el hemocultivo como positivo, mientras que el método convencional a partir de subcultivo tardaría entre 36-48 horas. Esto se traduce en una disminución en el tiempo de emisión de los resultados, informándose la identificación y el antibiograma el mismo día, sólo unas horas más tarde, que la tinción de Gram del hemocultivo positivo. Esto permitirá iniciar una terapia adecuada más rápidamente, lo que resulta en una disminución de la mortalidad y complicaciones asociadas, además de la estancia hospitalaria y los costes asociados [104, 171].

La menor precisión en la identificación sobre todo de *Staphylococcus aureus* por las consecuencias clínicas tan importantes que comporta, pero también de *Enterococcus faecium*, puede solventarse realizándola por otros métodos e introduciéndola en el sistema Vitek-2 para la interpretación del antibiograma. Así, en nuestro hospital, desde hace unos meses hemos introducido la identificación por espectrometría de masas Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time-of-Flight (MALDI-TOF) a partir de hemocultivo directo. De cada hemocultivo positivo se inoculara una gota en un medio de cultivo sólido (agar sangre), y después de una breve incubación a 36°C con 5% de CO₂, de aproximadamente unas 3 horas, se procede a la identificación mediante MALDI-TOF. De esta manera se reduce considerablemente el tiempo de identificación sin alterar la rutina diaria del laboratorio [121, 189, 123].

Objetivo 3

Estudiar la eficacia de Vitek-2 Compact para la identificación y determinación de la sensibilidad directamente de frascos de hemocultivo positivo pediátricos, así como el impacto clínico de la información rápida en esta población.

La sepsis es una entidad clínica grave, que produce una alta morbi-mortalidad en la población infantil, incluso superior a la de las neoplasias. En la infancia no existen suficientes estudios epidemiológicos, aunque se ha encontrado una incidencia de 56-60 sepsis /100.000 niños, siendo mucho más alta en menores de 1 año [190, 191]. En los estudios realizados en España se observa una incidencia y mortalidad similar [11]. Como sucede en adultos, el número de casos nuevos parece estar incrementándose, en relación con el aumento de la supervivencia de recién nacidos de muy bajo peso y de niños con enfermedades crónicas, ya que aproximadamente un 49% de los pacientes con sepsis, tienen enfermedades subyacentes. El panorama de la sepsis está cambiando en nuestro medio, por un lado, están disminuyendo las sepsis extrahospitalarias en pacientes sanos y producidos por microorganismos incluidos en el calendario de vacunación, y están aumentando en pacientes con enfermedad de base o inmunocomprometidos [192].

Al igual que en los adultos, la instauración de un paquete de medidas urgentes de reanimación y soporte hemodinámico, junto con el control del foco de infección y el inicio precoz de un tratamiento antibiótico adecuado, según las recomendaciones de la *American College of Critical Care Medicine* y la *Global Pediatric Sepsis Initiative* de la *World Federation of Pediatric Intensive Care and Critical Care Societies*, ha mejorado significativamente la evolución y el pronóstico del shock séptico pediátrico [193, 194]. Un retraso en el inicio de la terapia antibiótica efectiva puede conducir a peores resultados en la evolución clínica y dar lugar a un aumento de la mortalidad asociada.

El diagnóstico de certeza de la sepsis se realiza mediante el hemocultivo, que permite el aislamiento y la identificación de los agentes causales. Por lo que es importante minimizar los factores que pueden condicionar un resultado falso negativo. Diversos estudios han demostrado que uno de los factores que más influyen en la sensibilidad del hemocultivo es el volumen de sangre extraída para su realización [195]. De tal manera que paralelamente al diseño del estudio para la identificación y estudio de la sensibilidad antibiótica directamente de hemocultivos pediátricos PF BacT / ALERT que contienen charcoal, se optimizó el volumen de sangre necesario a extraer en función de la edad. Se estableció entonces el protocolo que se encuentra actualmente en vigor para aumentar el rendimiento de los hemocultivos pediátricos.

Utilizando el método de inoculación directo en los hemocultivos positivos de pediatría, Vitek-2 compact realizó la identificación correcta a nivel de género y especie en el 85,7 % de los aislamientos del estudio. En el caso de los estafilococos, dos hemocultivos con *Staphylococcus*

aureus fueron mal identificados, y al igual que en los adultos se pudo comprobar que el número de bacterias en la suspensión bacteriana utilizada para la inoculación de la tarjeta, fue inferior a la requerida para una identificación correcta, presentando un Mc Farland inferior a 1^5 . En el caso de las enterobacterias, en dos de las cuatro bacteriemias por *Salmonella* spp, el sistema Vitek-2 no fue capaz de dar ninguna identificación. Sólo fue mal identificado un *Enterobacter* spp, dado por el método directo como *Raoutella ornithinolytica*, seguramente debido a que ambos microorganismos están muy cercanos a nivel genético. Debemos tener en cuenta que el volumen de sangre inoculado en los frascos pediátricos es inferior al de los adultos, y que por lo tanto la alícuota extraída para llevar a cabo el protocolo de inoculación directa es también inferior. Este hecho unido a la presencia de charcoal en el medio de cultivo de los frascos pediátricos PF, conlleva muchas veces la obtención de una suspensión bacteriana insuficiente para una identificación correcta.

En cuanto al estudio de sensibilidad antibiótica, la concordancia completa a nivel de categoría fue $>99\%$ tanto para los bacilos gramnegativos como para los cocos grampositivos. Si comparamos estos datos con el estudio realizado en adultos, el porcentaje obtenido de concordancia fue muy similar o incluso mejor en pediatría, teniendo en cuenta, como se ha comentado anteriormente, que el cultivo del volumen de sangre es mucho menor y por lo tanto la probabilidad de obtener una suspensión bacteriana suficiente también es menor. Es de destacar que no se produjo ningún error muy grave, a diferencia de lo ocurrido en adultos, que aunque con un porcentaje inferior a lo recomendado ($<1^5\%$) se observaron errores muy graves en los dos estudios, tanto bacilos gramnegativos como cocos grampositivos. En cuanto, a los errores observados sólo fueron dos, una falsa resistencia en la oxacilina, que teniendo en cuenta que se detectó en un Estafilococo coagulasa negativa no hubiese provocado ninguna repercusión a nivel de política de aislamiento, a diferencia de si hubiese ocurrido en un *Staphylococcus aureus*. De todas maneras y para evitar errores se decidió añadir un E-test de oxacilina y disco-difusión de cefoxitina, utilizando Mueller Hinton-Sal, al mismo tiempo que inoculábamos las tarjetas de antibiograma para estafilococos, al igual que se hizo en adultos. El segundo error detectado fue un error menor en la piperacilina, en un aislamiento de *Escherichia coli* que no hubiese supuesto ningún problema a nivel del tratamiento.

Aunque el porcentaje de bacteriemias por microorganismos multirresistentes en el servicio de Pediatría del Hospital Germans Trias i Pujol es muy bajo, el sistema Vitek-2 mediante inoculación directa, fue capaz de detectar los dos aislamientos de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido. En los hemocultivos analizados no se detectó ningún

Staphylococcus aureus resistente a meticilina, todos fueron sensibles a meticilina y el resultado fue concordante con el método de referencia sin observarse falsas resistencias.

En cuanto al tiempo en la obtención de los resultados de identificación y sensibilidad antibiótica directamente de hemocultivos positivos PF BacT / ALERT, se obtuvieron datos fiables de identificación en sólo en $5 \pm 1,7$ h, y de sensibilidad en $7,7 \pm 1,8$ h, permitiendo la reducción en el tiempo de emisión de los resultados con respecto a los métodos convencionales. Por lo tanto, en la mayoría de los casos podremos informar de resultados definitivos sobre el agente etiológico de la bacteriemia y su antibiograma completo, sólo 24 horas después de la extracción del hemocultivo.

En cuanto a la revisión prospectiva que se realizó de las historias clínicas de los pacientes, el 50% de las bacteriemias fue de origen nosocomial y el otro 50% adquirida en la comunidad. En el grupo de las bacteriemias de origen hospitalario, la edad de los pacientes se encontraba entre 7 y 25 días de vida. La mayoría eran prematuros con muy bajo peso y como principal factor de riesgo externo para la infección, se encontró el hecho de ser portadores de un catéter intravascular. En más de la mitad de los casos, los bacilos gramnegativos fueron la causa de la bacteriemia (10/16) siendo *Klebsiella* spp el agente etiológico más frecuentemente encontrado. El resto de las bacteriemias en este grupo fueron producidas por estafilococos, tres por Estafilococo coagulasa negativa y 3 por *Staphylococcus aureus*. En los seis casos se las relacionó con la presencia de catéteres intravasculares, por lo que se las catalogó de bacteriemias de foco en el catéter.

Resultados similares a los obtenidos por A. Pérez et al. [196] en la revisión realizada sobre las bacteriemias del Servicio de Pediatría en el Hospital Germans Trias i Pujol durante siete años (1994-2000). En este estudio también se describe a los bacilos gramnegativos de la familia *Enterobacteriaceae* como los principales responsables de la sepsis neonatal tardía. Estos resultados son diferentes a los encontrados en otras series de la literatura, donde los agentes etiológicos que más predominan en las infecciones nosocomiales son, estafilococos coagulasa negativa y *Candida* spp [197, 198].

En cuanto a la bacteriemia adquirida en la comunidad, el 62,5 % de los pacientes tenían menos de 2 años. Sólo dos de los niños, de los 16 revisados en este grupo, presentaban alguna patología de base, concretamente una neoplasia hematológica, y además los dos eran portadores de catéter intravascular. En cuanto al foco de la bacteriemia, el más frecuente fue el foco urológico, donde en todos los casos el agente etiológico aislado fue *Escherichia coli*. El foco osteoarticular fue el segundo más frecuentemente encontrado en nuestra serie de bacteriemias, siendo *Staphylococcus aureus* el agente etiológico causante en todas ellas. El resto fueron todas de foco primario, destacando cuatro aislamientos por *Salmonella* spp. Según el trabajo de A. Pérez et al, [196] el

principal agente etiológico en las bacteriemias adquiridas en la comunidad en nuestro hospital en el período estudiado fue *Streptococcus pneumoniae*, al igual que lo descrito por otros autores [192, 199].

En nuestro hospital, en la última década estamos asistiendo a un aumento de la resistencia a los antibióticos en microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, además de aislamientos de *Escherichia coli* productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), lo que complica, cada vez con más frecuencia, la elección de un tratamiento empírico adecuado. Esta no es la situación actual del Servicio de Pediatría de nuestro hospital, donde el aislamiento de microorganismos multirresistentes es aún anecdótico. Según los estudios publicados, este hecho está suponiendo un gran problema, sobre todo en las unidades neonatales por las escasas opciones de tratamiento, dando lugar a un aumento de la morbilidad-mortalidad [200, 201]. En la revisión actual de esta serie de bacteriemias, sólo se detectaron dos aislamientos productores de betalactamasas de espectro extendido, uno en una *Salmonella* spp y otro en un *Enterobacter cloacae*. En los dos casos se trataba de pacientes con una neoplasia hematológica y con antecedentes de haber recibido tratamiento antibiótico previamente. El hecho de disponer de la información precoz y personalizada del resultado de la identificación y antibiograma permitió el inicio del tratamiento antibiótico en el paciente con la bacteriemia por *Salmonella* spp, mientras que en el segundo caso, el paciente estaba recibiendo un tratamiento que no cubría la BLEE, y por lo tanto, supuso cambiar a un tratamiento efectivo.

De manera global, en nuestro estudio, el hecho de proporcionar una información personalizada de los resultados obtenidos por el sistema Vitek-2 compact directamente de hemocultivo positivo, tuvo un impacto en el inicio de un tratamiento antibiótico correcto y adecuado en el 65,6% de los casos. En ocho pacientes (25%) la información proporcionada dio lugar al inicio de un tratamiento antibiótico. Concretamente en tres bacteriemias por *Staphylococcus aureus* de foco osteoarticular, donde los pacientes habían sido dados de alta desde el servicio de urgencias. En las cinco bacteriemias restantes, el foco fue primario, correspondiendo dos de ellas a pacientes prematuros ingresados en la unidad neonatal.

Por otro lado, en 12 (37,5%) casos el tratamiento antibiótico empírico fue cambiado por uno con menor espectro, y por tanto, con menos reacciones adversas, en particular sobre la selección de microorganismos multirresistentes, y también con un menor coste. En la mayoría de casos se trató de pacientes ingresados en la unidad neonatal con una pauta inicial de 2 o 3 antibióticos, en los que posteriormente a la información microbiológica, se realizó una adecuación del tratamiento a un solo antibiótico que cubría el agente etiológico de la bacteriemia. De esta manera

se disminuyó la presión selectiva sobre la flora del paciente, así como sobre el ecosistema donde estaban localizados los pacientes, la mayor parte, ingresados en la unidad neonatal.

Por último, sólo en un caso el tratamiento empírico no cubría el agente etiológico, correspondiendo al paciente de la bacteriemia por *Enterobacter cloacae* productor de BLEE, comentado anteriormente.

Por lo tanto, la utilización del sistema Vitek-2 compact directamente de hemocultivo positivo, permite el inicio de un tratamiento efectivo así como la aplicación precoz de las medidas de aislamiento, 24 horas antes que utilizando los métodos convencionales.

En un 65% de los pacientes (21/32), éste método proporcionó resultados que determinaron cambios precoces en cuanto al tratamiento antibiótico.

Objetivo 4

Cuantificar el impacto sobre el tratamiento antibiótico, de la información rápida y personalizada de la identificación y antibiograma obtenidos directamente de hemocultivo positivo

En los últimos años, las bacterias multirresistentes se están convirtiendo en un problema importante de salud pública. La infección por este tipo de microorganismos puede tener graves consecuencias, debido a su difícil manejo y a la evolución de los pacientes, repercutiendo en los costes sanitarios [164, 202]. Entre sus principales efectos negativos se encuentra el retraso en el inicio de la terapia adecuada, ya que cada vez es más complicado acertar en el tratamiento empírico correcto. Según diversos autores, el tratamiento empírico inadecuado en pacientes con sepsis está claramente asociado a un aumento de la mortalidad [35, 104, 171], siendo una de sus principales causas, el aumento de la resistencia de los agentes etiológicos implicados.

En nuestro hospital, en la última década estamos asistiendo a un aumento de la incidencia de las infecciones causadas por bacterias multirresistentes. Este hecho, ha contribuido a que el porcentaje del tratamiento empírico correcto de nuestras bacteriemias haya disminuido de un 50% en el año 2003 hasta un 34% en el 2014. Probablemente la clona causante del brote de *Klebsiella pneumoniae* BLEE que se diseminó por todo el hospital en 2005 y la posterior situación de endemia, que también afecta a *Staphylococcus aureus* SARM, han influido en estos porcentajes. Según la bibliografía, el tratamiento empírico no es adecuado en hasta un 40% de los pacientes con bacteriemia [119, 177, 108]. En otro estudio reciente, Beuving et al [203] compara dos métodos de obtención de resultados microbiológicos a partir de hemocultivo positivo, observando que el tratamiento antibiótico empírico en las bacteriemias revisadas, era inadecuado en el 26% de los casos y que la mayoría, correspondían a bacteriemias nosocomiales, producidas por microorganismos multirresistentes, ya fuese una resistencia adquirida (BLEE, SARM) o intrínseca (resistencia a betalactámicos en *Enterococcus* spp)

El retraso en el inicio del tratamiento antibiótico es un punto crítico y determinante en el pronóstico de los pacientes con sepsis, que en nuestra serie supone un porcentaje nada despreciable de un 7- 10%. Este porcentaje se ha mantenido, sin observarse disminución, a lo largo de los años. En otras series de estudios similares, como la de Bouza et al, observan un porcentaje ligeramente superior de pacientes que no habían recibido tratamiento antibiótico cuando se informaban los resultados, concretamente un 13,7%. Podría ser debido, a que a pesar que en los últimos años se han realizado avances significativos tanto en los sistemas de hemocultivo como en los métodos rápidos de identificación y antibiograma, el tiempo que tarda el hemocultivo en positivizarse es aún demasiado largo. Esto imposibilita iniciar un tratamiento

antibiótico en las primeras horas, en los casos en que la sospecha de sepsis no era muy elevada y el paciente no había recibido terapia antimicrobiana. En este sentido, en nuestro hospital, Tudela *et al* [204] revisaron durante un período de 10 años, los pacientes que habían sido atendidos en urgencias y fueron dados de alta y posteriormente se les avisaba por hemocultivo positivo. Estos datos reflejan una clara tendencia al descenso del porcentaje de la incidencia anual de la bacteriemia en pacientes no hospitalizados, pasando del 23'6% en el primer año al 4'2% al final del período del estudio. Probablemente este hecho se relaciona, entre otros factores, a la detección de positividad cada vez más temprana del hemocultivo, así como, a la incorporación de un microbiólogo de guardia hasta las 22 horas. De esta manera es posible informar personalmente de la tinción de Gram del hemocultivo positivo así como de la identificación y antibiograma, en muchas ocasiones, cuando los pacientes aún están en observación en el servicio de urgencias. Esta información supone el inicio del tratamiento antibiótico precoz y el cambio en la orientación del diagnóstico inicial, en un porcentaje no despreciable de los pacientes con bacteriemia no hospitalizados revisados en el estudio, concretamente 37'1%, según los autores.

Por otro lado, y no menos importante, la información rápida y personalizada del resultado del hemocultivo positivo, permitirá la optimización del tratamiento antibiótico. Como consecuencia, se limitarán las reacciones adversas del mal uso de los antibióticos, y en particular, la selección de microorganismos multirresistentes, que como hemos comentado anteriormente, son una de las causas más frecuentes de inicio de tratamiento inadecuado. En este sentido, según nuestros datos, en un 31% de las bacteriemias revisadas en el año 2014, el médico responsable del paciente cambia el tratamiento antibiótico empírico a un tratamiento de elección, con menor espectro de acción, y por lo tanto con menores consecuencias en la selección de la flora multirresistente y con un menor coste. Este porcentaje ha ido aumentando a lo largo de los años probablemente debido a que cada vez se amplía más el tratamiento empírico para poder cubrir las bacterias multirresistentes y en consecuencia, posteriormente es necesario restringir más [84, 205].

Según el trabajo realizado por Stoneking *et al*, [206] la terapia inicial se cambió a una con menor espectro antibiótico en el 55% de los casos, por lo que la reducción en el tiempo de los resultados supuso una terapia dirigida de forma precoz, reduciendo la mortalidad y minimizando el uso de antibióticos de amplio espectro. También destaca la importancia de la colaboración entre el laboratorio de microbiología y los clínicos.

En nuestro estudio, el porcentaje de tratamientos empíricos que no cubrían el agente etiológico implicado llegó a ser en el año 2008 del 28%. Dicho porcentaje ha ido en descenso durante los últimos años y actualmente el porcentaje de casos que ha precisado un cambio a un tratamiento efectivo se encuentra en el 18'5%. Son datos muy similares a los obtenidos por Bouza *et al*, [119]

que en su trabajo observó que el 27,7% de los pacientes estaban tratados con un antibiótico que no era efectivo frente al microorganismo aislado. En el trabajo de Stoneking et al [206], el porcentaje encontrado fue inferior, aunque nada despreciable, un 13 % de los pacientes con bacteriemia llevaban un tratamiento que no cubría la infección. Tal como refleja la *Surviving Sepsis Campaign* [158, 207], el retraso en el inicio de un tratamiento antibiótico correcto se relaciona con un aumento de la mortalidad. La reducción en el tiempo necesario para la obtención de los resultados de los métodos de identificación y antibiograma, junto con la información comunicada personalmente al médico responsable, conducirá en enormes beneficios para el paciente crítico. Mathevon *et al*, [117, 208], en un estudio realizado en pacientes de la unidad de cuidados intensivos con bacteriemia y neumonía, demostró que el cambio a un tratamiento antibiótico adecuado, sólo tuvo impacto en la supervivencia si se iniciaba dentro de las primeras 24 horas tras la obtención de los hemocultivos, y esto sólo es posible si existe una estrecha relación clínico-microbiólogo.

Por otro lado, el retraso en la emisión de los resultados es un gran inconveniente para poder realizar el cambio a tratamiento de elección y ajustar precozmente la terapia antibiótica. Cuando la información microbiológica se obtiene de forma más tardía y el paciente ya lleva un mínimo de dos días de tratamiento con buena respuesta clínica, existe, por parte del clínico, mayor reticencia en modificar el tratamiento antibiótico. A pesar de ello, en nuestro hospital, sólo en el 2% de las bacteriemias revisadas, el clínico no siguió las recomendaciones del microbiólogo en cuanto al cambio al tratamiento adecuado. Según Bouza *et al*, [161, 119], los resultados microbiológicos definitivos tienen un valor limitado si sólo se informan por escrito, ya que un 8-20% de los pacientes siguen con un tratamiento inadecuado a pesar de tener la información de la identificación y del antibiograma. Sin embargo, existe una mejora significativa en el caso de que los hemocultivos se informen de manera personalizada al clínico responsable en todas las fases, desde la obtención de la tinción de gram hasta los resultados definitivos.

Los rápidos avances tecnológicos en el diagnóstico, son importantes para el inicio del tratamiento antibiótico correcto y adecuado, pero igual o más importante es la manera cómo se informan los hemocultivos. La información personalizada y la comunicación entre el clínico y el microbiólogo, permite una mejor interpretación de los resultados de los hemocultivos, siendo esto básico para la obtención de beneficios tanto clínicos como económicos. Por lo que cada vez más, se recomienda la combinación de las nuevas tecnologías de diagnóstico rápido con el establecimiento de programas de optimización del uso de antimicrobianos (PROA) con el objetivo de mejorar sus ventajas [162, 92, 209].

En nuestro estudio, el hecho de realizar una información personalizada, tuvo un impacto en más del 50% de los episodios de bacteriemia, en cuanto a la toma de decisiones terapéuticas por parte del clínico, ya fuese por inicio de un tratamiento antibiótico o por cambio a un tratamiento adecuado. En la bibliografía revisada, no existen muchos trabajos que analicen las diferentes formas de notificación de los hemocultivos, y el impacto de las recomendaciones realizadas por médicos especialistas en cuanto a la optimización del tratamiento antibiótico. Algunos, como el de Mainardi *et al*, [109, 210], observan que si informan los hemocultivos positivos el mismo día, dando las recomendaciones pertinentes, el tratamiento es adecuado en el 92% de los casos de bacteriemia en las que se han realizado recomendaciones frente a el 79% si no se han realizado. A la misma conclusión llega Lesprit *et al*, [91, 211], centrándose en la información del hemocultivo positivo para mejorar el uso de antibióticos durante un año. Los resultados obtenidos en este último trabajo, fueron que el impacto global de la información de los hemocultivos por un especialista fue del 36%, obteniendo mejores resultados en los servicios médico-quirúrgicos que en UCI.

Es por tanto esencial mejorar y/o buscar métodos que permitan disminuir los tiempos de emisión de los resultados. Una de las posibilidades en esta línea es la inoculación directa de los sistemas automatizados, que a diferencia de los métodos moleculares, permiten obtener la sensibilidad antibiótica completa del microorganismo aislado. El hecho de disponer de estos datos de sensibilidad antibiótica completos, es importante para el seguimiento de los porcentajes de sensibilidad a nivel local, así como, de los microorganismos multirresistentes, para poder realizar una mejor gestión de la infección. El conocimiento de estos datos, además nos permitirá desarrollar guías de tratamiento antibiótico basadas en el perfil de sensibilidad local de los diversos microorganismos aislados.

Conclusiones

Objetivo 1

Estudiar comparativamente la eficacia de los sistemas automáticos, Vitek-2 Compact y MicroScan, para identificación y estudio de la sensibilidad antibiótica de bacilos gramnegativos directamente de hemocultivo positivo (sistema BacT/ALERT FA y FN) mediante el diseño de un protocolo de inoculación.

- El protocolo de dos centrifugaciones utilizado en el estudio permite de forma sencilla y rápida, en únicamente 20', eliminar el carbón activado de los hemocultivos positivos FAN BacT/ALERT, siendo un método fiable para la identificación y antibiograma directos, tanto por el sistema Vitek-2 compact como con MicroScan.
- Ambos sistemas presentan, en comparación con el método convencional, una correlación superior al 90% en la identificación a nivel de especie y una concordancia superior al 95% en el estudio de la sensibilidad antibiótica, directamente de hemocultivo positivo.
- La identificación y antibiograma directos de hemocultivo positivo, mediante el sistema Vitek-2 compact, proporciona resultados precisos con una media de 6 horas, permitiendo la información de resultados definitivos en 24 horas desde la extracción del hemocultivo.

Objetivo 2

Evaluar la eficacia del sistema Vitek-2 Compact(bioMérieux, France) para identificación y estudio de la sensibilidad antibiótica de cocos grampositivos directamente de hemocultivo positivo (sistema BacT/ALERT FA y FN), mediante el diseño de un protocolo modificado de inoculación.

- El carbón activado presente en los frascos de hemocultivo del sistema BacT/ALERT interfiere en el proceso de identificación y antibiograma directo de hemocultivo positivo. La aplicación de un nuevo protocolo que incorpora un paso previo de sonicación y posterior centrifugación de una alícuota del hemocultivo, ha demostrado ser fiable para la identificación directa, con una correlación con el método de referencia del 88'5% en estafilococos y *Enterococcus faecalis*, pero sólo del 44% en *Enterococcus faecium*.
- Los resultados de sensibilidad antibiótica, obtenidos mediante el protocolo evaluado, utilizando el sistema Vitek-2 compact directamente de hemocultivo positivo, presentan una concordancia global a nivel de categoría superior al 95% y un porcentaje de errores muy graves inferior al 1'5%, por lo que resultan totalmente comparables a los obtenidos por el método convencional.
- Con este protocolo, los resultados de identificación y antibiograma a partir de hemocultivo positivo, se obtienen de manera rápida y precisa en una media de sólo 4'6 h y 9 h respectivamente. Esto implica poder informar los resultados definitivos de 24 a 48 h antes que con los métodos convencionales.

Objetivo 3

Estudiar la eficacia de Vitek-2 Compact para la identificación y determinación de la sensibilidad directamente de frascos de hemocultivo positivo pediátricos, así como el impacto clínico de la información rápida en esta población

- El sistema Vitek-2 compact permite, a partir del hemocultivo pediátrico positivo, la identificación correcta a nivel de género y especie de los microorganismos gramnegativos y grampositivos aislados con más frecuencia en la práctica clínica diaria, con una correlación del 86% con respecto al método convencional y en un tiempo medio de 5 horas.
- La determinación de la sensibilidad antibiótica directamente del hemocultivo positivo pediátrico, utilizando el protocolo evaluado, tiene una concordancia, respecto al método de referencia superior al 99%. No se obtuvo ningún error muy grave y permite informar los resultados con una media de 7 horas.
- La información rápida y personalizada del hemocultivo positivo pediátrico, tuvo un impacto sobre las decisiones terapéuticas del clínico en el 65,6% de los casos. Teniendo en cuenta el aumento progresivo de la resistencia microbiana a los antibióticos, el sistema Vitek-2 compact permite iniciar de manera precoz el tratamiento adecuado y modificar las conductas terapéuticas, si fuese necesario.

Objetivo 4

Cuantificar el impacto sobre el tratamiento antibiótico, de la información rápida y personalizada de la identificación y antibiograma obtenidos directamente de hemocultivo positivo

- Durante el período de estudio se ha observado un descenso del 50% al 34% de los casos en que el tratamiento empírico podía considerarse el de elección. Paralelamente se ha producido un incremento en el porcentaje del 10% al 20% de episodios en que la información rápida y personalizada ha permitido cambiar un tratamiento que no cubría al microorganismo implicado, por uno efectivo.
- En el periodo revisado, en un 10% de los casos la información microbiológica ha comportado el inicio del tratamiento antibiótico, mientras que en sólo el 2% los clínicos no siguieron las recomendaciones del microbiólogo.
- La transmisión inmediata y personalizada al médico responsable del paciente, de la información obtenida del hemocultivo positivo, tanto de la tinción de Gram como de los resultados de identificación y antibiograma, permite orientar de forma rápida y adecuada el tratamiento antibiótico, evitando las consecuencias de una terapia incorrecta y/o tardía.

Referencias Bibliográficas

1. Angus DC, van der Poll T (2013) Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med* 369(9):840–851
2. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al (2013) Surviving Sepsis Campaign. *Critical Care Medicine* 41(2):580–637
3. Angus DC, Wax RS (2001) Epidemiology of sepsis: an update. *Critical Care Medicine* 29(7 Suppl):S109–116
4. Mayr FB, Yende S, Linde-Zwirble WT, Peck-Palmer OM, Barnato AE, Weissfeld LA, Angus DC (2010) Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. *JAMA* 303(24):2495–2503
5. Vincent J-L, Sakr Y, Sprung CL, et al (2006) Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Critical Care Medicine* 34(2):344–353
6. Lever A, Mackenzie I (2007) Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *BMJ* 335(7625):879–883
7. Martin GS, Mannino DM, Eaton S (2003) The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. ... *Journal of Medicine*
8. Kim PW, Perl TM, Keelaghan EF, Langenberg P, Perencevich EN, Harris AD, Song X, Roghmann M-C (2005) Risk of mortality with a bloodstream infection is higher in the less severely ill at admission. *Am J Respir Crit Care Med* 171(6):616–620
9. Muñoz P, Cruz AF, Rodríguez-Crèixems M, Bouza E (2008) Gram-negative bloodstream infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* 32:S10–S14
10. Hodgkin KE, Moss M (2008) The epidemiology of sepsis. *Current pharmaceutical design*
11. Bouza C, pez-Cuadrado TL, Saz-Parkinson Z, Amate-Blanco JMA (2014) Epidemiology and recent trends of severe sepsis in Spain: a nationwide population-based analysis (2006-2011). 1–13
12. Kumar G, Kumar N, Taneja A (2011) Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007). *Chest*
13. Vallés J, Palomar M, Álvarez-Lerma F, Rello J, Blanco A, Garnacho-Montero J, Martín-Loeches I, GTEI/SEMICYUC Working Group on Bacteremia (2013) Evolution over a 15-year period of clinical characteristics and outcomes of critically ill patients with community-acquired bacteremia. *Critical Care Medicine* 41(1):76–83
14. Martin GS (2012) Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 10(6):701–706
15. Moss M, Martin GS (2004) A global perspective on the epidemiology of sepsis. *Intensive Care Med*

16. Kumar A, Haery C, Paladugu B, et al (2006) The duration of hypotension before the initiation of antibiotic treatment is a critical determinant of survival in a murine model of *Escherichia coli* septic shock: association with serum lactate and inflammatory cytokine levels. *J Infect Dis* 193(2):251–258
17. Schottmueller H (1914) [CITATION][C]. *Inn Med*
18. Bone RC (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101(6):1644
19. Vincent JL (1997) Dear SIRS, I“m sorry to say that I don”t like you. *Critical Care Medicine*
20. Kaukonen K-M, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R (2015) Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria in Defining Severe Sepsis. *N Engl J Med* 372(17):1629–1638
21. MD PJ-LV, MD PSMO, MD PJCM, MD PKJT (2013) Sepsis definitions: time for change. *The Lancet* 381(9868):774–775
22. Czura CJ (2011) “Merinoff Symposium 2010: Sepsis”—Speaking with One Voice. *Molecular Medicine* 17(1-2):2
23. MD OON, MD JEP (2009) The Pathophysiology of Septic Shock. *Critical Care Clinics* 25(4):677–702
24. Campisi L, Brau F, Glaichenhaus N (2008) Imaging host–pathogen interactions. *Immunol. Rev.*
25. Seeley EJ, Matthay MA, Wolters PJ (2012) Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology* 303(5):L355–L363
26. van der Poll T, Opal SM (2008) Host–pathogen interactions in sepsis. *The Lancet Infectious Diseases*
27. Kumar H, Kawai T, Akira S (2011) Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *Int Rev Immunol* 30(1):16–34
28. Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T (2013) Host innate immune responses to sepsis. *Virulence* 5(1):36–44
29. Leentjens J, Kox M, van der Hoeven JG, Netea MG, Pickkers P (2013) Immunotherapy for the Adjunctive Treatment of Sepsis: From Immunosuppression to Immunostimulation. Time for a Paradigm Change? *Am J Respir Crit Care Med* 187(12):1287–1293
30. Rodríguez-Créixems M, Alcalá L, Muñoz P, Cercenado E, Vicente T, Bouza E (2008) Bloodstream Infections. *Medicine* 87(4):234–249

31. Vincent J-L, Rello J, Marshall J, et al (2009) International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 302(21):2323–2329
32. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, Muniain MA, de Cueto M, Ríos MJ, Hernández JR, Pascual A (2006) Bacteremia due to extended-spectrum beta -lactamase-producing *Escherichia coli* in the CTX-M era: a new clinical challenge. *CLIN INFECT DIS* 43(11):1407–1414
33. Shoham S, Marwaha S (2010) Invasive fungal infections in the ICU. *J Intensive Care Med* 25(2):78–92
34. Pérez MG (1999) Diagnóstico microbiológico de las bacteriemias.
35. Kumar G (2009) LEFT VENTRICULAR NON-COMPACTION SYNDROME PRESENTING AS PALPITATIONS. *Chest*. doi: 10.1378/chest.09-0087
36. Friedman ND (2002) Health Care–Associated Bloodstream Infections in Adults: A Reason To Change the Accepted Definition of Community-Acquired Infections. *Ann Intern Med* 137(10):791–797
37. Siegman-Igra Y, Fourer B, Orni-Wasserlauf R, Golan Y, Noy A, Schwartz D, Giladi M (2002) Reappraisal of community-acquired bacteremia: a proposal of a new classification for the spectrum of acquisition of bacteremia. *CLIN INFECT DIS* 34(11):1431–1439
38. Gaieski DF, Mikkelsen ME, Band RA, Pines JM, Massone R, Furia FF, Shofer FS, Goyal M (2010) Impact of time to antibiotics on survival in patients with severe sepsis or septic shock in whom early goal-directed therapy was initiated in the emergency department. *Critical Care Medicine* 38(4):1045–1053
39. Rodríguez-Baño J, de Cueto M, Retamar P, Gálvez-Acebal J (2010) Current management of bloodstream infections. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 8(7):815–829
40. Díaz MA, Hernández JR, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual A, Pascual A (2009) [Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Spanish hospitals: 2nd multicenter study (GEIH-BLEE project, 2006)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 27(9):503–510
41. Rodríguez-Baño J, Picón E, Gijón P, et al (2009) Community-onset bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: risk factors and prognosis. *CLIN INFECT DIS* 50(1):40–48
42. Shorr AF, Micek ST, Welch EC, Doherty JA, Reichley RM, Kollef MH (2010) Inappropriate antibiotic therapy in Gram-negative sepsis increases hospital length of stay. *Critical Care Medicine* 39(1):46–51
43. Cisneros-Herreros JM, Cobo-Reinoso J, Pujol-Rojo M, Rodríguez-Baño J, Salavert-Lletí M

- (2007) [Guidelines for the diagnosis and treatment of patients with bacteriemia. Guidelines of the Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 25(2):111–130
44. Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P, Dragoumanos V, Pitiriga V, Ranellou K, Prekates A, Themeli-Digalaki K, Tsakris A (2011) Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clinical Microbiology and Infection* 17(12):1798–1803
 45. Pien BC, Sundaram P, Raouf N, Costa SF (2010) The clinical and prognostic importance of positive blood cultures in adults. *The American journal of ...*
 46. Grace CJ, Lieberman J, Pierce K, Littenberg B (2001) Usefulness of blood culture for hospitalized patients who are receiving antibiotic therapy. *CLIN INFECT DIS* 32(11):1651–1655
 47. Lee A, Mirrett S, Reller LB, Weinstein MP (2007) Detection of bloodstream infections in adults: how many blood cultures are needed? *Journal of Clinical Microbiology* 45(11):3546–3548
 48. Riedel S, Carroll KC (2010) Blood cultures: key elements for best practices and future directions. *Journal of Infection and Chemotherapy* 16(5):301–316
 49. Ntusi N, Aubin L, Oliver S, Whitelaw A (2010) Guideline for the optimal use of blood cultures. *SAMJ: South African ...*
 50. Hardy DJ, Hulbert BB, Migneault PC (1992) Time to detection of positive BacT/Alert blood cultures and lack of need for routine subculture of 5- to 7-day negative cultures. *Journal of Clinical Microbiology* 30(10):2743–2745
 51. Baron EJ, Scott JD, Tompkins LS (2005) Prolonged incubation and extensive subculturing do not increase recovery of clinically significant microorganisms from standard automated blood cultures. *CLIN INFECT DIS* 41(11):1677–1680
 52. Rohner P, Auckenthaler R (1999) Review on evaluations of currently available blood-culture systems. *Clinical Microbiology and Infection* 5(9):513–529
 53. Reig AP, Creixems MR *Procedimientos en Microbiología Clínica*. seimc.org
 54. Pascual A (2003) Pascual: Hemocultivos y líquido cefalorraquídeo - Google Scholar. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*
 55. McDonald LC, Fune J, Gaido LB, Weinstein MP, Reimer LG, Flynn TM, Wilson ML, Mirrett S, Reller LB (1996) Clinical importance of increased sensitivity of BacT/Alert FAN aerobic and anaerobic blood culture bottles. *Journal of Clinical Microbiology* 34(9):2180–2184

56. Arbo MD, Snyderman DR (1993) Influence of blood culture results on antibiotic choice in the treatment of bacteremia. *Arch Intern Med* 154(23):2641–2645
57. Pardo J, Klinker KP, Borgert SJ, Trikha G, Rand KH, Ramphal R (2014) Time to Positivity of Blood Cultures Supports Antibiotic De-escalation at 48 Hours. *Annals of Pharmacotherapy* 48(1):33–40
58. Uehara Y (2010) [Impact of reporting gram stain results from blood culture bottles on the selection of antimicrobial agents]. *Rinsho Byori* 58(7):688–697
59. Paul M, Kariv G, Goldberg E, Raskin M, Shaked H, Hazzan R, Samra Z, Paghis D, Bishara J, Leibovici L (2010) Importance of appropriate empirical antibiotic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65(12):2658–2665
60. Waites KB, Brookings ES, Moser SA, Zimmer BL (1998) Direct bacterial identification from positive BacT/Alert blood cultures using MicroScan overnight and rapid panels. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 32(1):21–26
61. Schröppel K, Riessen R (2013) [Multiresistant gram-negative bacteria. A bacterial challenge of the twenty-first century]. *Med Klin Intensivmed Notfmed* 108(2):107–112
62. Murdoch DR (2004) Rapid identification of *Staphylococcus aureus* from BacT/ALERT blood culture bottles by direct Gram stain characteristics. *Journal of Clinical Pathology* 57(2):199–201
63. Girometti N, Lewis RE, Giannella M, et al (2014) *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: epidemiology and impact of inappropriate empirical therapy. *Medicine* 93(17):298–309
64. Viale P, Giannella M, Lewis R, Trecarichi EM, Petrosillo N, Tumbarello M (2013) Predictors of mortality in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 11(10):1053–1063
65. Chapin K, Musgnug M (2003) Evaluation of three rapid methods for the direct identification of *Staphylococcus aureus* from positive blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology* 41(9):4324–4327
66. Qian Q, Eichelberger K, Kirby JE (2007) Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures by use of the direct tube coagulase test. *Journal of Clinical Microbiology* 45(7):2267–2269
67. Speers DJ, Olma TR, Gilbert GL (1998) Evaluation of four methods for rapid identification of *Staphylococcus aureus* from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology* 36(4):1032–1034

68. Larsson MC, Karlsson E, Woksepp H, Lander KF, Rensson AM, Rashed F, Annika W, n TS, Serrander L (2014) Rapid identification of pneumococci, enterococci, beta-haemolytic streptococci and *S. aureus* from positive blood cultures enabling early reports. *BMC Infectious Diseases* 14(1):1–9
69. Vasallo FJ, López-Miragaya I, Rodríguez A, Torres J (2001) Rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* in blood cultures using a latex agglutination assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20(8):594–595
70. Inkster T, Halley L (2007) Caution regarding interpretation of positive *Streptococcus pneumoniae* latex agglutination results from blood cultures. *Journal of Infection* 55(5):e119–e119
71. Petti CA, Woods CW, Reller LB (2005) *Streptococcus pneumoniae* antigen test using positive blood culture bottles as an alternative method to diagnose pneumococcal bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology* 43(5):2510–2512
72. Wetkowski MA, Peterson EM, la Maza de LM (1982) Direct testing of blood cultures for detection of streptococcal antigens. *Journal of Clinical Microbiology* 16(1):86–91
73. Fontanals D, Cebollero A, Pons MLEI (2011) [Two latex agglutination techniques for the rapid detection of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* and *Enterococcus* spp. directly from the positive blood culture bottle]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 29(3):234–235
74. Ling TKW, Liu ZK, Cheng AFB (2003) Evaluation of the VITEK 2 system for rapid direct identification and susceptibility testing of gram-negative bacilli from positive blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology* 41(10):4705–4707
75. Funke G, Funke-Kissling P (2005) Performance of the new VITEK 2 GP card for identification of medically relevant gram-positive cocci in a routine clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 43(1):84–88
76. Kerremans JJ, Goessens WHF, Verbrugh HA, Vos MC (2004) Accuracy of identification and susceptibility results by direct inoculation of Vitek 2 cards from positive BACTEC cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23(12):892–898
77. Lupetti A, Barnini S, Castagna B, Nibbering PH, Campa M (2010) Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of Gram-positive cocci in blood cultures by direct inoculation into the BD Phoenix system. *Clinical Microbiology and Infection* 16(7):986–991
78. Beuving J, Verbon A, Gronthoud FA, Stobberingh EE, Wolffs PFG (2011) Antibiotic Susceptibility Testing of Grown Blood Cultures by Combining Culture and Real-Time

- Polymerase Chain Reaction Is Rapid and Effective. *PLoS ONE* 6(12):e27689
79. Jorgensen JH (1993) Selection criteria for an antimicrobial susceptibility testing system. *Journal of Clinical Microbiology* 31(11):2841–2844
 80. Leekha S, Standiford HC (2011) Empiric antimicrobial therapy for Gram-negative sepsis: back to the future. *Critical Care Medicine* 39(8):1995–1996
 81. Bruins MJ, Bloembergen P, Ruijs GJHM, Wolfhagen MJHM (2004) Identification and susceptibility testing of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* by direct inoculation from positive BACTEC blood culture bottles into Vitek 2. *Journal of Clinical Microbiology* 42(1):7–11
 82. Nordmann P, Poirel L (2014) The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect* 20(9):821–830
 83. Delory T, Seringe E, Antonioti G, Novakova I, Goulenok C, Paysant I, Boyer S, Carbonne A, Naas T, Astagneau P (2015) Prolonged delay for controlling KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak: The role of clinical management. *Am J Infect Control* 43(10):1070–1075
 84. Joung MK, Lee J-A, Moon S-Y, et al (2010) Impact of de-escalation therapy on clinical outcomes for intensive care unit-acquired pneumonia. *Critical care (London, England)* 15(2):R79–R79
 85. de Cueto M, Ceballos E, Martínez-Martínez L, Perea EJ, Pascual A (2004) Use of positive blood cultures for direct identification and susceptibility testing with the vitek 2 system. *Journal of Clinical Microbiology* 42(8):3734–3738
 86. Rodríguez-Baño J, Paño-Pardo JR, Alvarez-Rocha L, et al (2012) [Programs for optimizing the use of antibiotics (PROA) in Spanish hospitals: GEIH-SEIMC, SEFH and SEMPSPH consensus document]. In: *Farm Hosp*. pp 33.e1–30
 87. (2008) Identificación y sensibilidad de bacilosgram-negativos. 1–6
 88. Paul M, Shani V, Muchtar E, Kariv G, Robenshtok E, Leibovici L (2010) Systematic Review and Meta-Analysis of the Efficacy of Appropriate Empiric Antibiotic Therapy for Sepsis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(11):4851–4863
 89. Kaki R, Ellingsen M, Walker S, Simor A, Palmay L, Daneman N (2011) Impact of antimicrobial stewardship in critical care: a systematic review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66(6):1223–1230
 90. Diederer BMW, Zieltjens M, van Wetten H, Buiting AGM (2006) Identification and susceptibility testing of *Staphylococcus aureus* by direct inoculation from positive BACTEC blood culture bottles. *Clinical Microbiology and Infection* 12(1):84–86

91. Dik J-WH, Poelman R, Friedrich AW, Panday PN, Lo-Ten-Foe JR, Assen SV, van Gemert-Pijnen JE, Niesters HG, Hendrix R, Sinha B (2015) An integrated stewardship model: antimicrobial, infection prevention and diagnostic (AID). *Future Microbiology*. doi: 10.2217/fmb.15.99
92. Perez KK, Olsen RJ, Musick WL, Cernoch PL, Davis JR, Peterson LE, Musser JM (2014) Integrating rapid diagnostics and antimicrobial stewardship improves outcomes in patients with antibiotic-resistant Gram-negative bacteremia. *Journal of Infection* 69(3):216–225
93. Roger P-M, Courjon J, Léotard S, Déchamp C, Négrin N, Vassallo M, Réseau d'Infectiologie Paca-Est (2015) Antimicrobial stewardship policy: time to revisit the strategy? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34(11):2167–2170
94. MD LRS, BCPS AEPP, MD JPW, MD ABF, MS ESL III, MPH DPO, ABMM DMWP (2013) Would Earlier Microbe Identification Alter Antibiotic Therapy in Bacteremic Emergency Department Patients? *Journal of Emergency Medicine* 44(1):1–8
95. Sothoron C, Ferreira J, Guzman N, Aldridge P, McCarter YS, Jankowski CA (2015) A Stewardship Approach To Optimize Antimicrobial Therapy through Use of a Rapid Microarray Assay on Blood Cultures Positive for Gram-Negative Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 53(11):3627–3629
96. Ammerlaan HSM, Harbarth S, Buiting AGM, et al (2013) Secular trends in nosocomial bloodstream infections: antibiotic-resistant bacteria increase the total burden of infection. *CLIN INFECT DIS* 56(6):798–805
97. de Kraker MEA, Jarlier V, Monen JCM, Heuer OE, van de Sande N, Grundmann H (2013) The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clin Microbiol Infect* 19(9):860–868
98. Galar A, Leiva J, Espinosa M, Guillén-Grima F, Hernández S, Yuste JR (2012) Clinical and economic evaluation of the impact of rapid microbiological diagnostic testing. *Journal of Infection* 65(4):302–309
99. Lupetti A, Barnini S, Morici P, Ghelardi E, Nibbering PH, Campa M (2013) Saponin promotes rapid identification and antimicrobial susceptibility profiling of Gram-positive and Gram-negative bacteria in blood cultures with the Vitek 2 system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32(4):493–502
100. Galar A, Yuste JR, Espinosa M, Guillén-Grima F, Hernández-Crespo S, Leiva J (2012) Clinical and economic impact of rapid reporting of bacterial identification and antimicrobial susceptibility results of the most frequently processed specimen types. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31(9):2445–2452

101. Trenholme GM, Kaplan RL, Karakusis PH, Stine T, Fuhrer J, Landau W, Levin S (1989) Clinical impact of rapid identification and susceptibility testing of bacterial blood culture isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 27(6):1342–1345
102. Gherardi G, Angeletti S, Panitti M, et al (2012) Comparative evaluation of the Vitek-2 Compact and Phoenix systems for rapid identification and antibiotic susceptibility testing directly from blood cultures of Gram-negative and Gram-positive isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 72(1):20–31
103. Barreales A, Lara M, Hernández I, Díez O (2011) [Rapid identification and susceptibility testing of Gram-positive cocci in BacT/ALERT blood cultures by direct inoculation into the Vitek 2 system]. *Rev Esp Quimioter* 24(3):131–135
104. Lueangarun S, Leelarasamee A (2012) Impact of Inappropriate Empiric Antimicrobial Therapy on Mortality of Septic Patients with Bacteremia: A Retrospective Study. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2012(6):1–13
105. Putnam LR, Howard WJ, Pfaller MA, Koontz FP, Jones RN (1997) Accuracy of the Vitek system for antimicrobial susceptibility testing Enterobacteriaceae bloodstream infection isolates: use of “direct” inoculation from Bactec 9240 blood culture bottles. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 28(2):101–104
106. Mancini N, Carletti S, Ghidoli N, Cichero P, Burioni R, Clementi M (2010) The Era of Molecular and Other Non-Culture-Based Methods in Diagnosis of Sepsis. *Clinical Microbiology Reviews* 23(1):235–251
107. Liesenfeld O M.D., Lehman L, Hunfeld KP, Kost G (2014) Molecular diagnosis of sepsis: New aspects and recent developments. *European Journal of Microbiology and Immunology* 4(1):1–25
108. Kerremans JJ, Verboom P, Stijnen T (2008) Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing reduce antibiotic use and accelerate pathogen-directed antibiotic use. *Journal of ...*
109. Venkatesh M, Flores A, Luna RA, Versalovic J (2010) Molecular microbiological methods in the diagnosis of neonatal sepsis. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 8(9):1037–1048
110. Seifert H (2009) The Clinical Importance of Microbiological Findings in the Diagnosis and Management of Bloodstream Infections. *CLIN INFECT DIS* 48(s4):S238–S245
111. Degand N, Carbonnelle E, Dauphin B, Beretti J-L, Le Bourgeois M, Sermet-Gaudelus I, Segonds C, Berche P, Nassif X, Ferroni A (2008) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-

- negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology* 46(10):3361–3367
112. Nagy E, Becker S, Kostrzewa M, Barta N, Urbán E (2012) The value of MALDI-TOF MS for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria in routine laboratories. *Journal of Medical Microbiology* 61(Pt 10):1393–1400
113. Marklein G, Josten M, Klanke U, et al (2009) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 47(9):2912–2917
114. Jordana-Lluch E, Martró Català E, Ausina Ruiz V (2012) [Mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 30(10):635–644
115. La Scola B, Raoult D (2009) Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE* 4(11):e8041
116. van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ (2010) High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *Journal of Clinical Microbiology* 48(3):900–907
117. Jordana-Lluch E, Giménez M, Quesada MD, Rivaya B (2015) Evaluation of the Broad-Range PCR/ESI-MS Technology in Blood Specimens for the Molecular Diagnosis of Bloodstream Infections. *PLoS ONE*
118. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM (2013) Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 26(3):547–603
119. Bouza E, Sousa D, Muñoz P, Rodríguez-Créixems M, Fron C, Lechuz JG (2004) Bloodstream infections: a trial of the impact of different methods of reporting positive blood culture results. *CLIN INFECT DIS* 39(8):1161–1169
120. Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K, Aepfelbacher M (2010) Rapid Identification of Bacteria from Positive Blood Culture Bottles by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight Mass Spectrometry Fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology* 48(5):1584–1591
121. Ferreira L, Vega S, Sánchez-Juanes F, González M, Herrero A, Muñoz MC, González-Buitrago JM, Muñoz JL (2010) [Identifying bacteria using a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer. Comparison with routine methods used in clinical microbiology laboratories]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*

- 28(8):492–497
122. Kohlmann R, Hoffmann A, Geis G, Gatermann S (2015) MALDI-TOF mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid pathogen identification from positive blood cultures. *Int J Med Microbiol* 305(4-5):469–479
 123. Verroken A, Defourny L, Lechgar L, Magnette A, Delmée M, Glupczynski Y (2015) Reducing time to identification of positive blood cultures with MALDI-TOF MS analysis after a 5-h subculture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34(2):405–413
 124. Hrabák J, Studentová V, Walková R, et al (2012) Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* 50(7):2441–2443
 125. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M (2012) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *Journal of Clinical Microbiology* 50(3):927–937
 126. Burckhardt I, Zimmermann S (2011) Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *Journal of Clinical Microbiology* 49(9):3321–3324
 127. Navon-Venezia S, Leavitt A, Ben-Ami R, Aharoni Y, Schwaber MJ, Schwartz D, Carmeli Y (2005) Evaluation of an accelerated protocol for detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing gram-negative bacilli from positive blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology* 43(1):439–441
 128. Kempf VAJ, Mändle T, Schumacher U, Schäfer A, Autenrieth IB (2005) Rapid detection and identification of pathogens in blood cultures by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Int J Med Microbiol* 295(1):47–55
 129. Rüssmann H, Kempf VA, Koletzko S, Heesemann J, Autenrieth IB (2001) Comparison of fluorescent in situ hybridization and conventional culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 39(1):304–308
 130. Stender H (2003) PNA FISH: an intelligent stain for rapid diagnosis of infectious diseases. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 3(5):649–655
 131. Søgaard M, Hansen DS, Fiandaca MJ, Stender H, Schønheyder HC (2007) Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization for rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* from positive blood cultures. *Journal of Medical Microbiology* 56(Pt 7):914–917
 132. González V, Padilla E, Giménez M, Vilaplana C, Pérez A, Fernández G, Quesada MD, Pallarés MA, Ausina V (2004) Rapid diagnosis of *Staphylococcus aureus* bacteremia using

- S. aureus* PNA FISH. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23(5):396–398
133. Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, Chang TC (2001) Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *Journal of Clinical Microbiology* 39(10):3466–3471
 134. Tan TY, Corden S, Barnes R, Cookson B (2001) Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from positive blood cultures by real-time fluorescence PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 39(12):4529–4531
 135. Louie L, Goodfellow J, Mathieu P, Glatt A, Louie M, Simor AE (2002) Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 40(8):2786–2790
 136. Hirvonen JJ, Kaukoranta S-S (2013) GenomEra MRSA/SA, a fully automated homogeneous PCR assay for rapid detection of *Staphylococcus aureus* and the marker of methicillin resistance in various samplmatrixes. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 13(7):00–00
 137. Scanvic A, Courdavault L, Sollet J-P, Le Turdu F (2011) [Interest of real-time PCR Xpert MRSA/SA on GeneXpert(®) DX System in the investigation of staphylococcal bacteremia]. *Pathol Biol* 59(2):67–72
 138. Tissari P, Zumla A, Tarkka E, et al (2010) Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study. *The Lancet* 375(9710):224–230
 139. PhD MAP, PhD EMT, ABMM C-ADBPD (2013) Diagnostic Assays for Identification of Microorganisms and Antimicrobial Resistance Determinants Directly from Positive Blood Culture Broth. *Clinics in Laboratory Medicine* 33(3):651–684
 140. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al (2006) Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews* 19(1):165–256
 141. Hansen WLJ, Beuving J, Bruggeman CA, Wolffs PFG (2010) Molecular Probes for Diagnosis of Clinically Relevant Bacterial Infections in Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology* 48(12):4432–4438
 142. Mühl H, Kochem A-J, Disqué C, Sakka SG (2010) Activity and DNA contamination of commercial polymerase chain reaction reagents for the universal 16S rDNA real-time polymerase chain reaction detection of bacterial pathogens in blood. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 66(1):41–49
 143. Handschur M, Karlic H, Hertel C, Pfeilstöcker M, Haslberger AG (2009) Preanalytic removal of human DNA eliminates false signals in general 16S rDNA PCR monitoring of

- bacterial pathogens in blood. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 32(3):207–219
144. Opota O, Croxatto A, Prod'hom G, Greub G (2015) Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. *Clinical Microbiology and Infection* 1–10
 145. Wellinghausen N, Kochem AJ, Disque C, Muhl H, Gebert S, Winter J, Matten J, Sakka SG (2009) Diagnosis of Bacteremia in Whole-Blood Samples by Use of a Commercial Universal 16S rRNA Gene-Based PCR and Sequence Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 47(9):2759–2765
 146. Grif K, Heller I, Prodinger WM, Lechleitner K, Lass-Flörl C, Orth D (2012) Improvement of detection of bacterial pathogens in normally sterile body sites with a focus on orthopedic samples by use of a commercial 16S rRNA broad-range PCR and sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 50(7):2250–2254
 147. Schreiber J, Nierhaus A, Braune SA, de Heer G, Kluge S (2013) Comparison of three different commercial PCR assays for the detection of pathogens in critically ill sepsis patients. *Med Klin Intensivmed Notfmed* 108(4):311–318
 148. Leitner E, Kessler HH, Spindelboeck W, Hoenigl M, Putz-Bankuti C, Stadlbauer-Köllner V, Krause R, Grisold AJ, Feierl G, Stauber RE (2013) Comparison of two molecular assays with conventional blood culture for diagnosis of sepsis. *Journal of Microbiological Methods* 92(3):253–255
 149. Loonen AJM, Jansz AR, Stalpers J, Wolffs PFG, Brule AJC (2011) An evaluation of three processing methods and the effect of reduced culture times for faster direct identification of pathogens from BacT/ALERT blood cultures by MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31(7):1575–1583
 150. Navarro F, Calvo J, Cantón R (2011) Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. ... y *Microbiología Clínica*
 151. Fitting C, Parlato M, Adib-Conquy M, Memain N, Philippart F, Misset B, Monchi M, Cavaillon J-M, Adrie C (2012) DNAemia detection by multiplex PCR and biomarkers for infection in systemic inflammatory response syndrome patients. *PLoS ONE* 7(6):e38916
 152. Lehmann LE, Hunfeld K-P, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoeft A, Stüber F (2008) A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol* 197(3):313–324
 153. Varani S, Stanzani M, Paolucci M, Melchionda F, Castellani G, Nardi L, Landini MP, Baccarani M, Pession A, Sambri V (2009) Diagnosis of bloodstream infections in

- immunocompromised patients by real-time PCR. *Journal of Infection* 58(5):346–351
154. Casalta JP, Gouriet F, Roux V, Thuny F, Habib G, Raoult D (2008) Evaluation of the LightCycler® SeptiFast test in the rapid etiologic diagnostic of infectious endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28(6):569–573
 155. Wallet F, Loïez C, Herwegh S, Courcol RJ (2011) Usefulness of real-time PCR for the diagnosis of sepsis in ICU-acquired infections. *Infect Disord Drug Targets* 11(4):348–353
 156. Lilienfeld-Toal von M, Lehmann LE, Raadts AD, et al (2009) Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia. *Journal of Clinical Microbiology* 47(8):2405–2410
 157. Cockerill FR (2010) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical & Laboratory Standards Institute
 158. Dark P, Blackwood B, Gates S, McAuley D, Perkins GD, McMullan R, Wilson C, Graham D, Timms K, Warhurst G (2014) Accuracy of LightCycler® SeptiFast for the detection and identification of pathogens in the blood of patients with suspected sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med* 41(1):21–33
 159. Quesada MD, Giménez M, Molinos S, Fernández G, Sánchez MD, Ravelo R, Ramírez A, Banqué G, Ausina V (2010) Performance of VITEK-2 Compact and overnight MicroScan panels for direct identification and susceptibility testing of Gram-negative bacilli from positive FAN BacT/ALERT blood culture bottles. *Clinical Microbiology and Infection* 16(2):137–140
 160. Barry J, Brown A, Ensor V, Lakhani U, Petts D, Warren C, Winstanley T (2003) Comparative evaluation of the VITEK 2 Advanced Expert System (AES) in five UK hospitals. *J Antimicrob Chemother* 51(5):1191–1202
 161. Bacconi A, Richmond GS, Baroldi MA, et al (2014) Improved sensitivity for molecular detection of bacterial and *Candida* infections in blood. *Journal of Clinical Microbiology* 52(9):3164–3174
 162. Vincent J-L, Brealey D, Libert N, et al (2015) Rapid Diagnosis of Infection in the Critically Ill, a Multicenter Study of Molecular Detection in Bloodstream Infections, Pneumonia, and Sterile Site Infections. *Critical Care Medicine* 43(11):2283–2291
 163. (2009) Food and Drugs. Government Printing Office
 164. Harbarth S, Garbino J, Pugin J, Romand JA, Lew D, Pittet D (2003) Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. *The American Journal of Medicine* 115(7):529–535
 165. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Herrera-Melero I, Aldabo-Pallas T, Cayuela-

- Dominguez A, Marquez-Vacaro JA, Carbajal-Guerrero J, Garcia-Garmendia JL (2007) Mortality and morbidity attributable to inadequate empirical antimicrobial therapy in patients admitted to the ICU with sepsis: a matched cohort study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61(2):436–441
166. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al (2013) Surviving Sepsis Campaign. *Critical Care Medicine* 41(2):580–637
167. Green JM (2015) Essentials of sepsis management. *Surg Clin North Am* 95(2):355–365
168. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC (1999) Murray: Manual of clinical laboratory - Google Scholar. Washington DC
169. Murray PR, Niles AC, Heeren RL (1987) Comparison of a highly automated 5-h susceptibility testing system, the Cobas-Bact, with two reference methods: Kirby-Bauer disk diffusion and broth microdilution. *Journal of Clinical Microbiology* 25(12):2372–2377
170. Lueangarun S, Leelarasamee A (2012) Impact of Inappropriate Empiric Antimicrobial Therapy on Mortality of Septic Patients with Bacteremia: A Retrospective Study. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2012(6):1–13
171. Kang C-I, Sung YK, Lee KH, Lee KT, Lee JK (2013) Clinical impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome in bacteremic biliary tract infections. *Scand J Infect Dis* 45(3):227–234
172. Patrick R Murray PD, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML (2007) Manual of Clinical Microbiology.
173. Hansen DS, Jensen AG, Nørskov-Lauritsen N, Skov R, Bruun B (2002) Direct identification and susceptibility testing of enteric bacilli from positive blood cultures using VITEK (GNI+/GNS-GA). *Clinical Microbiology and Infection* 8(1):38–44
174. Ling TK, Tam PC, Liu ZK, Cheng AF (2001) Evaluation of VITEK 2 rapid identification and susceptibility testing system against gram-negative clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 39(8):2964–2966
175. Prod'hom G, Durussel C, Greub G (2013) A simple blood-culture bacterial pellet preparation for faster accurate direct bacterial identification and antibiotic susceptibility testing with the VITEK 2 system. *Journal of Medical Microbiology* 62(Pt_5):773–777
176. Munoz-Dávila MJ, Yagüe G, Albert M, García-Lucas T (2011) Comparative evaluation of Vitek 2 identification and susceptibility testing of Gram-negative rods directly and isolated from BacT/ALERT-positive blood culture bottles. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31(5):663–669
177. Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al (2006) Duration of hypotension before initiation of

- effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical Care Medicine* 34(6):1589–1596
178. Paterson DL (2008) Impact of antibiotic resistance in gram-negative bacilli on empirical and definitive antibiotic therapy. *CLIN INFECT DIS* 47 Suppl 1:S14–20
179. Cosgrove SE (2006) The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *CLIN INFECT DIS* 42 Suppl 2:S82–9
180. Gould IM, David MZ, Esposito S, Garau J, Lina G, Mazzei T, Peters G (2012) New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 39(2):96–104
181. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y (2002) Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *CLIN INFECT DIS* 36(1):53–59
182. Mutnick AH, Biedenbach DJ, Jones RN (2003) Geographic variations and trends in antimicrobial resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance *Diagnostic microbiology and ...*
183. Treitman AN, Yarnold PR, Warren J, Noskin GA (2004) Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002). *Journal of Clinical Microbiology* 43(1):462–463
184. Patel R (2003) Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother* 51 Suppl 3:iii13–21
185. Funke G, Funke-Kissling P (2004) Use of the BD PHOENIX Automated Microbiology System for direct identification and susceptibility testing of gram-negative rods from positive blood cultures in a three-phase trial. *Journal of Clinical Microbiology* 42(4):1466–1470
186. Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, Van Landuyt H (2004) Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 microg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23(5):389–392
187. Junkins AD, Lockhart SR, Heilmann KP, Dohrn CL, Stein Von DL, Winokur PL, Doern GV, Richter SS (2009) BD Phoenix and Vitek 2 detection of *mecA*-mediated resistance in *Staphylococcus aureus* with cefoxitin. *Journal of Clinical Microbiology* 47(9):2879–2882
188. Teixeira LA, Facklam RR (2003) [CITATION][C]. Murray PR
189. Idelevich EA, Schüle I, Grünastel B (2014) Acceleration of antimicrobial susceptibility

- testing of positive blood cultures by inoculation of Vitek 2 cards with briefly incubated solid medium cultures. *Journal of clinical ...*
190. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR (2001) Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine* 29(7):1303–1310
 191. Watson RS, Carcillo JA, Linde-Zwirble WT, Clermont G, Lidicker J, Angus DC (2003) The Epidemiology of Severe Sepsis in Children in the United States. *Am J Respir Crit Care Med* 167(5):695–701
 192. Bateman SL, Seed PC (2010) Procession to pediatric bacteremia and sepsis: covert operations and failures in diplomacy. *PEDIATRICS* 126(1):137–150
 193. Goldstein B, Giroir B, Randolph A (2005) International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics*. *Pediatric Critical Care Medicine* 6(1):2–8
 194. Brilli RJ, Goldstein B (2005) Pediatric sepsis definitions: Past, present, and future. *Pediatric Critical Care Medicine* 6(Supplement):S6–S8
 195. Connell TG, Rele M, Cowley D, BATTERY JP, Curtis N (2007) How reliable is a negative blood culture result? Volume of blood submitted for culture in routine practice in a children's hospital. *PEDIATRICS* 119(5):891–896
 196. Pérez López A, Giménez M, Rodrigo C, Alonso A, Prat C, Ausina V (2003) Seven-year review of paediatric bacteraemias diagnosed in a Spanish university hospital. *Acta Paediatr* 92(7):854–856
 197. Cohen-Wolkowicz M, Moran C, Benjamin DK, Cotten CM, Clark RH, Benjamin DK, Smith PB (2009) Early and late onset sepsis in late preterm infants. *Pediatr Infect Dis J* 28(12):1052–1056
 198. Kristóf K, Kocsis E, Nagy K (2009) Clinical microbiology of early-onset and late-onset neonatal sepsis, particularly among preterm babies. *Acta Microbiol Immunol Hung* 56(1):21–51
 199. Myers AL, Hall M, Williams DJ, Auger K, Tieder JS, Statile A, Jerardi K, McClain L, Shah SS (2013) Prevalence of bacteremia in hospitalized pediatric patients with community-acquired pneumonia. *Pediatr Infect Dis J* 32(7):736–740
 200. Musoke RN, Revathi G (2000) Emergence of multidrug-resistant gram-negative organisms in a neonatal unit and the therapeutic implications. *J Trop Pediatr* 46(2):86–91
 201. Khassawneh M, Khader Y, Abuqtaish N (2009) Clinical features of neonatal sepsis caused by resistant Gram-negative bacteria. *Pediatr Int* 51(3):332–336

202. Sat Sharma MD FF, Anand Kumar MD F (2008) Antimicrobial Management of Sepsis and Septic Shock. *Clinics in Chest Medicine* 29(4):677–687
203. Beuving J, Wolffs PFG, Hansen WLJ, Stobberingh EE, Bruggeman CA, Kessels A, Verbon A (2014) Impact of same-day antibiotic susceptibility testing on time to appropriate antibiotic treatment of patients with bacteraemia: a randomised controlled trial. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34(4):831–838
204. Tudela P, Mòdol JM, Giménez M, Prat C, Vilaseca B, Tor J (2007) [Bacteremia in outpatients: a 10-year period follow-up]. *Medicina Clinica* 129(20):770–772
205. Byl B, Clevenbergh P, Jacobs F, Struelens MJ, Zech F, Kentos A, Thys JP (1999) Impact of infectious diseases specialists and microbiological data on the appropriateness of antimicrobial therapy for bacteremia. *CLIN INFECT DIS* 29(1):60–6– discussion 67–8
206. Stoneking LR, Patanwala AE, Winkler JP (2013) Would earlier microbe identification alter antibiotic therapy in bacteremic emergency department patients? *The Journal of ...*
207. Jones AE, Puskarich MA (2013) The Surviving Sepsis Campaign guidelines 2012: update for emergency physicians. *Ann Emerg Med* 63(1):35–47
208. Mathevon T, Souweine B, Traoré O (2002) ICU-acquired nosocomial infection: impact of delay of adequate antibiotic treatment. ... *journal of infectious ...*
209. Avdic E, Carroll KC (2014) The Role of the Microbiology Laboratory in Antimicrobial Stewardship Programs. *Infectious Disease Clinics of North America* 28(2):215–235
210. Gros H, Aslangul E, Lesprit P, Mainardi JL (2012) Positive blood culture in hospital: Notification methods and impact of recommendations by an infectious disease specialist. *Med Mal Infect* 42(2):76–79
211. Lesprit P, Merabet L, Fernandez J, Legrand P, Brun-Buisson C (2010) Improving antibiotic use in the hospital: Focusing on positive blood cultures is an effective option. *Presse Med* 40(6):e297–e303

Anexos

Performance of VITEK-2 Compact and overnight MicroScan panels for direct identification and susceptibility testing of Gram-negative bacilli from positive FAN BacT/ALERT blood culture bottles

M. D. Quesada, M. Giménez, S. Molinos, G. Fernández, M. D. Sánchez, R. Rívelo, A. Ramírez, G. Banqué and V. Ausina

Department of Microbiology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, C/Canyet s/n, Badalona, Spain

Abstract

We describe the reliability of the VITEK-2 Compact and overnight MicroScan panels for direct identification and susceptibility testing from the BacT/ALERT blood culture system when using FAN (FA and FN) bottles. A simple procedure, in two centrifugation steps, was designed to remove the charcoal particles present in FA and FN bottles. A total of 113 positive blood cultures showing Gram-negative rods were investigated. *Enterobacteriaceae* were isolated in 104 cases, and *Pseudomonas aeruginosa* in nine. The MicroScan system correctly identified 106 (93.8%) of the 113 isolates. The seven identification errors included *P. aeruginosa* (three), *Enterobacter cloacae* (one), *Escherichia coli* (one), *Klebsiella oxytoca* (one), and *Klebsiella pneumoniae* (one). The VITEK-2 system correctly identified 109 (96.5%) of the 113 samples obtained directly from the blood culture bottles. The four unidentified isolates were *Enterobacter cloacae* (two), *Escherichia coli* (one), and *P. aeruginosa* (one). MicroScan yielded 4/779 (0.5%) very major errors and 28/2825 (0.9%) minor errors. VITEK-2 yielded 2/550 (0.36%) very major errors, 1/1718 (0.05%) major error, and 32/2373 (1.3%) minor errors. Both systems provided excellent identification (correlation of >90%) and susceptibility (correlation of >98%) results. The average times required to obtain identification and susceptibility results using the direct test applied to the VITEK-2 Compact system were 4.57 ± 1.37 h and 6.52 ± 1.64 h, respectively. The VITEK-2 compact system provided results on the same day that the blood culture was found to be positive.

Keywords: BacT/ALERT, blood culture, FAN bottles, MicroScan, Vitek

Original Submission: 24 October 2008; **Revised Submission:** 21 February 2009; **Accepted:** 18 March 2009

Editor: D. Mack

Clin Microbiol Infect

Corresponding author and reprint requests: M. Giménez, Department of Microbiology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, C/Canyet s/n, 08916 Badalona, Spain
E-mail: mgimenez.germanstrias@gencat.cat

Introduction

Bacteraemia continues to be one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. There are several factors that influence the clinical evolution of bloodstream infections. Among these, the identity and the antimicrobial susceptibility of the microorganisms involved have a great impact on the clinical management of the patient [1–4]. Thus, it has been demonstrated that inadequate empirical treatment of sepsis is related to a higher risk of clinical complications. These studies also demonstrated that decreasing the time needed to obtain the identification and susceptibility results led to significant reductions in patient mortality and overall hospital costs.

In order to decrease the time needed to obtain the results, automated identification and susceptibility testing systems are faced with the challenge of adapting their validated protocol using overnight bacterial isolates taken from solid media to protocols allowing direct inoculation from positive blood cultures. This could offer the possibility of having identification and susceptibility test results available on the same day that a positive blood culture was detected.

Although several studies have reported the reliability of automated systems for identification and susceptibility testing directly from the BACTEC 9240 (BD, Sparks, MD, USA) or BacT/ALERT (Biomérieux, Durham, NC, USA) blood culture systems [5–9], the protocols include long incubation times and multiple centrifugation steps that make their use difficult for routine purposes [10]. Otherwise, there are no published data on the performance of automated identification and susceptibility testing systems adapted to direct inoculation from the BacT/ALERT blood culture system using FA and FN culture bottles. These media contain absorbent charcoal particles that can potentially interfere with the direct testing procedures.

The objective of this study was to evaluate the reliability and accuracy of two automated identification and susceptibility testing systems, the VITEK-2 Compact (Biomérieux, Marcy l'Étoile, France) and the MicroScan (Dade Behring, Inc., West Sacramento, CA, USA), for direct identification and susceptibility testing of Gram-negative rods directly from positive BacT/ALERT FA and FN blood culture bottles.

Materials and Methods

A total of 113 prospective positive blood culture samples showing Gram-negative enteric organisms with bacillus-like morphology, derived from patients suspected of having bacteraemia, were included in the study. The growth of bacteria in FA and FN blood culture bottles was continuously monitored using the BacT/ALERT system. Positive bottles giving mixed cultures after overnight plate incubation were excluded from the study.

Once a blood culture was found to be positive, one aliquot was used to inoculate the VITEK-2 Compact cards and the MicroScan panels using the direct test procedure. Another aliquot was subcultured on a combination of agar plates. A simple and rapid direct testing procedure was validated for both systems.

MicroScan system (direct testing procedure)

To inoculate the MicroScan Combo 15 overnight conventional panels, a 5-mL aliquot was centrifuged at 900 g for 10 min. The supernatant was used to make a bacterial suspension adjusted to McFarland standard 2, and 100 µL of this suspension was added to 25 mL of distilled water containing Tween-80. Panels were finally inoculated using the Renox inoculation system, and incubated at 37°C for 18–24 h before being read by the Autoscan system (Dade Behring, Inc.).

VITEK-2 Compact system (direct testing procedure)

ID-GN and AST-N 020 cards were used, respectively, for identification and susceptibility testing directly from positive BacT/ALERT FA and FN blood cultures. To inoculate the VITEK-2 cards directly from a positive blood culture bottle, a 5-mL aliquot was centrifuged at 60 g for 10 min. The supernatant was removed and transferred to a new tube, and then centrifuged at 900 g for 10 min. The supernatant was discarded, and the sediment was used to make a bacterial suspension adjusted to a McFarland standard of 1. At this point, the VITEK-2 Compact cards were inoculated following the manufacturer's instructions. Bacterial isolates obtained from subculture on agar plates and overnight incubation

were used to perform the conventional MicroScan and VITEK-2 inoculation protocol.

Data analysis

The results obtained using the standard inoculation procedure for each system were used as reference methods. Discrepant identification or susceptibility results were resolved by using the API 20E (Biomérieux) and the Etest (AB Biodisk), respectively.

Discrepancies in category interpretation by both methods were determined for each antibiotic. Category disagreements were classified as follows: very major error (false susceptibility) when the result was susceptibility with the direct inoculation method but resistance with the reference procedure; major error (false resistance) when the result was resistance with the direct inoculation protocol but susceptibility with the reference method; and minor error when a susceptibility result of 'I' was obtained with the direct procedure and a susceptibility result of 'S' or 'R' with the reference protocol, or a susceptibility result of 'I' was obtained with the reference method and a susceptibility result of 'S' or 'R' with the direct procedure.

Results

A total of 113 positive blood culture samples showing Gram-negative rods were investigated. A member of the Enterobacteriaceae was isolated in 104 cases: 56 *Escherichia coli*, 23 *Klebsiella* sp., four *Salmonella* sp., 13 *Enterobacter* sp., two *Morganella morganii*, and six *Serratia marcescens*. *Pseudomonas aeruginosa* was isolated in nine cases.

The MicroScan system correctly identified 106 (93.8%) of the 113 isolates. The seven identification errors included *P. aeruginosa* (three), *Enterobacter cloacae* (one), *E. coli* (one), *Klebsiella oxytoca* (one), and *Klebsiella pneumoniae* (one). The VITEK-2 system correctly identified 109 of the 113 samples obtained directly from the blood culture bottles (96.5%). The four unidentified isolates were *Enterobacter cloacae* (two), *E. coli* (one) and *P. aeruginosa* (one). The assessed systems showed >90% agreement in bacterial identification. From the 2373 combinations giving a susceptibility category with the VITEK-2 Compact and the 2825 obtained with the MicroScan system, the overall category agreement was found to be >95% for the two systems.

MicroScan yielded 4/779 (0.5%) very major errors and 28/2825 (0.9%) minor errors (Table 1). The VITEK-2 system yielded 2/550 (0.36%) very major errors, 1/1718 (0.05%) major error and 32/2373 (1.3%) minor errors (Table 1). The main agreement percentage given by both methods was in

TABLE 1. Category agreement between VITEK-2 and MicroScan systems vs. the standard method

Interpretative category	VITEK-2 Compact					MicroScan				
	No. of antibiotics tested	No. of strains in agreement (%)	No. of minor errors ^a (%)	No. of major errors ^b (%)	No. of very major errors ^c (%)	No. of antibiotics tested	No. of strains in agreement (%)	No. of minor errors (%)	No. of major errors (%)	No. of very major errors (%)
Susceptible	1718	1705 (99.3)				1977	1967 (99.5)			
Intermediate	105	90 (85.7)				69	51 (74)			
Resistant	550	543 (98.7)				779	775 (99.5)			
Total	2373	2338 (98.5)	32 (1.3)	1 ^d (0.04)	2 ^e (0.08)	2825	2793 (98.9)	28 (0.9)	0	4 ^f (0.14)

^aThe denominator for the major error rate is the total number of MICs indicating bacterial susceptibility as determined by the standard method, and that for very major errors is the total number of MICs indicating bacterial resistance as determined by the standard method. For minor errors, the denominator indicates total antibiotic MIC combinations.

^b*Escherichia coli*.

^c*Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii*.

^d*Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *M. morganii*.

the susceptibility category, 99.2 % for VITEK-2 and 99.5% for MicroScan. Agreement in the resistance category was greater with MicroScan (99.5%) than with VITEK-2 (98.7%). Finally, in the intermediate category, the MicroScan system showed 74% agreement, whereas the VITEK-2 system showed 85.7% (Table 1). The distribution of errors by antibiotic using both systems is shown in Table 2.

Of the 104 enterobacterial isolates, seven produced extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). They were identified as *E. coli* (three) and *K. pneumoniae* (four). The MicroScan system warned of the possibility of ESBL production in the seven isolates. The VITEK-2 system detected ESBL production in five strains. In two of the four *K. pneumoniae* strains an antibiogram resistant pattern was detected but was not compatible with an ESBL profile and reported as incoherent phenotype by the VITEK-2 software.

The average times required to obtain an identification and susceptibility result by using the direct test applied to the VITEK-2 Compact system were 4.57 ± 1.37 h and

6.52 ± 1.64 h, respectively. No statistically significant difference was found in the average time to result between the direct and the standard procedure in the VITEK-2 Compact system. This system provided a final identification and susceptibility result in <6 h for 80% of the samples tested. The time needed to obtain a final identification and susceptibility result with the MicroScan system was 18–24 h for both inoculation protocols.

Discussion

Using the direct method, both systems correctly identified >90% of the *Enterobacteriaceae* isolates included in the study and 89% of *P. aeruginosa* isolates. Other comparative evaluations of the susceptibility testing systems have suggested that very major errors should occur in <1.5% of all tests, and the overall agreement between test and reference method should be superior to 95% [11]. In our study, we found only 0.36% of very major errors, and the percentage of complete agreement in the susceptibility and resistance categories was >96% in both systems. As shown by Waites et al. [11], minor errors accumulated in the intermediate category. Bruins et al. [5] obtained similar results when testing VITEK-2 direct inoculation from positive BACTEC blood culture bottles. In this case, they used resin-containing bottles and VITEK-2 fluorescent identification cards. Our protocol, consisting of two centrifugation steps, is easy to perform and allows charcoal to be removed so that identification and susceptibility results using the ID-GN colorimetric VITEK-2 identification cards and AST-N020 susceptibility cards yielded satisfactory results.

Several studies have demonstrated the adverse effect of delays in effective initiation of antimicrobial therapy on patient survival [3,12–14]. In our hospital, ESBL-producing *Enterobacte-*

TABLE 2. Number of minor errors by antibiotic and system after resolution of discrepancies

Antibiotic	VITEK-2 Compact	MicroScan
Ampicillin	–	2
Ampicillin-clavulanate	1	10
Piperacillin	12	4
Piperacillin-tazobactam	–	1
Cephalosporins	10	6
Cefuroxime	1	3
Cefazidime	1	1
Cefotaxime	2	–
Cefepime	2	–
Acetaminophen	–	3
Gentamicin	1	–
Tobramycin	3	1
Amikacin	–	1
Ciprofloxacin	2	1
Norfloxacin	1	–
Total	35	33

riaceae and multiresistant *P. aeruginosa* have become endemic, causing nearly 20% of infections. Therefore, the percentage of inadequate empirical therapy is high. The VITEK-2 Compact system of rapid antimicrobial testing provides, directly from FAN BacT/ALERT positive blood cultures, reliable susceptibility results in 6.52 ± 1.64 h, allowing reduction of turn-around time to approximately 24 h. These data permit the initiation of contact isolation measures and the changing of inadequate empirical treatment sooner than if conventional methods are used. Other studies have shown that rapid identification and susceptibility testing results in earlier switches in antibiotic therapy, narrowing the spectrum and reducing total antibiotic consumption [1,15].

In this study, we demonstrate the usefulness of the protocol for direct identification and susceptibility testing of Enterobacteriaceae from BacT/ALERT FA and FN bottles containing charcoal particles. The identification and susceptibility testing of non-fermenters following direct inoculation appeared to be less reliable, but we tested only nine strains, so these results must be interpreted with extreme caution. Our study is also limited by the fact that we did not test Gram-positive cocci, which are implicated in a large amount of positive blood cultures. Gram-positive microorganisms, particularly staphylococci, adhere strongly to charcoal particles; this fact may therefore have contributed to our lack of success in developing a protocol for direct testing from FAN bottles. Further studies are needed to validate a methodology with the capacity to reliably identify and provide correct susceptibility results from blood cultures yielding Gram-positive microorganisms. Polymicrobial blood cultures with Gram-negative organisms were not included in the study, but the present technique has demonstrated, in our daily routine (data not shown), that it can be used to provide direct susceptibility test results in these cases.

As the goal of the microbiology laboratory is to provide rapid, reliable and clinically relevant results, direct inoculation of VITEK-2 cards from positive blood cultures can help clinicians to more rapidly determine adequate treatment. However, the use of this procedure implies a skilled review of potential inaccuracies stemming from polymicrobial cultures. Thus, a clinical microbiologist should be available during the evening schedule. Otherwise, the overnight MicroScan panel could be a good option.

Acknowledgements

We thank E. Padilla for his assistance in reviewing and editing the manuscript.

©2009 The Authors

Journal Compilation ©2009 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI

Transparency Declaration

None of the investigators have any financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript.

References

- Kerremans JJ, Verboom P, Stijnen T et al. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing reduce antibiotic use and accelerate pathogen-directed antibiotic use. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 428–435.
- Kollef MH. Broad-spectrum antimicrobials and the treatment of serious bacterial infections: getting it right up front. *Clin Infect Dis* 2008; 47: S3–S13.
- Kumar A, Roberts D, Wood KE et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34: 1589–1596.
- Harbarth S, Nobre V, Pittet D. Does antibiotic selection impact patient outcome? *Clin Infect Dis* 2007; 44: 87–93.
- Bruins MJ, Bloembergen P, Ruijs GJHM et al. Identification and susceptibility testing of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* by direct inoculation from positive BACTEC blood culture bottles into VITEK 2. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 7–11.
- Kerremans J, Gommers WHF, Verburgh HA, Vos MC. Accuracy of identification and susceptibility results by direct inoculation of VITEK 2 cards from positive BACTEC cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 892–898.
- Ling TK, Liu ZK, Cheng AFB. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid direct identification and susceptibility testing of gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4705–4707.
- Cueto M, Cepellos E, Martinez-Martinez L et al. Use of positive blood cultures for direct identification and susceptibility testing with the VITEK 2 System. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3734–3738.
- Funke G, Funke-Kastig P. Use of the BD PHOENIX automated microbiology system for direct identification and susceptibility testing of gram-negative rods from positive blood cultures in a three-phase trial. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1466–1470.
- Nohe FS, Contestable PB, Lincsis D, Punsalang A. Rapid direct antibiotic susceptibility testing on blood culture isolates using the Abbot advantage system. *Am J Clin Pathol* 1986; 86: 645–649.
- Wailes KB, Brookings E, Moser SA, Zimmer L. Direct susceptibility testing with positive BacT/ALERT blood cultures by using MicroScan overnight and rapid panels. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2052–2056.
- Pateron DL. Impact of antibiotic resistance in gram-negative bacilli on empirical and definitive antibiotic therapy. *Clin Infect Dis* 2008; 47: S14–S20.
- Hyle EP, Lipworth AD, Zouros TE et al. Impact of inadequate initial antimicrobial therapy on mortality in infections due to extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Arch Intern Med* 2005; 165: 1375–1380.
- Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin Infect Dis* 2006; 42: 582–589.
- Barenfanger J, Drake C, Kacich G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1415–1418.

D-1538



Performance of Vitek-2 Compact for Direct Identification and Susceptibility Testing of Gram-positive cocci from Positive FAN BacT/ALERT Blood Culture Bottles

M.Giménez, M.D Quesada, S.Molinos, J.Hidalgo, M.C. Colomer, Y.Hernández, V. Ausina
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona. Spain



mgimenez.germanstrias@gencat.cat

Abstract

Background: gram-positive microorganisms, particularly staphylococci adhere strongly to charcoal particles which limiter direct blood culture testing. We describe the reliability of the Vitek-2 Compact (bioMérieux) for direct identification (ID) and susceptibility (AS) testing from the BacT/ALERT system

(bioMérieux) when using FAN bottles.

Methods: ID- GP, AST-P588, AST-P589 and Vitek-2 Compact cards were used for ID and AS testing: coagulase tub test was performed directly from positive blood cultures showing staphylococci, in 19 cases. A 5 mL aliquot was sonicated 10', then centrifuged at 750g. 2'. The supernatant (1-2mL) was sonicated 5' and then centrifuged at 2000 g. 5'. The sediment was adjusted to Mc Farland 1.7-2. Standard inoculation procedure from bacterial isolates was used as reference method.

Results: A total of 114 positive blood culture samples showing gram-positive cocc (GP) were investigated. A member of *Staphylococcus* genera was isolated in 88 cases, (*S. aureus* 53, *S. epidermidis* 25, other coagulase-negative staphylococci 10), *M. luteus*, 1, *E. faecalis* 17 and *E. faecium* 7. Vitek-2 compact correctly identified 93/114 (81.5%) of samples. The direct coagulase tub test identified 11/19 (58%) of *S. aureus* in 4 h. From the 1780 combinations giving a susceptibility category, overall agreement was 99%. Vitek-2 yielded 7 very major errors (0.5%), 2 major errors (0.5%) and 8 minor errors (0.5%). Average times to obtain direct ID and AS results were 5.6±1 h and 9.9±1.2 h respectively for Staphylococci and 3.68±1.3 h and 9.56±1.3 h for Enterococci.

Conclusions: Vitek-2 Compact system provides rapid and reliable results directly from positive FA and FN BacT/ALERT blood culture bottles containing charcoal particles.

A simple method to remove charcoal allows ID and AS results the same day the blood culture is detected positive reducing turn-around time to ~ 24 h.

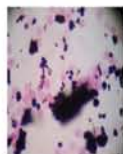
Background

Several studies have demonstrated the adverse effect of delays in effective initiation of antimicrobial therapy in clinical evolution of sepsis. Decreasing the time need to obtain the identification (ID) and susceptibility (AS) results led to significant reductions in patient mortality and overall hospital costs^{1,2}

Automated identification and susceptibility testing systems used directly from positive blood culture bottles offer the possibility to obtain results the same day a blood culture was detected as positive. We previously validated a protocol for ID and AS testing of Gram-negative rods directly from positive BacT/ALERT FA and FN blood culture bottles (bioMérieux, Durham, NC, USA)³ Absorbent charcoal particles contained in FAN bottles can potentially interfere with direct testing procedures. Gram-positive microorganisms, particularly staphylococci adhere strongly to charcoal particles; this fact may have contributed to the lack of success in developing a method for Gram-positive direct testing from FAN bottles.

Objective

To evaluate the reliability and accuracy of a protocol designed for direct ID and AS testing of Gram-positive coccid using VITEK-2 Compact system (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), directly from positive BacT/ALERT FA and FN blood culture bottles.



Results

This easy protocol using VITEK-2 compact directly from positive FAN BacT/ALERT bottles permit to start isolation measures and effective treatment ~ 24 h, sooner than using conventional methods.

The coagulase tub test performed directly from positive bottles showing staphylococci, was positive only in 19/35 (54.2%) in 4 hours

Table 1: Performance of Vitek 2 for identification of gram-positive cocci directly from positive blood cultures

Species	Number of isolates			
	Isolated	Correctly identified	Unidentified	Misidentified
Staphylococci (88)				
<i>S. aureus</i>	53	42 (80%)	4	7 ^a
<i>S. epidermidis</i>	25	24 (96%)	0	1 ^b
Other coagulase-negative staphylococci	10	8	2	0
<i>Micrococcus luteus</i>	1	1	0	0
Enterococci (25)				
<i>E. faecalis</i>	18	17 (94.5%)	0	1 ^c
<i>E. faecium</i>	7	3 (43%)	0	4 ^d
Total	114	95 (83.3%)	6	13

^a *S. marimul* (2), *Klebsiella* spp. (2), *Aerococcus* sp. (1), *Artemisia* (1), *Aspergillus* (1)
^b *Aspergillus* sp.
^c *Aspergillus* sp.
^d *S. aureus* (1), *E. gallinarum* (2)

Table 2: Average time to identification and Susceptibility results using direct VITEK-2 Compact

VITEK-2 Direct blood culture	Identification (hours)	Susceptibility (hours)
Staphylococci	5.6 ± 1	9.2 ± 1.2
Enterococci	3.6 ± 1.3	9.5 ± 1.3

Table 3: Susceptibility category agreement between direct VITEK-2 system and the reference method

Interpretative category	No. of antibiotics tested	No. of strains in agreement (%)	No. of very major errors (%) ^a	No. of major errors (%) ^b	No. of minor errors (%) ^c
Staphylococci					
Susceptible	1042	1042 (100%)			
Intermediate	29	29 (99.65%)			
Resistant	269	261 (97.02%)			
Total	1340	1339 (99.17%)	0^d (2.23%)	0	5 (0.37%)
Enterococci					
Susceptible	182	180 (98.9%)			
Intermediate	15	13 (86.6%)			
Resistant	243	241 (99.17%)			
Total	440	434 (98.63%)	1 (0.41%)	2 (1.09%)	3 (0.68%)

^a The denominator for the very major errors is the total number of MICs indicating bactericidal resistance determined by the standard method. For the major error rate is the total number of MICs indicating bactericidal susceptibility determined by the standard method, and for the minor errors, the denominator indicates total antibiotic MIC combinations.
^b All related to Penicillin. ^c Enterococci was positive in all cases.

Materials & Methods

ID-GP, AST-P588 and AST-P589 Vitek-2 compact cards were used for ID and AS testing. A coagulase tub test with rabbit plasma (bioMérieux) was performed directly from positive blood cultures.

We used the results obtained with the standard inoculation procedure as the reference method. Discrepant ID or AS results were resolved performing the API 20E (bioMérieux) and the E-test (AB Biodisk) respectively. Category susceptibility disagreements were classified as follows: very major error (false susceptibility) when the result was susceptibility with the direct inoculation method but resistance with the reference procedure; major error (false resistance) when the result was resistance with the direct inoculation protocol but susceptibility with the reference method; and minor error when a susceptibility result of "I" was obtained with the direct procedure and a "S" or "R" with the reference protocol, or a susceptibility result of "I" was obtained with the reference method and a susceptibility result of "S" or "R" with the direct procedure. The direct testing procedure is detailed in figure 1.



G1-896



Accuracy of Vitek-2 Compact for Rapid Identification and Susceptibility Testing Directly from Positive Paediatric FAN Bact/ALERT Blood Culture Bottles

M. D. Quesada, M. Giménez, C. Rodrigo, S. Molinos, J. Hidalgo, M. C. Colomer, V. Ausina.
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona. Spain.

mgimenez.germantrias@gencat.cat



Abstract

Background: The aims of the study were to design a simple procedure to remove charcoal particles from FN Paediatric Bact/ALERT bottles (bioMérieux) that permit rapid identification (ID) and susceptibility (AS) results. To analyse their impact on clinical management of paediatric sepsis.

Methods: Vitek-2 Compact cards (bioMérieux) were used for ID and AS testing: for Gram-negative rods (GN) a 5-mL aliquot was centrifuged at 60 g, 10'. The supernatant (SP) at 900 g, 10'. The sediment was adjusted to McFarland (MF) 1; for Gram-positive cocci (GP), 5-mL was sonicated 10', then centrifuged at 750g 2'. The SP (1-2 mL) was sonicated 5' and centrifuged 5' at 2000g. The sediment was adjusted to MF 1.7-2. Standard inoculation procedure from bacterial isolates were used as reference method.

Results: A total of 20 paediatric blood culture samples showing GN or GP bacteria were investigated. An Enterobacteriaceae was isolated in 13 cases, *S. aureus* 5, coagulase-negative staphylococci 2. Vitek-2 compact correctly identified 16 of the 20 samples. It showed 80% agreement in bacterial ID. From the 366 combinations giving a susceptibility category, overall agreement was 99.7%. Vitek-2 yielded only one minor error. Average times to obtain ID and AS results directly from blood culture bottles were 5.1±1.5 h and 7.7±1.9 h respectively. In 13/20 patients (65%), this method provide results that determined early changes in antibiotic treatment. In 10 patients, antibiotic treatment was streamlined. Inadequate empirical therapy was changed in 2 and contact isolation measures were initiated in one patient.

Conclusions: Vitek-2 Compact system applied directly from positive FN Paediatric Bact/ALERT blood culture bottles allows identification and susceptibility results the same day the blood culture yield a positive result. This technique permits application of appropriate therapy sooner than conventional methods.

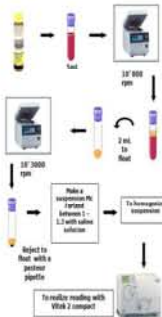
Background

Despite advances in diagnostic techniques and treatments, sepsis remains a major cause of paediatric morbidity and mortality, specially among neonates, the critically ill and the immunocompromised¹. A delay in effective initiation of antimicrobial therapy may lead to a poorer outcome². With the increasing incidence of sepsis due to multiresistant microorganisms (ESBL, *P. aeruginosa* and MRSA) an inadequate empirical antibiotic therapy is more likely to occur. Automated identification (ID) and susceptibility (AS) testing systems like VITEK-2 Compact (bioMérieux, Marcy L'Étoile, France) offer the possibility to provide results the same day a blood culture is detected as positive^{3,4}. Absorbent charcoal particles contained in FN Paediatric Bact/ALERT (bioMérieux, Durham, NC, USA) blood culture bottles can potentially interfere with the direct testing procedures. Two simple and rapid protocols for identification and susceptibility testing of Gram-positive cocci and Gram-negative rods directly from positive FN Paediatric blood culture bottles were validated.

Objectives

1. To evaluate the reliability and accuracy of two protocols designed for ID and AS testing of Gram-positive cocci and Gram-negative rods using VITEK-2 Compact system directly from positive FN Paediatric blood culture bottles.
2. To analyse their impact in clinical management of paediatric sepsis.

Materials & Methods



ID-GP, ID-GN, AST-P588, AST-P589, AST-P589 and AST-112 VITEK-2 compact cards were used for ID and AS testing. We used the results obtained with the standard inoculation procedure as the reference method. Discrepant ID or AS results were resolved performing the API 20E or NE for Gram-negatives, the ID 32 STAPH or the rapid ID32 STREP (bioMérieux) for Gram-positives and the E-test (AB Biodisk) respectively. Category susceptibility disagreements were classified as follows: very major error (false susceptibility) when the result was susceptibility with the direct inoculation method but resistance with the reference procedure; major error (false resistance) when the result was resistance with the direct inoculation protocol but susceptibility with the reference method; and minor error when a susceptibility result of "I" was obtained with the direct procedure and a "S" or "R" with the reference protocol, or a susceptibility result of "I" was obtained with the reference method and a susceptibility result of "S" or "R" with the direct procedure. Both protocols for direct ID and AS testing are detailed in figure 1.



Table 1: Performance of Vitek 2 for identification directly from positive blood cultures

Species	Number of isolates			
	Tested	Correctly identified	Identified	Misidentified
Staphylococci (7)				
<i>S.aureus</i>	5	4	0	1*
Coagulase-negative staphylococci (13)	2	2	0	0
Enterobacteriaceae				
<i>Salmonella</i> spp	4	2	2	0
<i>Klebsiella</i> spp.	3	3	0	0
<i>E.coli</i>	3	3	0	0
<i>Enterobacter</i> spp.	2	1	0	1*
<i>S.marcescens</i>	1	1	0	0
Total	20	16 (80%)	2	2

**Kocuria* sp.
**Raoultella ornitholytica*

Table 2: Average time in Identification and Susceptibility Results using direct VITEK-2 Compact system

	Identification (hours)	Susceptibility (hours)
Direct blood culture	5.1 ± 1.5	7.7 ± 1.9

Results

Table 3: Susceptibility category agreement between direct VITEK-2 system and the reference method

Interpretative category	No. of antibiotics tested	No. of strains in agreement (%)	No. of very major errors (%) ^a	No. of major errors (%) ^a	No. of minor errors (%) ^a
Staphylococci					
Susceptible	86	86			
Intermediate	0	0			
Resistant	34	34			
Total	120	120(100%)	0	0	0
Enterobacteriaceae					
Susceptible	197	197			
Intermediate	4	3			
Resistant	45	45			
Total	246	245 (99.6%)	0	0	1 (0.004%)
Staphylococci and Enterobacteriaceae	366	365 (99.7%)	0	0	1 (0.0027%)

^aThe denominator for the very major errors is the total number of MICs indicating bacterial resistance determined by the standard method. For the major error rate is the total number of MICs indicating bacterial susceptibility determined by the standard method, and that for minor errors, the denominator indicates total antibiotic MIC combinations.

Table 4: patients characteristics and antibiotic switches after rapid reporting of identification and susceptibility results.

Case	Mik factor	Source	Microorganism	Empirical treatment	Definitive treatment
1	Preneurole	Catheter	<i>S. marcescens</i>	Vancomycin Colistin	Colistin
2	Preneurole	Primary	<i>K. pneumoniae</i>	Piperacillin/tazobactam	Cefazolin
3	Preneurole	Catheter	<i>K. pneumoniae</i>	Vancomycin Colistin	Cefazolin
4	-	Urinary	<i>E. coli</i>	Ampicillin Colistin	Colistin
5	-	Primary	<i>E. cloacae</i>	Ampicillin Colistin	Cefazolin
6	Immunosuppression	Catheter	<i>S. epidermidis</i>	Colistin	Vancomycin Colistin
7	Immunosuppression	Primary	<i>Salmonella</i> (H5a) (SBL)	-	Imipenem
8	-	Osteomyelitis	<i>S. aureus</i>	-	Cephalexin
9	Preneurole	Catheter	<i>E. cloacae</i>	-	Cefazolin Gentamicin
10	Preneurole	Catheter	<i>S. aureus</i>	-	Cephalexin
11	-	Urinary	<i>E. coli</i>	Ampicillin Gentamicin	Ampicillin
12	-	Primary	<i>S. Typhimurium</i>	-	Cefazolin
13	Preneurole	Admitted	<i>K. pneumoniae</i>	Colistin	Cefazolin

Conclusions

1. This easy protocol using VITEK-2 compact directly from positive FAN Bact/ALERT bottles permit to start isolation measures and effective treatment ~ 24 h. sooner than using conventional methods.
2. In 13/20 patients (65%), this method provided results that determined early changes in antibiotic treatment.

References

1. Bateman SL and Sead PC. Progression to pediatric bacteremia and sepsis: covert operations and failures in diplomacy. *Pediatrics* 2010; 126: 137-150.
2. Seifert H. The clinical importance of microbiological findings in the diagnosis and management of bloodstream infections. *Clin Infect Dis* 2009; 48: S238-45.
3. Quesada MD, Giménez M, Molinos S et al. Performance of VITEK-2 Compact and overnight MicroScan panels for direct identification and susceptibility testing of Gram-negative bacilli from positive FAN Bact/ALERT blood culture bottles. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 137-140.
4. Giménez M, Quesada MD, Molinos S et al. Performance of VITEK-2 compact for direct identification and susceptibility testing of Gram-positive cocci from positive FAN Bact/ALERT blood culture bottles. *JCAAC, Boston*, September 12-15, 2010 (P-1612).