

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA DE LAS BACTERIEMIAS EN UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL

TESIS DOCTORAL
JONATHAN FERNÁNDEZ SUÁREZ
OVIEDO, 2018



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

TESIS DOCTORAL

**Diagnóstico y epidemiología de las
bacteriemias en un hospital de
tercer nivel**

Jonathan Fernández Suárez

Oviedo, 2018



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Diagnóstico y epidemiología de las bacteriemias en un hospital de tercer nivel	Inglés: Diagnosis and epidemiology of bacteremias in a third level hospital
2.- Autor	
Nombre: Jonathan Fernández Suárez	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: CIENCIAS DE LA SALUD	
Órgano responsable: Departamento de Morfología y Biología Celular	

RESUMEN (en español)

La bacteriemia es el origen de la sepsis, una patología muy grave, con una incidencia y unos costes muy elevados, y en la que el factor tiempo es crítico para reducir la mortalidad. Su correcto diagnóstico y manejo requiere de la implicación de equipos multidisciplinares. El Servicio de Microbiología tiene un rol muy importante, contribuyendo fundamentalmente en dos puntos:

- Manteniendo actualizada la información acerca de la etiología y las susceptibilidades antibióticas de los microorganismos.
- Mejorando los métodos diagnósticos, haciéndolos más fiables y sobre todo más rápidos, una de las carencias más acusadas de las técnicas clásicas.

El método de referencia para el diagnóstico microbiológico de la bacteriemia es el hemocultivo, seguido de la identificación del microorganismo aislado y de la realización de las pruebas de susceptibilidad antibiótica. Se considera un método lento, pues suele requerir unas 24-48 horas para su positivización más otro tanto para la posterior identificación y realización del antibiograma.

En este trabajo se ha analizado la información recogida, referente al diagnóstico de las bacteriemias, en el Servicio de Microbiología del HUCA durante el período 2007-2016, con un total de 141383 hemocultivos procesados y 11521 bacteriemias confirmadas.

En la fase preanalítica se estudiaron las peticiones recibidas, el tiempo medio de procesamiento de las muestras y el porcentaje de hemocultivos contaminados. Las peticiones se incrementaron progresivamente en la población adulta y disminuyeron en la pediátrica. La media del tiempo de procesamiento fue inferior a cinco horas, no influyendo en el rendimiento del hemocultivo hasta las 18 horas. La tasa de contaminaciones fue del 8,4%, muy por encima



de los estándares recomendados (3%).

En la fase analítica, se analizaron la repercusión del cambio de incubador que tuvo lugar en el servicio, los tiempos de positividad de los hemocultivos, la utilidad de MALDI-TOF MS, en combinación con los antibiogramas directos de hemocultivo positivo, y el rendimiento de RAPIDEC® CARBA NP para la detección rápida de carbapenemasas. El incubador nuevo supuso mejoras en la especificidad y la facilidad de manejo, pero no en la sensibilidad o el tiempo de respuesta. Los tiempos de positividad demostraron ser una herramienta muy útil, en combinación con la tinción de Gram, principalmente para orientar acerca de posibles contaminaciones. MALDI-TOF MS supuso una gran mejora a nivel de rapidez en la identificación de los microorganismos, demostrándose muy fiable incluso en cultivos incubados 3 o 4 horas. Las pruebas de susceptibilidad antibiótica realizadas simultáneamente e incubadas el mismo período de tiempo demostraron utilidad principalmente para bacterias gram negativas. CARBA NP también demostró un buen rendimiento (más del 95% de sensibilidad y especificidad).

c) En la fase postanalítica se valoraron la epidemiología, la etiología, la evolución de las resistencias antibióticas y los tiempos de respuesta. Las bacteriemias afectaron principalmente a pacientes mayores de 65 años y a neonatos, y más a hombres que a mujeres. El estudio etiológico mostró como predominantes a las bacterias gram positivas frente a los gram negativas, invirtiéndose esta tendencia en los últimos años. *S.epidermidis* y *E.coli* fueron los microorganismos más frecuentes, seguidos por otros estafilococos coagulasa negativa, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *E.faecalis*, *E.faecium*, *S.pneumoniae*, *E.cloacae* y *A.baumannii*. La etiología fue dependiente de la edad, el sexo y el servicio solicitante, con algunos microorganismos evidenciando además estacionalidad. Las resistencias antibióticas se mostraron estables en gram positivos excepto en *S.epidermidis*, donde se produjo un incremento en las mismas; en gram negativos sí aumentaron de manera acusada en todas las bacterias comentadas excepto en *A.baumannii*, muy resistente desde el inicio del estudio. Los cambios tecnológicos habidos en el Servicio, con las consiguientes modificaciones en los algoritmos de trabajo, supusieron una reducción de los tiempos de respuesta, principalmente a nivel de identificación del microorganismo (entre 6,9 y 37,2 horas), pero también referidos a las pruebas de susceptibilidad antibiótica (entre 2,4 y 7,2 horas).

El Servicio de Microbiología tiene un papel esencial en el manejo de los pacientes con sepsis. El conocimiento acerca de la etiología y los patrones de resistencia permite optimizar los tratamientos empíricos, y la mejora diagnóstica a nivel de rapidez permite pasar antes de



tratamiento empírico a dirigido, con las ventajas de una mayor supervivencia de los pacientes y unos menores costes.

RESUMEN (en Inglés)

Bacteremia is the origin of sepsis, a very serious disease, with a very high incidence and costs, and in which the time factor is critical to reduce the mortality. Its correct diagnosis and management requires the involvement of multidisciplinary teams. The Microbiology Department has a very important role in two ways:

- Maintaining updated the information about the etiology and antibiotic susceptibilities of the microorganisms.
- Improving diagnostic methods, making them more reliable and especially faster, one of the most pronounced shortcomings of classical techniques.

The reference method for the microbiological diagnosis of bacteremia is the blood culture, followed by the identification of the isolated microorganism and the performance of the antibiotic susceptibility tests. It is considered a slow method, since it usually requires about 24-48 hours for its positivization plus another for the later identification and performance of the antibiogram.

In this study we have analyzed the information collected, about the diagnosis of bacteremia, in the Microbiology Service of HUCA during the period 2007-2016, with a total of 141,383 blood cultures processed and 11,521 confirmed bacteremia.

In the preanalytical phase, the received petitions, the mean time of processing of the samples and the percentage of contaminated blood cultures were studied. The requests increased progressively in the adult population and decreased in the pediatric population. The average of the processing time was less than five hours, with no influence on the efficiency of the blood culture in the first 18 hours. The contamination rate was 8.4%, well above the recommended standards (3%).

In the analytical phase, the impact of the change of incubator that took place in the service, the positivity times of the blood cultures, the utility of MALDI-TOF MS, in combination with the direct antibiograms of positive blood culture, and the performance of RAPIDEC® CARBA NP for the rapid detection of carbapenemases were analyzed. The new incubator resulted in improvements in specificity and ease of handling, but not in sensitivity or response time. The positivity times proved to be a very useful tool, in combination with the Gram stain, mainly to



guide about possible contaminations. MALDI-TOF MS was a great improvement in the level of speed in the identification of microorganisms, proving very reliable even in incubated cultures 3 or 4 hours; antibiotic susceptibility tests performed simultaneously and incubated the same period of time proved useful mainly for gram-negative bacteria. CARBA NP also demonstrated good performance (more than 95% of sensitivity and specificity).

c) In the post-analytical phase, epidemiology, etiology, evolution of antibiotic resistance and response times were evaluated. Bacteremia affected mainly patients older than 65 years and neonates, and more men than women. The etiological study showed that gram-positive predominate versus gram-negative bacteria, reversing this trend in recent years. *S.epidermidis* and *E.coli* were the most frequent microorganisms, followed by other coagulase negative staphylococci, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E.faecalis*, *E.faecium*, *S.pneumoniae*, *E.cloacae* and *A. baumannii*. The etiology was dependent on the age, the sex and the requesting service, with some microorganisms evidencing also seasonality. The antibiotic resistance was stable in gram positive, except in *S.epidermidis*, where there was an increase in them; in gram negative, they did increase markedly in all the commented bacteria except in *A.baumannii*, which was very resistant from the beginning of the study. The technological changes in the Service, with the consequent modifications in the working algorithms, meant a reduction in the response times, mainly at the level of identification of the microorganism (between 6.9 and 37.2 hours), but also referred to antibiotic susceptibility tests (between 2.4 and 7.2 hours).

Microbiology Department has a essential role in the management of patients with sepsis. The knowledge about the etiology and the resistance patterns allows to optimize the empirical treatments, and the diagnostic improvement at the level of rapidity allows to pass before empirical treatment to directed, with the advantages of a more survival of the patients and less costs.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no hubiera sido posible sin la colaboración de mucha gente, familia, compañeros y amigos.

Al Dr. Fernando Vázquez, por proponerme el desarrollo de esta tesis, animarme a realizarla, aconsejarme en todo momento y por supuesto dirigírmela. Si no hubiera sido por él, todo esto no hubiera empezado.

A Rafa, por su ayuda totalmente desinteresada, por la muchas horas que sé que invirtió en ayudarme, por saber transmitirme un poco de lo mucho que sabe de este tema y por sus numerosos y acertados comentarios, siempre bien recibidos.

A José Boga, siempre presente desde mi llegada al HUCA, y siempre con buena cara y con ganas de ayudar y orientarme en todo lo que va surgiendo.

A todos mis compañeros del HUCA, por preocuparse por mí, por mi tesis y por estar siempre dispuestos a echar una mano en cualquier momento.

A mi familia, por apoyarme siempre, en esto y en todo lo que hago, en las buenas y en las menos buenas.

Y a Sandra, por su paciencia, por sus contribuciones y sobre todo por ella.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

Abreviaturas	3
Introducción	5
1. Sepsis.....	7
1.1. Evolución histórica del término	8
1.2. Patogenia.....	10
1.3. Diagnóstico.....	10
1.4. Tratamiento.....	12
2. Bacteriemia	13
2.1. Clasificación.....	13
2.2. Etiología.....	14
2.3. Contaminaciones, pseudobacteriemias o falsas bacteriemias	16
2.4. Diagnóstico microbiológico	17
2.4.1. Hemocultivo	17
2.4.2. Métodos de identificación clásicos	20
2.4.3. Métodos de determinación de la susceptibilidad antibiótica.....	20
2.5. Diagnóstico microbiológico. Nuevas tecnologías.....	21
2.5.1. Métodos genómicos.....	22
2.5.2. Métodos proteómicos.....	23
2.5.3. Otros métodos	26
3. El Laboratorio de Microbiología y la sepsis.....	28
Objetivos	31
Material y métodos	35
<u>A. Materiales y métodos generales</u>	37
*Pacientes	37
*Muestras	37
1. Fase preanalítica.....	38
1.1. Extracción de la muestra.....	38
1.2. Conservación, transporte y procesamiento de la muestra	38
2. Fase analítica	39
2.1. Cultivo de sangre (hemocultivo)	39
2.1.1. Medios de cultivo (botellas de hemocultivo).....	39
2.1.2. Incubadores.....	40

2.1.3. Tiempo de incubación	41
2.2. Métodos de identificación de los microorganismos	41
2.2.1. Métodos de identificación fenotípicos	41
2.2.2. Métodos de identificación proteómicos (espectrometría de masas MALDI-TOF MS)	43
2.2.2.1. Plataforma utilizada	43
2.2.2.2. Procedimiento realizado en el laboratorio	44
2.2.3. Métodos de identificación genómicos	45
2.3. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	47
2.3.1. Antibiograma preliminar	47
2.3.2. Antibiograma definitivo	48
2.4. Algoritmos de trabajo	49
2.4.1. Algoritmo de trabajo pre MALDI-TOF MS	49
2.4.2. Algoritmo de trabajo post MALDI-TOF MS	51
3. Fase postanalítica	52
3.1. Programas informáticos	52
3.2. Análisis estadístico	52
<u>B. Materiales y métodos específicos por objetivo</u>	53
Resultados	63
Objetivo 1.....	65
Objetivo 2.....	69
Objetivo 3.....	71
Objetivo 4.....	80
Objetivo 5.....	81
Objetivo 6.....	88
Objetivo 7.....	90
Objetivo 8.....	91
Objetivo 9.....	92
Objetivo 10.....	104
Objetivo 11.....	113
Discusión	115
Conclusiones	147
Referencias bibliográficas	151
Anexos	171

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AE: botella aerobia.

A/C: amoxicilina-ácido clavulánico.

AN: botella anaerobia.

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal.

BD: Becton Dickinson.

BGN: bacilo gram negativo.

BGN-NF: bacilo gram negativo no fermentador.

BLEE: betalactamasa de espectro extendido.

C.General: Cirugía General.

CDC: Centers for Disease Control and Prevention.

CE: Conformité Européenne.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CMI: concentración mínima inhibitoria.

Da: Dalton.

ECN: estafilococo coagulasa negativa.

EE.UU.: Estados Unidos de América.

EGV: estreptococo del grupo viridans.

Estreptomicina AN: estreptomicina de alto nivel.

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

FiO₂: fracción inspirada de oxígeno.

FISH: fluorescent in situ hybridization.

Gentamicina AN: gentamicina de alto nivel.

GIT: isotiocianato de guanidina.

HC: hemocultivo/s.

HPLC: high performance liquid chromatography.

HUCA: Hospital Universitario Central de Asturias.

IVD: In Vitro Diagnostics.

LIA: lysine iron agar.

M.Intensiva: Medicina Intensiva.

M.Interna: Medicina Interna.

MALDI-TOF MS: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OXA-48: tipo de carbapenemasa.

PaO₂: presión arterial de oxígeno.

pb: pares de bases.

pCO₂: presión parcial de CO₂.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PCR/ESI MS: PCR–Electrospray Ionization Mass Spectrometry.

Pip/tazobactam: piperacilina-tazobactam.

qSOFA: quick Sepsis related Organ Failure Assessment.

rpm: respiraciones por minuto.

SDMO: Síndrome de disfunción multiorgánica.

SOFA: Sepsis related Organ Failure Assessment.

SRIS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

SSC: surviving sepsis campaign.

SXT: cotrimoxazol.

TSI: triple sugar iron.

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos.

UFC: unidades formadoras de colonia.

UMI: urea motility índole.

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

INTRODUCCIÓN

1. SEPSIS

Existe una clara relación entre infección, bacteriemia y sepsis, aún siendo fenómenos muy diferentes. Las enfermedades infecciosas son una de las principales causas de muerte en el mundo (1 de cada 10 fallecimientos en el primer mundo y 6 de cada 10 en el tercer mundo según datos de la Organización Mundial de la Salud -OMS, 2004-). Como complicación de algunas de ellas pueden originarse bacteriemias o fungemias (invasión del torrente sanguíneo por parte de las bacterias u hongos), que a su vez pueden desencadenar una respuesta sistémica denominada sepsis, una entidad muy grave, y con una incidencia y costes económicos asociados muy importantes. De hecho, la tasa de mortalidad global de la sepsis puede oscilar entre el 30% y el 50% según las series y el tipo de paciente, origen, manejo inicial y otros factores (Angus y van der Poll, 2013).

La cuantificación de su incidencia y mortalidad a nivel mundial es compleja; los estudios más recientes valoran que anualmente se producirían más de 30 millones de casos de sepsis con seis millones de muertes estimadas, siendo de esta manera la patología infecciosa con mayor mortalidad en el mundo (Fleischmann et al., 2016).

Respecto a los EE.UU. y a los países europeos, donde es más sencillo obtener datos fiables, se sabe que en los EE.UU. se registran anualmente 750000 casos de sepsis con 215000 muertes (Angus y Wax, 2001); en Europa se calculan 135000 muertes anuales (Lever y Mackenzie, 2007). En España, las estimaciones son de unos 50000 casos al año, los cuales pueden originar 17000 muertes (*Código Sepsis-Declaración Mallorca 2012*). Para comprender la magnitud de la cifra, recordar que es 13 veces superior a los fallecidos en accidentes de tráfico, y ostensiblemente superior a las muertes provocadas por algunos cánceres comunes como el de mama, colon, páncreas o próstata.

Además, su incidencia va en aumento. En EE.UU., entre los años 2000 y 2008, se produjo un incremento anual de casos de sepsis del 7-8% (Hall et al., 2011), y en España también es un hecho contrastado.

La sepsis es la causa más común de deceso entre las personas hospitalizadas, la segunda causa de muerte en las unidades de cuidados intensivos (UCIs) no coronarias y la décima causa más común de muerte en general (Dellinger et al., 2008). Se observa en el 1-2% de todas las hospitalizaciones y explica hasta el 25% de utilización de las camas de las UCIs, además de ser la mayor causa de ingreso entre los 45 y los 84 años (García et al., 2015).

La sepsis requiere grandes gastos en tratamientos y pruebas diagnósticas, suponiendo una gran carga económica para los sistemas sanitarios. Su cuantificación es compleja, existiendo

estudios con resultados muy variables. En los EE.UU. el coste de la sepsis se estima en un 6,2% del total de gastos hospitalarios (24000 millones de dólares por año) (OMS, 2017). En España se estima que anualmente los costes derivados de la sepsis son de 345 millones de euros (Davies et al., 2001), con un promedio de 10000 a 15000 euros por episodio (Iñigo et al., 2006).

1.1. Evolución histórica del término

El término *sepsis* (*σῆψις*) es de origen griego, y su significado es *putrefacción*. Su introducción en la medicina fue en el siglo IV a.C.; Hipócrates consideró a la sepsis el proceso por el cual las heridas supuran (Hernández Botero y Florián Pérez, 2012).

En el siglo XIX comenzó a utilizarse para describir los casos de toxicidad sistémica grave: se creía que los microorganismos producían sustancias que podían hacer enfermar al huésped, y que las toxinas liberadas durante la infección causaban la fiebre y el shock séptico comunes durante las infecciones graves. En el mismo siglo, con la confirmación de la teoría de los gérmenes por Semmelweis, Pasteur y otros científicos la sepsis se redefinió como una infección sistémica que a menudo se describía como "envenenamiento de la sangre" (Angus y van der Poll, 2013) y se suponía que era el resultado de la invasión del huésped por microorganismos patógenos que luego se extendían por el torrente sanguíneo.

Con el advenimiento de los antimicrobianos esta teoría pasó a ser una explicación incompleta de la patogenia de la sepsis dado que muchos pacientes con esa enfermedad morían pese a la erradicación del agente causal. Por lo tanto, se sugirió la posibilidad de que el desencadenante de la patogenia fuera el huésped, no el microorganismo.

Thomas (1972) propuso que la respuesta del sistema inmune frente a los microorganismos durante una infección puede ser tan fuerte que se convierta en nociva para el propio individuo. Bone (1992) acuñó el término síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) para describir a aquellos pacientes que presentaban evidencia clínica de este fenómeno.

En 1991 se celebró la Primera Conferencia Internacional (Bone et al., 1992) para las definiciones de Sepsis y Shock séptico, intentando unificar los criterios sobre la terminología empleada para designar la sepsis y sus complicaciones. Se definió la *sepsis* como una respuesta inflamatoria sistémica a la infección (SRIS + infección probada), se propusieron los términos *sepsis grave* para describir los casos en los que la sepsis se complica con un síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) y *shock séptico* para describir a la sepsis grave con hipotensión refractaria a la reanimación con un aporte adecuado de líquidos. Se señaló el término septicemia (acuñado en el siglo XIX) como una definición sin utilidad.

En el año 2001, la Segunda Conferencia (Levy et al., 2003) revisó los criterios diagnósticos de sepsis: se llegó al acuerdo de que la infección podía ser probada o supuesta, en este último caso a condición de cumplir algún otro criterio diagnóstico.

En la Tercera Conferencia (Singer et al., 2016) se produjeron cambios significativos. El SRIS deja de ser la referencia para el diagnóstico (en parte por el estudio de Kaukonen et al. (2015), que demuestra un 12% de falsos negativos con su utilización), utilizándose unas nuevas escalas denominadas SOFA (*Sepsis related Organ Failure Assessment*) y quick SOFA (qSOFA). Se eliminan términos considerados redundantes como el de sepsis grave y se redefinieron los conceptos de *sepsis* (disfunción orgánica que amenaza la vida de un paciente causada por una respuesta no regulada del individuo frente a la infección) y *shock séptico* (cuadro de sepsis que cursa con alteraciones circulatorias, celulares y metabólicas lo suficientemente profundas como para aumentar sustancialmente la mortalidad).

Para un correcto manejo de la sepsis se requiere la creación de grupos multidisciplinares (microbiólogos, infectólogos, internistas, intensivistas, farmacéuticos, preventivistas, etc.). Se han comenzado a desarrollar tanto a nivel internacional como nacional una serie de proyectos con el objetivo de mejorar el diagnóstico, manejo y tratamiento de la sepsis:

- *Surviving Sepsis Campaign* (SSC): Dellinger et al. (2004) desarrollaron una guía para su manejo, promovida por sociedades científicas de ámbito mundial, en la cual se realizaban una serie de recomendaciones para el manejo de esta patología, haciendo especial hincapié en las primeras horas. Posteriormente se desarrollaron actualizaciones en los años 2008, 2012 y 2016. Con la aplicación del paquete de medidas o "*bundles*" recomendadas por la SSC se ha logrado disminuir la morbilidad y la mortalidad en torno al 25% (Rodríguez Díaz et al., 2017).

- *Código sepsis*: como consecuencia de la SSC, en el año 2012, 24 Sociedades Científicas nacionales promovieron la implantación de estas recomendaciones en el *Código Sepsis* (*Código Sepsis-Declaración Mallorca 2012*). Su objetivo es la detección precoz de los pacientes, la aplicación rápida y estructurada del conjunto de medidas recomendadas para diagnosticar, monitorizar y tratar a estos enfermos, y la definición de unos indicadores asistenciales que permitan evaluar el cumplimiento de las recomendaciones.

- Proyecto *Bacteriemia Zero*: se está desarrollando a nivel nacional, desde el año 2008, en los Servicios de Medicina Intensiva de los distintos hospitales. Pretende reducir el número de bacteriemias nosocomiales relacionadas con el catéter a <4 episodios por 1000 días de utilización de catéter venoso central.

1.2. Patogenia

La sepsis es un proceso complejo pues el cuadro clínico que se origina dependerá tanto de los factores de virulencia del microorganismo como de la respuesta del hospedador. La patogenia ocurre en fases sucesivas:

-Presencia de una infección bacteriana desde donde se produce la invasión al torrente circulatorio. Esta invasión puede producirse desde un foco infeccioso extravascular, a través de los capilares sanguíneos o de los vasos linfáticos, o desde un foco intravascular (endocarditis, infección de catéteres intravenosos o arteriales...). Los focos más frecuentes (Ausina Ruiz y Moreno Guillén, 2005) son el tracto genitourinario, las heridas quirúrgicas, el tracto gastrointestinal y los catéteres intravasculares, aunque hasta en un 25% de los casos es desconocido. En relación a las fungemias, el foco más habitual es el catéter.

-Invasión del torrente circulatorio. En circunstancias normales el organismo con sus mecanismos de defensa neutralizará dicha invasión, originándose una bacteriemia transitoria sin repercusión clínica.

-Síndrome clínico como consecuencia de esta invasión. Al no ser eliminados los microorganismos del torrente circulatorio se originan una serie de síntomas clínicos que caracterizan la denominada sepsis, dependiente de la propia respuesta del organismo humano y de los factores de virulencia del microorganismo (endotoxinas en caso de los gram negativos, exotoxinas, etc.) (Wesley et al., 2005). La fase temprana de la enfermedad, caracterizada por una inflamación excesiva (que a veces desencadena una tormenta de citocinas), puede ser seguida por un período prolongado de disminución del funcionamiento del sistema inmunitario. Cualquiera de esas fases puede resultar fatal. Sus manifestaciones clínicas son muy variadas y oscilan desde aquellos cuadros inaparentes (paso puntual a sangre de una baja carga microbiana) hasta lo que se conoce como shock séptico caracterizado por la presencia de fracaso multiorgánico.

1.3. Diagnóstico

Se basa en la sospecha y en la aplicación de escalas clínicas, combinada con la realización de pruebas complementarias (analíticas, de imagen y cultivos de muestras biológicas). Las escalas clínicas han cambiado muy recientemente:

a) Hasta el año 2016, la base del diagnóstico eran los criterios de SRIS y la posterior categorización en sepsis, sepsis grave y shock séptico. Los criterios de SRIS eran los siguientes:

- Temperatura > 38°C o <36°C.
- Frecuencia cardíaca > 90 por minuto.
- Frecuencia respiratoria > 20 respiraciones por minuto (rpm) o pCO₂ < 32 mmHg.
- Leucocitos >12000 o < 4000 células/mm³.

Partiendo de esta definición, tenemos las siguientes:

Sepsis: infección, documentada o sospechada, y SRIS.

Sepsis grave: sepsis asociada a algún dato de disfunción de órgano o alteraciones relacionadas con hipoperfusión de las siguientes:

- Acidosis metabólica.
- Hipoxemia arterial (PaO₂ < 75 mm Hg. o PaO₂/FiO₂ < 250).
- Oliguria (< 0,03 l./h. durante 3 h. o < 0,7 l./h. durante 24 h.).
- Coagulopatía (aumento en tiempo de protrombina o disminución de plaquetas del 50%, o < 100000/l.).
- Encefalopatía (cifra < 15 en la escala de Glasgow).

Shock séptico: hipotensión persistente al menos una hora a pesar de la administración de fluidos, en asociación con signos de hipoperfusión o disfunción de órgano.

b) Desde el año 2016 se ha optado por unas nuevas escalas, denominadas SOFA y qSOFA.

La escala SOFA utiliza seis puntuaciones (de 0 a 4) para medir diferentes sistemas críticos del paciente: respiratorio, cardiovascular, hepático, coagulación, renal y neurológico (Figura 1).

Table 1. Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Assessment Score^a

System	Score				
	0	1	2	3	4
Respiration					
PaO ₂ /FiO ₂ , mm Hg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) with respiratory support	<100 (13.3) with respiratory support
Coagulation					
Platelets, ×10 ³ /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Liver					
Bilirubin, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (20)	1.2-1.9 (20-32)	2.0-5.9 (33-101)	6.0-11.9 (102-204)	>12.0 (204)
Cardiovascular					
MAP ≥70 mm Hg	MAP <70 mm Hg	Dopamine <5 or dobutamine (any dose) ^b	Dopamine 5.1-15 or epinephrine ≤0.1 or norepinephrine ≤0.1 ^b	Dopamine >15 or epinephrine >0.1 or norepinephrine >0.1 ^b	
Central nervous system					
Glasgow Coma Scale score ^c	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinine, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (110)	1.2-1.9 (110-170)	2.0-3.4 (171-299)	3.5-4.9 (300-440)	>5.0 (440)
Urine output, mL/d				<500	<200

Abbreviations: FiO₂, fraction of inspired oxygen; MAP, mean arterial pressure; PaO₂, partial pressure of oxygen.

^a Adapted from Vincent et al.²⁷

^b Catecholamine doses are given as μg/kg/min for at least 1 hour.

^c Glasgow Coma Scale scores range from 3-15; higher score indicates better neurological function.

Figura 1. Escala SOFA. Tomado de Ferreira et al., 2001.

La escala qSOFA incluye exclusivamente criterios clínicos, por lo que es fácilmente aplicable. Los 3 criterios del qSOFA son: alteración del nivel de conciencia, presencia de una presión arterial sistólica ≤ 100 mmHg y presencia de una frecuencia respiratoria ≥ 22 rpm.

De tal manera que se define **sepsis** de la siguiente forma: infección documentada o sospechada + un incremento en la escala SOFA de 2 o más o 2/3 criterios qSOFA.

Shock séptico quedaría definido como: sepsis + requerimientos vasopresores para mantener una presión arterial media ≥ 65 mm Hg + un nivel de lactato sérico > 2 mmol/l. (> 18 mg./dl.) a pesar de una adecuada resucitación con fluidos.

1.4. Tratamiento

El tratamiento debe iniciarse inmediatamente siguiendo las directrices de la SSC. La terapia antimicrobiana constituye una de las herramientas fundamentales; la adopción de medidas terapéuticas adecuadas y la administración de un tratamiento antimicrobiano correcto lo más precoz posible son imprescindibles para disminuir la elevada morbimortalidad que se observa en los casos de sepsis (Mayr et al., 2013).

El tratamiento antimicrobiano debe cumplir una serie de requisitos: ha de ser eficaz sobre el microorganismo –a ser posible bactericida-, ha de tener la capacidad de llegar al foco de infección, y no debe tener –o en su caso los mínimos- efectos secundarios ni interacciones medicamentosas. Se puede clasificar en función del conocimiento del microorganismo responsable de la sepsis:

-Tratamiento empírico: no se conoce cuál es el microorganismo causal. Se pauta en función de los datos de etiología y resistencias conocidos para la patología origen de la sepsis.

-Tratamiento dirigido: se conoce el microorganismo y su antibiograma, por tanto el tratamiento se ajusta en función del mismo.

2. BACTERIEMIA

El Laboratorio de Microbiología es uno de los pilares para un correcto diagnóstico y manejo de la sepsis, puesto que es donde se detectan las bacteriemias y las fungemias, que son el origen de la misma. Ya hemos visto que bacteriemia y sepsis están íntimamente relacionadas, pero no son lo mismo.

La palabra **bacteriemia** procede del griego *bakterion* (βακτήριον) (pequeño bastón), y *haima* (αίμα) (sangre). Por tanto, su significado es *presencia de bacterias en sangre*. La demostración científica de este hecho es relativamente reciente puesto que la detección de bacterias en sangre data de los años 30 del siglo pasado (Wilson et al., 2015).

En los últimos estudios, la mortalidad global de la bacteriemia se fija en un 12% (Pien et al., 2010). En Europa se estima un número total de bacteriemias anuales entre 1,2 y 1,4 millones, con 157.000 muertes (Goto y Al-Hasan, 2013). En España, la incidencia varía entre 5 y 30 casos por 1000 pacientes en función del tipo de población estudiada (Loza et al., 2003).

Los factores de riesgo para que se desarrolle una bacteriemia son la edad (mayor riesgo en niños muy pequeños y ancianos), las enfermedades y los estados que debilitan el sistema inmunitario, y los traumatismos y quemaduras de importancia. La mortalidad de la misma depende de factores relacionados con el paciente, el inóculo, el microorganismo, el diagnóstico y el tratamiento.

2.1. Clasificación

Las bacteriemias se pueden clasificar en función de lo siguiente:

- a) Origen: se dividen en primarias (o de origen desconocido) o secundarias a una infección localizada y en general documentada microbiológicamente, lo que se denomina foco de la infección. Dicho foco, que no siempre es detectable, puede ser alguno de los siguientes: foco urinario, respiratorio, articular, endovascular, intraabdominal, etc.
- b) Número de microorganismos implicados: mono o polimicrobianas.
- c) Momento de aparición: comunitaria, nosocomial o asociada a los cuidados sanitarios. Se consideran bacteriemias nosocomiales aquellas cuyo origen es posterior a las 48 horas de ingreso hospitalario del paciente; en caso contrario, serían comunitarias. En las bacteriemias asociadas a la asistencia sanitaria se incluyen las bacteriemias secundarias a un procedimiento diagnóstico o terapéutico ambulatorio, las bacteriemias en pacientes ambulatorios portadores

de sondas urinarias o catéteres intravenosos, en hemodiálisis crónica o en diálisis peritoneal y las bacteriemias en pacientes ingresados en residencias de ancianos y centros de larga estancia (Siegman et al., 2002).

d) La continuidad de las bacterias en sangre: transitorias, continuas, intermitentes o en brecha. Las primeras son las más frecuentes y aparecen al inicio de ciertas infecciones bacterianas locales. Las intermitentes se desarrollan cuando se producen recurrencias periódicas por el mismo microorganismo. Las persistentes suelen acompañar a una endocarditis u otra infección endovascular, como un catéter intravascular infectado. Por último, las bacteriemias en brecha cuando se presentan en un paciente que está recibiendo terapia sistémica con antimicrobianos a los cuales es sensible el microorganismo aislado.

e) Procedencia o no de las bacterias del torrente circulatorio: las bacteriemias se clasifican en verdaderas o falsas (contaminaciones o pseudobacteriemias). Una bacteriemia verdadera consiste en la presencia cierta de microorganismos en la sangre del paciente. Una bacteriemia falsa es aquella situación en la que se detecta crecimiento en hemocultivos de uno o más microorganismos que no estaban causando bacteriemia verdadera. Se debe a contaminación al tomar la muestra o al procesarla.

2.2. Etiología

La etiología es fundamentalmente bacteriana, con más de un 90% de bacteriemias monomicrobianas (Reimer et al., 1997). Los hongos causan entre el 0,5 y el 1% de las bacteriemias/fungemias. Ciertos virus y parásitos pueden invadir puntualmente el torrente circulatorio, pero con una incidencia menor, no es posible diagnosticarlos por cultivo, el tratamiento antibiótico no existe o no es claro, y no entrarán en el objeto de este estudio.

La etiología de las bacteriemias ha ido variando con el paso de los años: en los años 30 del siglo pasado eran mayoritariamente estreptococos β -hemolíticos (*Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*) y *Streptococcus pneumoniae* los agentes responsables (McGowan et al., 1975). Con la introducción masiva de los antibióticos después de mediados de siglo se produjo un aumento de los bacilos gram negativos (BGNs), (Bryan., 1989) a los que la presencia de endotoxina, intrínseca a todos ellos, les dotaba de una mayor virulencia. Posteriormente, en los años 80 y 90, las bacterias gram positivas, especialmente estafilococos y enterococos, igualaron o superaron en frecuencia a las gram negativos, debido al uso de antibióticos de amplio espectro como tratamiento y profilaxis, al uso generalizado de catéteres

intravasculares –que facilitan las infecciones por microorganismos gram positivos al ser los colonizantes habituales de la piel- y al empleo de métodos de diagnóstico invasivos (Mikulska et al., 2014). Por otra parte, el aumento de pacientes inmunodeprimidos con tratamientos antineoplásicos o con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ha propiciado la aparición de bacteriemias por agentes que en el pasado eran causa muy rara de infección, al presentar escasos factores de virulencia.

Los microorganismos gram positivos más frecuentemente implicados pertenecen a los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*. Los bacilos gram negativos más frecuentemente aislados son especies de la familia *Enterobacteriaceae*.

En cuanto a la fungemia, *Candida albicans* ha sido el hongo más frecuente. En los últimos años se está observando un incremento de infecciones por otras especies del género como *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*.

La etiología va a depender de una serie de factores:

-Lugar de adquisición. En las bacteriemias comunitarias hay un gran predominio de las bacterias gram negativas, principalmente *Escherichia coli*. En las bacteriemias nosocomiales las bacterias gram positivas –fundamentalmente estafilococos coagulasa negativa (ECN, *Staphylococcus epidermidis* el más habitual dentro de los mismos)- son las predominantes (Cisneros-Herreros et al., 2007). Las bacteriemias asociadas a la asistencia sanitaria son más parecidas a las bacteriemias nosocomiales (Cross y Levine, 2017).

-Epidemiología local. Los microorganismos más frecuentes no tienen por qué ser exactamente los mismos en todos los entornos. La etiología y el patrón de sensibilidad de las bacteriemias nosocomiales muestran grandes diferencias entre distintos centros e incluso entre áreas de un mismo hospital, por lo que el conocimiento de la epidemiología local es imprescindible para la selección del tratamiento antimicrobiano empírico.

-Edad. En los niños, la etiología de la bacteriemia ha sufrido variaciones, determinadas por la epidemiología local y la política antibiótica, pero también por los programas de vacunación y los microorganismos emergentes. En el primer mes de vida la etiología más frecuente está asociada a bacterias de transmisión vertical (*S.agalactiae*, *E.coli* y *Listeria monocytogenes*) y posteriormente, cuando la adquisición es comunitaria, aparecen bacterias como *S.pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis* y la familia *Enterobacteriaceae*. En los niños hospitalizados, muchos de ellos portadores de catéteres intravasculares, existe la posibilidad de que la bacteriemia esté causada por ECN de origen en el catéter.

-Foco. En el caso de bacteriemias de foco urinario los microorganismos más frecuentes son las enterobacterias, principalmente *E.coli*. Si el foco es respiratorio habrá que tener en cuenta a *S.pneumoniae* o *Haemophilus influenzae*. Y si están relacionadas con el catéter la etiología tiene que ver con bacterias que forman parte de la microbiota cutánea: *S.aureus* y ECN.

2.3. Contaminaciones, pseudobacteriemias o falsas bacteriemias

Son las debidas a la contaminación del medio de cultivo. Contaminación se define como el crecimiento de bacterias en el hemocultivo que no están presentes en el torrente sanguíneo del paciente (Department of Health, 2007).

Según la Guía IDSA del 2013 (Baron et al., 2013), la contaminación de los hemocultivos se considera un indicador de la calidad asistencial y no debería sobrepasar el 3% del total de hemocultivos extraídos.

Las contaminaciones suponen para los centros hospitalarios un incremento en los costes, en base a aumentos en la estancia hospitalaria y a la administración de mayor cantidad de antibióticos (Dawson, 2014). Según distintos estudios, éstos se utilizan en el 41-50% de los pacientes con contaminaciones -vancomicina de manera destacada entre un 20 y un 34%-, suponiendo un 39% de aumento de la carga antibiótica intravenosa (Dawson, 2014). Existen distintas referencias en la literatura que cuantifican el problema económico y de estancia originado por cada contaminación: 7502,2 \$ y 5,4 días (Alahmadi et al., 2011); 8720 \$ y 1 día (Gander et al., 2009).

Para poder determinar si una bacteriemia es contaminación, debemos tener en cuenta el tipo de microorganismo, el número de extracciones en las que se obtiene crecimiento del mismo, el tiempo de positividad del hemocultivo y la respuesta a la terapia antibiótica del paciente (Hall y Lyman, 2006). El *National Healthcare Safety Network* de los EE.UU. define hemocultivo contaminado (falso positivo) como aquel en el que se aíslan especies propias de la microbiota comensal de la piel o propios del medio ambiente: ECNs, otros microorganismos de baja o nula virulencia como *Aerococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Propionibacterium acnes*, la mayoría de las especies de los géneros *Bacillus* y *Corynebacterium* y algunos estreptococos del grupo viridans (EGV). Sin embargo, no existe un patrón oro, e idealmente cada caso debería analizarse individualmente, ya que estos microorganismos pueden estar implicados en bacteriemias verdaderas.

2.4. Diagnóstico microbiológico clásico de las bacteriemias

La concentración habitual de microorganismos en la sangre durante una bacteriemia suele ser muy escasa (suele oscilar entre 10^1 y 10^4 UFC/ml., pudiendo ser incluso inferior a 0,1 UFC/ml en un 20% de los casos). Esta característica hace que sólo las técnicas muy sensibles puedan ser utilizadas en el diagnóstico de este proceso.

De las técnicas clásicas microbiológicas el examen con tinciones directas de la muestra no es utilizable al no detectar cantidades tan pequeñas de microorganismos. El cultivo de sangre (hemocultivo) sí es adecuado pues consigue un enriquecimiento de la cantidad de microorganismos presentes en el torrente circulatorio. Una vez obtenido el crecimiento bacteriano adecuado, se procede a la identificación del microorganismo, y en caso de considerarse necesario, a la realización de las pruebas de susceptibilidad antibiótica del mismo.

La detección de los microorganismos también puede realizarse empleando otro tipo de técnicas diagnósticas, menos utilizadas, basadas principalmente en la genómica y en la proteómica, que veremos posteriormente.

2.4.1. Hemocultivo

En la actualidad el hemocultivo es el método de referencia para el diagnóstico microbiológico de las bacteriemias (Smith-Elekes y Weinstein, 1993) (Riedel y Carroll, 2010). Consiste en la inoculación de la sangre del paciente en frascos o botellas en los cuales hay un medio de cultivo líquido y una atmósfera adecuada. Cada hemocultivo es cada venopunción realizada, y habitualmente la muestra extraída se inocular en 2 botellas, con dos tipos de atmósferas diferentes (aerobia y anaerobia).

El hemocultivo tal y como lo acabamos de describir (en botellas) se empezó a utilizar a mediados del siglo pasado (Scott, 1951). A lo largo de los años, se fueron produciendo una serie de cambios y mejoras en el mismo, con el objetivo de mejorar la sensibilidad, la rapidez y la facilidad de manejo:

-Optimización de los medios de cultivo: la adición de resinas o carbón supuso una gran mejora e incrementó las tasas de recuperación de los microorganismos (Weinstein, 1996), al actuar como quelantes de los antibióticos. Los agentes lisantes como la saponina también mejoraron de manera ostensible la sensibilidad (Elliott et al., 1998).

-Optimización del manejo: utilización de incubadores automáticos. Originariamente, la incubación y posterior detección de los hemocultivos positivos se realizaba de manera manual

y visual. El desarrollo de los métodos automatizados para el procesamiento de los hemocultivos (que data de los años 70 del siglo pasado) supuso un avance sustancial ya que los frascos se introducen en sistemas de incubación automatizados (diferentes según la compañía empleada) que mantienen la temperatura de los mismos a unos $36\pm 1^{\circ}\text{C}$. Estos sistemas constan de una serie de celdas individuales con agitación continua para facilitar la multiplicación bacteriana y realizan una monitorización periódica para la detección de frascos positivos. Con el paso de los años, se han ido desarrollando incubadores más limpios (evitando los residuos radiactivos, que se originaban en los primeros diseños de incubadores automáticos), rápidos, fiables, automatizados y con mayor capacidad, y con el añadido de emplear un software cada vez más avanzado y fácil de utilizar.

En la actualidad estos métodos automatizados son los de elección y los más ampliamente difundidos (Mirrett et al., 2003). Su fácil manejo los hace asequibles a cualquier centro y son los únicos métodos diagnósticos que permiten el aislamiento del microorganismo viable, necesario para determinar su sensibilidad antibiótica.

Indicaciones del hemocultivo

En general y dada la relevancia clínica, terapéutica y pronóstica de la bacteriemia y la frecuente inespecificidad de los datos clínicos, se justifica un bajo índice de sospecha para solicitar hemocultivos. Eso sí, hay que tener en cuenta que cuanto más grave es el cuadro clínico, más probable es la detección de bacteriemia (17-31% en los pacientes con sepsis, 25-53% con sepsis grave o shock séptico). (Cisneros-Herreros et al., 2013)

Las recomendaciones de extracción de hemocultivos han ido variando con el paso de los años y los cambios en los protocolos. En la actualidad, se recomienda su extracción en las siguientes circunstancias (Willems et al., 2012):

- En todo paciente hospitalizado con fiebre ($\geq 38^{\circ}\text{C}$), hipotermia ($\leq 36^{\circ}\text{C}$), leucocitosis, absoluta granulocitopenia, o una combinación de estos marcadores.
- En pacientes críticos, con neutropenia postquimioterapia o con inmunodepresión significativa (receptores de trasplante, infección por VIH con linfocitos $\text{CD4} < 200$ células/ μl ., tratamiento con inmunosupresores, pacientes con hemopatías malignas o asplenia...), si se da fiebre de nueva aparición, aunque los hallazgos clínicos no sean muy sugerentes de infección.
- En pacientes ancianos que presenten letargia, confusión, incontinencia, caídas, dolor abdominal o vómitos, aún en ausencia de fiebre.
- En niños pequeños con un decaimiento súbito.

-En sospechas de sepsis, meningitis, bacteriemias relacionadas con el catéter, endocarditis infecciosa, artritis, osteomielitis y fiebre de origen desconocido. En caso de neumonía o pielonefritis no complicada no siempre es obligada la extracción de hemocultivos.

-Para guiar la duración del tratamiento en caso de candidemia (Pappas et al., 2009), endocarditis infecciosa (Baddour et al., 2015) o bacteriemia por *S.aureus*.

Extracción de la muestra

Respecto a cómo debe hacerse la extracción hay que tener en cuenta lo siguiente:

-Se considera una extracción para hemocultivo a la sangre extraída de una única venopunción, independientemente del número de frascos en los que sea inoculada, habitualmente aerobio y anaerobio.

-Siempre que sea posible, las extracciones deben realizarse antes de la administración de antimicrobianos. El momento de la extracción idealmente debe coincidir con el mayor número de bacterias en sangre. Esto es cuando aparecen los escalofríos, una hora antes de la aparición de la fiebre.

-Respecto al número de hemocultivos a extraer, históricamente se ha considerado un mínimo de 2 y un máximo de 3 en un intervalo de 24 horas (Isenberg, 2010). La probabilidad de recuperar el agente causal se incrementa con el número de hemocultivos extraídos al paciente: 60-80% en el primer hemocultivo, 80-90% cuando se cursan dos hemocultivos y del 95-99% con el tercero. En la actualidad algunos autores recomiendan ya la extracción de 4 hemocultivos (Cockerill et al., 2004).

-Las muestras de sangre para hemocultivo deben extraerse (Rodríguez-Díaz et al., 2017) mediante venopunción (extracción periférica), evitándose la extracción a partir de dispositivos intravasculares, cambiando de equipo y localización anatómica en la extracción de cada hemocultivo.

-Para el transporte la temperatura ideal es la temperatura ambiente (Baron et al., 2005; Wayne, 2007; Isenberg, 2010).

-Respecto al tiempo de transporte máximo aconsejable no hay muchas referencias, pero la mayoría de ellas sugieren un intervalo máximo de 2 (Baron et al., 2005; Wayne, 2007) o 4 horas (Isenberg, 2010), aunque otras referencias elevan este tiempo incluso a un máximo a 18 horas (Loza et al., 2003). Los hemocultivos nunca deben ser refrigerados a 4°C.

-El volumen de muestra extraído ha de ser el recomendado por el fabricante. En el caso de los niños, se aconseja recoger un máximo del 1% (Wayne, 2007) del volumen total de sangre según unas guías, y entre el 4 y el 5% según otras (Baron et al., 2005).

-El tiempo de incubación de los hemocultivos más habitual es de cinco días (Huang et al., 1998).

2.4.2. Métodos de identificación clásicos

En el momento en el que el hemocultivo es positivo debemos proceder a la identificación del microorganismo y a la realización de las pruebas de susceptibilidad antibiótica del mismo. La identificación del microorganismo por métodos clásicos necesita de su crecimiento en medio sólido, lo que habitualmente requiere unas 24 horas, y se basa en distintos métodos fenotípicos como los siguientes (Carroll y Weinstein, 2007):

-Características microscópicas (tinción de Gram) y macroscópicas (morfología, hemólisis).

-Requisitos de crecimiento (atmósfera, temperatura, nutrientes).

-Detecciones de antígeno (*clumping factor*, carbohidratos específicos de pared,...)

-Discos de identificación (optoquina, bacitracina...).

-Métodos bioquímicos: individuales (catalasa, oxidasa,...) o agrupados (galerías o paneles de identificación).

Algunas de estas pruebas son rápidas (segundos o minutos) y pueden proporcionar información preliminar, pero en general para la identificación definitiva del microorganismo se requiere de un tiempo mínimo aproximado de un día en el mejor de los casos.

2.4.3. Métodos de determinación de la susceptibilidad antibiótica

Habitualmente las susceptibilidades antibióticas de los microorganismos se realizan a partir del microorganismo crecido en cultivo puro. Para disminuir el tiempo de respuesta los Servicios de Microbiología asumen la realización de un antibiograma directamente de la sangre del hemocultivo positivo, aún a riesgo de perder algo de fiabilidad y otorgar información provisional.

a) Antibiograma a partir de hemocultivo positivo

Existen varias técnicas en la literatura para la realización del antibiograma directo; la primera data de 1979 (Fay y Oldfather). Estas técnicas están basadas en métodos de difusión disco-

placa, con el inóculo bacteriano sin ajustar. Actualmente las recomendaciones del *European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) no avalan estos protocolos para emitir un informe definitivo, y por tanto estos datos se deben considerar preliminares. El *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) ha desarrollado un protocolo para su estandarización en el año 2018 (Chandrasekaran et al., 2018).

b) Antibiograma a partir del microorganismo

El método de referencia en la actualidad es la microdilución en placa, que se realiza siguiendo los protocolos proporcionados por el EUCAST o el CLSI, que varían en función del tipo de microorganismo. En dichos protocolos se especifican los medios de cultivo, el inóculo, la atmósfera y el tiempo de incubación (habitualmente entre 16 y 24 horas). También están validados métodos de difusión disco-placa y los gradientes de concentración (Etest[®], bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia), siguiendo los protocolos proporcionados por las mismas entidades. Dentro de los métodos comerciales, el sistema VITEK[®]2 (bioMérieux) proporciona resultados de sensibilidad a partir de 4 horas de incubación.

El problema del antibiograma definitivo a partir de cepa es el tiempo de respuesta (unas 48 horas desde que el hemocultivo es positivo). En el caso del antibiograma directo se mejora unas 24 horas, pero se pierde fiabilidad, no es factible para todos los microorganismos y el tiempo de respuesta sigue siendo mejorable.

2.5. Diagnóstico microbiológico. Nuevas tecnologías

Como acabamos de ver, el hemocultivo, asociado a la posterior identificación y pruebas de sensibilidad antibiótica, es la referencia para el diagnóstico de las bacteriemias. Eso no quiere decir que no sea mejorable, pues presenta una serie de desventajas:

-Baja sensibilidad. La rentabilidad de los hemocultivos en pacientes adultos varía entre el 2 y el 20%, e incluso en casos de sepsis grave no supera el 50% según algunos estudios (Dellinger et al., 2008). Estos resultados pueden ser debidos a una baja sospecha clínica, pero también a la presencia de falsos negativos, debidos al tratamiento antibiótico previo de los pacientes, a la baja carga de microorganismos en sangre o a la presencia de microorganismos exigentes (no crecen en los medios de hemocultivo o no son cultivables).

-Demora de resultados. Los hemocultivos positivos suelen crecer en las primeras 48 horas (Rodríguez Díaz et al., 2017) de incubación, aunque para dar un resultado negativo se

requieren cinco días. En caso de ser positivos, se requiere un mínimo de otras 48-72 horas para tener el resultado de la identificación del microorganismo y su susceptibilidad antibiótica, si se utilizan métodos clásicos.

-Presencia de contaminaciones. Debido a la contaminación en la toma de muestras con microorganismos pertenecientes a la microbiota de la piel (Gross et al., 1994).

Todo esto ha hecho que se intenten diseñar nuevos métodos diagnósticos con el objetivo de superar estas limitaciones. La técnica ideal debería tener rapidez, sensibilidad y especificidad elevada, capacidad para detectar microorganismos no cultivables y diversos mecanismos de resistencia, la mayor automatización posible y ser coste-efectiva.

En función de la técnica empleada, podrán realizarse a partir del hemocultivo positivo o directamente desde la muestra. Este último enfoque sería ideal, pues reduciría enormemente los tiempos de respuesta, pero su realización es muy difícil por el bajo inóculo bacteriano habitualmente presente en sangre.

2.5.1. Métodos genómicos

Los métodos que presentan mayor potencial son los métodos fundamentados en la detección y amplificación genómica, habitualmente basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las ventajas de estas técnicas son la rapidez y su utilidad cuando se trata de microorganismos no cultivables, de difícil crecimiento o cuando la toma de muestras se realiza después de instaurado el tratamiento antimicrobiano. Además, algunas aportan cierta información sobre la sensibilidad antibiótica del patógeno implicado mediante la detección de algunos determinantes de resistencia. En contrapartida son caras, están diseñadas para detectar unas dianas concretas ya elegidas (no cualquier microorganismo) y necesitan una interpretación experta ya que pueden poner de manifiesto ADN de bacterias no viables.

Pueden realizarse del hemocultivo ya positivo (acortando el tiempo de identificación del microorganismo) o directamente de la sangre del paciente (acortando todo el proceso diagnóstico, cultivo + identificación). En este último caso se permite conocer el resultado en pocas horas, aunque todavía existen diversas limitaciones que dificultan su empleo, como la baja carga bacteriana habitualmente presente y la presencia de interferentes e inhibidores (ADN humano, hierro, inmunoglobulinas, heparina) (Al-Soud y Rådström, 2001).

Algunos de los métodos moleculares, basados en la PCR, disponibles en la actualidad son: AccuProbe system® (Hologic, Marlborough, Massachusetts, EE.UU.), GenomEra® *S. pneumoniae* y GenomEra® *S. aureus* (Abacus Diagnostica, Turku, Finlandia), Light Cycler® Septifast (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Suiza), Sepsitest™ (Molzyme, Bremen, Alemania), iDTECT™ Dx Blood (PathoQuest, París, Francia), LiDia™ BSI test (DNAe, Carlsbad, California, EE.UU.), MagicPlex™ Sepsis Test (Seegene, Taewon, Corea del Sur), FilmArray® Blood Culture Identification Panel (bioMérieux), Sepsis Flow Chip (Máster Diagnóstica, Granada, España), GeneXpert® (Cepheid, Sunnyvale, California, EE.UU.), Verigene® (Nanosphere, Chicago, Illinois, EE.UU.), entre otros.



Figura 2. Sistema FilmArray®. Tomado de <http://www.biomerieux.com/>.



Figura 3. Cartucho de GeneXpert®. Tomado de <http://www.cepheid.com/>.

Según las publicaciones, estos métodos sobre muestra directa presentan resultados dispares; en general, falta sensibilidad y especificidad y no todos aportan información acerca de genes de resistencia antibiótica (Marco, 2017). Suelen estar validadas para su aplicación en clínica, pero su impacto económico aún no ha sido evaluado (Peters et al., 2004).

De todas estas técnicas, como ya hemos comentado, algunas detectan genes de resistencia de los microorganismos. Es una aportación importante, pero no es siempre extrapolable a la resistencia fenotípica del microorganismo, pues un microorganismo puede tener el gen y no expresarlo ni tener significación clínica. Y por otro lado, puede no tener ciertos genes de resistencia, pero mostrarla por otros mecanismos que o bien no se están detectando o bien no se conocen.

2.5.2. Métodos proteómicos

Una de las grandes revoluciones el mundo de la microbiología ha sido la utilización de MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight-Mass Spectrometry*)

(desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo-espectrometría de masas) en el diagnóstico, debido a su capacidad para identificar microorganismos de manera rápida, fiable y sencilla.

La identificación por MALDI-TOF MS está basada en la proteómica y la espectrometría de masas:

-La proteómica es el estudio y caracterización del conjunto de proteínas expresadas por un genoma (proteoma). Lo que se estudia es la huella peptídica obtenida, que es el conjunto de fragmentos peptídicos que se obtienen tras tratar una proteína concreta con una proteasa determinada. Dicha huella peptídica va ser específica de la proteína o muestra en cuestión.

-La espectrometría de masas es una técnica analítica que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos al permitir la medición de iones derivados de moléculas separándolos en función de su relación masa/carga. El espectro de masas de cada compuesto se denomina huella química y es una representación gráfica de los fragmentos obtenidos, por orden creciente de masa frente a su abundancia relativa.

La primera propuesta de utilización de la espectrometría de masas para identificar bacterias data de 1975 (Anhalt y Fenselau); posteriormente, su combinación con la proteómica dio lugar, en 1996, a la primera propuesta de MALDI-TOF MS como método de identificación de microorganismos (Carbonnelle et al., 2010).

Desde el momento de su implantación ha sido una técnica muy analizada (Conway et al., 2001; Kumar et al., 2004; Bizzini y Greub, 2010; Lagacé-Wiens et al., 2012; López Roa et al., 2013). En principio su uso se destinó a la identificación de microorganismos crecidos en cultivo sólido (incluso con cultivos mínimamente crecidos, de unas pocas horas, algo que para la identificación bioquímica tradicional no es posible), presentando grandes ventajas:

-Fiabilidad óptima, por encima incluso de las identificaciones tradicionales bioquímicas. A nivel de especie en un primer momento las identificaciones exitosas oscilaban entre el 84% (Seng et al., 2009) y el 93% (Bizzini y Greub, 2010).

-Rapidez, pueden identificarse microorganismos en minutos, frente a las 24 horas habituales de los métodos tradicionales.

-Bajo coste, únicamente es necesaria la amortización del equipo, pues el gasto en consumibles es mínimo (se estima entre 0,5–1 € por identificación) (Lagacé-Wiens et al., 2012).

En microbiología, el principio de funcionamiento de MALDI-TOF MS consiste en la aplicación de un láser a la muestra (de manera habitual el microorganismo crecido) que proporciona una energía que romperá la bacteria y sus moléculas, principalmente sus proteínas, fragmentándolas en distintos tamaños y cargándolas positivamente. En una segunda fase, en un tubo de vacío al que se aplica un voltaje, dichos fragmentos se separarán en función de la relación masa/carga. Al ser la carga en todos los casos +1, se separarán en función de su masa. En una tercera fase llegarán al detector, que emitirá una señal cuya intensidad será proporcional a la cantidad de fragmento que llega. Lo que se obtendrá al final de todo el proceso será un espectro que será característico del microorganismo en cuestión, y que se comparará con las bases de datos existentes proporcionando de esta manera la identificación.

Los componentes de un equipo MALDI-TOF MS son, por tanto, la fuente de ionización (componente MALDI), el analizador de masas (componente TOF), y el detector (Figura 4).

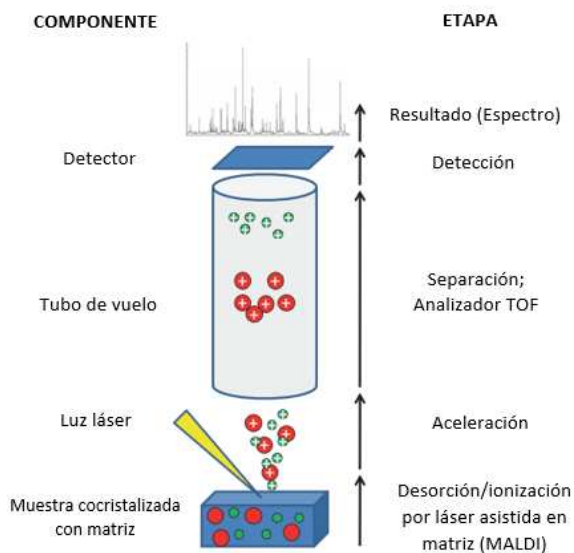


Figura 4. Componentes y etapas de MALDI-TOF MS. Imagen modificada de Croxatto et al., 2012.

Posteriormente, MALDI-TOF MS también se ha intentado usar trabajando desde muestra directa (como el hemocultivo positivo). Sin embargo, esto presenta más dificultades que cuando se aplica directamente sobre bacterias aisladas en medios de cultivo sólidos a causa de la baja carga microbiana y de la alteración de los espectros proteicos bacterianos por interferencias con el medio (proteínas humanas, células sanguíneas y carbón en el frasco de hemocultivo). Debido a estas limitaciones no existe un único protocolo establecido y validado sobre el modo de procesar estas muestras. Existen 2 técnicas comerciales que presentan una concordancia en la identificación que oscila entre el 60-99% (Verroken et al., 2016): Sepsityper

kit (Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, EE.UU.) y VITEK MS Blood Culture Kit (bioMérieux).

Desgraciadamente, MALDI-TOF proporciona identificación, pero no la sensibilidad antibiótica del microorganismo en cuestión. Se están perfeccionando técnicas para conseguirlo, con las que se obtendría información acerca de la sensibilidad antibiótica, pero no un antibiograma convencional. Son técnicas rápidas (unas tres horas), pero difíciles técnicamente y no validadas para su aplicación clínica:

-Análisis directo de extractos bacterianos, que pueden diferenciar aquellos microorganismos que presentan proteínas responsables de la resistencia a ciertos antimicrobianos. Se han realizado estudios de este tipo para la detección de carbapenemasas y betalactamasas (Hoyos-Mallecot et al., 2014).

-Detección de actividad enzimática: incubando antibióticos en presencia del microorganismo, evaluando la desaparición del pico del antibiótico (Carbonnelle et al., 2010).

-Comparación de crecimiento bacteriano con y sin antibiótico. Las bacterias crecen de manera distinta, y por tanto los espectros bacterianos originados son diferentes (Verroken et al., 2016).

Con todo ello, la aplicación de la espectrometría de masas MALDI-TOF MS a la Microbiología Clínica ha supuesto una revolución en los protocolos de trabajo en los centros que disponen de esta tecnología, pues ofrece información sobre la etiología de forma precoz, minutos después de realizarse la tinción de Gram si se realiza de hemocultivo positivo y pocas horas si se realiza desde colonias crecidas en medios sólidos.

2.5.3. Otros métodos

Las PCRs y MALDI-TOF MS no han sido las únicas técnicas que han colaborado en la mejora del diagnóstico de las bacteriemias. Existen otras, basadas en otros métodos, con gran potencial en este campo:

-Detección de antígeno: BinaxNOW *Staphylococcus aureus* test (Alere Scarborough, Inc., Scarborough, Maine, EE.UU.). Detecta antígenos de *S.aureus* a partir de hemocultivo positivo en 30 minutos.

-Resonancia magnética: T2MR (T2 Biosystems, Lexington, Misisipi, EE.UU.). Detecta microorganismos directamente desde la muestra. De momento disponible para la detección de especies del género *Candida* en un tiempo de 3 a 5 horas.

-Hibridación in situ con sondas fluorescentes: PNA FISH (Panagene, Daejeon, Corea del Sur). Identifica los microorganismos en unas tres horas desde la positividad del hemocultivo utilizando sondas específicas.

- Accelerate PhenoTest™ BC Kit (Accelerate Diagnostics Inc., Tucson, Arkansas, EE.UU.). Basada en el mismo principio, detecta microorganismos desde hemocultivo positivo en una hora, y puede proporcionar resultados definitivos de sensibilidad antibiótica en seis horas.

- IRIDICA™ BAC-BSI Assay (Abbott Molecular, Des Plaines, Illinois, EE.UU.) (basada en la ionización por electrospray (PCR/ESI-MS): combina una PCR con un posterior análisis del amplicón obtenido mediante espectrometría de masas. Permite identificar casi 800 microorganismos en menos de seis horas desde la muestra directa.

-Colorimetría: RAPIDEC® CARBA NP, sirve para detectar cepas productoras de carbapenemasas entre 30 minutos y 2 horas después de la positividad del hemocultivo.

3. EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y LA SEPSIS

Hemos visto que la **sepsis** es un proceso clínico muy grave, en el cual el factor tiempo es fundamental, y cuyo origen es la **bacteriemia**, diagnosticada en los Servicios de **Microbiología Clínica**. Éstos pueden hacer una serie de aportaciones que influirán en la mejora del diagnóstico y manejo de la sepsis, impulsados por las nuevas técnicas diagnósticas comentadas:

1. Mejora de la fase preanalítica:

-Los laboratorios de Microbiología Clínica deberían estar implicado en la elaboración y mejora de los protocolos de extracción del hemocultivo, lo que supondría una reducción de las contaminaciones con las consiguientes ventajas ya comentadas.

-La mejora del flujo de información con los servicios solicitantes acerca de la tasa de contaminaciones también juega un papel importante en su disminución y control.

-Los tiempos de procesamiento del hemocultivo tienen una relación directa con el tiempo de respuesta, con una influencia directa en la mortalidad.

2. Mejora de la fase analítica:

-Mejora de los métodos diagnósticos, tanto a nivel de sensibilidad como de fiabilidad y rapidez. Estas mejoras se refieren a distintos campos:

a) Al hemocultivo, mejorando la capacidad de recuperación de los microorganismos y disminuyendo el tiempo necesario para ello.

b) A los métodos de identificación de los microorganismos, haciéndolos todo lo rápidos y fiables posible.

c) A los métodos de realización del antibiograma, acortando los tiempos de respuesta.

3. Mejora de la fase postanalítica:

-Manteniendo actualizada la información acerca de la etiología de la bacteriemias y los perfiles de resistencia de dichos microorganismos.

-Mejorando la rapidez del flujo de información al clínico, con la emisión de informes preliminares de manera más precoz y frecuente.

Por todo ello, el planteamiento de este trabajo fue el de evaluar las distintas fases del proceso diagnóstico de las **bacteriemias** centrados en aspectos puramente microbiológicos, con el objetivo de obtener la máxima información posible y descubrir oportunidades de mejora.

OBJETIVOS

Fase preanalítica:

1. Estudiar la evolución de las solicitudes de hemocultivo en un hospital de tercer nivel a lo largo de un período de 10 años y su relación con factores demográficos como la edad, el sexo, la estacionalidad o el Servicio solicitante.
2. Evaluar el tiempo de procesamiento del hemocultivo.
3. Evaluar los resultados y contaminaciones del hemocultivo.

Fase analítica:

4. Analizar las posibles mejoras aportadas por la introducción de nuevos modelos de incubadores.
5. Analizar el tiempo de positividad de los microorganismos y su utilidad como herramienta predictiva y diagnóstica.
6. Evaluar la fiabilidad e impacto de MALDI-TOF MS en los flujos de trabajo y el tiempo de respuesta.
7. Evaluar la fiabilidad e impacto del antibiograma rápido a partir de hemocultivo positivo.
8. Evaluar RAPIDEC® CARBA NP como método diagnóstico rápido para la detección de carbapenemasas.

Fase postanalítica:

9. Conocer la etiología de las bacteriemias y su evolución a lo largo de la década a estudio.
10. Estudiar los patrones de resistencia de los microorganismos aislados y su evolución a lo largo de los 10 años.
11. Evaluar la influencia de los cambios tecnológicos habidos en el laboratorio en los tiempos de respuesta de emisión de informes de resultados.

MATERIAL Y MÉTODOS

A. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

Para el estudio de los 11 objetivos de este trabajo, hubo una mayoría de materiales y métodos comunes a todos ellos puesto que formaron parte de la rutina de trabajo del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) durante los 10 años de recogida y revisión de datos.

***PACIENTES**

El objeto de estudio fueron los pacientes del HUCA a los que se les solicitaron y extrajeron hemocultivos durante el decenio 2007-2016.

El HUCA es un hospital de tercer nivel, cubre el área sanitaria IV del Principado de Asturias (con una población que a lo largo de los 10 años osciló entre 330925 y 336026 habitantes) y además es centro de referencia para muchas especialidades de toda la Comunidad Autónoma del Principado de Asturias.

***MUESTRAS**

La muestra objeto de todo este trabajo fue el hemocultivo: la sangre del paciente extraída en cada venopunción e inoculada en botellas que contenían medio de cultivo. En este estudio se inocularon dos botellas (aerobia y anaerobia) por hemocultivo.

No se tuvieron en cuenta los cultivos de sangre realizados en medios de lisis-centrifugación (Isolator®, DuPont Co., Wilmington, Delaware, EE.UU.), por ser muy minoritarios (en ningún año se excedió el número de 30 peticiones).

1. FASE PREANALÍTICA

La fase preanalítica comprende todas las actuaciones relacionadas con la extracción de la muestra y su conservación y transporte al laboratorio.

1.1. EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

La obtención de la sangre a inocular se hizo siguiendo los protocolos del hospital para este fin. En ellos se reflejaban las técnicas de antisepsia, los tiempos de extracción de los hemocultivos y el número de ellos a obtener. Habitualmente la extracción se realizaba por venopunción, principalmente de venas periféricas. En Medicina Intensiva y algunas otras unidades especiales también se extrajeron de una vía venosa central, incluso alguna vez de vía arterial.

El volumen de muestra recomendado fue de entre 8 y 10 ml. por botella, es decir, entre 16 y 20 ml. por hemocultivo (según instrucciones del fabricante).

1.2. CONSERVACIÓN, TRANSPORTE Y PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Una vez extraídos los hemocultivos por el personal de Enfermería, la conservación de las botellas fue a temperatura ambiente hasta su transporte al laboratorio. Éste era realizado por personal del hospital, y, a partir del año 2016, también a través de tubo neumático (en cuanto estuvo disponible en el nuevo HUCA y hubo botellas de material plástico).

Una vez en el laboratorio, las botellas permanecían a temperatura ambiente, durante un intervalo de tiempo variable, hasta su introducción en el incubador. Este tiempo fue inferior a una hora durante las horas de trabajo del personal técnico, pudiendo ser superior durante las horas de trabajo del personal de guardia. Las muestras venían identificadas con los datos del paciente, y en el laboratorio, a su llegada, se añadía además un número de muestra único e identificativo.

2. FASE ANALÍTICA

La fase analítica comprende todas las actuaciones realizadas en el Servicio de Microbiología desde la llegada de la muestra al laboratorio hasta la emisión del resultado.

2.1. CULTIVO DE SANGRE (HEMOCULTIVO)

2.1.1. Medios de cultivo (botellas de hemocultivo)

Los frascos de hemocultivo utilizados fueron BACTEC™ Plus Aerobic/F Culture Vials y BACTEC™ Plus Lytic/10 Anaerobic/F Culture Vials (Becton Dickinson –BD-, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE.UU.). El volumen de medio, la composición y atmósfera de dichas botellas, según el fabricante, fue la siguiente:

Tabla 1. Composición de las botellas aerobias Plus Aerobic/F Blood Culture.

Agua tratada	30 ml.
	p/v
Caldo digerido de soja-caseína	3%
Extracto de levadura	0,25%
Aminoácidos	0,05%
Azúcar	0,20%
Polianetolsulfonato de sodio (SPS)	0,05%
Vitaminas	0,03%
Antioxidantes/reductores	0,01%
Resina adsorbente no iónica	13,40%
Resina de intercambio catiónico	0,90%

Estos medios se suministran con atmósfera aerobia y CO₂ añadido.



Figura 5. Botella aerobia utilizada en nuestro laboratorio.

Tabla 2. Composición de las botellas anaerobias Lytic/10 Anaerobic/F Blood Culture.

Agua tratada	40 ml.
	p/v
Caldo digerido de soja-caseína	2,75%
Extracto de levadura	0,20%
Digerido de tejido animal	0,05%
Dextrosa	0,20%
Polianetolsulfonato de sodio (SPS)	0,035%
Hemina	0,0005%
Menadiona	0,00005%
Citrato sódico	0,02%
Tioles	0,10%
Piruvato sódico	0,10%
Saponina	0,26%
Agente antiespumante	0,01%

Los medios anaerobios se prerreducen y se dispensan con

CO₂ y N₂ añadidos.



Figura 6. Botella anaerobia utilizada en nuestro laboratorio.

En los 2 últimos años del estudio dichas botellas se cambiaron por las Plus Aerobic (o Anaerobic)/F Blood Culture Plastic Bottles. La única diferencia fue el material plástico, con lo cual fue posible su envío a través del tubo neumático.

2.1.2. Incubadores

El cultivo de sangre en las botellas comentadas se llevó a cabo en incubadores automáticos: BD BACTEC™ 9240 blood culture system (BD) hasta el traslado al nuevo HUCA (junio de 2014), BD BACTEC™ FX blood culture system (BD) posteriormente:

-1 de enero de 2007 a junio de 2014:

Incubador BD BACTEC™ 9240: sistema totalmente automático, no invasor, de agitación continua, que se compone de un incubador en el que se introducen las botellas, un detector y un ordenador. Su principio de funcionamiento está basado en la producción de CO₂ por el metabolismo bacteriano, que reacciona con un material fluorescente situado en el fondo del frasco del hemocultivo, lo que modula la cantidad de luz que es absorbida por un sensor. Esta medida es interpretada por el sistema de acuerdo con unos parámetros programados. Realiza una lectura de todos los frascos cada 10 minutos y mediante un sistema luminoso de alarma indica los frascos positivos detectados en cada lectura. Se requieren cinco lecturas positivas para que otorgue un resultado positivo, de ahí que el tiempo mínimo de positividad sea de 50 minutos. Una lectura positiva indica la presencia de presuntos microorganismos viables dentro del frasco.



Figura 7. Incubador BD BACTEC™ 9240. Tomado de <https://bd.com/>.

-Junio de 2014 a diciembre de 2016:

Incubador BD BACTEC™ FX: Utiliza el mismo principio de funcionamiento –tanto a nivel de estructura, incubación como de detección de los positivos- y medios de cultivo que el BACTEC™ 9240, pero con un software optimizado. Dicho software permite la entrada de datos de las muestras procesadas vía online desde el programa de gestión del laboratorio, y el volcado al mismo de los



Figura 8. Incubadores BD BACTEC™ FX utilizados en nuestro laboratorio.

resultados, así como de los tiempos de positividad de las botellas.

2.1.3. Tiempo de incubación

El tiempo máximo habitual de incubación hasta considerar el hemocultivo negativo fue de cinco días. En determinados casos la incubación se prolongaba hasta 15 días o más (a voluntad del responsable de Microbiología): sospechas de endocarditis, de infección fúngica o de infección bacteriana por algún microorganismo de crecimiento lento.

2.2. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Se realizó la identificación de los microorganismos mediante distintos métodos y técnicas, con las que se alcanza distinto grado de fiabilidad y detalle, y con distinto tiempo de respuesta y coste asociado:

2.2.1. Métodos de identificación fenotípicos.

Son métodos que se llevan utilizando durante décadas, y su coste habitualmente es muy reducido:

***Características microscópicas:**

a) Tinción de Gram: realizada de forma manual en el laboratorio hasta el año 2014 y desde el año 2015 en el teñidor automático PREVI® Color Gram (bioMérieux).

***Características macroscópicas:**

a) Morfología de la colonia.

b) Hemólisis en medios con sangre: total (β), parcial (α), nula (γ).

***Crecimiento en cultivo:**

a) Requerimientos nutricionales.

b) Tipo de metabolismo: aerobio o anaerobio estricto, anaerobio facultativo, microaerófilo...

c) Temperatura de crecimiento: psicrófilas, mesófilas, termófilas.



Figura 9. Tinción de Gram realizada en nuestro laboratorio.

***Detección de antígenos:**

- a) Clumping factor en *S.aureus* (Pastorex™ Staph Plus (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, EE.UU.).
- b) Carbohidrato de pared específico de grupo para el tipado de especies de estreptococo en los distintos grupos de Lancefield (Pastorex™ Strep, Bio-Rad Laboratories Inc.).

***Discos de identificación. Basados en la resistencia o sensibilidad a determinados compuestos:**

- a) Optoquina para *S.pneumoniae* (sensible) (Oxoid, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU).
- b) Bacitracina para *S.pyogenes* (sensible) (bioMérieux).

***Pruebas bioquímicas:**

Se pueden realizar individualmente o en baterías, y el resultado puede ser inmediato o requerir diferentes tiempos de incubación:

- Catalasa: reactivo preparado en el laboratorio. H₂O₂ al 3% v/v. Lectura inmediata.
- Citocromo oxidasa: Remel™ Pathotec™ CO Paper Strips (Thermo Fisher Scientific). Lectura inmediata.
- Tubos Triple Sugar Iron Agar (TSI), Lysine Iron Agar (LIA), Urea Motility Indole Agar (UMI), (Difco™, BD), Bile-Aesculine (Maim S.L., Vic, España). Lectura en aproximadamente 24 horas.
- Galerías de pruebas bioquímicas: combinación de distintas pruebas bioquímicas. En nuestro caso las galerías utilizadas fueron las API® ID (bioMérieux), en función del tipo de microorganismo a identificar: API® 20 E, API® 20 NE, API® 20 STREP, API® STAPH, API® CORYNE, API® 20 A, API® NH, API® CAMPY, API® 20 A, API® 20 C AUX. Lectura mayoritariamente a las 24 horas.

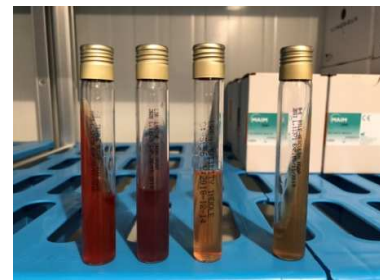


Figura 10. Tubos TSI, LIA, UMI y Bilis-Esculina utilizados en nuestro laboratorio.



Figura 11. API® 20E utilizado en nuestro laboratorio.

-Paneles de identificación de pruebas bioquímicas: combinación de distintas pruebas bioquímicas. En nuestro laboratorio se utilizaron los paneles MicroScan® (Beckman Coulter Inc., Brea, California, EE.UU.). Lectura entre 16 y 24 horas. Se utilizaron distintos tipos de paneles en función del microorganismo, algunos de los cuales fueron:

-Panel 31: panel para estafilococos.

-Panel 32: panel para enterococos y algunos estreptococos.

-Panel 53: panel para enterobacterias.

-Panel 54: panel para bacilos gram negativos no fermentadores.



Figura 12. Panel 53 utilizado en nuestro laboratorio.

2.2.2. Métodos de identificación proteómicos (espectrometría de masas MALDI-TOF MS).

2.2.2.1. Plataforma utilizada.

A partir de octubre de 2014 el laboratorio incorporó la tecnología MALDI-TOF MS, concretamente el sistema MALDI-TOF MS MS (Microflex™; Bruker Daltonics).

La identificación mediante MALDI-TOF MS MS de Bruker se basa en la detección de proteínas ribosómicas S y L (de 2.000 a 20.000 Da), que se asume suponen el 80-90% de las señales del espectro de la bacteria. Este sistema permite:

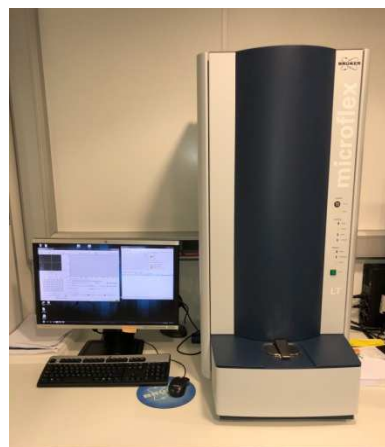


Figura 13. Sistema MALDI-TOF MS utilizado en nuestro laboratorio.

-Análisis simultáneo de 96 muestras/hora dando los primeros resultados en minutos.

-Posibilidad de realizar la identificación sin pretratamientos, utilizando directamente una colonia bacteriana.

-No presenta diferencias en el espectro obtenido bajo distintas condiciones de cultivo (al basarse en la medida de proteínas ribosómicas presentes de forma abundante).

-Identificación de todo tipo de bacterias (gram positivas, gram negativas, anaerobias, no fermentadoras, micobacterias,...), levaduras y hongos filamentosos.

- Identificación a nivel de género y especie, en ocasiones subespecie.
- Bases de datos en constante actualización con más de 3.500 entradas. La base de datos está formada por entradas que corresponden al espectro promedio (de al menos 24 espectros de alta calidad) de un microorganismo concreto (género, especie y cepa).
- Posibilidad de incluir nuevas referencias de cepas por el usuario.
- Marcado IVD y CE. : se puede usar para diagnóstico clínico.

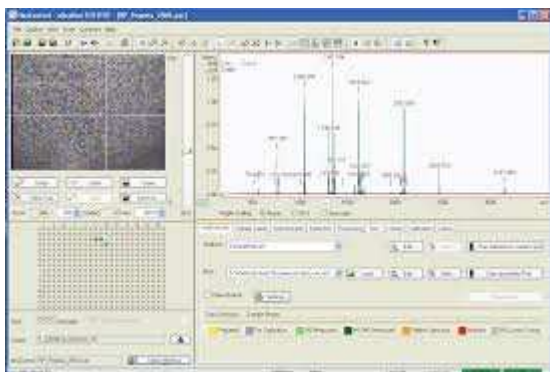


Figura 14. Programa flexControl utilizado para manejar el sistema MALDI-TOF MS.

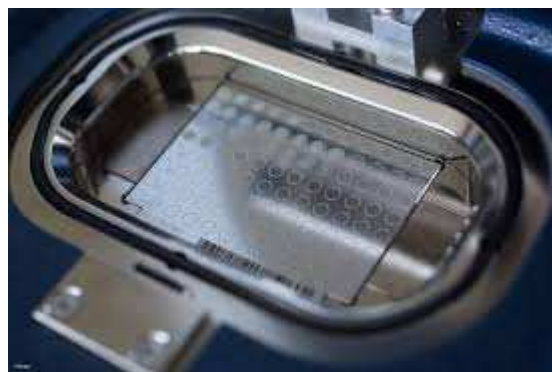


Figura 15. Placa de inoculación de muestras en el sistema MALDI-TOF MS.

2.2.2.2. Procedimiento realizado en el laboratorio

Los pasos a la hora de utilizar MALDI-TOF MS en el laboratorio fueron los siguientes:

Paso previo: Condiciones del cultivo: los microorganismos se obtuvieron a partir de un cultivo en medio sólido. Se trabajó con cultivos puros, con independencia de que los medios fueran o no selectivos, a ser posible con no más de 18-24 horas de incubación para evitar esporas (*Bacillus spp.*), productos metabólicos (*Arthrobacter spp.*) o autólisis (*Streptococcus spp.*).

Paso optativo: extracción con etanol/ ácido fórmico/ acetonitrilo: se puede realizar para conseguir mejores resultados en la identificación. Este método rompe las células y libera las proteínas. Se realizó únicamente si la identificación sin su uso no era concluyente. Se emulsionó una colonia en agua y etanol absoluto (%), y se centrifugó y resuspendió el pellet en una mezcla de ácido fórmico al 70%/ acetonitrilo (1:1). En el caso de partir de un cultivo en medio líquido se centrifugó y procedió de igual manera con el pellet resultante.

Paso 1: Transferencia a la tarjeta y adición de la matriz: para inocular la tarjeta metálica, se transfirió una colonia (o parte de ella) del microorganismo crecido al correspondiente punto de la tarjeta de metal realizando una extensión fina. En el caso de haber realizado la extracción, se empleó 1 µl. del sobrenadante final y se dejó secar a temperatura ambiente.

Paso 2: Análisis en el espectrómetro: se introdujo la tarjeta y la lectura comenzó de forma automática cuando se alcanzaron las condiciones óptimas de vacío. El software de obtención del espectro proporcionó la adquisición óptima de la muestra por acumulación de entre 240-500 disparos en diferentes lugares de la extensión. El espectro obtenido se comparó automáticamente con todos los espectros de la base de datos del software de identificación.

Paso 3: Interpretación de los resultados. El software MALDI BioTyper versión 2.0 analizó los picos obtenidos, y tras la comparación con los picos de la base de datos obtuvo un “*score*” o puntuación logarítmica cuyo valor, en base al grado de identidad, permite definir especie: ≥ 2 ; género $\geq 1,7$. Estos puntos de corte son los recomendados por el fabricante, pero en base a numerosos estudios (Schulthess et al., 2014; Faron et al., 2017, Lagacé-Wiens et al., 2012; Rodríguez-Sánchez et al., 2014), el “*score*” de 1,7 puede utilizarse para dar identificaciones a nivel de especie. Esto fue lo que se hizo en nuestro trabajo.

2.2.3. Métodos de identificación genómicos.

Cuando la identificación por métodos bioquímicos o por MALDI-TOF MS no fue posible, no era concluyente (baja o nula fiabilidad de las identificaciones, tanto referidas a las pruebas bioquímicas como a los “*scores*” obtenidos mediante MALDI-TOF MS) o era discrepante entre los métodos bioquímicos y proteómicos se procedía a la identificación del microorganismo mediante la secuenciación del gen codificante del ARNr 16S (gen *rrs*), considerado patrón oro (Bosshard et al., 2003) de las identificaciones bacterianas. El procedimiento consistía en varios pasos:

1. Realizar la extracción del genoma utilizando extractores automáticos, basados en la utilización de proteinasa K e isotiocianato de guanidina (GIT). El extractor utilizado fue el MagCore® (RBC Bioscience, New Taipei City, Taiwan).
2. Posteriormente se amplificaba el gen *rrs* que codifica el ARNr 16S bacteriano mediante una PCR casera. El fragmento amplificado era de unas 600 pares de bases (pb), del total de 1500 pb de que consta dicho gen, fragmento de un tamaño considerado suficiente para llegar a nivel de especie (Rodicio y Mendoza, 2004). Dicha PCR casera era simple (una única amplificación) y convencional (con revelado en gel de agarosa). Los cebadores fueron los que veremos a continuación, y el protocolo utilizado fue el descrito por Xu et al. (2003). La amplificación tenía lugar el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific):

Forward: 5'-AGG ATT AGA TAC CCT GGT AGT CCA-3'

Reverse: 5'-AGG CCC GGG AAC GTA TTC AC-3'

3. El fragmento obtenido posteriormente se secuenció partiendo de los mismos cebadores utilizados para la amplificación, utilizando los reactivos y condiciones del kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific).

4. Una vez finalizado el proceso de secuenciación, la secuencia obtenida se comparaba en distintas bases de datos (Blast® -Basic Local Alignment Search Tool- y leBIBI^{QBPP} -Quick Bioinformatic Phylogeny of Prokaryotes- v 1.1), lo que nos proporcionaba la identificación del microorganismo y el grado de fiabilidad de la misma, en base a distintos parámetros relacionados con la longitud de la secuencia y el grado de similitud de la misma al resto de secuencias existentes.

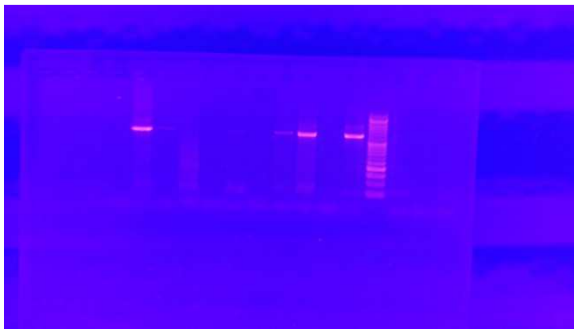


Figura 16. Revelado en gel de agarosa de una PCR del gen *rrs*.

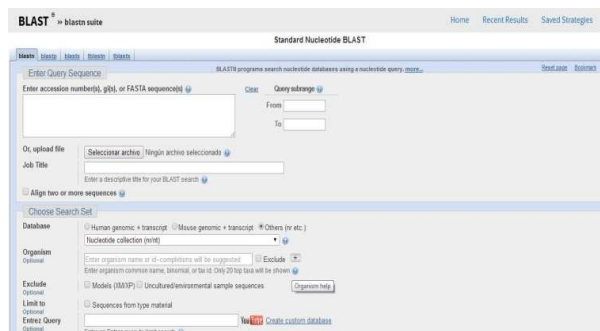


Figura 17. Web de la base de datos Blast®.

2.3. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Se realizaron partiendo de dos situaciones: directamente del hemocultivo positivo (se obtendría un antibiograma preliminar) o a partir del microorganismo ya crecido en subcultivo en medio sólido (se obtendría el antibiograma definitivo).

2.3.1. Antibiograma preliminar

El antibiograma preliminar se realizó en aquellos casos en los que la tinción de Gram objetivó bacilos gram negativos, o bien cocos gram positivos en grupos, compatibles con el género estafilococo, en más de una extracción del mismo paciente. Para su realización se utilizaba el método de difusión disco-placa. El protocolo a seguir era el siguiente:

1. Se partió de una botella de hemocultivo positiva. Se inoculó una cantidad aproximada de tres gotas de la misma por placa de medio BD Mueller Hinton II Agar (BD). Dichas gotas se extendieron de manera homogénea por la placa, mediante la utilización de un hisopo o asa de siembra.
2. Posteriormente se colocaron los discos de antibiótico (Antimicrobial Susceptibility Disks, Bio-Rad Laboratories, Inc.), de 6 mm. de diámetro, en la placa ya inoculada con la sangre del hemocultivo positivo, mediante la utilización de dispensadores (Disk Dispensers, Antimicrobial Susceptibility Disks, Bio-Rad Laboratories, Inc.), que situaban en cada placa 7 discos de antibiótico.

Para microorganismos gram positivos, se testaron 7 antibióticos: oxacilina, ceftoxitina, vancomicina, ciprofloxacino, cotrimoxazol, eritromicina y clindamicina.

Para microorganismos gramnegativos, 14 antibióticos: amoxicilina, amoxicilina-clavulánico, cefuroxima, ceftaxima, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, imipenem, meropenem, gentamicina, tobramicina, amikacina, ciprofloxacino y colistina.
3. Una vez colocados los discos se procedió a la incubación de las placas, que se realizaba a 37°C en estufa aerobia durante un tiempo máximo de 24 horas.
4. El día siguiente se medían los diámetros de los halos y se categorizaba al microorganismo como sensible, intermedio o resistente utilizando los criterios del CLSI para antibiogramas de difusión disco-placa.



Figura 18. Ejemplo de antibiograma disco-placa para gram positivos.



Figura 19. Ejemplo de antibiograma disco-placa para gram negativos.

5. Posteriormente, siempre se realizaba el antibiograma **definitivo** mediante métodos de microdilución en caldo utilizando paneles de Microscan®.

2.3.2. Antibiograma definitivo

Se realizaba el antibiograma definitivo una vez por bacteriemia valorable (aunque los dos hemocultivos fueran positivos), partiendo del microorganismo crecido en medio sólido.

Para la realización de las pruebas definitivas de sensibilidad antimicrobiana se siguieron los protocolos del CLSI (Wayne, 2008) basados en el método de microdilución en caldo, considerado de referencia para la realización de las pruebas de susceptibilidad antibiótica. Dicho método proporciona como resultado una concentración mínima inhibitoria (CMI), que categorizará al aislado como sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) al antimicrobiano en cuestión.

Para ello se utilizaron los paneles Microscan®. Constan de 96 micropocillos, en los cuales pueden tener lugar reacciones bioquímicas de identificación o pueden contar con concentraciones crecientes de antibiótico (la CMI sería la concentración del primer pocillo en el que no hay crecimiento). La incubación, lectura de los paneles e interpretación de los mismos se realizaba de manera automática mediante el software de Microscan®, basándose en los criterios CLSI.

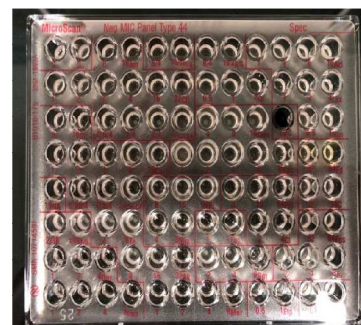


Figura 20. Panel Microscan® de susceptibilidad antibiótica.

2.4. ALGORITMOS DE TRABAJO

Los algoritmos de trabajo en el Servicio de Microbiología cambiaron radicalmente con la aparición de la técnica MALDI-TOF MS.

2.4.1. ALGORITMO DE TRABAJO PRE MALDI-TOF MS (1 de enero de 2007-junio de 2014)

1. Primer nivel: Identificación a nivel de morfotipo. Tiempo aproximado: minutos.

En el momento en el que el incubador notificaba la presencia de una botella positiva, se le realizaba a la misma una tinción de Gram, con lo que se obtenía una identificación presuntiva a nivel de morfotipo: cocos gram positivos en grupos, cocos gram positivos en cadenas, bacilos gram negativos, bacilos gram positivos...

En este momento además de la tinción de Gram se realizaban subcultivos a distintos medios sólidos en placa de agar, en función del microorganismo y el tipo de botella en el que se obtuvo crecimiento: Columbia Agar with 5% Sheep Blood, Chocolate II Agar, Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood, Levine EMB Agar, BBL™ CHROMagar™ Orientation, CDC Anaerobe Agar with 5% Sheep Blood, Sabouraud Dextrose Agar (BD). La incubación de los mismos se realizó a 35-37°C. Los medios sin sangre en atmósfera aerobia y los que la contenían en atmósfera aerobia con un 5% de CO₂. Las placas se revisaron a las 24 horas, manteniéndose más tiempo la incubación si eran negativas. La excepción fue el medio para anaerobios estrictos (CDC Anaerobe Agar with 5% Sheep Blood), que se incubó 48 horas, a 35-37°C, pero en atmósfera anaerobia.

Simultáneamente a dichos subcultivos, en función de lo visualizado en la tinción de Gram, se realizaron ciertas pruebas de identificación complementarias:

-Bacilos gram negativos: tubos LIA, UMI, TSI.

-Cocos gram positivos en cadenas o bacilos gram positivos: tubo Bilis-Esculina. Identificación presuntiva de *Enterococcus spp.* y *Listeria spp.* (hidrólisis de la esculina positiva).

-Cocos gram positivos en cadenas: disco de optoquina como identificación preliminar de *S.pneumoniae* (sensible a optoquina).

A nivel de susceptibilidad antibiótica se realizaba el antibiograma directo en el caso de bacilos gram negativos o de cocos gram positivos en grupo crecidos en más de un hemocultivo del mismo paciente.

2. Segundo nivel: Identificación preliminar (morfortipo, género o especie). Antibiograma preliminar. Tiempo aproximado: máximo 24 horas.

Se evaluaba el subcultivo realizado el día anterior, las características macroscópicas de crecimiento del microorganismo, y resultado de las pruebas de identificación. A esto se le añadía la realización de nuevas pruebas diagnósticas rápidas:

-Catalasa.

-Citocromo oxidasa.

-*Clumping factor* para identificar *S.aureus*.

En este momento se decidía si el microorganismo identificado preliminarmente requería de identificación definitiva y antibiograma. Esto era así si se consideraba un microorganismo valorable; como **contaminante** la identificación se detenía en este punto.

Los criterios para considerar un microorganismo como valorable o contaminante fueron microbiológicos (Bekeris et al., 2005; Hall, 2006). Consideramos microorganismos valorables a:

a) Un microorganismo que no es una causa habitual de contaminación de hemocultivos, por ejemplo *S.aureus*, enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *S.pneumoniae*,

independientemente del número de hemocultivos en los que aparezca.

b) Un microorganismo que es un contaminante habitual de los hemocultivos, por ejemplo ECN, EGV, *Corynebacterium spp.*, *Bacillus spp.*, *Propionibacterium spp.* y algunas especies de *Clostridium* si se aislaban en **al menos dos hemocultivos** obtenidos de extracciones distintas.

En las bacteriemias por ECN se comprobó que la especie y el antibiograma de ambos hemocultivos positivos fueran idénticos para considerarlo valorable. Para el resto de microorganismos potencialmente contaminantes, su crecimiento en más de un hemocultivo llevaba a asumir la bacteriemia como verdadera sin comparar antibiogramas. Si se recibía únicamente 1 hemocultivo, los contaminantes habituales se consideraron bacteriemias verdaderas en caso de obtenerse crecimiento en las 2 botellas del mismo hemocultivo.

En caso de considerarse el microorganismo como **valorable**, se realizaba un panel de identificación MicroScan® o una galería de identificación API® ID (para determinados microorganismos, como el género *Streptococcus* o *Corynebacterium*, las bacterias anaerobias estrictas o las levaduras, o si la identificación por Microscan® no era concluyente).

A nivel de susceptibilidad antibiótica, se realizaba la lectura del antibiograma preliminar y se realizaba el definitivo en un panel MicroScan®, que habitualmente llevaba incorporadas las pruebas bioquímicas.

3. Tercer nivel: Identificación definitiva. Antibiograma definitivo. Tiempo aproximado: máximo 48 horas.

Se obtenía la identificación y susceptibilidad antibiótica definitiva de los paneles MicroScan®. Si la identificación no era posible o concluyente se procedía a la identificación por secuenciación del gen *rrs*; así, la identificación se completaba en todos los casos, si bien se requería de 48 a 72 horas más.

2.4.2. ALGORITMO DE TRABAJO POST MALDI-TOF MS

1. Primer nivel: Identificación a nivel de morfotipo. Tiempo aproximado: minutos.

Se realizaba exactamente igual que en la época PRE MALDI-TOF MS; también la realización del antibiograma preliminar.

2. Segundo nivel: Identificación definitiva. Antibiograma preliminar. Tiempo aproximado: máximo 24 horas.

Se evaluaba el subcultivo realizado el día anterior, las características macroscópicas de crecimiento del microorganismo y el resultado de las pruebas complementarias.

Se realizaba la identificación del microorganismo crecido mediante MALDI-TOF MS, y este resultado, si presentaba un “*score*” mínimo de 1,7 se consideraba **definitivo**.

A nivel susceptibilidad antibiótica, se realizaba la lectura del antibiograma preliminar y se realizaba el definitivo en un panel MicroScan®, en este caso habitualmente sin identificación bioquímica.

3. Tercer nivel: Antibiograma definitivo. Tiempo aproximado: máximo 48 horas.

La identificación ya estaba completada previamente. A nivel susceptibilidad antibiótica, se obtenían los resultados definitivos del panel MicroScan®.

3. FASE POSTANALÍTICA

La fase postanalítica incluye las tareas relacionadas con la comunicación eficiente de los resultados microbiológicos al médico solicitante.

3.1. PROGRAMAS INFORMÁTICOS

Se utilizaron dos programas informáticos de gestión de laboratorio diferentes: Servolab® Laboratory Information System (Siemens Healthcare, Erlangen, Alemania) del 1 de enero de 2007 a junio de 2014 y Gestlab® (Cointec Ingenieros y Consultores, S.L., Orihuela, España) de junio de 2014 a 31 de diciembre de 2016:

-A nivel del registro inicial de la petición, en Servolab las solicitudes se realizaban a través de “*volantes*” de petición –formularios cubiertos manualmente con los datos del paciente, la muestra y el tipo de solicitud-, que se registraban en el sistema informático de manera manual. En Gestlab las solicitudes de los clínicos se realizaban a través del sistema de gestión de historias clínicas Cerner Millennium® (Cerner Corporation, Kansas City, Missouri, EE.UU.), y todos los datos de paciente, muestra y solicitud se transmitían automáticamente a Gestlab.

-A nivel de la obtención posterior de los datos, en ambos programas de laboratorio se podía obtener posteriormente una hoja Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EE.UU.) con los datos recogidos y el resultado. Para obtener los tiempos de positividad de los hemocultivos, Servolab los proporcionaba en formato papel, mientras Gestlab lo hacía en archivos Excel convencionales. Los tiempos de procesamiento únicamente se pudieron obtener con Gestlab.

3.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizaron los programas Excel y QIMacros (Microsoft Corporation) y GraphPad InStat (GraphPad Software, La Jolla, California, EE.UU.). La tendencia y aleatoriedad de las series temporales se estudio mediante el coeficiente de correlación de Pearson (r). Las variables cualitativas fueron comparadas mediante el test χ^2 . Las medias fueron comparadas mediante el test de t de Student. Para todos los cálculos de medias se calculó el intervalo de confianza del 95% (IC 95%). Un valor de p bilateral $<0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Los indicadores estadísticos utilizados en cada caso concreto vienen descritos en los siguientes apartados.

B. MATERIALES Y MÉTODOS ESPECÍFICOS POR OBJETIVO

Objetivo 1: Estudiar la evolución de las solicitudes de hemocultivo en un hospital de tercer nivel a lo largo de un período de 10 años y su relación con factores demográficos como la edad, el sexo, la estacionalidad o el Servicio solicitante.

*Diseño del estudio: realizado retrospectivamente con los datos de los hemocultivos recibidos durante 10 años (2007-2016).

*Muestras analizadas: todos los **hemocultivos** recibidos en el laboratorio durante el período de estudio.

*Métodos de laboratorio y procesamiento de las muestras: los comentados previamente en la fase analítica.

*Análisis de los datos: se analizaron los datos globalmente (los 10 años), año a año, y en función de variables como la edad (pediátricos y adultos), el sexo (hombre y mujer), el mes de solicitud y el Servicio peticionario. En los pacientes pediátricos habitualmente cada episodio clínico se diagnosticaba con 1 único hemocultivo; en los pacientes adultos con 2 hemocultivos, de ahí la división realizada.

Los servicios se agruparon en críticos, médicos, quirúrgicos, pediátricos y Urgencias Generales. Se valoraron individualmente para el estudio sólo si el número total de hemocultivos recibidos en la década era de un mínimo de 1000.

*Análisis estadístico: la tendencia y aleatoriedad de las series temporales se estudió mediante el coeficiente de correlación de Pearson (r).

Objetivo 2: Evaluar el tiempo de procesamiento del hemocultivo.

*Diseño del estudio: realizado retrospectivamente entre enero y junio de 2016.

*Muestras analizadas: todos los **hemocultivos** recibidos en el laboratorio durante el período de tiempo comentado.

*Métodos de laboratorio y procesamiento de las muestras: los comentados previamente en la fase analítica.

*Análisis de los datos: se estudió el tiempo de procesamiento en relación con el resultado posterior del hemocultivo. El tiempo se dividió en distintas fracciones: <2 horas, 2-4 horas, 4-

12 horas, 12-18 horas y >18 horas, en base a los tiempos máximos recomendados en las distintas revisiones sobre este tema (Baron et al. -2 horas-, 2005; Isenberg, 2010 -4 horas-; Loza et al., 2003 -18 horas-).

*Definiciones: se definió tiempo de procesamiento como el tiempo transcurrido entre la realización de la extracción sanguínea y la introducción de las botellas en el incubador.

*Análisis estadístico: la significación estadística del resultado de cada fracción temporal se llevó a cabo mediante el test χ^2 .

Objetivo 3: Evaluar los resultados y contaminaciones del hemocultivo.

*Diseño del estudio: realizado retrospectivamente con los datos de los hemocultivos recibidos durante 10 años (2007-2016).

*Muestras analizadas: todos los **hemocultivos** recibidos en el laboratorio durante el período de tiempo comentado.

*Métodos de laboratorio y procesamiento de las muestras: los comentados previamente en la fase analítica.

*Análisis de los datos: se analizaron los datos globalmente, año a año, y en función de variables como la edad, el sexo, el mes de solicitud y el servicio peticionario.

Los servicios se valoraron individualmente para el estudio si el número total de hemocultivos recibidos en la década era de un mínimo de 1000. Se realizaron gráficos de control estadísticos para los cinco servicios con mayor número de peticiones.

Se analizaron los microorganismos causantes de las contaminaciones, el número total y porcentaje de los mismos y la significación clínica de los aislados.

*Definiciones: se definió resultado positivo cuando se aisló en el hemocultivo un microorganismo considerado valorable; contaminación cuando se aisló un microorganismo considerado contaminante; negativo si no se obtuvo crecimiento.

*Análisis estadístico: La significación estadística de cada grupo poblacional se llevó a cabo mediante el test χ^2 .

Los gráficos de control calculan la media de los datos y muestran en las gráficas límites de control superiores e inferiores (3 veces la desviación estándar), que marcan el intervalo dentro del cual los datos están en control.

Objetivo 4: Analizar las posibles mejoras aportadas por la introducción de nuevos modelos de incubadores.

*Diseño del estudio: realizado retrospectivamente para dos incubadores diferentes: año 2013 para el BACTEC™ 9240 y 2016 para el BACTEC™ FX.

*Muestras analizadas: todas las **botellas** de hemocultivo introducidas en el incubador durante los períodos de tiempo comentados.

*Métodos de laboratorio y procesamiento de las muestras: los comentados previamente en la fase analítica.

*Análisis de los datos: se analizó la especificidad de los incubadores. Los datos se obtuvieron de los registros del laboratorio en el caso del año 2013 y de los datos proporcionados por Gestlab en el caso del año 2016.

*Definiciones: se definió falso positivo cuando en una botella positiva no se objetivaron microorganismos, ni en la tinción de Gram ni en el subcultivo.

*Análisis estadístico: la significación estadística se llevó a cabo mediante el test χ^2 .

Objetivo 5: Analizar el tiempo de positividad de los microorganismos y su utilidad como herramienta predictiva y diagnóstica.

Se realizaron dos estudios:

a) Estudios por incubador.

*Diseño del estudio: realizado retrospectivamente para dos incubadores diferentes: año 2013 para el BACTEC™ 9240, y 2016 para el BACTEC™ FX.

*Muestras analizadas: todas las **botellas** de hemocultivo introducidas en los incubadores durante los períodos de tiempo comentados.

*Métodos de laboratorio y procesamiento de las muestras: los comentados previamente en la fase analítica.

*Análisis de los datos: se analizaron los tiempos de positividad del hemocultivo en función del incubador, del tipo de botella y del microorganismo crecido.

*Definiciones: se definió tiempo de positividad como el tiempo transcurrido entre la introducción de la botella en el incubador y su detección como positiva.

*Análisis estadístico: la significación estadística de los tiempos de los distintos grupos de muestras se llevó a cabo con los test t de Student.

b) Estudio del algoritmo Gram+tiempo de positividad.

*Diseño del estudio: realizado retrospectivamente durante el período 2015-2016 para el BACTEC™ FX.

*Muestras analizadas: la **primera botella** de hemocultivo positiva de cada sospecha de bacteriemia.

*Métodos de laboratorio y procesamiento de las muestras: los comentados previamente en la fase analítica.

*Análisis de los datos: se analizaron los tiempos de positividad del hemocultivo en función de la tinción de Gram del hemocultivo positivo y del microorganismo crecido.

*Definiciones: se definió tiempo de positividad como el tiempo transcurrido entre la introducción de la botella en el incubador y su detección como positiva.

Objetivo 6: Evaluar la fiabilidad e impacto de MALDI-TOF MS en los flujos de trabajo y el tiempo de respuesta.

Se realizaron dos estudios:

a) Microorganismo incubado durante 24 horas.

*Diseño del estudio: realizado prospectivamente los meses de febrero y marzo de 2015.

*Muestras analizadas: **microorganismos** crecidos de hemocultivos positivos durante 24 horas aproximadamente.

*Métodos de laboratorio y procesamiento de las muestras: los comentados previamente en la metodología de identificación por MALDI-TOF MS.

*Método de referencia: los resultados obtenidos se compararon con los proporcionados por MicroScan®. Las discrepancias se resolvieron mediante la secuenciación del ARNr 16S.

*Análisis de los datos: se compararon los resultados obtenidos con las dos técnicas a nivel de género y de especie. Para considerar válida la identificación se requirió un "score" mínimo de 1,7.

b) Microorganismo incubado durante 3-4 horas.

*Diseño del estudio: realizado prospectivamente durante el año 2015.

*Muestras analizadas: aquellos **microorganismos** crecidos de hemocultivos positivos en los que fue posible, dentro del funcionamiento habitual del laboratorio, realizar la identificación por MALDI-TOF MS a las 3 o 4 horas de incubación.

*Métodos de laboratorio y procesamiento de las muestras: los comentados previamente en la metodología de identificación por MALDI-TOF MS.

*Método de referencia: los resultados obtenidos se compararon con los proporcionados por MALDI-TOF MS con 24 horas de incubación.

*Análisis de los datos: se compararon los resultados obtenidos a nivel de género y de especie. Para considerar válida la identificación se requirió un “score” mínimo de 1,7.

Objetivo 7: Evaluar la fiabilidad e impacto de los antibiogramas rápidos a partir de hemocultivo positivo.

*Diseño del estudio: realizado prospectivamente durante el año 2015.

*Muestras analizadas: aquellos **microorganismos** crecidos de hemocultivos positivos en los que fue posible, dentro del funcionamiento habitual del laboratorio, realizar la lectura y anotación de los resultados del antibiograma a las 3 o 4 horas de incubación.

*Métodos de laboratorio y procesamiento de las muestras: los comentados previamente en la metodología de realización del antibiograma preliminar.

*Método de referencia: los resultados obtenidos se compararon con los definitivos proporcionados por los paneles MicroScan®.

*Análisis de los datos: se valoró si el antibiograma era interpretable o no, y de serlo, el grado de concordancia del mismo con el definitivo.

*Definiciones: se definieron los siguientes términos para cada antibiótico:

-Error muy grave (*Very major error*): resultado preliminar sensible; definitivo resistente.

-Error grave (*Major error*): resultado preliminar resistente; definitivo sensible.

-Error leve (*Minor error*): cualquier otro tipo de error.

-Concordancia (*Agreement*): resultado idéntico.

*Análisis estadístico: la significación estadística se llevó a cabo mediante el test χ^2 .

Objetivo 8: Evaluar RAPIDEC® CARBA NP como método diagnóstico rápido de detección de carbapenemasas.

*Diseño del estudio: realizado prospectivamente entre junio y agosto de 2015.

*Muestras analizadas: **microorganismos** crecidos tanto de hemocultivos positivos como de botellas positivas inoculadas artificialmente.

*Métodos de laboratorio: RAPIDEC® CARBA NP (bioMérieux) permite la determinación rápida de carbapenemasas. Se realizó a partir de subcultivo en medio sólido incubado cuatro horas.

*Procesamiento de las muestras: la técnica tiene un tiempo de respuesta de entre 30 minutos y 2 horas (la lectura de la misma se realizó como mínimo a los 30 minutos, y, en caso de ser negativa, no más allá de las 2 horas). Los pasos a seguir fueron los siguientes:

1. Lisado bacteriano siguiendo el procedimiento proporcionado por la casa comercial para la extracción del enzima del microorganismo, si la hubiera.
2. Puesta en contacto de dicho lisado con una solución que contiene un antibiótico carbapenémico (imipenem).
3. En presencia de una cepa productora de carbapenemasa, se produce la hidrólisis del imipenem presente en la solución. Dicha hidrólisis acidifica el medio resultando en un cambio de color del indicador del pH (rojo fenol) a color amarillo e indicando específicamente la presencia de resistencia a los carbapenemes. No proporciona información acerca de cuál es el tipo de carbapenemasa implicada.

La presentación del producto y la visualización de los resultados están representadas en la Figura 21.

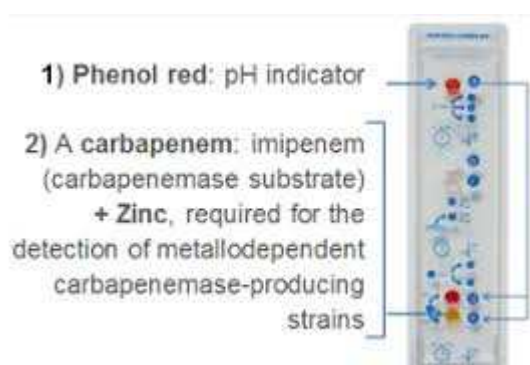


Figura 21. Kit diagnóstico RAPIDEC® CARBA NP. Tomado de <http://www.biomerieux.es/>.

*Método de referencia: los resultados obtenidos se compararon con los definitivos obtenidos mediante el test de Hodge (EUCAST, 2017), los paneles Microscan® y la PCR comercial Carba-R Xpert® PCR (Cepheid).

*Análisis de los datos: se obtuvieron los resultados de sensibilidad y especificidad de la técnica.

Objetivo 9: Conocer la etiología de las bacteriemias y su evolución a lo largo de la década a estudio.

*Diseño del estudio: realizado retrospectivamente de los datos de las bacteriemias de 10 años (2007-2016).

*Muestras analizadas: se estudiaron **episodios clínicos/sospechas de bacteriemia**. Se consideraron dentro de un mismo episodio clínico todos los hemocultivos recibidos en un intervalo de siete días.

*Métodos de laboratorio y procesamiento de las muestras: los comentados previamente en la fase analítica.

*Análisis de los datos: se analizaron los datos globalmente, año a año, y en función de variables como la edad (en este caso ≤ 14 años, 15-65 años y >65 años), el sexo, el mes de solicitud y el servicio peticionario.

Respecto a los estudios por hemocultivos, se añadió el rango de edad de mayores de 65 años.

Se valoraron de manera individual únicamente los servicios con más de 5000 peticiones a lo largo de los 10 años.

Para valorar estacionalidad, se requirieron cambios significativos en tres meses consecutivos.

El estudio de la evolución temporal se realizó teniendo en cuenta los años 1, 4, 7 y 10 de la década.

*Análisis estadístico: la significación estadística se llevó a cabo mediante el test χ^2 .

Objetivo 10: Estudiar los patrones de resistencia de dichos microorganismos y su evolución a lo largo de los 10 años.

*Diseño del estudio: realizado retrospectivamente de los datos de las bacteriemias de 10 años (2007-2016).

*Muestras analizadas: se valoró un antibiograma del microorganismo en cuestión por cada **episodio clínico**. Se consideraron dentro de un mismo episodio clínico todos los hemocultivos recibidos en un intervalo de siete días.

*Métodos de laboratorio y procesamiento de las muestras: los comentados previamente en la fase analítica.

*Análisis de los datos: se analizaron los datos para cada microorganismo año a año. Los microorganismos estudiados fueron los 10 más frecuentes exceptuando los ECN distintos a *S.epidermidis*.

Se investigaron los porcentajes de aislados **sensibles** a un determinado antibiótico, como así está recomendado (Calvo Montes et al., 2014). Se presentan aquellos antibióticos con especial interés para cada microorganismo concreto.

En el estudio de microorganismos dentro de un mismo Servicio, se consideró un mínimo de 150 aislados en los 10 años.

Objetivo 11: Evaluar la influencia de los cambios tecnológicos habidos en el laboratorio en los tiempos de respuesta de emisión de informes de resultados.

*Diseño del estudio: realizado retrospectivamente para los años 2013 (flujo de trabajo pre-MALDI-TOF MS y 2016 (flujo de trabajo post-MALDI-TOF MS).

*Muestras analizadas: las **100 primeras bacteriemias valorables** de cada uno de los dos años. La proporción turno habitual/turno de guardia del año 2013 se adaptó al año 2016 para valorar las 100 primeras bacteriemias de 2016 en las mismas condiciones.

*Métodos de laboratorio y procesamiento de las muestras: los comentados previamente en la fase analítica.

*Análisis de los datos: se estudiaron los tiempos necesarios para la emisión de informes preliminares y definitivos, tanto a nivel de identificación del microorganismo, como de antibiograma, en función también del turno de trabajo considerado. Los datos se obtuvieron de los registros del laboratorio en el caso del año 2013, y del programa de laboratorio Gestlab en el año 2016.

*Definiciones:

-Se definió turno habitual al habido entre las 8 y las 15 horas de los días laborables; turno de guardia al resto de días y horarios.

-Se definió tiempo de respuesta como el intervalo habido entre la detección de una botella como positiva y la emisión de la información a la que nos referimos en cada caso.

*Análisis estadístico: la significación estadística de los tiempos de los distintos grupos de muestras se llevó a cabo con los test t de Student.

RESULTADOS

Objetivo 1: Estudiar la evolución de las solicitudes de hemocultivo en un hospital de tercer nivel a lo largo de un período de 10 años y su relación con factores demográficos como la edad, el sexo, la estacionalidad o el Servicio solicitante.

En los 10 años del estudio (2007-2016) se recibieron **141383 hemocultivos** (HC) correspondientes a **47988 pacientes**, con un rango de edad de 0 días a 102,9 años y una media de $53,6 \pm 28,5$ años.

1. Datos demográficos

En la Tabla 3 se detalla el **porcentaje** de hemocultivos recibidos en el Servicio de Microbiología en función de la edad, el sexo y el mes de solicitud. Anualmente y en el total de los 10 años del estudio. En la Figura 22 se representan los **números totales** en función de la edad y el sexo.

Tabla 3. Evolución anual del porcentaje de HC en función de distintas variables demográficas.

AÑO	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	TOTAL
HC TOTALES	13390	12716	12928	13670	15180	14388	14674	14449	14350	15638	141383
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
EDAD											
Pediátricos	16,9	17,1	16,1	15,1	14,5	13,8	11	10,4	11,5	7	13,2
Adultos	81	82,1	82,8	84	84,8	85,2	88,4	87,8	88,4	93	86,1
Desconocida	2,1	0,8	1,1	0,9	0,7	1	0,6	0,3	0,1	0	0,7
SEXO											
Hombres	58,9	61,6	58,6	59,2	59,5	58	59,1	58,7	60,3	60	59,5
Mujeres	41,1	38,2	41,3	40,8	40,4	41,9	40,9	39,7	39,6	40	40,5
Desconocido	0,1	0,2	0,1	0	0	0	0	0,1	0,1	0	0,1
MES											
Enero	9,8	10,2	8,4	7,8	9,9	9,6	10,1	10,4	8,1	7,6	9,2
Febrero	8	10,4	6,4	8,3	8,1	9,5	8,4	9	8,2	8,1	8,4
Marzo	8,9	9	9,9	9,2	9,5	9,2	8,3	9,4	8,7	8	9
Abril	9,2	8,4	8,5	7,5	7,8	7,3	9,4	9,1	8,2	7,5	8,3
Mayo	7,6	8,4	7,5	9,1	8,9	8,5	7,8	9,4	8,3	8,7	8,5
Junio	8	8,9	8,8	8,3	8,4	7,3	7,6	6,4	8,5	7,6	8
Julio	8,4	7,3	8,7	7,9	7	8,4	8,9	7,4	8,6	7,6	8
Agosto	7,7	6,8	8	8,8	8,9	8,2	8	7	8,6	7,8	8
Septiembre	6,7	7,1	7,7	6,8	7,9	7	8,3	7,9	8,5	8,2	7,7
Octubre	8,9	6,9	8,2	7,9	8,3	8,8	7,9	8,3	8,1	9,3	8,3
Noviembre	8,2	7	9,3	8,5	7,5	8,4	7	7,3	7,5	9,1	8
Diciembre	8,7	9,5	8,6	9,9	7,8	7,8	8,3	6,8	8,6	10,6	8,7

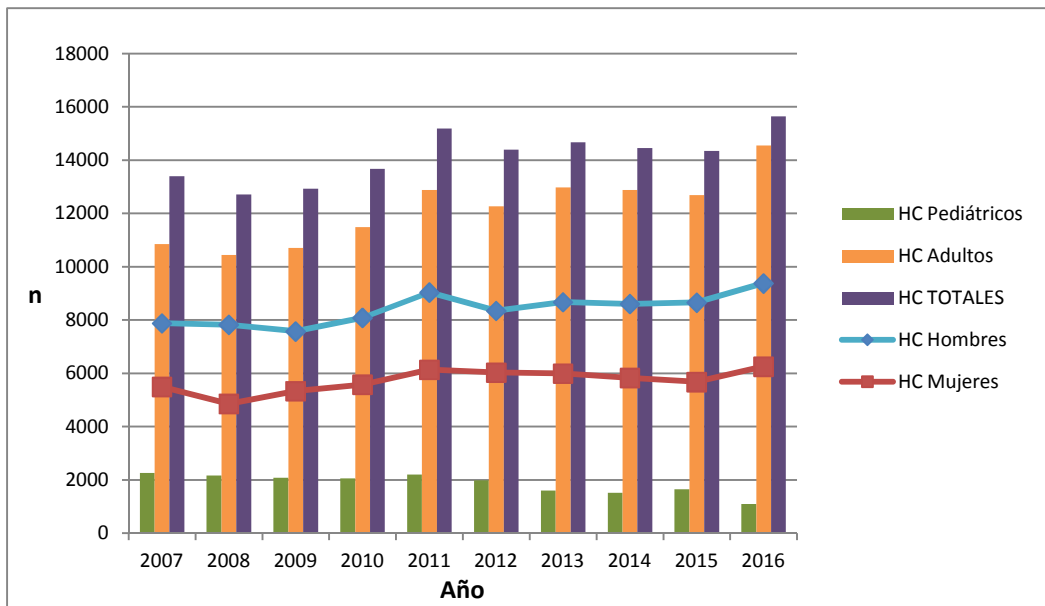


Figura 22. Evolución anual del número de HC (n) solicitados en función de la edad, el sexo y el año. *: significativo.

-El número total de hemocultivos recibidos ha ido aumentando significativamente con los años ($r=0,8030$, $p=0,0052$), siendo un 17% más elevado al final que al principio del estudio, y con una variación máxima del 23% (entre 12716 y 15638 hemocultivos/año).

-Los hemocultivos de adultos se incrementaron progresivamente (14546 hemocultivos el último año frente a 10847 del primero) ($r=0,9079$, $p=0,0003$). En contraposición, se observó un descenso ($r=-0,8987$, $p=0,0004$) de más del 50% en el número de hemocultivos pediátricos (2268 en 2007, 1092 en 2016), que pasaron de un 17 a un 7% del total de peticiones. Los descensos más importantes ocurrieron en los años 2013 y 2016.

-Hubo un mayor número de hemocultivos en pacientes varones, con un ratio varones/mujeres de 1,5:1, estable a lo largo de los 10 años.

-No se ha encontrado estacionalidad. Enero es el mes en el que se solicita el mayor número de hemocultivos (12984 en 10 años) y septiembre el de menor número (10822) pero de manera no significativa.

2. Hemocultivos por servicios hospitalarios

La evolución del **porcentaje** de hemocultivos recibidos en función del servicio la podemos observar en la Tabla 4, en la Figura 23 (**números totales** en función del tipo de servicio hospitalario), y en la Figura 24 (**números totales** de 4 de los 5 servicios con mayor número de peticiones a lo largo de los 10 años; Urgencias Generales está presente en la Figura 23). Los servicios presentes en la Tabla 4 recibieron un mínimo de 1000 hemocultivos en la década.

Tabla 4. Evolución anual del porcentaje de HC solicitados por distintos servicios.

AÑO	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	TOTAL
HC TOTALES	13390	12716	12928	13670	15180	14388	14674	14449	14350	15638	141383
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
UNIDADES DE CRÍTICOS	23,6	22,4	20,7	17,6	18,5	18,6	19,1	14,3	16,7	16,1	18,6
Medicina Intensiva	21,8	20,7	19,1	16,1	16,8	17,1	17,7	13,2	13,9	13,1	16,8
Anestesiología	1,8	1,7	1,6	1,5	1,7	1,5	1,4	1,1	2,8	3	1,8
SERVICIOS MÉDICOS	42,4	45,1	44,6	45,5	43,2	45,8	42,7	35,5	46,1	46,1	43,6
Medicina Interna	12,8	13	11,1	12,1	10,8	11,2	10,1	8,4	9,2	9,3	10,7
Hematología	10	9,8	10,6	9	9	10,9	10	9,8	14,8	12,3	10,6
Digestivo	6,6	8,5	8,5	7,7	6,4	6,4	5,8	4,9	5,7	7	6,7
Nefrología	4,2	4,2	4,1	3,7	3,9	3,7	3,3	3,4	3,3	3,4	3,7
Neumología	0,7	0,8	1	3,6	4,3	4,7	4,6	1,9	1,8	2,1	2,6
Cardiología	2	2,3	2,8	3,1	2,2	2,2	2,6	1,9	2,9	3,3	2,5
Oncología	2,4	2,2	2,1	1,9	2,3	2,2	2,5	2,2	2,9	2,9	2,4
Neurología	1,9	1,7	2,5	2,9	2,7	2,7	2,3	2,2	2,2	2,4	2,4
Ginecología	0,7	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,5	2	2	0,8
Otros	1,1	2,2	1,5	1	1,2	1,4	1,1	0,3	1,3	1,4	1,2
SERVICIOS QUIRÚRGICOS	13,8	13,3	12,3	12,5	13	12,1	13,3	11,4	9,2	7,9	11,9
Cirugía general	4,1	4,4	3,8	4	2,9	2,7	3,2	2,6	2,7	2,2	3,2
Urología	3,1	3,1	2,8	2,5	2,8	2,4	2,9	2,3	2,1	1,7	2,6
Obstetricia	0,9	0,9	1,1	1,5	2,8	2,8	2	2,3	0,2	0	1,5
Neurocirugía	1,4	1,5	1,4	1,5	1,4	0,9	1,2	1,2	1,4	1,4	1,3
Otros	4,3	3,4	3,2	3	3,1	3,3	4	3	2,8	2,6	3,3
SERVICIOS PEDIÁTRICOS	15,3	15,4	14,2	12,9	12,1	10,9	9,8	10,1	9	6,9	11,5
Pediatría	3,4	2,4	2,3	1,7	2	2,6	2	1,9	8,3	6,9	3,4
Neonatología	2,4	3,2	2,8	3,2	3,2	1,4	1,6	2,1	0,1	0	2
UVI Neonatología	2,5	2,5	2,5	2,6	2,3	2,1	2	2,1	0,1	0	1,8
Urgencias Pediátricas	7	7,3	6,6	5,4	4,6	4,8	4,2	4	0,5	0	4,3
URGENCIAS GENERALES	0,7	1,3	2,1	3,3	4,3	3,9	6,5	15	13,6	15,2	6,8
CONSULTAS	1,4	2	3,2	3,5	4,1	4	4,3	0	0	0	2,2
OTROS/DESCONOCIDO	2,9	0,6	3	4,7	4,9	4,6	4,3	13,6	5,4	7,8	5,4

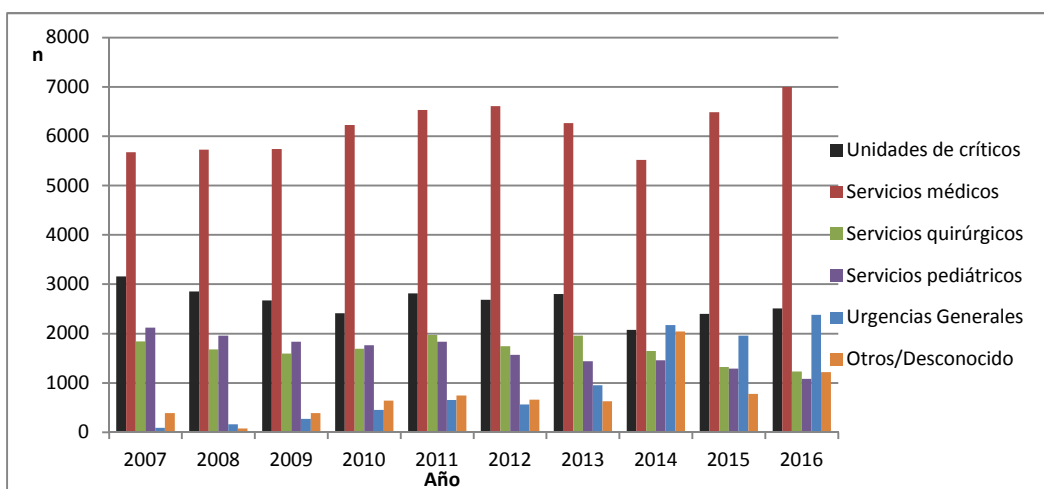


Figura 23. Evolución anual del número de HC (n) solicitados por distintos servicios.

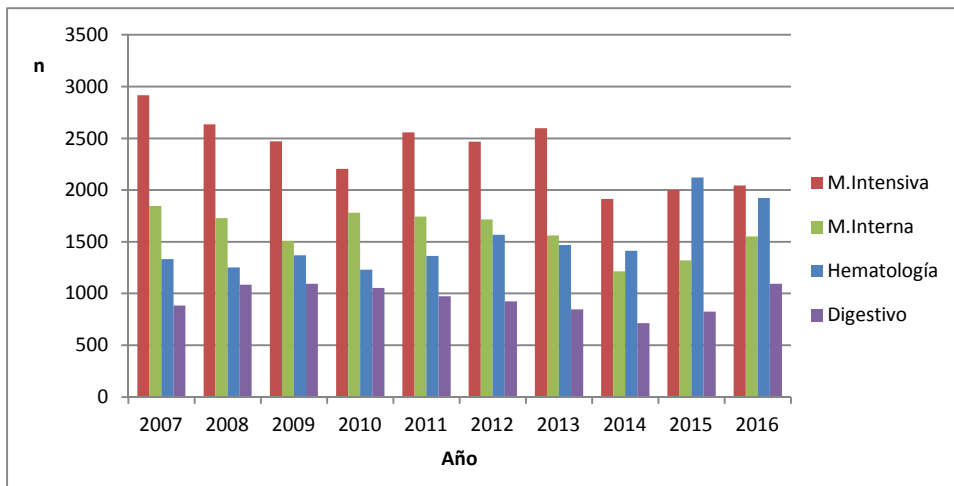


Figura 24. Evolución anual del número de HC (n) en función del servicio solicitante.

-Los servicios con mayor número de solicitudes se mantuvieron estables a lo largo de los años siendo, por este orden, Medicina Intensiva, Medicina Interna, Hematología, Urgencias Generales y Digestivo. Urgencias Generales pasó a ser el servicio con más demanda a partir de 2014; los números anteriores no son fiables por una limitación del estudio que explicaremos posteriormente.

-Se observó un descenso en el porcentaje respecto al total de peticiones de Medicina Intensiva (se pasa de un 21% a un 13%), Medicina Interna (del 13% a menos del 10%), Cirugía General (del 4-4,5% al 2,5%) y Urología (de casi el 3% a menos del 2%), y un aumento de Hematología (del 10% al 12,3%), Anestesia (del 1,8% al 3%) y Cardiología (del 2% al 3,3%). El resto de servicios se mantuvo en porcentajes aproximadamente estables.

Objetivo 2: Evaluar el tiempo de procesamiento del hemocultivo.

Mediante los sistemas informáticos Millennium y Gestlab –implantados en junio de 2014- se monitorizaron los momentos de extracción de la muestra y de introducción de la misma en el incubador, lo que nos permitió calcular el tiempo de procesamiento del hemocultivo.

El tiempo medio de procesamiento fue de 286,5 minutos (234,4 minutos los HC positivos y 296,9 minutos los negativos), con una mediana de 90 minutos. En la Tabla 5 y la Figura 25 se representan el **porcentaje de positivos, negativos y contaminaciones** en función del tiempo de procesamiento de los hemocultivos (en distintos intervalos de tiempo). En la Figura 26 se representa la influencia de dicho tiempo de procesamiento en los tiempos de positividad de microorganismos típicamente valorables (*E.coli*) o típicamente contaminantes (ECN).

Tabla 5. Resultados (y porcentaje) de los HC en función del tiempo de procesamiento.

Nº de HC (%)	Tiempo de procesamiento (minutos)										TOTAL	%
	<120	%	120-240	%	240-720	%	720-1080	%	>1080	%		
TOTALES	4379	58,8	1011	13,6	1412	19	292	3,9	353	4,7	7447	100
Positivos	667	15,2	146	14,4	230	16,3	31	10,6	0	0	1074	14,4
Contaminados	355	8,1	83	8,2	93	6,6	24	8,2	12	3,4	567	7,6
Negativos	3357	76,7	782	77,3	1089	77,1	237	81,2	341	96,6	5806	78

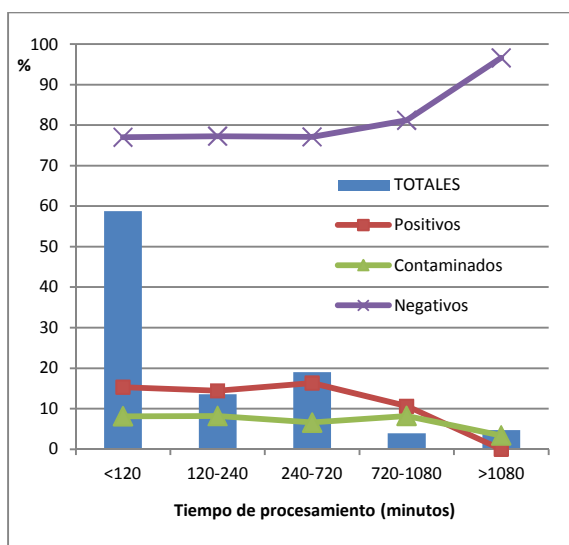


Figura 25. Porcentaje de HC en función del resultado y tiempo de procesamiento.

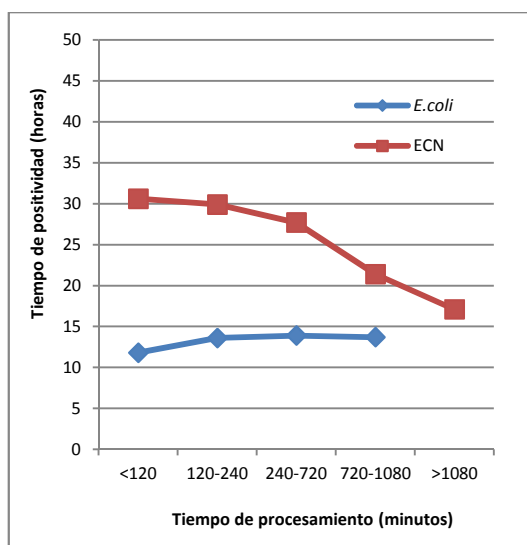


Figura 26. Tiempo de positividad en función del microorganismo y el tiempo de procesamiento.

-Más de dos tercios de los hemocultivos (72,4%) se introdujeron en el incubador en menos de 4 horas. Menos del 5% estuvieron más de 18 horas sin ser introducidos.

-La influencia del tiempo de procesamiento en los resultados comenzó después de 12 horas (720 minutos). En ese momento, el porcentaje de positivos cayó de manera muy significativa ($p < 0,0001$); al porcentaje de contaminaciones le ocurrió lo mismo a partir de las 18 horas ($p = 0,0022$).

-Los tiempos de procesamiento no influyeron en los tiempos de positividad de los hemocultivos positivos; sí lo hicieron en el caso de las contaminaciones y de manera inversamente proporcional.

Objetivo 3: Evaluar los resultados y contaminaciones del hemocultivo.

Al ser las contaminaciones parte de la fase preanalítica, estos resultados son analizados en este apartado, aún sabiendo que se obtuvieron posteriormente, en la fase postanalítica.

1. Resultados globales año a año

Se valoraron los resultados de los hemocultivos recibidos a lo largo de los 10 años; los **números totales** los podemos ver en la Tabla 6, y los **porcentajes** en la Figura 27. Los resultados posibles fueron: negativo, positivo y contaminado.

Tabla 6. Evolución anual de los resultados de los HC en la década 2007-2016.

	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	TOTAL	%
HC TOTALES	13390	12716	12928	13670	15180	14388	14674	14449	14350	15638	141383	
Negativos	10393	9716	9861	10392	11647	10933	11187	11031	10751	12153	108064	76,4
Positivos	1758	1903	2036	2099	2186	2153	2265	2258	2487	2334	21479	15,2
Contaminados	1239	1097	1031	1179	1347	1302	1222	1160	1112	1151	11840	8,4

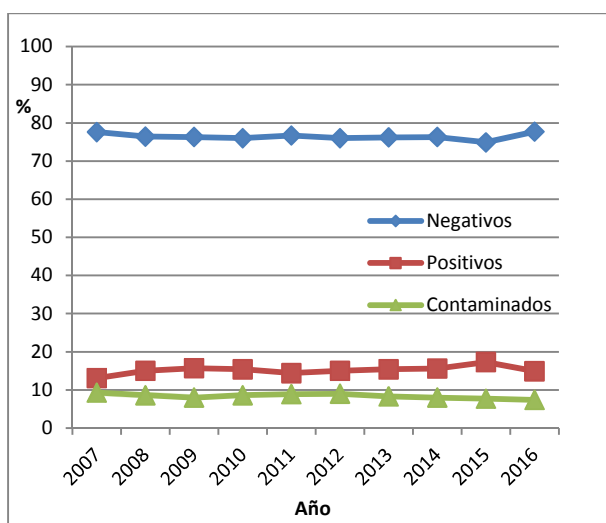


Figura 27. Evolución anual (%) de los resultados de los HC en la década 2007-2016.

-La tasa de positivos se mantuvo estable a lo largo de los diez años, oscilando entre el 13 y el 17% (promedio del 15,2%).

-El porcentaje de hemocultivos contaminados sigue una tendencia levemente descendente (no significativa) con un máximo en el primer año -9,3%- y un mínimo en el último -7,4%- (8,4% de promedio).

-Hubo 11840 contaminaciones totales. Con una tasa del 3% (el estándar máximo aconsejado) habrían sido 4241, **7599 contaminaciones menos.**

2. Resultados en función de las variables demográficas (edad, sexo, mes y Servicio peticionario).

2.1. Resultados globales

Los resultados globales (**número y porcentaje**) se desglosaron en las variables comentadas (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados de los hemocultivos en función de la edad, el sexo y el mes.

	Negativos	%	Positivos	%	Contaminados	%	TOTAL
HC TOTALES	108064	76,4	21479	15,2	11840	8,4	141383
EDAD							
Pediátricos	14932	80,1	2084	11,2	1627	8,7	18643
Adultos	92371	75,9	19247	15,8	10104	8,3	121722
Edad desconocida	761	74,8	148	14,5	109	10,7	1018
SEXO							
Hombres	64408	76,6	13031	15,5	6647	7,9	84086
Mujeres	43598	76,2	8436	14,7	5174	9,0	57208
Desconocido	58	65,2	12	13,5	19	21,3	89
MES							
Enero	10097	77,8	1740	13,4	1147	8,8	12984
Febrero	9306	77,9	1661	13,9	978	8,2	11945
Marzo	9874	77,6	1815	14,3	1043	8,2	12732
Abril	9242	78,8	1567	13,4	915	7,8	11724
Mayo	9150	76,6	1855	15,5	944	7,9	11949
Junio	8543	76,0	1739	15,5	966	8,6	11248
Julio	8509	75,0	1875	16,5	962	8,5	11346
Agosto	8416	74,4	1956	17,3	942	8,3	11314
Septiembre	8090	74,8	1814	16,8	918	8,5	10822
Octubre	8750	74,4	1994	17,0	1009	8,6	11753
Noviembre	8565	75,8	1721	15,2	1016	9,0	11302
Diciembre	9522	77,7	1742	14,2	995	8,1	12259

-El porcentaje de hemocultivos positivos fue mayor en adultos (15,8%) que en niños (11,2%) ($p < 0,0001$). En cambio no se encontraron diferencias significativas en el caso de las contaminaciones ($p = 0,0502$).

-Respecto al sexo, la tasa de positivos en los hombres fue ligeramente superior a la de las mujeres. En cambio, las contaminaciones fueron más frecuentes entre las mujeres ($p < 0,0001$). Con el objetivo de evaluar si dicha diferencia de contaminaciones era realmente atribuible al sexo y no al hecho de que los servicios solicitantes podían ser diferentes (por ejemplo,

Ginecología y Obstetricia), se evaluaron las diferencias en los servicios de Medicina Interna y Medicina Intensiva, y se confirmaron los resultados anteriores. (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de contaminaciones en función del sexo en un mismo servicio (año 2016).

M.Interna	HC	% HC Contaminados	M.Intensiva	HC	% HC Contaminados
Hombres	864	6,5	Hombres	1392	8,2
Mujeres	588	11,9	Mujeres	652	9,5
TOTAL	1452	8,5	TOTAL	2044	8,6

Las contaminaciones en mujeres fueron significativamente superiores en los dos servicios estudiados ($p < 0,0001$).

-En cuanto al **mes de solicitud**, el porcentaje de positivos fue mayor en los meses de julio a octubre (entre el 16,5 y el 17,3%) ($p < 0,0001$). De diciembre a abril, las tasas fueron las más bajas (entre el 13,4 y el 14,3%). Las contaminaciones no presentaron variación en función del mes.

2.2. Evolución anual de los resultados

Se estudiaron estos resultados (**en porcentaje**) año a año en función de las variables comentadas. Se presentan en la Tabla 9 los datos referidos a edad y sexo. No se presenta la evolución estacional al no aportar datos ni variaciones de interés.

Tabla 9. Evolución anual (%) de los resultados de los HC en función de edad y sexo.

		2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
HEMOCULTIVOS TOTALES		13390	12716	12928	13670	15180	14388	14674	14449	14350	15638
HC TOTALES	% positivos	13,1	15,0	15,7	15,4	14,4	15,0	15,4	15,6	17,3	14,9
	% contaminados	9,3	8,6	8,0	8,6	8,9	9,0	8,3	8,0	7,7	7,4
	% negativos	77,6	76,4	76,3	76,0	76,7	76,0	76,2	76,3	74,9	77,7
EDAD											
Adultos	% positivos	13,8	16,1	16,5	15,9	14,9	15,5	15,7	16,1	18,3	15,2
	% contaminados	8,3	8,9	8,0	8,6	8,8	9,2	8,5	8,0	7,8	7,2
	% negativos	77,8	75,0	75,4	75,5	76,3	75,3	75,8	75,9	74,0	77,6
Pediátricos	% positivos	9,5	9,9	11,8	12,1	11,6	11,8	13,3	11,3	10,2	10,6
	% contaminados	13,9	7,0	7,7	8,6	9,1	7,6	6,7	8,5	7,6	9,8
	% negativos	76,6	83,1	80,5	79,3	79,2	80,6	80,0	80,2	82,2	79,6
SEXO											
Hombres	% positivos	13,4	15,1	15,6	15,8	14,6	15,5	16,2	16,3	17,6	14,8
	% contaminados	8,6	8,2	7,2	7,9	8,1	8,5	7,7	7,7	8,0	7,3
	% negativos	78,0	76,7	77,2	76,3	77,3	76,0	76,1	75,9	74,5	77,8
Mujeres	% positivos	12,8	14,8	16,0	14,8	14,1	14,2	14,4	14,6	16,9	13,0
	% contaminados	10,2	9,3	9,1	9,7	10,0	9,9	9,2	8,4	7,4	6,4
	% negativos	77,1	75,9	75,0	75,5	76,0	75,9	76,4	77,0	75,6	80,6

-Respecto a los hemocultivos pediátricos, en el año 2007 la tasa de contaminaciones fue mucho más elevada y la de positivos más baja que en el resto de años, en los cuales se mantuvieron estables. En los adultos, la tasa de positivos se mantuvo estable; la de contaminaciones fue a la baja desde el año 2012 (descendiendo de un 9,2% al 7,2% en 2016).

-A nivel de sexo, el porcentaje de positivos se conservó estable. Las contaminaciones se redujeron en mujeres desde 2011 (de un 10% a un 6,4% en 2016).

3. Resultados en función del servicio solicitante

3.1. Resultados globales

Los resultados globales (en **porcentaje**) en función del servicio los podemos ver en la Tabla 10.

Tabla 10. Resultados de los HC en función del servicio solicitante.

Servicio	Negativos	%	Positivos	%	Contaminados	%	TOTAL
UNIDADES DE CRÍTICOS							
Medicina Intensiva	18608	78,2	3284	13,8	1917	8,1	23809
Anestesiología	2006	78	380	14,8	185	7,2	2571
SERVICIOS MÉDICOS							
Medicina Interna	11148	73,5	2561	16,9	1452	9,6	15161
Hematología	11466	76,2	2625	17,5	948	6,3	15039
Digestivo	6781	71,5	1862	19,6	847	8,9	9490
Nefrología	3835	73,4	961	18,4	427	8,2	5223
Neumología	2943	79,8	306	8,3	440	11,9	3689
Cardiología	2817	78,4	576	16	200	5,6	3593
Oncología	2590	77,2	547	16,3	218	6,5	3355
Neurología	2596	78,1	394	11,8	336	10,1	3326
Ginecología	895	80,7	103	9,3	111	10	1109
SERVICIOS QUIRÚRGICOS							
Cirugía general	3169	69,8	1008	22,2	362	8	4539
Urología	2632	72,6	710	19,6	282	7,8	3624
Obstetricia	1693	82	159	7,7	213	10,3	2065
Neurocirugía	1497	79,5	170	9	216	11,5	1883
SERVICIOS PEDIÁTRICOS							
Pediatría	3425	81	454	10,7	352	8,3	4231
Neonatología	2047	74,2	381	13,8	330	12	2758
UVI de Neonatología	1698	65,3	624	24	278	10,7	2600
Urgencias Pediátricas	5467	89,5	151	2,5	491	8	6109
URGENCIAS GENERALES							
	7186	74,4	1405	14,5	1070	11,1	9661
CONSULTAS							
	2668	84,3	349	11	148	4,7	3165
TOTAL	108064	76,4	21479	15,2	11840	8,4	141383

-Los servicios que tuvieron las tasas de positividad más elevadas fueron la UVI de Neonatología (24%), Cirugía General (22,2%), Digestivo y Urología (19,6%) y Nefrología (18,4%).

-Urgencias de Pediatría ocupó el último lugar, con únicamente un 2,5% de hemocultivos positivos. También por debajo del 10% estuvieron Neurocirugía, Neumología, Obstetricia y Ginecología.

-A nivel de contaminaciones, las más elevadas correspondieron, en este orden, a Neonatología, Neumología, Neurocirugía, Urgencias Generales, UVI de Neonatología, Obstetricia y Neurología, todos por encima del 10%. Respecto a los servicios con mayor número de peticiones, presentaron los siguientes porcentajes de contaminación en orden decreciente: Urgencias Generales (11,1%), Medicina Interna (9,6%), Digestivo (8,9%), Medicina Intensiva (8,1%) y Hematología (6,3%).

-Ningún servicio consiguió estar por debajo del 3% considerado como estándar máximo de calidad en porcentaje de contaminaciones. Los servicios más cercanos fueron Cardiología, Hematología y Oncología (5,6%, 6,3% y 6,5% respectivamente).

3.2. Evolución anual de los resultados

3.2.1. Resultados positivos

Se observaron variaciones anuales pero no tendencias en todos los servicios solicitantes (datos totales no presentados) excepto en el Servicio de Cirugía General en el cual se apreció una significativa tendencia ascendente (del 15% al 30% de positividad); en la Figura 28 podemos ver su evolución junto a la de los tres servicios con mayor número de peticiones.

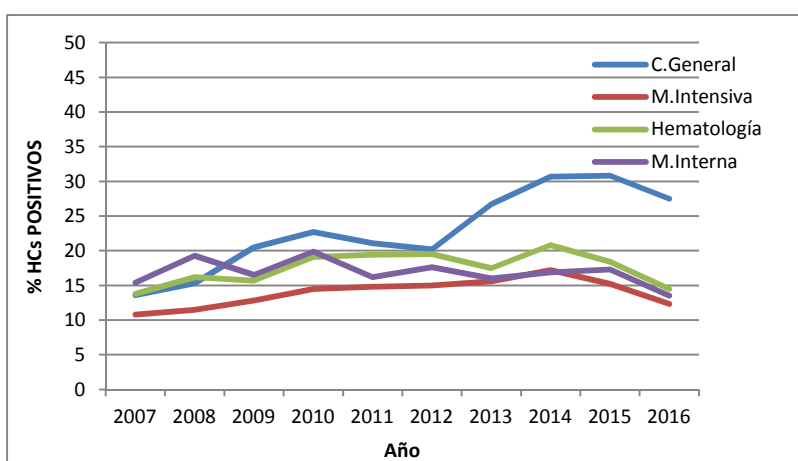


Figura 28. Evolución anual (%) de los HC positivos en Medicina Intensiva, Hematología, Medicina Interna y Cirugía General.

3.2.2. Contaminaciones

La evolución anual (en **porcentaje**) de las mismas la podemos ver en la Tabla 11.

Tabla 11. Evolución anual del porcentaje de HC contaminados en función del servicio.

	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
HEMOCULTIVOS TOTALES	13390	12716	12928	13670	15180	14388	14674	14449	14350	15638
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
UNIDADES DE CRÍTICOS										
Medicina Intensiva	6,3	10,3	6,6	7	8,4	9	8,8	8,8	7,9	8,6
Anestesiología	5,3	8,1	8,1	8,7	8,9	7,8	9	7,5	5,5	5,4
SERVICIOS MÉDICOS										
Medicina Interna	11,9	9,9	10,5	11,1	9,4	11,8	10,1	4,6	7	8,5
Hematología	7,9	7,3	7,0	6,4	7,3	8,6	8,1	4,8	3,4	6,2
Digestivo	11,0	9,1	8,7	10,3	9,4	10,5	10,7	5,1	6,0	8,1
Nefrología	8,5	6,8	8,7	9,4	6,6	8,5	4,5	8,0	6,3	6,8
Neumología	5,4	4,1	9,6	10,9	14,0	12,6	10,4	5,9	12,4	10,3
Cardiología	6,1	3,6	3,0	4,7	4,8	4,2	4,9	8,6	7,8	6,4
Oncología	7,1	5,2	11,2	5,1	6,2	5,9	6,5	6,3	6,3	5,3
Neurología	10,6	9,8	11,3	12,2	9,9	10,2	8,4	7,8	11,3	9,4
Ginecología	12,2	14,3	10,7	13,2	11,9	6,7	11,9	9,9	8,5	9,2
SERVICIOS QUIRÚRGICOS										
Cirugía general	6,8	7,8	7,7	8,0	10,8	9,4	8,2	5,6	11,4	8,7
Urología	5,7	7,3	5,3	6,4	7,0	7,7	7,1	6,6	2,9	5,8
Obstetricia	13,6	12,2	14,6	15,2	8,7	9,8	7,5	7,8		
Neurocirugía	12,3	20,6	13,1	12,6	7,6	8,8	14,5	7,8	10,9	6,8
SERVICIOS PEDIÁTRICOS										
Pediatría	11,6	8,5	4,0	6,0	7,3	6,2	8,0	4,8	8,5	6,9
Neonatología	18,6	10,7	13,8	12,6	12,9	11,9	13,2	9,1		
UVI de Neonatología	17,1	8,6	8,3	11,2	9,3	8,0	5,7	15,4		
Urgencias Pediátricas	13,8	5,7	6,9	7,1	8,6	8,3	5,9	6,2		
URGENCIAS GENERALES	13,5	10,4	13,5	12,2	11,1	12,8	11,8	11,6	11,5	11,9

Gráficos de control

Para estudiar con mayor detalle las contaminaciones por servicios a lo largo del tiempo, hemos realizado gráficos de control, que representaron el **porcentaje** de hemocultivos contaminados por trimestre (40 trimestres o puntos de control en total) y permitieron monitorizar las contaminaciones y detectar tendencias de forma estadística. Los realizamos para todos los servicios; aquí sólo presentamos aquellos con mayor número de solicitudes (Medicina Intensiva, Medicina Interna, Hematología y Digestivo) y Urgencias Generales a partir de 2010 (anteriormente el número de muestras era muy bajo, por las limitaciones que comentaremos posteriormente).

En las gráficas: CL: línea control; UCL: línea de control superior; LCL: línea de control inferior.

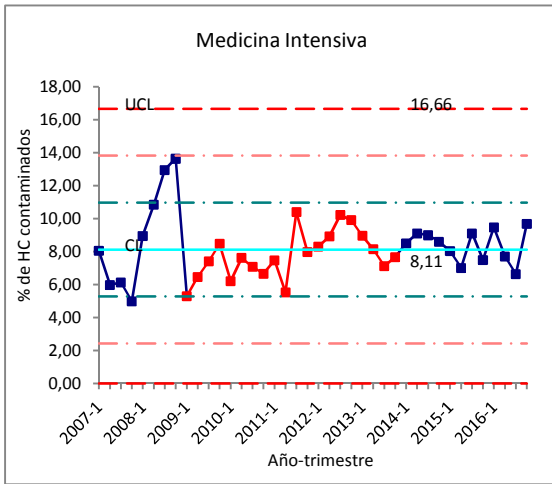


Figura 29. Gráfico de control de M.Intensiva.

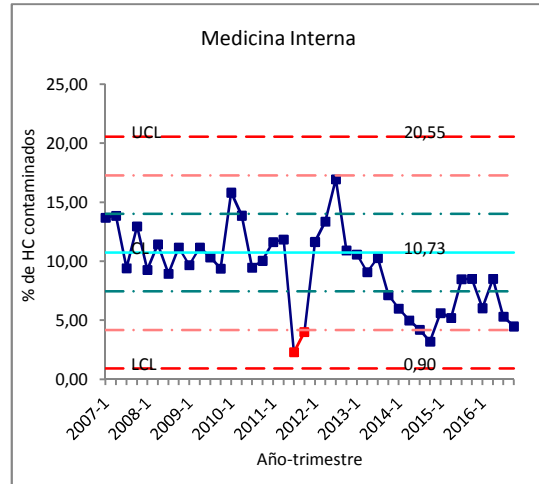


Figura 30. Gráfico de control de M.Interna.

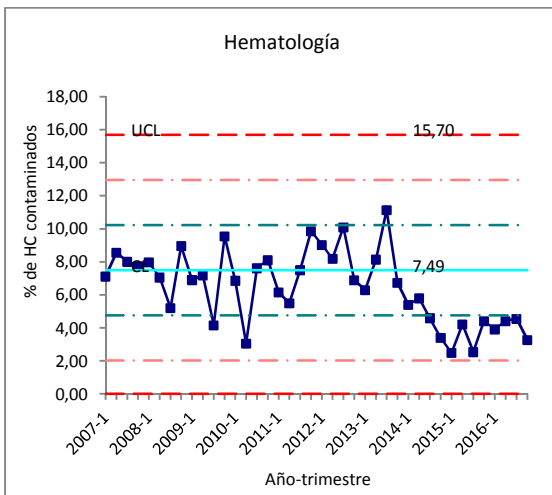


Figura 31. Gráfico de control de Hematología.

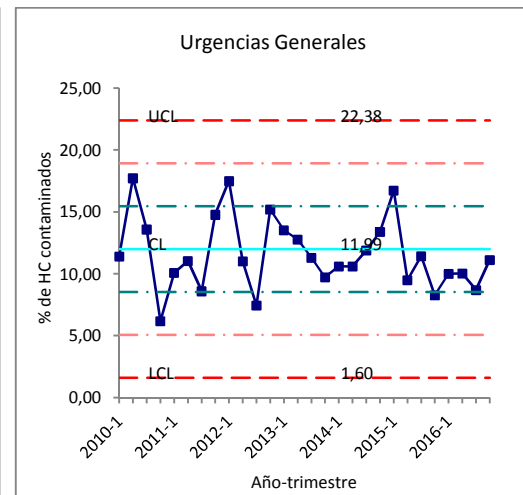


Figura 32. Gráfico de control de Urg. Generales.

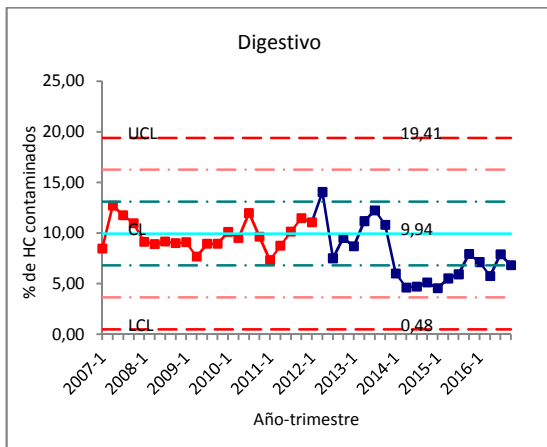


Figura 33. Gráfico de control de Digestivo.

-En Medicina Interna, Hematología y Digestivo hubo un descenso notable en el número de contaminaciones con el cambio de hospital (año 2014).

-En Medicina Intensiva y Urgencias Generales se mantuvieron estables a lo largo de los 10 años.

Para el resto de servicios, no presentes en los gráficos de control, en general se apreciaron oscilaciones pero no tendencias claras con el paso de los años. Excepciones fueron Neumología desde el año 2008 (ascendente), y Obstetricia y Ginecología (descendentes). Todos los servicios pediátricos presentaron porcentajes mucho más elevados en 2007, como ya comentamos previamente.

4. Microorganismos contaminantes

4.1. Microorganismos totales año a año

En la Tabla 12 se observa el **número y porcentaje** de hemocultivos contaminados por los distintos microorganismos y el número de contaminaciones simples y mixtas.

Tabla 12. Evolución anual del número de contaminaciones en función del microorganismo.

Microorganismos contaminantes	Año y número de HC contaminados										
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	TOTAL
Estafilococos coagulasa negativa	1014	979	941	1091	1244	1201	1165	1055	1013	1148	10851
%	81,8	89,2	91,3	92,5	92,4	92,2	95,3	90,9	91,1	99,7	91,6
Streptococos grupo viridans	64	39	37	45	50	50	44	50	58	68	505
%	5,2	3,6	3,6	3,8	3,7	3,8	3,6	4,3	5,2	5,9	4,3
Corynebacterium spp.	47	70	52	53	49	49	30	46	49	37	482
%	3,8	6,4	5	4,5	3,6	3,8	2,5	4	4,4	3,2	4,1
Propionibacterium spp.	103	36	12	18	22	28	21	26	29	37	332
%	8,3	3,3	1,2	1,5	1,6	2,2	1,7	2,2	2,6	3,2	2,8
Micrococcus spp.	8	14	11	14	20	12	8	10	9	16	122
%	0,6	1,3	1,1	1,2	1,5	0,9	0,7	0,9	0,8	1,4	1
Clostridium spp.	12	12	7	13	10	7	10	11	11	10	103
%	1	1,1	0,7	1,1	0,7	0,5	0,8	0,9	1	0,9	0,9
Bacillus spp.	20	0	6	11	14	10	7	10	12	10	100
%	1,6	0	0,6	0,9	1	0,8	0,6	0,9	1,1	0,9	0,8
Lactobacillus spp.	2	0	3	0	0	0	0	2	2	5	14
%	0,2	0	0,3	0	0	0	0	0,2	0,2	0,4	0,1
OTROS	8	10	8	9	11	10	6	10	10	8	90
%	0,6	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	0,5	0,9	0,9	0,7	0,8
TOTAL MICROORGANISMOS	1278	1160	1077	1254	1420	1367	1291	1220	1193	1339	12599
Contaminaciones simples	1200	1034	985	1104	1274	1237	1153	1100	1031	963	11081
Contaminaciones mixtas	39	63	46	75	73	65	69	60	81	188	759
% contaminaciones mixtas	3,1	5,7	4,5	6,4	5,4	5	5,6	5,2	7,3	16,3	6,4
CONTAMINACIONES TOTALES	1239	1097	1031	1179	1347	1302	1222	1160	1112	1151	11840
% HC CONTAMINADOS	9,3	8,6	8	8,6	8,9	9	8,3	8	7,7	7,4	8,4

-Los microorganismos responsables de un mayor número de contaminaciones son los ECN, que estuvieron presentes en el 91,6% del total de las mismas. Los siguientes fueron, por este orden, EGV, *Corynebacterium spp.* y *Propionibacterium spp.*

-Las contaminaciones por cada microorganismo no mostraron tendencias a lo largo de los años; excepción fue *Propionibacterium spp.* en el primer año del estudio.

-El número de contaminaciones mixtas experimentó un incremento acusado en el año 2016 ($p < 0,0001$).

4.2. Análisis del significado clínico de los organismos contaminantes

Hemos analizado la significación clínica de las bacteriemias ocasionadas por estos microorganismos utilizando los criterios microbiológicos previamente expuestos (Tabla 13).

Tabla 13. Porcentaje de bacteriemias verdaderas en función del microorganismo.

MICROORGANISMO	Aislamientos	Bacteriemias verdaderas	%
Estafilococos coagulasa negativa	14792	3941	26,6
Estreptococos grupo <i>viridans</i>	955	436	45,7
<i>Corynebacterium spp.</i>	585	72	12,3
<i>Propionibacterium spp.</i>	399	39	9,8
<i>Clostridium spp.</i>	156	51	32,7
<i>Micrococcus spp.</i>	146	15	10,3
<i>Bacillus spp.</i>	120	13	10,8
<i>Lactobacillus spp.</i>	12	4	33,3

-Los aislamientos de estafilococos coagulasa negativa únicamente representaron bacteriemias verdaderas en una cuarta parte de los casos.

-En el caso de los estreptococos del grupo *viridans* esto ocurrió en prácticamente la mitad de los casos, por un tercio de los aislamientos de *Clostridium spp.* y alrededor de únicamente el 10% para el resto de contaminantes habituales.

Objetivo 4: Analizar las posibles mejoras aportadas por la introducción de nuevos sistemas de incubadores.

Analizamos el número de falsos positivos que presentaron los incubadores; es decir, en cuantas ocasiones hubo indicación de cultivo positivo sin verificarse posteriormente (por tinción o subcultivo a medio sólido). Se hizo comparando las tasas de falsos positivos del incubador antiguo (BACTEC™ 9240; año 2013) y el nuevo (BACTEC™ FX; año 2016) (Tabla 14):

Tabla 14. Porcentaje de falsos positivos de los distintos incubadores.

	BACTEC™ 9240	BACTEC™ FX
Botellas positivas	5308	4893
Verdaderos positivos	4807	4843
Falsos positivos	501	50
% falsos positivos	9,4	1

El nuevo incubador supuso un gran avance en este sentido, al reducir el número de falsos positivos de manera muy significativa ($p < 0.0001$).

Objetivo 5: Analizar el tiempo de positividad de los microorganismos y su utilidad como herramienta predictiva y diagnóstica.

1. Estudios por incubador y tipo de botella

Se evaluaron los tiempos de positividad de los distintos microorganismos a lo largo del año 2013 (incubador BACTEC™ 9240) y 2016 (incubador BACTEC™ FX). La comparación de ambos incubadores en función del microorganismo se puede ver en la Figura 34.

-Incubador **BACTEC™ 9240** (año 2013): se estudió el tiempo de incubación de 2901 botellas positivas con infección **simple** (1542 botellas aerobias y 1359 anaerobias) (Tabla 15). El tiempo promedio de positividad fue de 23,3 horas (botellas aeróbicas 22 horas y anaeróbicas 24,6 horas). Las botellas consideradas como contaminación fueron significativamente más lentas (30,3 horas) que los verdaderos positivos (20,1 horas) ($p < 0,0001$).

Tabla 15. Tiempos de positividad de distintos microorganismos (Incubador BACTEC™ 9240).

Microorganismo	TOTAL HC POSITIVOS	t medio positividad (horas)	Botellas AE Positivas	t medio positividad AE (horas)	Botellas AN Positivas	t medio positividad AN (horas)
VERDADEROS POSITIVOS						
GRAM POSITIVOS						
<i>S.epidermidis</i>	169	23,1	149	22,8	152	23,4
<i>S.aureus</i>	160	17,3	141	15,2	151	19,4
<i>Enterococcus spp.</i>	44	11,6	39	11,8	37	11,4
<i>S.pneumoniae</i>	16	12,2	14	13,3	11	11
<i>S.agalactiae</i>	9	8,1	8	8,3	9	7,9
<i>S.pyogenes</i>	4	6,4	4	5,8	3	7
GRAM NEGATIVOS						
<i>E.coli</i>	243	13,9	213	13,8	218	13,9
<i>K.pneumoniae</i>	44	15,3	38	17,3	38	13,3
<i>P.aeruginosa</i>	71	30,5	71	24,3	11	70,8
<i>A.baumannii</i>	5	9,8	5	9,8	0	
<i>Bacteroides spp.</i>	8	64,1	0		8	64,1
HONGOS						
<i>C.albicans</i>	25	57,7	25	57,7	0	
<i>C.parapsilosis</i>	15	32,4	15	32,4	0	
CONTAMINANTES						
ECN	569	29,9	412	28,2	352	31,8
EGV	12	25,6	9	27,4	7	23
<i>Corynebacterium spp.</i>	18	48,2	17	48,2	0	
<i>Propionibacterium spp.</i>	15	114	0		15	114

K.pneumoniae: *Klebsiella pneumoniae*; **A.baumannii:** *Acinetobacter baumannii*.

-Incubador **BACTEC™ FX** (año 2016): se estudió el tiempo de incubación de 2513 botellas positivas con infección **simple** (1356 botellas aerobias y 1157 anaerobias). El tiempo promedio de positividad fue de 26,5 horas (botellas aeróbicas 26 horas y anaeróbicas 27 horas). Los considerados contaminantes fueron más lentos (32,8 horas) que los verdaderos positivos (23,8 horas) ($p < 0,0001$). Resultados en la Tabla 16.

Tabla 16. Tiempos de positividad de distintos microorganismos (Incubador BACTEC™ FX).

Microorganismo	TOTAL HEMOCULTIVOS POSITIVOS	t medio positividad (horas)	Botellas AE Positivas	t medio positividad AE (horas)	Botellas AN Positivas	t medio positividad AN (horas)
VERDADEROS POSITIVOS						
GRAM POSITIVOS						
<i>S.epidermidis</i>	156	26,8	129	27,8	133	25,7
<i>S.aureus</i>	94	16,6	85	17,6	74	15,3
<i>Enterococcus spp.</i>	54	14,5	47	16,9	41	11,8
<i>S.pneumoniae</i>	24	11,2	22	11,3	22	11,1
<i>S.agalactiae</i>	12	10,8	8	11,6	9	10,2
<i>S.pyogenes</i>	3	11	2	10,3	3	11,5
GRAM NEGATIVOS						
<i>E.coli</i>	247	12,3	198	14,4	215	10,5
<i>K. pneumoniae</i>	62	14,5	54	16,1	53	12,9
<i>P.aeruginosa</i>	35	20,3	35	19,3	7	25
<i>A.baumannii</i>	9	21,2	9	11,1	2	66,9
<i>Bacteroides spp.</i>	6	27,2	0		6	27,2
HONGOS						
<i>C.albicans</i>	6	53,3	6	53,3	0	
<i>C.parapsilosis</i>	3	57,8	3	57,8	0	
CONTAMINANTES						
ECN	504	31	353	29,4	313	33
EGV	22	17,6	11	15,6	18	18,8
<i>Corynebacterium spp.</i>	11	55,7	11	55,1	4	57,4
<i>Propionibacterium spp.</i>	14	107,6	1	117,6	14	106,9

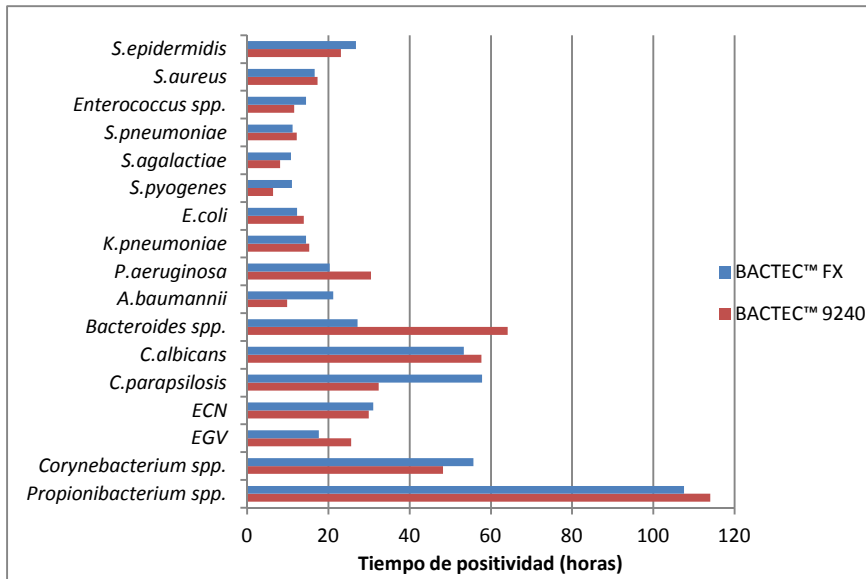


Figura 34. Tiempo de positividad de distintos microorganismos en función del incubador.
*: significativo.

Combinando estos 2 estudios podemos apreciar:

-El incubador nuevo no fue más rápido que el viejo; fue incluso unas tres horas de media más lento (26 frente 23) e independientemente del tipo de botella ($p < 0,0001$). A nivel de microorganismos esto se vio reflejado principalmente para *S. epidermidis*, no así para el resto de microorganismos valorables.

-En los microorganismos facultativos el crecimiento en términos absolutos (positivo/negativo) fue similar en función de la botella; sin embargo, las botellas anaerobias fueron ligeramente más rápidas que las aerobias (un promedio de 2 horas) en BACTEC™ FX.

-La diferencia de tiempo de positividad entre los microorganismos considerados contaminantes y los considerados como verdaderos positivos fue muy significativa independientemente del tipo de incubador (entre 9 y 10 horas: 20-23 frente a 30-33) ($p < 0,0001$). Ciñéndonos a los ECN, los valorados como contaminantes presentaron un tiempo de positividad significativamente mayor que los verdaderos positivos (ECN 29,9-31 horas; *S. epidermidis* 23,1-26,8 horas) ($p < 0,0001$).

-Los microorganismos que mostraron una velocidad de crecimiento hasta la positividad más rápida fueron *S. pyogenes* (6,4-11 horas en función del incubador), *S. agalactiae* (8,1-10,8 horas), *S. pneumoniae* (12,2-11,2 horas) y *Enterococcus spp.* (11,6-14,5 horas).

-Respecto a los microorganismos valorables aislados en mayor número, sus tiempos de positividad fueron los siguientes: *E. coli* (13,9 -12,3 horas), *S. epidermidis* (23,1-26,8 horas),

S.aureus (160, 17,3-16,6 horas) *K.pneumoniae* (15,3-14,5 horas) y *P.aeruginosa* (24,3-19,3 horas, contabilizando sólo las botellas aerobias).

-Las especies de *Candida* fueron más lentas (alrededor de 50 horas), con una diferencia importante ($p < 0,0001$) entre *C.albicans* (57,7 horas) y *C.parapsilosis* (32,4 horas) según BACTEC™ 9240, que no se ve reflejada en BACTEC™ FX.

-El resto de microorganismos contaminantes presentaron tiempos de positividad muy altos (*Corynebacterium spp.* por encima de 48 horas, *Propionibacterium spp.* por encima de 100 horas).

2. Algoritmo diagnóstico: (Gram + tiempo de positividad)

Se relacionó la tinción de Gram del hemocultivo positivo con los tiempos de positividad y el microorganismo identificado posteriormente. Lo realizamos **teniendo en cuenta únicamente la primera botella positiva de cada tanda de hemocultivos** (Tabla 17). El estudio se llevó a cabo durante 2 años (2015-2016), para BACTEC™ FX.

Tabla 17. Microorganismos en función del tiempo de positividad y la tinción de Gram.

TIPO DE MICROORGANISMO	TIEMPO DE POSITIVIDAD							TOTAL
	<12h.	12-24h.	24-48h.	48-72h.	72-96h.	96-120h.	>120h.	
Cocos gram positivos en grupos	110	777	632	155	38	11	11	1734
Valorables	81	183	114	28	2	2	1	411
<i>S.epidermidis</i>	8	79	55	18	1	1		162
<i>S.aureus</i>	62	37	17	3		1	1	121
Otros ECN valorables	11	65	42	7	1			126
Otros		2						2
Contaminantes	29	594	518	127	36	9	10	1323
ECN	29	594	505	120	33	7	9	1297
<i>Micrococcus spp.</i>			11	7	3	2	1	24
Otros			2					2
Cocos gram positivos en cadenas	105	78	80	9	2	1	2	277
Valorables	100	56	49	4	1	1	1	212
<i>Enterococcus spp.</i>	33	15	11				1	60
<i>S.pneumoniae</i>	27	6	10	1		1		45
<i>S.agalactiae</i>	18	4	5	1				28
<i>S.pyogenes</i>	3		2		1			6
EGV valorables	18	26	13	1				58
Otros	1	5	8	1				15
Contaminantes	5	22	31	5	1		1	65
EGV	5	22	31	3	1		1	63
Otros				2				2
Bacilos gram positivos	6	20	18	14	18	23	18	117
Valorables	2	10	3	1				16
<i>Listeria monocytogenes</i>	2	6	1					9
Otros		4	2	1				7
Contaminantes	4	10	15	13	18	23	18	101
<i>Corynebacterium spp.</i>		3	11	10	7	2	3	36
<i>Propionibacterium spp.</i>				2	9	21	14	46
Otros	4	7	4	1	2		1	19
Bacilos gram negativos	334	143	100	20	8	2	2	609
<i>E.coli</i>	193	44	36	4	2			279
<i>K.pneumoniae</i>	49	7	9					65
Otras enterobacterias	70	47	24	1	1	2		145
<i>P.aeruginosa</i>	11	30	14	3	2		1	61
<i>A.baumannii</i>	8	2	3					13
Otros BGN-NF	1	2	5	1				9
<i>Bacteroides spp.</i>		7	3	3			1	14
<i>Fusobacterium spp.</i>			2	3	2			7
Otros	2	4	4	5	1			16
Hongos	1	4	9	4	1	1	1	21
<i>C.albicans</i>			5	4		1		10
<i>C.parapsilosis</i>	1	2	2		1		1	7
Otros		2	2					4
TOTAL	556	1022	839	202	67	38	34	2758

En las Figuras 35, 36 y 37 se puede ver, en función de los resultados de la Tabla 9, la relación entre **tiempo de positividad** y los **porcentajes** de que se trate de un microorganismo concreto, para las morfologías y tinciones de interés.

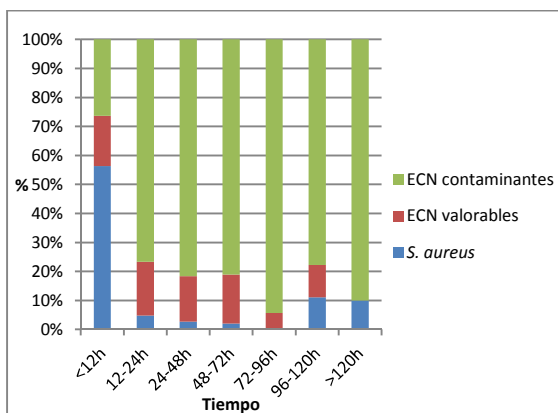


Figura 35. Cocos gram positivos en grupos.

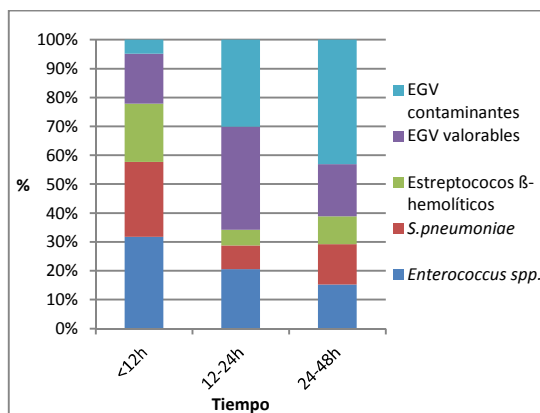


Figura 36. Cocos gram positivos en cadenas.

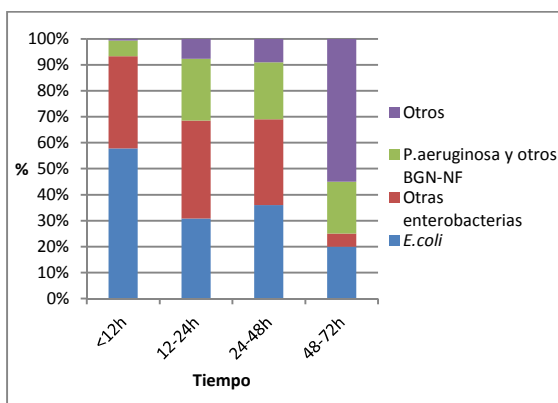


Figura 37. Bacilos gram negativos.

* Teniendo en cuenta que es **la primera botella positiva** de cada episodio clínico (habitualmente 4):

-Las bacteriemias valorables se detectaron en función del tiempo de la siguiente manera (1269 bacteriemias valorables): en 12 horas el 40,8%, el 24 horas el 72% y en 48 horas el 93,7%.

-Los microorganismos que crecieron antes de 12 horas fueron casi siempre valorables (518/556, 93,2%), frente al resto de tramos de tiempo: 12-24 horas (396/1022, 38,7%), 24-48 horas (275/839, 32,8%), 48-72 horas (57/202, 28,2%), 72-96 horas (12/67, 17,9%), 96-120 horas (6/38, 15,8%), >120 horas (5/34, 14,7%); para un total de botellas positivas valorables del 46% (1269/2758).

-Para los cocos gram positivos en grupos, si fueron positivos antes de 12 horas, la probabilidad de ser valorable fue de un 73,6% (56,4% de que sea un *S.aureus*). Si el positivo fue posterior,

sólo fue valorable en un 20,3% de los casos y la probabilidad de que fuera un *S.aureus* baja a un 3,6%, independientemente de la franja de tiempo concreta.

-Los cocos gram positivos en cadenas fueron valorables mayoritariamente (76,5% de los casos). En el caso de las primeras 12 horas, son valorables en un 95,2%. Los estreptococos β -hemolíticos (*S.agalactiae* y *S.pyogenes*) y el *S.pneumoniae* crecieron principalmente en las 12 primeras horas (60,8%).

-Los bacilos gram positivos sólo fueron valorables en el 13,7% de los casos. En las primeras 24 horas, este porcentaje ascendió al 46,2%.

-Los bacilos gram negativos, valorables en principio por definición, fueron positivos en sólo 12 horas en un 54,8% de los casos, en 24 horas en un 78,3% y en 48 horas en un 94,7%.

Específicamente las enterobacterias fueron positivas en las primeras 12 horas en un 63,8% de los casos, mientras que los bacilos gram negativos no fermentadores sólo en un 24,1%. Ante un bacilo gram negativo en las primeras 12 horas de incubación, hubo un 57,8% de probabilidades de que fuera un *E.coli*, un 35,6% de que fuera otra enterobacteria y un 6% de que fuera un BGN-NF. A partir de las 48 horas, la probabilidad de que fuera otro tipo de bacilo respecto a los comentados es del 46,9% (en las primeras 48 horas es del 3,8%).

-Las levaduras crecieron en todas las franjas de tiempo, principalmente entre las 12 y las 72 horas (81%). *C.parapsilosis* creció más rápido que *C.albicans*, pero la casuística fue muy reducida para sacar más conclusiones.

-Para los microorganismos facultativos las botellas anaerobias fueron más rápidas: las enterobacterias fueron positivas en 12 horas en el 49,3% de los casos en aerobiosis y en el 62,5% en anaerobiosis; un 31,3% y un 48,4% para *S.aureus*; y un 44,5% y un 50% para los enterococos (resultados no presentados).

Objetivo 6: Evaluar la fiabilidad e impacto de MALDI-TOF MS en los flujos de trabajo y el tiempo de respuesta.

1. Concordancia global de la identificación de MALDI-TOF MS

Después de la instalación y puesta a punto de MALDI-TOF MS se comparó su identificación con la identificación bioquímica tradicional (Microscan®) y se recurrió a la identificación genómica en aquellos casos de discrepancia. Los resultados se pueden ver en la Figura 38.

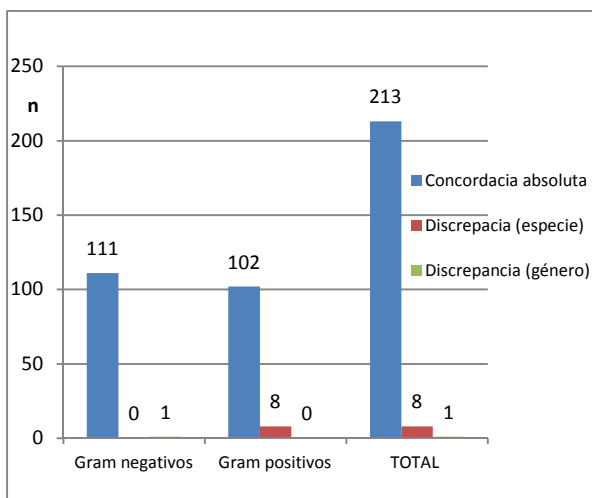


Figura 38. Identificación: MALDI-TOF MS frente a Microscan®.

Se encontraron nueve discrepancias; todas ellas se resolvieron a favor de MALDI-TOF mediante la secuenciación del ARNr 16S. La única discrepancia de género fue una identificación errónea de *Enterobacter agglomerans* en vez de *Pantoea dispersa* (cuestión taxonómica, *E.agglomerans* pasó a ser *Pantoea agglomerans*), mientras que las discrepancias a nivel de especie fueron estafilococos (7/8) y un enterococo.

2. Fiabilidad de la identificación de MALDI-TOF MS en 3-4 horas

Se evaluó la fiabilidad de MALDI-TOF MS utilizando microorganismos crecidos durante 3-4 horas (Figura 39). La comparación se realizó respecto a MALDI-TOF MS a las 24 horas (identificación definitiva). El total de microorganismos analizados fue de 332 (257 gram negativos y 75 gram positivos). Identificación posible se consideró cuando se alcanzaron los puntos de corte en los “scores” comentados en material y métodos.

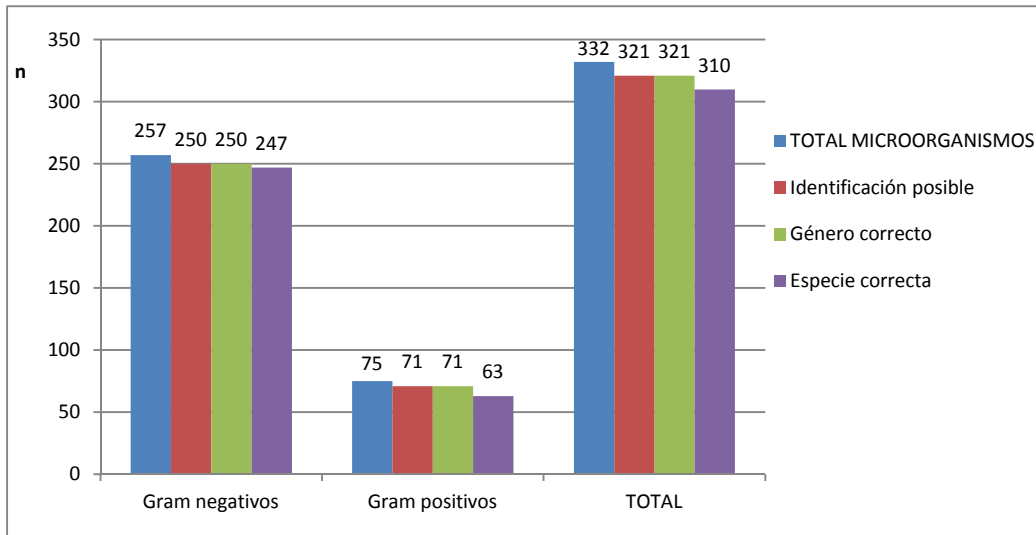


Figura 39. Identificación por MALDI-TOF MS con 3-4 horas de incubación.

En la mayoría de los casos la identificación fue posible (96,7%), y la fiabilidad a nivel de género fue del 100% (321/321), y a nivel de especie del 96,6% (310/321); esta última más elevada en el caso de los gram negativos (98,8% frente al 88,7%). A nivel de especie las discrepancias fueron en el género *Staphylococcus*.

Objetivo 7: Evaluar la fiabilidad e impacto de los antibiogramas rápidos a partir de hemocultivo positivo.

Se analizaron un total de 183 cepas (75 gram positivas, 108 gram negativas). En cada antibiograma de gram positivos se evaluaron 7 antibióticos; 14 para los gram negativos. Los resultados referidos al antibiograma completo de una cepa concreta, respecto a los resultados finales ofrecidos por Microscan®, los podemos ver en la Tabla 18.

Tabla 18. Lectura del antibiograma disco-placa a las 3-4 horas. Discrepancias en función del tipo de microorganismo.

Tipo de microorganismo	n	Lectura posible (%)	Resultado			
			Concordancia (%)	Discrepancia (%)		
				Errores muy graves	Errores graves	Errores leves
Gram positivo	75	12 (16%)	11 (91,7%)	1 (8,3%)	0	0
Gram negativo	108	78 (72,2%)	48 (61,5%)	6 (7,7%)	12 (15,4%)	12 (15,4%)
TOTAL	183	90 (49,2%)	59 (65,6%)	7 (7,8%)	12 (13,3%)	12 (13,3%)

-Sólo se pudo realizar la lectura de los antibiogramas preliminares en el 49,2% de los casos; con mayor éxito en el caso de gram negativos (72,2%) que de gram positivos (16%) ($p < 0.0001$). Los bacilos gram negativos no fermentadores (BGN-NF) de manera más difícil (8/14, 57,1%) que las enterobacterias (70/94, 74,5%). Respecto a los gram positivos, el antibiograma de *S.aureus* es mucho más fácil de leer (6/8, 75%) que los de los ECN (6/23, 26,1%), enterococos (0/18), estreptococos (0/20) y otros microorganismos (0/6).

-Cuando la interpretación fue posible. la concordancia fue total en el 65,6% de los casos, con un 34,4% de error por antibiograma completo (7,8% de errores muy graves, 13,3% de errores graves y leves), muy similar para gram positivos y negativos.

-La concordancia global por antibiótico fue del 96,7% (1137/1176), con un 98,8% para gram positivos (83/84 antibióticos correctos), y un 96,5% (1054/1092) para gram negativos.

Objetivo 8: Evaluar RAPIDEC® CARBA NP como método diagnóstico rápido de detección de carbapenemasas.

149 botellas positivas fueron testadas después de cuatro horas de su cultivo para verificar la producción de carbapenemasas mediante CARBA NP. Otros 19 hemocultivos se inocularon artificialmente con microorganismos productores de carbapenemasas y se testaron también por dicho método. Los resultados se verificaron posteriormente de manera definitiva a las 24 horas. Los resultados se pueden ver en la Tabla 19:

Tabla 19. Microorganismos productores de carbapenemasas y detectados por CARBA NP.

	HC	HC inoculados	TOTAL
Microorganismos totales	149	19	168
Productores de carbapenemasas	10	19	29
Detectadas por CARBA NP	9	19	28

CARBA NP presentó una sensibilidad del 96,5 % y una especificidad del 100% en la detección de carbapenemasas después de sólo 4 horas de incubación del microorganismo.

Objetivo 9: Conocer la etiología de las bacteriemias y su evolución a lo largo de la década a estudio.

1. Etiología global de las bacteriemias

Teniendo en cuenta los datos poblacionales del área sanitaria IV del Principado de Asturias, a la que da cobertura este hospital, y los obtenidos en este estudio, la incidencia de la bacteriemia se movió de manera ascendente entre los 346,4 (año 2008, primero del que se tienen datos) y los 374,4 casos (año 2016) por 100000 habitantes.

Se estudió la etiología de las mismas globalmente, año a año, en función de las variables demográficas conocidas y del Servicio peticionario. La relación entre hemocultivo (datos presentados hasta ahora) y bacteriemia está en el hecho de que habitualmente, para cada episodio clínico o sospecha de bacteriemia, se extrajeron dos hemocultivos para población adulta y un hemocultivo para población pediátrica.

En la Figura 40 vemos los **números totales** en función del **tipo** de microorganismo. Para los microorganismos más frecuentes los resultados, en **porcentaje anual respecto al total de bacteriemias y número total**, los podemos ver en la Tabla 20, y la **evolución numérica anual** en las Figuras 41 y 42. Para el resto de microorganismos el **número total** en la Tabla 21. Dentro de los estafilococos coagulasa negativa, en la Tabla 22 presentamos los números, **totales y año a año**, de los ECN responsables de bacteriemia.

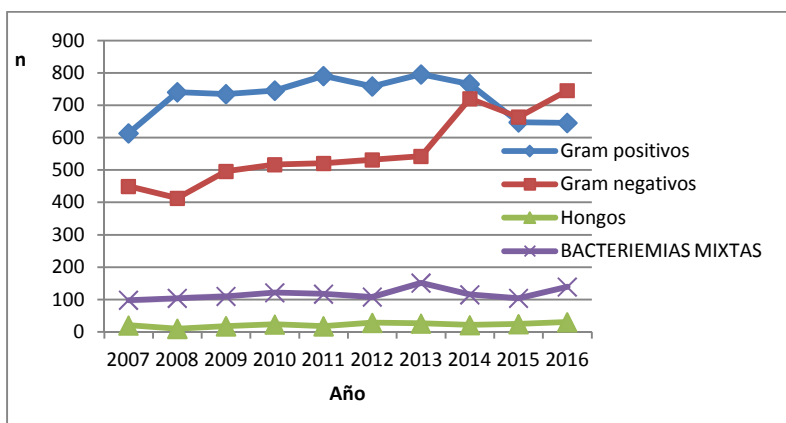


Figura 40. Evolución anual de las bacteriemias (n) de gram positivos, gram negativos y hongos.

Tabla 20. Microorganismos causantes de bacteriemias por año. Porcentaje respecto al total de bacteriemias.

Microorganismo	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	TOTAL	%
GRAM POSITIVOS	64,0%	71,9%	66,3%	66,6%	67,9%	65,7%	65,1%	58,1%	53,9%	52,1%	7242	62,9%
<i>S. epidermidis</i>	23,5%	25,0%	23,0%	21,6%	23,2%	22,4%	22,6%	19,4%	16,0%	14,8%	2418	21,0%
Otros ECN	9,3%	17,1%	15,0%	15,1%	16,8%	15,6%	14,6%	9,1%	11,6%	8,9%	1523	13,2%
<i>S. aureus</i>	11,5%	12,2%	10,8%	11,2%	11,5%	8,9%	11,3%	11,2%	8,6%	9,8%	1228	10,7%
<i>E. faecalis</i>	5,2%	5,5%	3,6%	4,9%	4,8%	5,2%	5,6%	5,3%	4,8%	4,1%	566	4,9%
EGV valorables	5,2%	4,4%	4,6%	4,6%	3,8%	4,6%	2,7%	3,8%	1,4%	3,4%	436	3,8%
<i>S. pneumoniae</i>	3,8%	2,9%	3,7%	4,9%	3,5%	2,9%	2,5%	1,5%	3,4%	2,4%	359	3,1%
<i>E. faecium</i>	2,8%	2,7%	3,0%	2,3%	2,4%	4,1%	2,9%	2,7%	3,2%	3,6%	343	3,0%
<i>S. agalactiae</i>	0,6%	0,4%	0,6%	1,0%	0,8%	0,5%	1,0%	0,8%	0,7%	1,1%	87	0,8%
<i>Listeria spp.</i>	0,8%	0,5%	0,5%	0,2%	0,3%	0,1%	0,5%	0,2%	0,2%	0,5%	41	0,4%
<i>S. pyogenes</i>	0,3%	0,5%	0,4%	0,3%	0,3%	0,3%	0,4%	0,4%	0,2%	0,3%	40	0,3%
Otros gram positivos	0,9%	0,7%	1,2%	0,6%	0,5%	1,0%	1,1%	3,6%	3,8%	3,2%	201	1,7%
GRAM NEGATIVOS	46,9%	40,1%	44,8%	46,2%	44,7%	46,0%	44,4%	54,7%	55,2%	60,2%	5603	48,6%
<i>E. coli</i>	21,3%	18,4%	22,5%	22,5%	19,1%	19,2%	20,1%	18,4%	21,3%	24,1%	2382	20,7%
<i>P. aeruginosa</i>	6,7%	5,3%	5,5%	6,5%	7,8%	8,1%	7,3%	4,7%	5,2%	5,3%	717	6,2%
<i>K. pneumoniae</i>	3,1%	3,1%	3,3%	6,9%	6,4%	5,4%	5,3%	7,9%	5,2%	8,2%	644	5,6%
<i>E. cloacae</i>	2,5%	2,6%	1,6%	1,7%	2,8%	1,7%	2,0%	1,4%	2,2%	3,7%	255	2,2%
<i>A. baumannii</i>	1,3%	1,6%	1,5%	1,0%	1,2%	1,4%	1,6%	2,6%	2,4%	0,5%	174	1,5%
<i>P. mirabilis</i>	1,9%	1,6%	1,4%	1,1%	1,4%	1,5%	0,8%	1,4%	0,9%	1,9%	157	1,4%
<i>S. marcescens</i>	2,1%	0,7%	0,9%	0,8%	0,9%	1,0%	1,4%	1,5%	1,3%	1,6%	140	1,2%
<i>K. oxytoca</i>	1,5%	1,6%	1,4%	1,0%	1,5%	1,1%	1,5%	0,9%	0,9%	0,9%	138	1,2%
<i>Bacteroides spp.</i>	1,6%	1,8%	0,9%	1,6%	1,1%	1,4%	0,9%	0,9%	0,6%	0,8%	131	1,1%
<i>Salmonella spp.</i>	0,8%	0,6%	0,5%	0,5%	0,6%	0,3%	0,1%	0,5%	0,2%	0,5%	53	0,5%
<i>Fusobacterium spp.</i>	0,6%	0,1%	0,4%	0,2%	0,1%	0,3%	0,3%	0,4%	0,2%	0,5%	34	0,3%
<i>S. maltophilia</i>	0,2%	0,5%	0,2%	0,2%	0,1%	0,9%	0,1%	0,3%	0,2%	0,2%	32	0,3%
Otros gram negativos	3,4%	2,2%	4,6%	2,2%	1,8%	3,8%	3,1%	14,0%	14,7%	12,1%	746	6,5%
ANAEROBIOS	2,4%	2,2%	1,9%	2,2%	1,7%	2,1%	1,8%	2%	1,4%	1,8%	202	1,8%
HONGOS	2,1%	1,0%	1,7%	2,1%	1,6%	2,4%	2,2%	1,6%	2%	2,4%	218	1,9%
<i>Candida spp.</i>	2,0%	0,8%	1,4%	2,1%	1,4%	2,2%	2,0%	1,5%	1,8%	2,3%	202	1,8%
Otros hongos	0,1%	0,2%	0,3%	0,0%	0,2%	0,2%	0,2%	0,1%	0,2%	0,1%	16	0,1%
BACTERIEMIAS MIXTAS	10,2%	10,1%	9,9%	10,8%	10,0%	9,9%	8,8%	11,5%	8,6%	11,2%	1167	10,1%
TOTAL BACTERIEMIAS	960	1030	1108	1120	1165	1156	1222	1318	1203	1239	11521	
SOSPECHAS DE BACTERIEMIA	5239	5002	5097	5311	5908	5593	5777	5640	5562	6227	55356	
SOSPECHAS CONFIRMADAS	18,3%	20,6%	21,7%	21,1%	19,7%	20,7%	21,2%	23,4%	21,6%	19,9%	20,8%	

E.faecalis: Enterococcus faecalis; *E.faecium*: Enterococcus faecium; *E.cloacae*: Enterobacter cloacae;

P.mirabilis: Proteus mirabilis; *S.marcescens*: Serratia marcescens;

K.oxytoca: Klebsiella oxytoca; *S.maltophilia*: Stenotrophomonas maltophilia.

Tabla 21. Microorganismos causantes de bacteriemia ausentes en la Tabla 18. En negrita los géneros con especies representadas en la Tabla 18. Cifras totales de los 10 años (n).

Gram positivos	n	Gram negativos	n	Gram negativos	n	Gram negativos	n
Enterococcus spp.	58	Enterobacterias		BGN-NF		OTROS BGN	
Streptococcus β-hemolíticos	28	Enterobacter spp.	142	Pseudomonas spp.	49	<i>Haemophilus spp.</i>	32
<i>Gemella spp.</i>	20	<i>Morganella morganii</i>	78	Acinetobacter spp.	42	<i>Prevotella spp.</i>	20
<i>Lactococcus spp.</i>	20	<i>Citrobacter spp.</i>	72	<i>Burkholderia cepacia complex</i>	31	<i>Campylobacter spp.</i>	18
<i>Actinomyces spp.</i>	14	Proteus spp.	34	<i>Chryseobacterium spp.</i>	14	<i>Neisseria meningitidis</i>	16
<i>Granulicatella spp.</i>	10	<i>Providencia spp.</i>	32	<i>Alcaligenes spp.</i>	7	<i>Aeromonas spp.</i>	14
<i>Aerococcus spp.</i>	9	<i>Hafnia alvei</i>	17	<i>Achromobacter spp.</i>	6	<i>Neisseria spp.</i>	10
<i>Abiotrophia defectiva</i>	9	<i>Pantoea spp.</i>	10	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	5	<i>Capnocytophaga spp.</i>	9
<i>Brevibacterium spp.</i>	4	Serratia spp.	10	<i>Brevundimonas spp.</i>	3	<i>Moraxella spp.</i>	9
<i>Leuconostoc spp.</i>	6	<i>Raoultella spp.</i>	8	<i>Empedobacter brevis</i>	3	<i>Aggregatibacter spp.</i>	8
<i>Parvimonas spp.</i>	4	Escherichia spp.	6	<i>Flavobacterium spp.</i>	3	<i>Veillonella spp.</i>	8
<i>Rothia spp.</i>	4	<i>Kluyvera ascorbata</i>	4	<i>Ralstonia spp.</i>	3	<i>Pasteurella spp.</i>	5
<i>Arcanobacterium spp.</i>	2	<i>Yersinia spp.</i>	3	<i>Shewanella spp.</i>	3	<i>Eikenella corrodens</i>	2
<i>Bifidobacterium spp.</i>	3	<i>Shigella flexneri</i>	1	<i>Sphingomonas spp.</i>	3	<i>Dialister pneumosintes</i>	1
<i>Eggerthella lenta</i>	2	<i>Tatumella tyseos</i>	1	<i>Roseomonas spp.</i>	2	<i>Leptotrichia trevisanii</i>	1
<i>Finegoldia magna</i>	2			<i>Weeksella virosa</i>	1		
<i>Peptoniphilus spp.</i>	2						
<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	1			Hongos	n		
<i>Eubacterium lentum</i>	1			Cryptococcus neoformans	6		
<i>Facklamia hominis</i>	1			Rhodotorula spp.	3		
<i>Streptomyces spp.</i>	1			Fusarium spp.	2		
				Scedosporium spp.	2		
				Aspergillus fumigatus	1		
				Exserohilum rostratum	1		
				Histoplasma capsulatum	1		

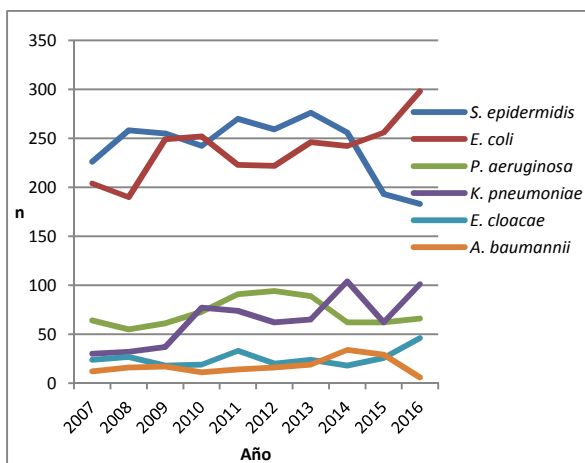


Figura 41. Evolución del número anual de bacteriemias (n) por microorganismo (I).

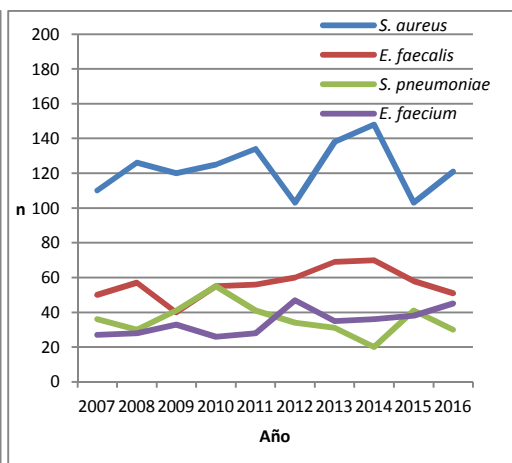


Figura 42. Evolución del número anual de bacteriemias (n) por microorganismo (II).

Tabla 22. Bacteriemias valorables por estafilococos coagulasa negativa.

ESPECIE	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	TOTAL
<i>S. epidermidis</i>	226	258	255	242	270	259	276	256	193	183	2418
<i>S. hominis</i>	49	87	81	87	97	91	97	69	74	68	800
<i>S. haemolyticus</i>	8	34	36	38	53	43	38	24	25	17	316
<i>S. capitis</i>	15	17	21	21	18	17	21	16	24	20	190
<i>S. simulans</i>	4	11	5	5	7	9	5	3	3	1	53
<i>S. warneri</i>	5	13	3	7	3	7	5	4	6	0	53
<i>S. lugdunensis</i>	3	6	6	3	8	6	6	2	2	1	43
<i>S. auricularis</i>	2	2	6	1	3	3	2	1	1	0	21
<i>S. schleiferi</i>	1	1	2	2	4	0	1	1	0	1	13
<i>S. intermedius</i>	0	1	0	2	1	2	3	0	0	1	10
<i>S. saprophyticus</i>	1	1	1	2	1	1	0	0	1	0	8
<i>S. cohnii</i>	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	6
<i>S. sciuri</i>	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>S. hyicus</i>	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
<i>S. saccharolyticus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
<i>S. xylosus</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>S. pettenkoferi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
TOTAL otros ECN	89	176	166	169	196	180	178	120	139	110	1523
TOTAL ECN	315	434	421	411	466	439	454	376	332	293	3941

-Las bacterias gram positivas fueron predominantes respecto a las gram negativas. En total, hubo 7242 microorganismos gram positivos implicados y 5603 gram negativos, por 218 fungemias.

-A partir del año 2014 se produjo un notable descenso de las bacteriemias por gram positivos, coincidiendo con un ascenso de los gram negativos.

-*S.epidermidis* y *E.coli* fueron los microorganismos que originaron un mayor número de bacteriemias. *S.epidermidis* fue menos frecuente en los últimos años del estudio, coincidiendo con el resto de ECN valorables y con el ascenso de *E.coli*.

-Destaca el aumento de las bacteriemias por *K.pneumoniae* a largo de estos 10 años (del 3,1% al 8,2% del total). Aumento más discreto pero importante de *E.cloacae*, coincidiendo con el descenso hasta casi desaparecer de *A.baumannii*.

-*E.faecalis* fue más frecuente que *E.faecium* (566 bacteriemias totales frente a 343); a partir de 2014 las diferencias se redujeron de manera importante hasta la actualidad.

-El porcentaje de bacteriemias por *S.aureus* y *P.aeruginosa* se mantuvo constante a lo largo de los años.

-Las fungemias se mantuvieron constantes, sin oscilaciones apreciables.

-Las bacteriemias ocasionadas por los microorganismos agrupados en “Otros” aumentaron del 4,4% al 15,4% del total en el último año.

-El número de bacteriemias confirmadas referido al total de sospechas se mantuvo estable, en cifras aproximadas al 20%.

-Además de *S.epidermidis*, se aislaron otras dieciséis especies de estafilococos coagulasa negativa responsables de bacteriemia a lo largo de estos diez años, siendo *Staphylococcus hominis* el aislado con mayor frecuencia.

Por otra parte, también relacionamos los microorganismos más frecuentes con el número de hemocultivos en las que aparecen (Tabla 23). Sólo se tuvieron en cuenta aquellos casos en los que se recibieron 2 hemocultivos por episodio clínico.

Tabla 23. % de HCs positivos por bacteriemia en función del microorganismo causal (año 2016).

Microorganismo	Bacteriemias	Nº de HC POSITIVOS (%)			
		1	%	2	%
<i>A. baumannii</i>	5	1	20	4	80
<i>E. cloacae</i>	44	13	29,5	31	70,5
<i>E. faecalis</i>	41	11	26,8	30	73,2
<i>E. faecium</i>	44	27	61,4	17	38,6
<i>E. coli</i>	289	32	11,1	257	88,9
<i>K. pneumoniae</i>	98	37	37,8	61	62,2
<i>P. aeruginosa</i>	63	24	38,1	39	61,9
<i>S. aureus</i>	108	34	31,5	74	68,5
<i>S. epidermidis</i>	154	3	1,9	151	98,1
<i>S. pneumoniae</i>	28	13	46,4	15	53,6

-*S.epidermidis* debería presentar un valor de 2 (para ser valorable debería aislarse en los dos hemocultivos); fue valorado como verdadero en otros tres casos.

-De las bacterias estudiadas, las gram negativas (especialmente *E.coli*) presentaron ambos hemocultivos positivos con mayor frecuencia que las gram positivas (78,6% frente a 61,5%) ($p<0,0001$).

-*S.pneumoniae*, y, sobre todo *E.faecium*, presentaron los 2 hemocultivos positivos con una frecuencia mucho más baja que los demás microorganismos ($p<0,0001$).

2. Etiología en función de la edad

Se estudiaron las **bacteriemias totales** en función de la edad de los pacientes (Tabla 24), y su **porcentaje** respecto al total para cada rango de edad (Figura 43). Se realizó una división por edades basada en ≤ 14 (edad pediátrica), 15-65, y >65 años. Se analizaron los números totales y año a año. La evolución temporal se presenta para los años 1, 4, 7 y 10 del estudio (Tabla 25), con el objetivo de poder valorar posibles tendencias. Se estudió respecto a las 10 especies de microorganismos más frecuentes (descartando ECN diferentes a *S.epidermidis*).

Tabla 24. Etiología de las bacteriemias en función del rango de edad.

MICROORGANISMO	EDAD (años)						TOTAL	%
	≤ 14	%	15-65	%	>65	%		
<i>S. epidermidis</i>	385	31,6	970	20,1	1063	19,4	2418	20,7
<i>E. coli</i>	147	12,1	897	18,6	1338	24,5	2382	20,7
<i>S. aureus</i>	118	9,7	550	11,4	560	10,2	1228	10,7
<i>P. aeruginosa</i>	37	3,0	307	6,4	373	6,8	717	6,2
<i>K. pneumoniae</i>	81	6,7	280	5,8	283	5,2	644	5,6
<i>E. faecalis</i>	120	9,9	201	4,2	245	4,5	566	4,9
<i>S. pneumoniae</i>	55	4,5	144	3,0	160	2,9	359	3,1
<i>E. faecium</i>	8	0,7	221	4,6	114	2,1	343	3,0
<i>E. cloacae</i>	41	3,4	105	2,2	109	2,0	255	2,2
<i>A. baumannii</i>	0	0,0	90	1,9	84	1,5	174	1,5
OTROS	225	18,5	1068	22,1	1142	20,9	2435	21,1
TOTAL BACTERIEMIAS	1217	10,6	4833	41,9	5471	47,5	11521	
SOSPECHAS DE BACTERIEMIA	10103	18,3	23121	41,8	22132	40,0	55356	
SOSPECHAS CONFIRMADAS	12,0%		20,9%		24,7%		20,8%	

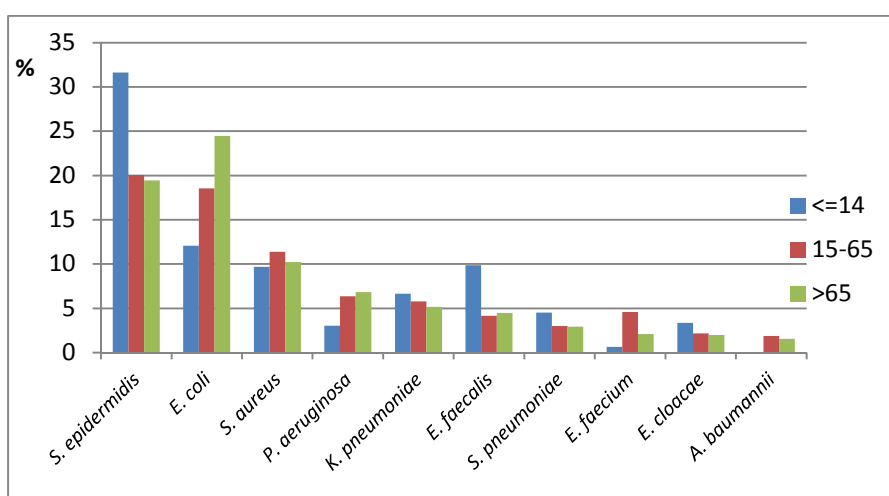


Figura 43. Porcentaje de bacteriemias por microorganismo en función de la edad.

-Las bacteriemias fueron más frecuentes a medida que aumenta la edad (hay más bacteriemias en mayores de 65 años que en todo el rango de 15 a 65 años) ($p < 0,0001$).

-Esto se confirma también referido a las sospechas diagnósticas confirmadas: en edad pediátrica la tasa fue significativamente inferior, siendo la más alta la de los >65 años.

-*S.epidermidis* fue claramente el patógeno más frecuente en los menores de 15 años; más importante que en las demás edades de manera significativa ($p < 0,0001$).

-*E.coli* destacó en mayores de 65 años. Se relacionó con el incremento de la edad ($p < 0,0001$).

-*K.pneumoniae* estuvo presente en todos los rangos de edad, y al revés que *E.coli*, disminuyó discretamente con la edad pero no de manera significativa ($p = 0,0906$).

-*S.aureus* se relacionó ligeramente con el rango de edad intermedio ($p = 0,033$).

-*E.faecalis* estuvo mucho más presente en la población pediátrica ($p < 0,0001$), mientras que *E.faecium* lo fue, de manera muy significativa ($p < 0,0001$), en el rango de 15 a 65 años.

-*A.baumannii* y *P.aeruginosa* fueron prácticamente inexistentes en población pediátrica ($p < 0,0001$), al contrario que *E.cloacae* y *S.pneumoniae* ($p < 0,0001$).

Tabla 25. Evolución de la etiología de las bacteriemias en función del rango de edad.

MICROORGANISMO	2007				2010				2013				2016			
	TOTAL	≤14	15-65	>65	TOTAL	≤14	15-65	>65	TOTAL	≤14	15-65	>65	TOTAL	≤14	15-65	>65
<i>A. baumannii</i>	12	0	7	5	11	0	6	5	19	0	11	8	6	0	2	4
<i>E. cloacae</i>	24	7	9	8	19	5	9	5	24	0	14	10	46	2	19	25
<i>E. faecalis</i>	50	5	20	25	55	18	20	17	69	14	24	31	51	10	15	26
<i>E. faecium</i>	27	1	20	6	26	0	20	6	35	0	16	19	45	1	25	19
<i>E. coli</i>	204	16	89	99	252	19	93	140	246	10	99	137	298	9	87	202
<i>K. pneumoniae</i>	30	4	15	11	77	19	33	25	65	5	30	30	101	3	39	59
<i>P. aeruginosa</i>	64	7	29	28	73	0	34	39	89	2	50	37	66	3	24	39
<i>S. aureus</i>	110	5	55	50	125	15	55	55	138	8	55	75	121	13	50	58
<i>S. epidermidis</i>	226	34	92	100	242	39	98	105	276	57	127	92	183	29	70	84
<i>S. pneumoniae</i>	36	4	16	16	55	13	20	22	31	5	10	16	30	2	12	16
OTROS	177	20	80	77	185	24	80	81	230	25	100	105	292	25	125	142
TOTAL	960	103	432	425	1120	152	468	500	1222	126	536	560	1239	97	468	674

-En la evolución a lo largo de los 10 años, destaca el incremento de *K.pneumoniae* en mayores de 65 años y en menores de 14 años en el año 2010, consecuencia de un brote en Neonatología.

3. Etiología en función del sexo

Se estudiaron las **bacteriemias totales** en función del sexo de los pacientes, y su **porcentaje** respecto al total. Se analizó globalmente (Tabla 26), y año a año, aunque los resultados se presentan para los años 1, 4, 7 y 10 del estudio (Tabla 27).

Tabla 26. Etiología de las bacteriemias en función del sexo. *: significativo.

MICROORGANISMO	SEXO		SEXO		TOTAL	%
	H	%	M	%		
<i>S. epidermidis</i>	1316	18,9	1102	24,2	2418	20,7
<i>E. coli</i>	1332	19,1	1050	23,0	2382	20,7
<i>S. aureus</i>	889	12,8	339	7,4	1228	10,7
<i>P. aeruginosa</i>	494	7,1	223	4,9	717	6,2
<i>K. pneumoniae</i>	393	5,6	251	5,5	644	5,6
<i>E. faecalis</i>	384	5,5	182	4,0	566	4,9
<i>S. pneumoniae</i>	222	3,2	137	3,0	359	3,1
<i>E. faecium</i>	240	3,4	103	2,3	343	3,0
<i>E. cloacae</i>	187	2,7	68	1,5	255	2,2
<i>A. baumannii</i>	125	1,8	49	1,1	174	1,5
OTROS	1380	19,8	1055	23,1	2435	21,1
TOTAL BACTERIEMIAS	6962	60,4	4559	39,6	11521	
SOSPECHAS DE BACTERIEMIA	32424	58,6	22932	41,4	55356	
SOSPECHAS CONFIRMADAS	21,5%		19,9%		20,8%	

-Las bacteriemias fueron significativamente más frecuentes en hombres (6962 frente a 4559, prácticamente un 53% más) ($p < 0,0001$), siendo así a lo largo de los 10 años de estudio (Figura 44). También en los hombres hubo un mayor porcentaje de bacteriemias confirmadas.

- En las mujeres, *S.epidermidis* y *E.coli* tuvieron mayor peso en el número total de bacteriemias ($p < 0,0001$), mientras que en los varones ocurrió con *S.aureus* -con un 12,8% frente a un 7,4%-, *P.aeruginosa*, *E.cloacae* (todo ello $p < 0,0001$), *E.faecium* y *E.faecalis* ($p = 0,0002$), y *A.baumannii* ($p = 0,0019$). Para *K.pneumoniae* y *S.pneumoniae* no se hallaron diferencias ($p > 0,05$).

Tabla 27. Evolución de la etiología de las bacteriemias en función del sexo.

MICROORGANISMO	2007			2010			2013			2016		
	TOTAL	H	M	TOTAL	H	M	TOTAL	H	M	TOTAL	H	M
<i>A. baumannii</i>	12	10	2	11	9	2	19	15	4	6	2	4
<i>E. cloacae</i>	24	19	5	19	13	6	24	20	4	46	31	15
<i>E. faecalis</i>	50	29	21	55	39	16	69	50	19	51	34	17
<i>E. faecium</i>	27	18	9	26	18	8	35	20	15	45	37	8
<i>E. coli</i>	204	118	86	252	132	120	246	146	100	298	162	136
<i>K. pneumoniae</i>	30	14	16	77	44	33	65	44	21	101	67	34
<i>P. aeruginosa</i>	64	43	21	73	49	24	89	58	31	66	51	15
<i>S. aureus</i>	110	74	36	125	94	31	138	96	42	121	93	28
<i>S. epidermidis</i>	226	122	104	242	132	110	276	144	132	183	105	78
<i>S. pneumoniae</i>	36	24	12	55	31	24	31	19	12	30	20	10
OTROS	177	117	60	185	115	70	230	140	90	292	180	112
TOTAL	960	588	372	1120	676	444	1222	752	470	1239	782	457

-Respecto a la evolución temporal, destacó el incremento de *K.pneumoniae* ($p < 0,0001$) en los hombres. Los porcentajes se pueden ver en la Figura 44.

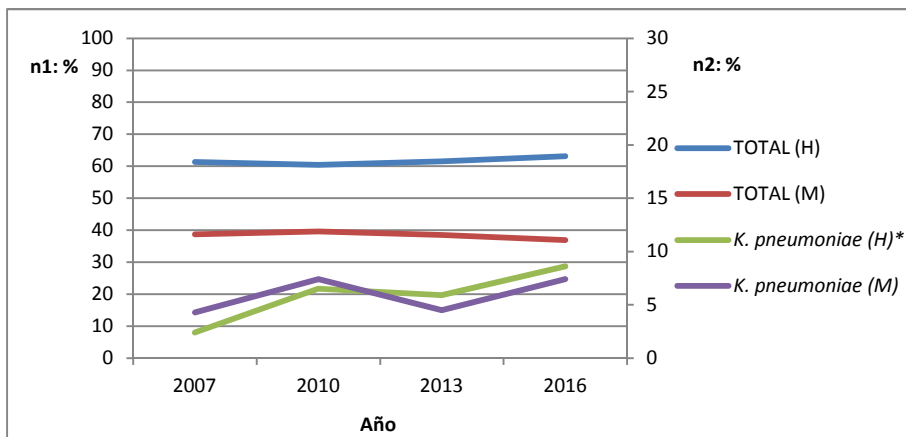


Figura 44. Evolución del porcentaje de bacteriemias en función del sexo (TOTAL -n1- y *K.pneumoniae* -n2-). *: significativo.

4. Etiología en función del mes de solicitud

Se estudiaron las bacteriemias totales por microorganismo y su porcentaje respecto al total en función del mes de solicitud (Tabla 28). Se analizó año a año pero se presentan los porcentajes totales de cada mes al no encontrarse diferencias significativas por años.

Tabla 28. Etiología de las bacteriemias en función del mes de solicitud. Porcentaje respecto al total.

MICROORGANISMO	MES												TOTAL
	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
<i>S. epidermidis</i>	23,1	19,1	19,2	28,7	21,7	17,3	20,6	24,6	20	19,7	16,9	20,8	21
<i>E. coli</i>	18	18,9	18,4	19,8	22,8	23,9	22,8	20,9	21,4	24,4	20,2	16,6	20,7
<i>S. aureus</i>	7,9	9,8	15,6	7,4	13	8,8	12,8	12,8	9,2	10,4	11,1	8,9	10,7
<i>P. aeruginosa</i>	7	6,9	4,4	5,2	4,6	8,4	6,8	5	6,7	8,7	4,8	5,9	6,2
<i>E. faecalis</i>	5,2	4,7	7	4	4,2	2,9	3,5	3,3	6,1	5,4	4,1	7,9	4,9
<i>K. pneumoniae</i>	5,5	6,5	5,3	3,4	3,2	7,5	5,5	7,8	8,1	3,7	5,3	4,9	5,6
<i>E. faecium</i>	3,6	2,9	2,8	2,7	0,9	3,1	2,8	2,4	2,4	3	5,9	3,5	3
<i>S. pneumoniae</i>	4,6	3,7	4,2	3,3	3,7	1,9	0,5	2	1,2	2,1	5,4	5,1	3,1
<i>E. cloacae</i>	2,3	1,4	1	2	2,3	1,9	2,6	2,5	3,7	2,5	1,5	2,5	2,2
<i>A. baumannii</i>	0,3	3,7	1,4	1,1	1,7	0,6	1	1	1,2	1,2	2,5	2,3	1,5
OTROS	22,4	22,3	20,5	22,3	21,9	23,6	21	17,8	20,3	18,6	22,3	21,5	21,1
TOTAL BACTERIEMIAS	974	938	959	901	895	883	956	1008	1006	1084	921	997	11521
SOSPECHAS DE BACTERIEMIA	5118	4728	5036	4666	4698	4362	4374	4331	4229	4661	4340	4813	55356
SOSPECHAS CONFIRMADAS	19,00%	19,80%	19,00%	19,30%	19,10%	20,20%	21,90%	23,30%	23,80%	23,30%	21,20%	20,70%	20,8

-Se observó estacionalidad para *E.coli* (mayor frecuencia de mayo a octubre) y *S.pneumoniae* (menor de junio a octubre) ($p < 0,0001$). Se representan en la Figura 45 junto con *S.epidermidis* y *S.aureus*. Para el resto de microorganismos se apreciaron oscilaciones pero no tendencias de varios meses consecutivos..

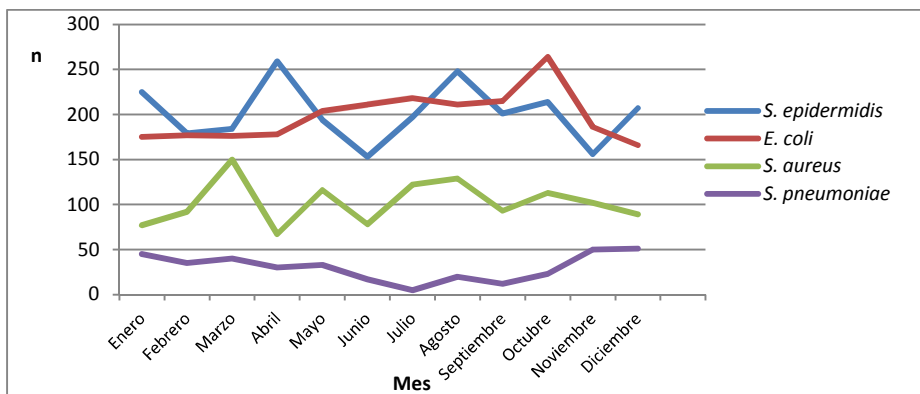


Figura 45. Variación mensual de las bacteriemias (n) por algunos microorganismos.

5. Etiología en función del servicio peticionario

Se estudiaron las **bacteriemias totales** en función del servicio solicitante, presentándose aquellos servicios con un número total de peticiones global superior a 5000, además de otros tres que no llegaron a dicha cifra: Cirugía General y Urología por ser los Servicios Quirúrgicos con más peticiones y la UVI de Neonatología (Tabla 29).

Tabla 29. Etiología de las bacteriemias en función del servicio solicitante (total de los 10 años).

Servicio	Microorganismo	n	Servicio	Microorganismo	n	Servicio	Microorganismo	n
Medicina Intensiva	<i>S. epidermidis</i>	339	Nefrología	<i>S. aureus</i>	96	Hematología	<i>S. epidermidis</i>	301
	<i>P. aeruginosa</i>	172		<i>E. coli</i>	91		<i>E. coli</i>	195
	<i>E. coli</i>	160		<i>S. epidermidis</i>	81		<i>P. aeruginosa</i>	103
	<i>S. aureus</i>	148		<i>K. pneumoniae</i>	31		<i>E. faecium</i>	77
	<i>K. pneumoniae</i>	83		<i>E. faecalis</i>	15		<i>S. aureus</i>	49
	<i>A. baumannii</i>	82		<i>P. aeruginosa</i>	14		<i>K. pneumoniae</i>	47
	<i>E. faecalis</i>	82		<i>E. faecium</i>	10		<i>E. faecalis</i>	46
	<i>E. cloacae</i>	55		<i>E. cloacae</i>	7		<i>E. cloacae</i>	28
	<i>E. faecium</i>	45		<i>S. pneumoniae</i>	5		<i>S. pneumoniae</i>	23
	<i>S. pneumoniae</i>	26		<i>A. baumannii</i>	3		<i>A. baumannii</i>	8
	OTROS	449		OTROS	135		OTROS	417
	TOTAL	1641		TOTAL	488		TOTAL	1294
Medicina Interna	<i>E. coli</i>	326	Digestivo	<i>E. coli</i>	331	Urología	<i>E. coli</i>	136
	<i>S. epidermidis</i>	178		<i>S. epidermidis</i>	102		<i>P. aeruginosa</i>	50
	<i>S. aureus</i>	167		<i>E. faecium</i>	68		<i>S. epidermidis</i>	26
	<i>S. pneumoniae</i>	68		<i>K. pneumoniae</i>	66		<i>K. pneumoniae</i>	17
	<i>K. pneumoniae</i>	53		<i>S. aureus</i>	64		<i>E. faecalis</i>	16
	<i>P. aeruginosa</i>	48		<i>P. aeruginosa</i>	43		<i>E. cloacae</i>	9
	<i>E. faecalis</i>	43		<i>E. faecalis</i>	30		<i>S. aureus</i>	8
	<i>E. cloacae</i>	10		<i>E. cloacae</i>	22		<i>E. faecium</i>	4
	<i>E. faecium</i>	8		<i>S. pneumoniae</i>	12		<i>A. baumannii</i>	1
	<i>A. baumannii</i>	2		<i>A. baumannii</i>	5		<i>S. pneumoniae</i>	0
	OTROS	429		OTROS	222		OTROS	93
	TOTAL	1332		TOTAL	965		TOTAL	360
Cirugía General	<i>E. coli</i>	120	Urgencias Generales	<i>E. coli</i>	194	Urgencias de Pediatría	<i>S. pneumoniae</i>	29
	<i>S. epidermidis</i>	99		<i>S. epidermidis</i>	52		<i>S. epidermidis</i>	29
	<i>S. aureus</i>	27		<i>S. aureus</i>	51		<i>S. aureus</i>	21
	<i>K. pneumoniae</i>	26		<i>S. pneumoniae</i>	42		<i>E. coli</i>	21
	<i>E. faecalis</i>	24		<i>K. pneumoniae</i>	30		<i>E. faecalis</i>	15
	<i>P. aeruginosa</i>	23		<i>P. aeruginosa</i>	29		<i>K. pneumoniae</i>	2
	<i>E. faecium</i>	19		<i>E. faecalis</i>	17		<i>E. cloacae</i>	0
	<i>E. cloacae</i>	11		<i>E. faecium</i>	8		<i>P. aeruginosa</i>	0
	<i>A. baumannii</i>	7		<i>E. cloacae</i>	6		<i>A. baumannii</i>	0
	<i>S. pneumoniae</i>	4		<i>A. baumannii</i>	1		<i>E. faecium</i>	0
	OTROS	161		OTROS	336		OTROS	34
	TOTAL	521		TOTAL	756		TOTAL	151
UVI de Neonatología			<i>S. epidermidis</i>	186	<i>P. aeruginosa</i>	12		
			<i>E. coli</i>	54	<i>E. faecium</i>	3		
			<i>K. pneumoniae</i>	49	<i>S. pneumoniae</i>	1		
			<i>E. faecalis</i>	37	<i>A. baumannii</i>	0		
			<i>E. cloacae</i>	24	OTROS	197		
			<i>S. aureus</i>	23	TOTAL	586		

-*S.epidermidis* fue, con mucha diferencia, el microorganismo más frecuente en Medicina Intensiva, Hematología y UVI de Neonatología.

En el resto de servicios, excepto Nefrología (*S.aureus*) y Urgencias de Pediatría (*S.pneumoniae* junto con *S.epidermidis*), *E.coli* fue el microorganismo que produjo mayor número de bacteriemias.

-*P.aeruginosa* destacó en Medicina Intensiva, Hematología y Urología.

-*A.baumannii* estuvo presente mayoritariamente en Medicina Intensiva.

-Respecto a la relación entre *E.faecalis* y *E.faecium*, *E.faecalis* fue más frecuente en todos los servicios, excepto en Hematología y Digestivo.

La evolución temporal se analizó año a año. Los resultados se presentan para los años 1, 4, 7 y 10, de 4 de los 5 servicios con mayor número de peticiones (en Urgencias Generales no pudimos valorar la evolución de los primeros años) y para aquellos microorganismos con un número total de bacteriemias de 100 como mínimo (Tabla 30).

Tabla 30. Evolución de la etiología de las bacteriemias en función del servicio solicitante.

Servicio	Microorganismo	2007	%	2010	%	2013	%	2016	%
UVI	<i>S. epidermidis</i>	40	19,9	35	23,5	40	22,5	27	19,1
	<i>P. aeruginosa</i>	21	10,4	26	17,4	28	15,7	11	7,8
	<i>E. coli</i>	24	11,9	22	14,8	24	13,5	13	9,2
	<i>S. aureus</i>	19	9,5	13	8,7	28	15,7	14	9,9
	TOTAL	201		149		178		141	
Hematología	<i>S. epidermidis</i>	15	13,9	36	34,3	40	33,3	36	24,3
	<i>E. coli</i>	20	18,5	26	24,8	16	13,3	18	12,2
	<i>P.aeruginosa</i>	10	9,3	5	4,8	11	9,2	15	10,1
	TOTAL	108		105		120		148	
M. Interna	<i>E. coli</i>	29	19,1	45	30,4	40	31,3	25	20,5
	<i>S. epidermidis</i>	33	21,7	28	18,9	10	7,8	14	11,5
	<i>S. aureus</i>	12	7,9	19	12,8	18	14,1	15	12,3
	TOTAL	152		148		128		122	
Digestivo	<i>E. coli</i>	29	34,1	36	35,3	34	40,5	43	41,3
	<i>S. epidermidis</i>	15	17,6	13	12,7	7	8,3	4	3,8
	TOTAL	85		102		84		104	

-El número de bacteriemias por *S.epidermidis* evolucionaron con los años: aumentaron en Hematología y disminuyeron en M.Interna y Digestivo. En el resto de casos hubo variaciones puntuales, pero no tendencias claras ascendentes o descendentes.

Objetivo 10: Estudiar los patrones de resistencia de dichos microorganismos y su evolución a lo largo de los 10 años.

1. Evolución de las resistencias por microorganismo

Se compararon las tasas de **sensibilidad** (aunque en el texto hablaremos básicamente de resistencias) de los 10 microorganismos ya comentados previamente (5 gram positivos y 5 gram negativos) viendo su evolución a lo largo de los 10 años de estudio. Se examinaron todos los antibióticos, pero se presentan aquellos con especial utilidad clínica, representativos de una familia de antibióticos, o donde se produjeron tendencias a lo largo de los años, omitiendo el resto (incluidos aquellos a los que el microorganismo en cuestión presenta resistencia intrínseca y aquellos que no estuvieron presentes en los 10 años completos del estudio). Lo podemos ver en las siguientes figuras:

1.1. Microorganismos gram negativos

Figuras 46 y 47. Evolución de las sensibilidades de *E.coli* (n total=2382).

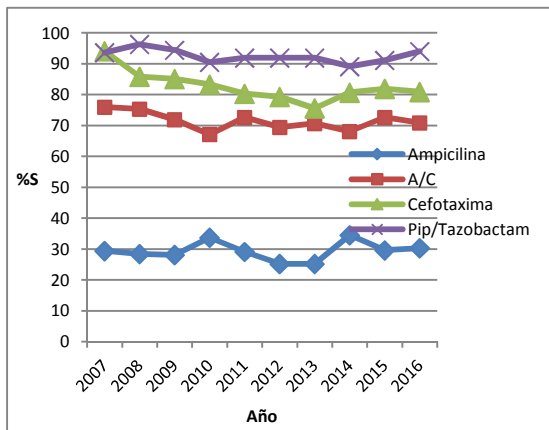


Figura 46. Porcentaje de cepas de *E.coli* sensibles a distintos antimicrobianos (I).
A/C: amoxicilina-ácido-clavulánico.
Pip/Tazobactam: piperacilina/tazobactam.

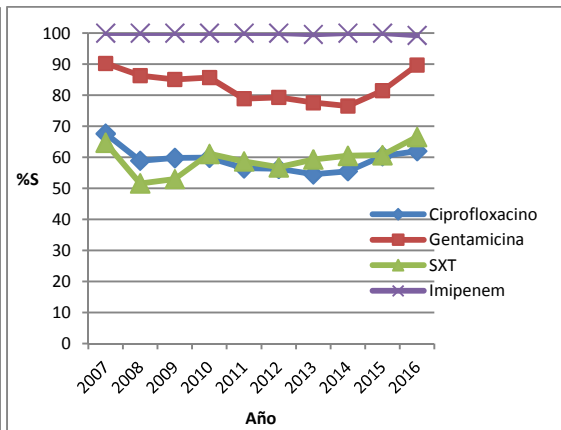


Figura 47. Porcentaje de cepas de *E.coli* sensibles a distintos antimicrobianos (II).
SXT: cotrimoxazol.

Se incrementaron las resistencias a cefalosporinas de 3ª generación (cefotaxima) –en base a las cepas productoras de BLEEs-, pasando de un 5% de las cepas a un 20% a lo largo del estudio. No se han objetivado apenas cepas productoras de carbapenemasas. Las sensibilidades se mantuvieron relativamente estables para el resto de antimicrobianos.

Figuras 48 y 49. Evolución de las sensibilidades de *K.pneumoniae* (n total=644):

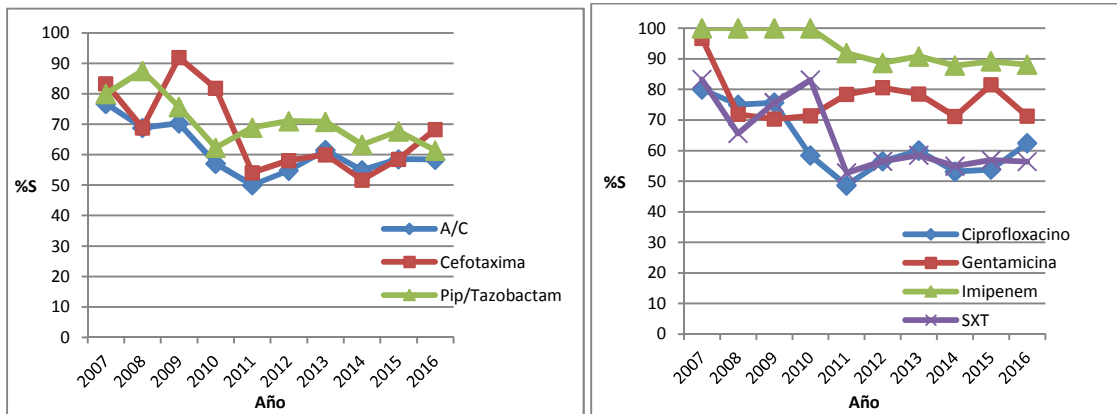


Figura 48. Porcentaje de cepas de *K.pneumoniae* sensibles a distintos antimicrobianos (I).
A/C: amoxicilina-ácido-clavulánico.
Pip/Tazobactam: piperacilina/tazobactam.

Figura 49. Porcentaje de cepas de *K.pneumoniae* sensibles a distintos antimicrobianos (II).
SXT: cotrimoxazol.

Significativo aumento de las resistencias. Inicialmente las tasas de BLEEs (resistencia a cefalosporinas de 3ª generación) estaban en un 10-20% de las cepas pero a partir de 2011 se situaron en el 40%. Asimismo, hasta ese año, no existían cepas productoras de carbapenemasas. En la actualidad el porcentaje de éstas es del 15% aproximadamente. También se objetiva una disminución de la sensibilidad para cotrimoxazol, ciprofloxacino y aminoglucósidos de un 20/30%.

Figuras 50 y 51. Evolución de las sensibilidades de *E.cloacae* (n total=255):

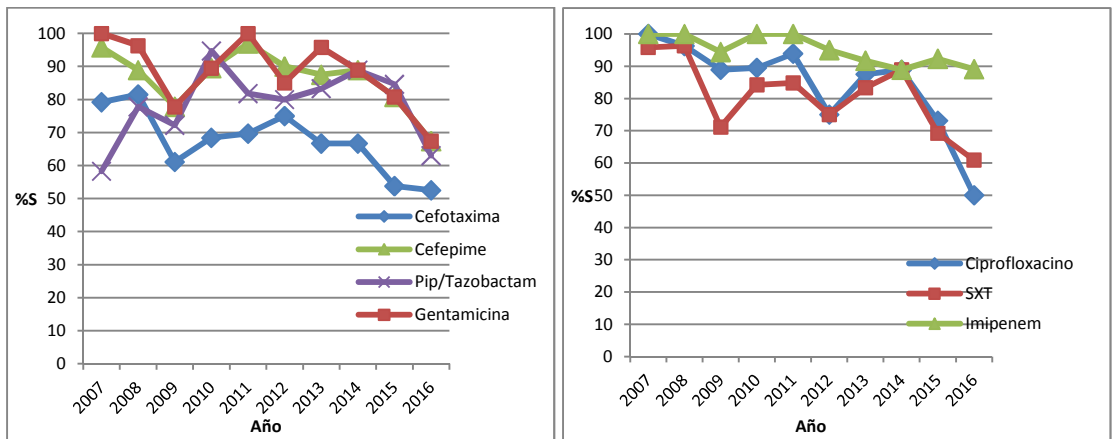


Figura 50. Porcentaje de cepas de *E.cloacae* sensibles a distintos antimicrobianos (I).
Pip/Tazobactam: piperacilina/tazobactam.

Figura 51. Porcentaje de cepas de *E.cloacae* sensibles a distintos antimicrobianos (II).
SXT: cotrimoxazol.

Inicialmente, la resistencia a cefalosporinas de 3ª generación rondaba el 20%, y al resto de antibióticos era casi uniformemente sensible. En la actualidad prácticamente el 50% son resistentes a cefalosporinas de 3ª generación y hasta un 10% de las cepas son productoras de carbapenemasas. La resistencia a la mayoría del resto de antibióticos también ha aumentado.

Figuras 52 y 53. Evolución de las sensibilidades de *P.aeruginosa* (n total=717):

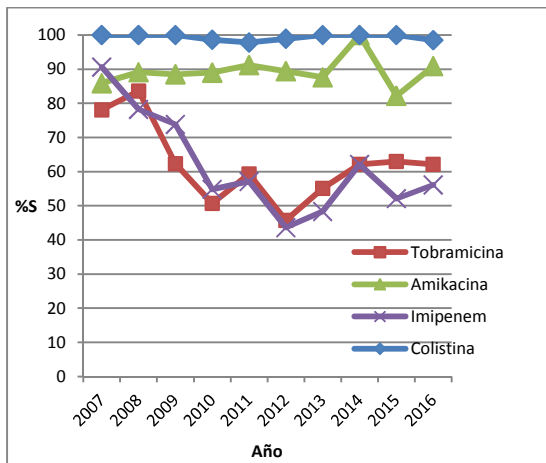


Figura 52. Porcentaje de cepas de *P.aeruginosa* sensibles a distintos antimicrobianos (I).

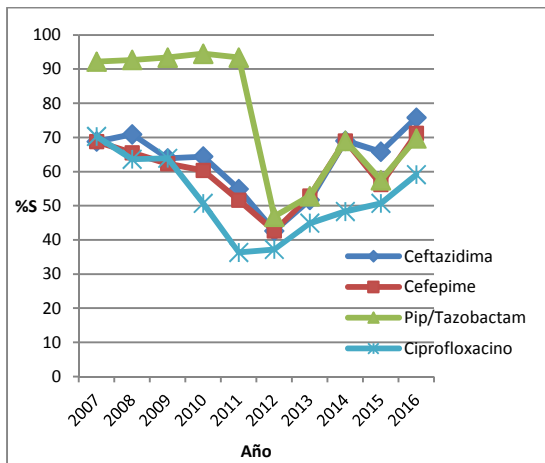


Figura 53. Porcentaje de cepas de *P.aeruginosa* sensibles a distintos antimicrobianos (II). Pip/Tazobactam: piperacilina/tazobactam.

Las tasas de resistencia se han mantenido o incrementado para todos los antibióticos, destacando que las cepas resistentes a carbapenemes han pasado de ser un 10% a casi un 50%. Colistina mantiene un buen perfil de sensibilidad.

Figuras 54 y 55. Evolución de las sensibilidades de *A.baumannii* (n total=174):

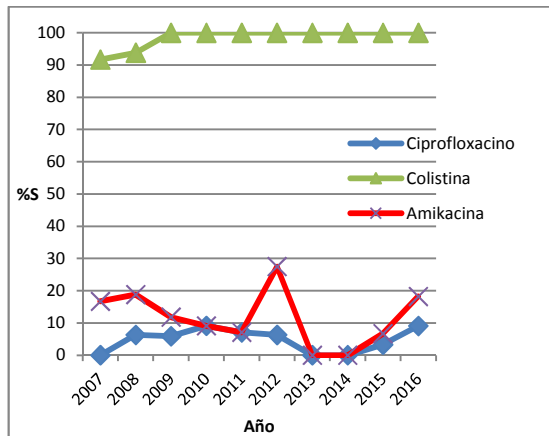


Figura 54. Porcentaje de cepas de *A.baumannii* sensibles a distintos antimicrobianos (I).

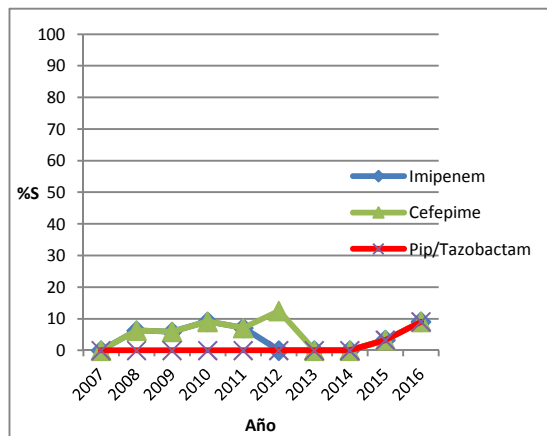


Figura 55. Porcentaje de cepas de *A.baumannii* sensibles a distintos antimicrobianos (II). Pip/Tazobactam: piperacilina/tazobactam.

Las tasas de sensibilidad fueron estables a lo largo de los diez años del estudio. Ya presentaba unas tasas de resistencia muy elevadas inicialmente, con sensibilidad únicamente a colistina y así se mantuvieron con el tiempo.

1.2. Microorganismos gram positivos

Figuras 56 y 57. Evolución de las sensibilidades de *S.aureus* (n total=1228):

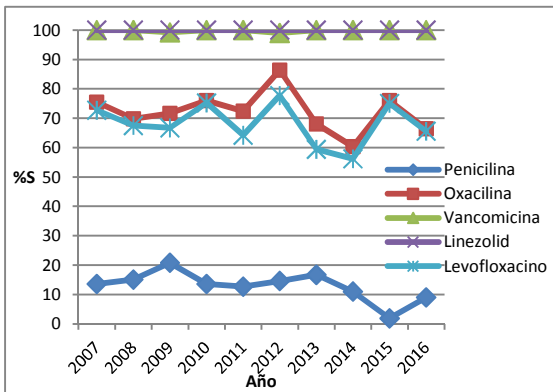


Figura 56. Porcentaje de cepas de *S.aureus* sensibles a distintos antimicrobianos (I).

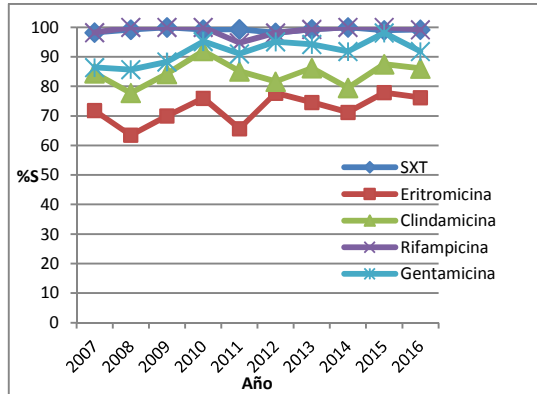


Figura 57. Porcentaje de cepas de *S.aureus* sensibles a distintos antimicrobianos (II). SXT: cotrimoxazol.

Las tasas de resistencia se han mantenido bastante estables a lo largo de estos diez años, con resistencia a oxacilina en el 30% de las cepas, sensibilidad a penicilina en el 10%, sin resistencia apenas a cotrimoxazol y con tasas de resistencia a levofloxacino y aminoglucósidos del 20-30%.

Figuras 58 y 59. Evolución de las sensibilidades de *S.epidermidis* (n total=2418):

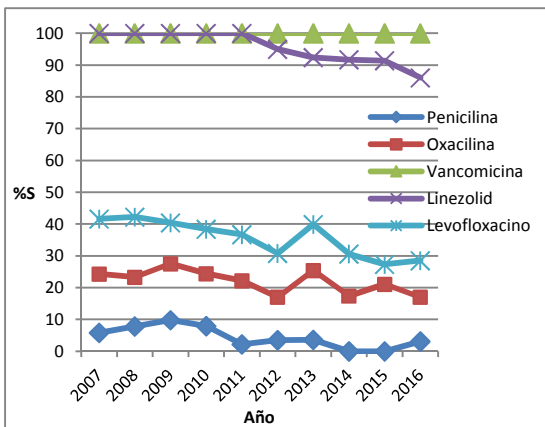


Figura 58. Porcentaje de cepas de *S.epidermidis* sensibles a distintos antimicrobianos (I).

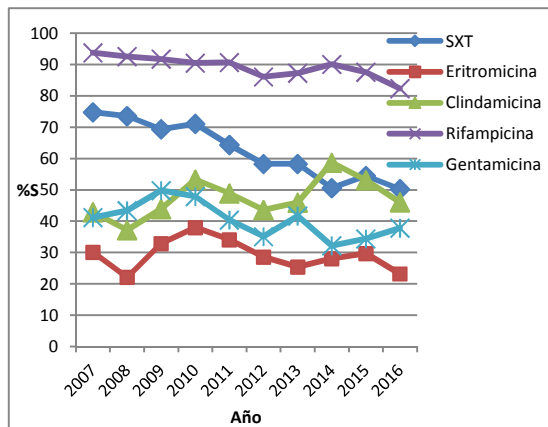


Figura 59. Porcentaje de cepas de *S.epidermidis* sensibles a distintos antimicrobianos (II). SXT: cotrimoxazol.

Las tasas de sensibilidad han disminuido ligeramente. Presentó una gran resistencia a la mayoría de antimicrobianos de uso clínico: aminoglucósidos (60-70%), levofloxacino (60-70%) y cotrimoxazol (incrementándose notoriamente hasta el 50%). El porcentaje de cepas sensibles a oxacilina fue del 20%, mientras que la sensibilidad a penicilina prácticamente no existió. Respecto al linezolid, se ha pasado de una sensibilidad prácticamente uniforme a llegar el último año a una tasa de resistencia del 15%.

Figuras 60 y 61. Evolución de las sensibilidades de *E. faecalis* (n total=566):

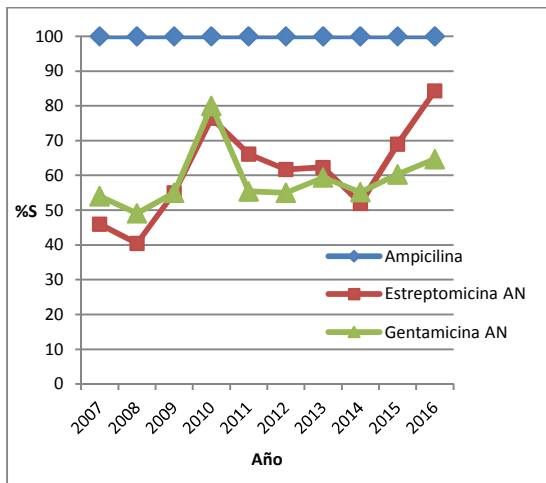


Figura 60. Porcentaje de cepas de *E. faecalis* sensibles a distintos antimicrobianos (I).

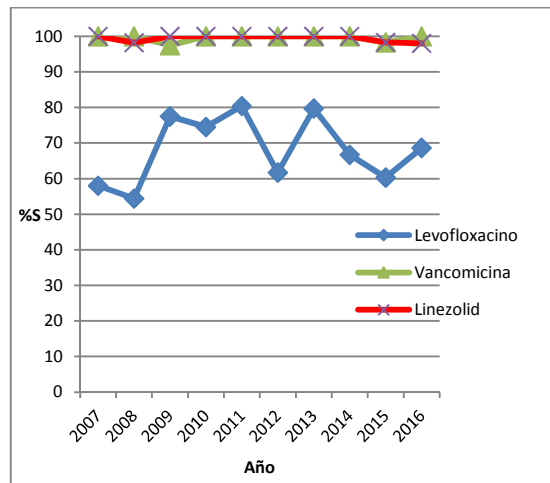


Figura 61. Porcentaje de cepas de *E. faecalis* sensibles a distintos antimicrobianos (II).

Figuras 62 y 63. Evolución de las sensibilidades de *E. faecium* (n total=343):

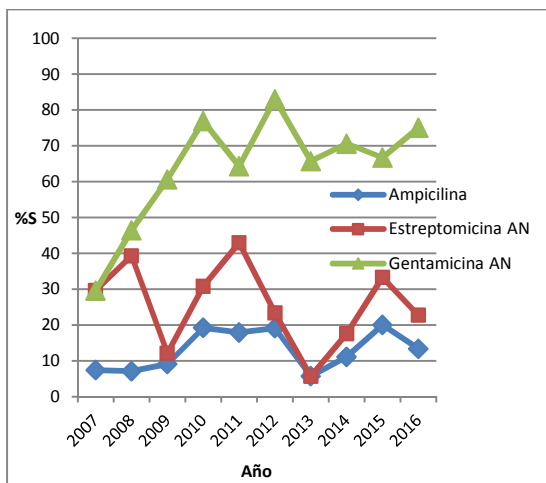


Figura 62. Porcentaje de cepas de *E. faecium* sensibles a distintos antimicrobianos (I).

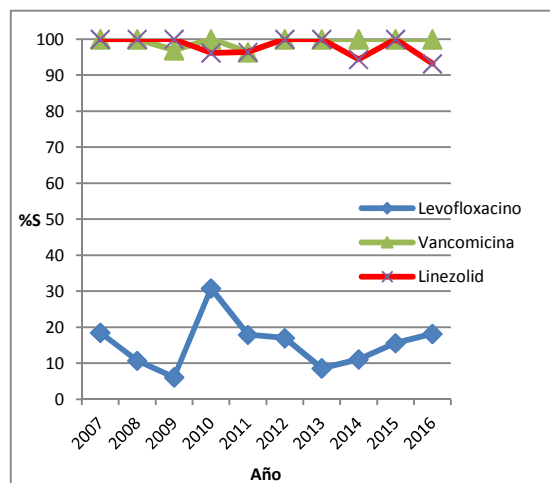


Figura 63. Porcentaje de cepas de *E. faecium* sensibles a distintos antimicrobianos (II).

Para los enterococos no se han incrementado las resistencias; al contrario, la resistencia a aminoglucósidos de alto nivel ha disminuido. Para el resto de antibióticos se ha mantenido estable. En los últimos años han empezado a aparecer resistencias a linezolid.

Figuras 64 y 65. Evolución de las sensibilidades de *S.pneumoniae* (n total=359):

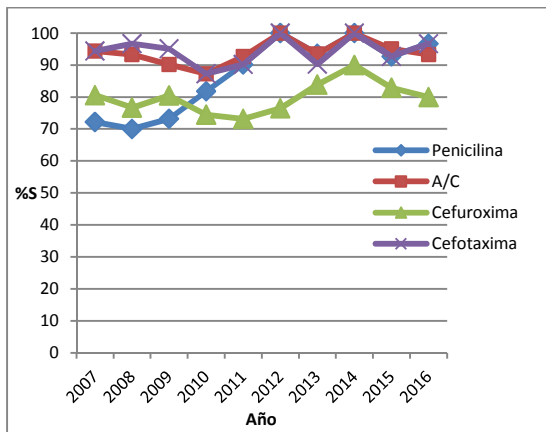


Figura 64. Porcentaje de cepas de *S.pneumoniae* sensibles a distintos antimicrobianos (I).
A/C: amoxicilina/ácido clavulánico.

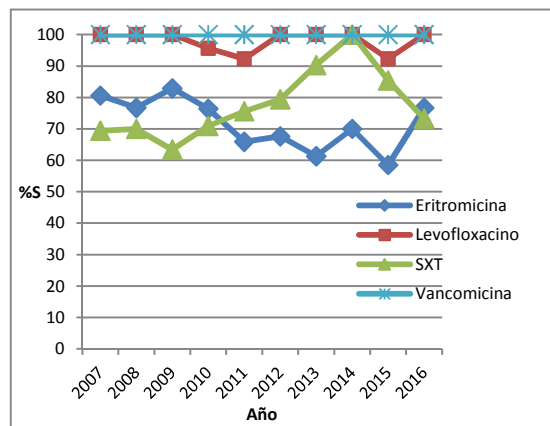


Figura 65. Porcentaje de cepas de *S.pneumoniae* sensibles a distintos antimicrobianos (II).
SXT: cotrimoxazol.

Se ha producido un aumento de la sensibilidad a penicilina pasando de tener un 30% de cepas resistentes a prácticamente ninguna en la actualidad. Al resto de antimicrobianos de uso clínico presentó bastante sensibilidad, y sin cambios a lo largo de los años.

2. Evolución de las resistencias (microorganismo y servicio)

Estudiamos la variación de los patrones de resistencia de los 10 microorganismos más frecuentes en función del servicio en el que se hubieron aislado. Se consideró un mínimo de 15 aislados por Servicio y año, lo que ocurre en casos limitados. Por tanto, aquí reflejamos los resultados del primer y último año de aquellos Servicios y microorganismos con un número total de bacteriemias de 150 el total de la década de estudio.

Tabla 31. Evolución de las sensibilidades en Medicina Intensiva: *S.epidermidis* (n=339), *P.aeruginosa* (n=172) y *E.coli* (n=160).

<i>S. epidermidis</i>	%S		<i>P. aeruginosa</i>	%S		<i>E. coli</i>	%S	
	2007	2016		2007	2016		2007	2016
Año	2007	2016		2007	2016		2007	2016
n	40	27		21	11		24	13
Penicilina	8,8	4	Ciprofloxacino	77,8	63	Ampicilina	27,3	38,5
Oxacilina	14,7	8	Tobramicina	88,9	72	A/C	72,7	53,9
Levofloxacino	23,5	12	Amikacina	88,9	90	Ciprofloxacino	54,5	69,2
SXT	41,2	20	Imipenem	88,9	72	SXT	63,6	76,9
Gentamicina	32,4	16	Ceftazidima	55,6	81	Gentamicina	95,5	100
Eritromicina	32,4	16	Cefepime	66,7	72	Imipenem	100	100
Clindamicina	38,2	24	Pip/Tazobactam	83,3	72	Cefotaxima	90,9	84,6
Rifampicina	94,1	60	Colistina	100	100	Pip/Tazobactam	86,4	100
Vancomicina	100	100						
Linezolid	100	64						

-*S.epidermidis* sufrió un gran incremento de resistencias, superior al reflejado en los resultados globales. *E.coli* experimentó un incremento de resistencias con aparición de cepas productoras de BLEE. Para *K.pneumoniae* las tasas de producción de BLEEs se dispararon hasta el 50% en los años finales del estudio y se produjo la aparición de cepas productoras de carbapenemasas. También para *P.aeruginosa* se produjo un aumento significativo de la resistencia a carbapenemes.

Tabla 32. Evolución de las sensibilidades en Hematología: *S.epidermidis* (n=301) y *E.coli* (n=195).

<i>S. epidermidis</i>	%S		<i>E. coli</i>	%S	
	2007	2016		2007	2016
n	15	36		20	18
Penicilina	0	4,4	Ampicilina	20	9
Oxacilina	20	18,8	A/C	80	68,2
Levofloxacino	46,7	26,1	Ciprofloxacino	65	50
SXT	80	24,6	SXT	45	31,8
Gentamicina	66,7	31,9	Gentamicina	90	100
Eritromicina	33,3	18,8	Imipenem	100	100
Clindamicina	53,3	44,9	Cefotaxima	100	90,9
Rifampicina	93,3	75,4	Pip/Tazobactam	90	90,9
Vancomicina	100	100			
Linezolid	100	85,5			

Se produjo una disminución de las sensibilidades, de manera moderada en *E.coli*, y más acusada en *S.epidermidis* (excepto betalactámicos), con aparición de resistencias a linezolid.

Tabla 33. Evolución de las sensibilidades en Medicina Interna: *E.coli* (n=326), *S.epidermidis* (n=178) y *S.aureus* (n=167).

<i>E.coli</i>	%S		<i>S.epidermidis</i>	%S		<i>S.aureus</i>	%S	
	2007	2016		2007	2016		2007	2016
Año	2007	2016	n	2007	2016	n	2007	2016
n	29	25	n	33	14	n	12	15
Ampicilina	31,0	20,0	Penicilina	0,0	7,1	Penicilina	8,3	13,3
A/C	72,4	64,0	Oxacilina	24,2	35,7	Oxacilina	58,3	53,3
Ciprofloxacino	65,5	48,0	Levofloxacino	30,3	35,7	Levofloxacino	66,7	40,0
SXT	65,5	72,0	SXT	72,7	64,3	SXT	100,0	100,0
Gentamicina	93,1	84,0	Gentamicina	36,4	42,9	Gentamicina	83,3	93,3
Imipenem	100,0	100,0	Eritromicina	42,4	35,7	Eritromicina	75,0	73,3
Cefotaxima	96,6	80,0	Clindamicina	51,5	85,7	Clindamicina	83,3	93,3
Pip/Tazobactam	96,6	92,0	Rifampicina	84,8	92,9	Rifampicina	100,0	100,0
			Vancomicina	100,0	100,0	Vancomicina	100,0	100,0
			Linezolid	100,0	92,9	Linezolid	100,0	100,0

Se siguieron los patrones generales ya comentados. El porcentaje de *S.aureus* resistente a oxacilina se mantuvo cercano al 50% de las cepas, superior a los números globales.

Tabla 34. Evolución de las sensibilidades en Digestivo: *E.coli* (n=331). Urgencias Generales: *E.coli* (n=194). UVI de Neonatología: *S.epidermidis* (n=186).

<i>E.coli</i>	Digestivo		Urgencias Generales				UVI Neonatología	
	%S		<i>E.coli</i>	%S		<i>S.epidermidis</i>	%S	
	2010	2016		2010	2016		2007	2013
n	29	43	n	11	71	n	16	34
Ampicilina	44,8	44,2	Ampicilina	36,4	31	Penicilina	0	0
A/C	89,7	79,1	A/C	81,8	78,9	Oxacilina	0	8,8
Ciprofloxacino	69,0	74,4	Ciprofloxacino	72,7	64,8	Levofloxacino	68,8	55,9
SXT	79,3	69,8	SXT	81,8	71,8	SXT	100	97,1
Gentamicina	96,6	95,3	Gentamicina	100	80,3	Gentamicina	12,5	14,7
Imipenem	100	100	Imipenem	100	98,6	Eritromicina	0	5,9
Cefotaxima	100	79,1	Cefotaxima	81,8	84,5	Clindamicina	6,3	14,7
Pip/Tazobactam	96,6	95,3	Pip/Tazobactam	100	94,4	Rifampicina	100	100
						Vancomicina	100	100
						Linezolid	100	100

Digestivo: como ya comentamos, destacó la aparición de resistencias a cefalosporinas de tercera generación (en la actualidad alrededor del 20% de las cepas).

Urgencias Generales: el estudio en este caso se refiere a los años 2010 y 2016, al no haber aislados suficientes en 2007. En el año 2010 las tasas de BLEEs ya rondaban el 20% y se mantuvieron. Disminuyó la sensibilidad a SXT, ciprofloxacino y aminoglucósidos.

UVI de Neonatología: el estudio en este caso se refiere a los años 2007 y 2013, al no haber aislados en 2016. Las tasas de resistencia ya eran muy altas en 2007 y se mantuvieron en 2013.

3. Análisis de resistencias 2016: ingresados y urgencias

En el año 2016 se compararon las resistencias en pacientes ingresados y en pacientes que habían acudido al Servicio de Urgencias Generales. Valoramos aquellos microorganismos con al menos 10 bacteriemias en Urgencias.

Tabla 35. Comparativa de sensibilidades entre microorganismos aislados en pacientes ingresados y Urgencias (año 2016).

<i>E. coli</i>	INGRESADOS (%S)	URGENCIAS (%S)	<i>S. aureus</i>	INGRESADOS (%S)	URGENCIAS (%S)
n	227	71	n	109	12
Ampicilina	30,1	31	Penicilina	9,0	8,3
A/C	68,1	78,9	Oxacilina	66,3	66,7
Ciprofloxacino	60,9	64,8	Levofloxacino	65,6	66,7
SXT	64,8	71,8	SXT	99,2	100,0
Gentamicina	89,7	80,3	Gentamicina	91,8	91,7
Imipenem	99,3	98,6	Eritromicina	76,2	66,7
Cefotaxima	79,6	84,5	Clindamicina	86,1	83,3
Pip/Tazobactam	93,8	94,4	Rifampicina	99,2	100,0
			Vancomicina	100,0	100,0
			Linezolid	100,0	100,0
<i>S. epidermidis</i>	INGRESADOS (%S)	URGENCIAS (%S)	<i>S. pneumoniae</i>	INGRESADOS (%S)	URGENCIAS (%S)
n	167	16	n	17	13
Penicilina	3,1	0,0	Penicilina	96,7	92,9
Oxacilina	17,0	31,3	A/C	93,3	100
Levofloxacino	28,5	56,3	Cefuroxima	80,0	71,4
SXT	50,3	93,8	Cefotaxima	96,7	100
Gentamicina	37,8	68,8	Eritromicina	76,7	71,4
Eritromicina	23,2	31,3	Levofloxacino	100,0	100
Clindamicina	46,1	68,8	SXT	73,3	64,3
Rifampicina	82,4	100,0	Vancomicina	100,0	100
Vancomicina	100,0	100,0			
Linezolid	86,0	100,0			

Para *E.coli*, *S.aureus* y *S.pneumoniae* no fue significativa la diferencia de sensibilidades entre los 2 tipos de cepas; sí para *S.epidermidis* (las cepas procedentes del Servicio de Urgencias – cepas “comunitarias”- presentaron tasas de resistencia más bajas a todos los antimicrobianos de uso clínico.

Objetivo 11: Evaluar la influencia de los cambios tecnológicos habidos en el laboratorio en los tiempos de respuesta de emisión de informes de resultados.

Se estudiaron los tiempos de respuesta previos y posteriores a los cambios acaecidos en el laboratorio en el año 2014 (Pre-MALDI-TOF MS y Post-MALDI-TOF MS, principalmente). Estos tiempos de respuesta eran referidos a la información proporcionada al clínico responsable del paciente acerca de un microorganismo causante de bacteriemia, a nivel de identificación y susceptibilidad antibiótica, y con distinto grado de precisión. Para ello se analizó dicha información acerca de los 100 primeros microorganismos causantes de bacteriemia en los años 2013 y 2016. Los datos se pueden ver en la Tabla 36.

Tabla 36. Tiempos para la emisión de información en función del algoritmo diagnóstico.

TIPO DE IDENTIFICACIÓN	TIPO DE TURNO	n	Tiempo promedio (h.)/AÑO	
			Pre-MALDI-TOF MS	Post-MALDI-TOF MS
Gram (morfotipo)	Turno habitual	60	2,5	2,5
	Turno de guardia	40	1	1
	GLOBAL	100	1,9	1,9
Identificación provisional	Turno habitual	60	24,2	10,1
	Turno de guardia	40	16,8	9,9
	GLOBAL	100	21,2	10
Antibiograma provisional	Turno habitual	60	24,2	17,9
	Turno de guardia	40	16,8	14,4
	GLOBAL	100	21,2	16,6
Identificación definitiva	Turno habitual	60	47,3	10,1
	Turno de guardia	40	36,5	9,9
	GLOBAL	100	43,2	10
Antibiograma definitivo	Turno habitual	60	43,2	36
	Turno de guardia	40	36	33,6
	GLOBAL	100	40,3	35

-Como se puede ver, la ganancia de tiempo con el algoritmo nuevo es significativa ($p < 0,05$) en prácticamente todos los casos. Principalmente a nivel de identificación del microorganismo (entre 11,2 y 33,2 horas de mejora, al ser, con MALDI-TOF MS, la identificación provisional y la definitiva idénticas).

-A nivel de antibiograma, se obtuvieron mejoras de 5,6 y 5,3 horas referidas al antibiograma provisional y definitivo respectivamente.

DISCUSIÓN

La sepsis es un síndrome clínico de extremada gravedad, con una mortalidad muy elevada, una incidencia en ascenso, y unos costes muy importantes. Todo esto ha generado la necesidad en el entorno sanitario de optimizar su diagnóstico y su manejo, implicando a profesionales de distintos campos: clínicos, microbiólogos, farmacéuticos, preventivistas...

La variable fundamental que influye en la mortalidad y costes derivados de la sepsis es el tiempo. Es sabido que la mortalidad se incrementa un 7,6% por cada hora sin un tratamiento antimicrobiano adecuado (Kumar et al., 2006), y se estima que entre el 25% y el 33% de los pacientes reciben una terapia incorrecta el primer día (Verroken et al., 2016) (Rodríguez Díaz et al., 2017). La reducción de mortalidad pasa, por tanto, por tratamientos empíricos mejor diseñados y, fundamentalmente, por pasar lo antes posible a tratamientos dirigidos (Weinbren et al., 2018).

Dentro del enfoque multidisciplinar comentado, el Servicio de Microbiología es uno de los pilares fundamentales pues su labor es la de confirmar la bacteriemia, paso obligado de una infección hacia la sepsis, de una manera rápida y fiable. La optimización de las técnicas diagnósticas existentes y la incorporación de otras nuevas apuntan hacia este objetivo, así como la mejora de la fase preanalítica y el análisis de la etiología y los patrones de resistencia de los distintos microorganismos implicados.

Este trabajo está centrado en el estudio de las bacteriemias en el Servicio de Microbiología, desde el punto de vista del laboratorio, analizando las variables que influyen en las fases preanalítica, analítica y postanalítica, y utilizando los datos proporcionados por los programas de gestión de laboratorio. No se revisaron las historias clínicas de los pacientes. De esta manera ciertos datos clínicos fueron innacesibles: no pudimos hablar de foco de infección ni hacer la distinción entre bacteriemia comunitaria o nosocomial.

FASE PREANALÍTICA

Así como el clínico es el que decide cuándo solicitar hemocultivos, el Servicio de Microbiología participa, junto con Enfermería, en la elaboración de protocolos para la fase preanalítica (Willems et al., 2012). Los indicadores de calidad de dicha fase (Willems et al., 2012), que se deberían monitorizar, controlar e intentar mejorar, son los siguientes:

- Volumen extraído (influye en el rendimiento del hemocultivo) (Cockerill et al., 2004).
- Tiempo de procesamiento (puede condicionar el rendimiento del hemocultivo y los tiempos de positividad) (Mancini et al., 2010).
- Número de hemocultivos contaminados (suponen un aumento de los costes y la morbilidad (Hall y Lyman, 2006; Garcia et al., 2015)).

De estos indicadores, solamente pudimos monitorizar el tiempo de procesamiento y el número de hemocultivos contaminados.

Limitación del estudio: la ejecución de esta fase no dependió directamente del Servicio de Microbiología. Existían indicaciones acerca de cómo realizar las extracciones de sangre, a nivel de tiempo, volumen y número de muestras, y de cómo realizar la conservación y transporte, pero su cumplimiento no fue monitorizable.

Objetivo 1: Estudiar la evolución de las solicitudes de hemocultivo en un hospital de tercer nivel a lo largo de un período de 10 años y su relación con factores demográficos como la edad, el sexo, la estacionalidad o el Servicio solicitante.

El número de hemocultivos recibidos va a ser dependiente del tipo de hospital (en nuestro caso un hospital de tercer nivel), del tamaño poblacional del área sanitaria y de las características de la población que atiende (una población envejecida es un factor de riesgo de bacteriemia (Henriksen et al., 2015)).

Nuestro promedio de solicitudes ha sido de aproximadamente 15000 hemocultivos al año, con más de 5000 sospechas de bacteriemia o episodios clínicos, y habitualmente más de 1000 bacteriemias valorables anuales confirmadas, lo que lleva a una incidencia, con los datos de población disponibles, de unos 350 episodios de bacteriemia confirmados por 100000 habitantes. Estas cifras se incrementaron paulatinamente entre 2007 y 2016 (un 17% el número de hemocultivos, un 18,9% las sospechas clínicas, un 29,1% las bacteriemias confirmadas, y un 10,8% la incidencia). Esto coincide con lo descrito en la literatura, en la que

se demuestra que la incidencia de la sepsis va en aumento, y por ende, su causa fundamental, la bacteriemia. Concretamente, en un estudio comparativo realizado en los EE.UU. entre 1979 y 2000, los casos de sepsis se incrementaron anualmente un 8,7%, pasando de 83 a 240 episodios por cada 100000 habitantes (Martin et al., 2003). Ya con datos del presente siglo, Hall et al. (2011) y Walkey et al. (2015) también encuentran este incremento. En nuestro mismo hospital, en los años 80, las bacteriemias tuvieron una incidencia claramente inferior, de 218 casos por cada 100000 habitantes (Vázquez et al., 1994), con un incremento aproximado del 60% de los años 80 a los años de este estudio, de manera paralela al número total de hemocultivos procesados (58039 en 10 años -unos 5800 de promedio anual, frente a los más de 15000 actuales-).

La solicitud de hemocultivos está relacionada con una serie de características epidemiológicas de los pacientes, como el sexo, la edad, la estacionalidad o el Servicio solicitante.

a) El número de peticiones de hemocultivos, según nuestros datos, ha sido mayor para los varones que para las mujeres (un 50% más). Esto estaba descrito en nuestro mismo entorno ya hace 30 años, con un 70% más de solicitudes en los años 80 (Vázquez et al., 1994), y es algo conocido en la literatura (Mayr et al., 2013).

b) Comparar el número de hemocultivos solicitados entre edad pediátrica y adulta es complejo, pues además de ser pacientes con características muy diferentes, los episodios clínicos en edad pediátrica se resolvieron con un único hemocultivo por dos de los adultos. Lo que más llama la atención es la significativa disminución de los hemocultivos pediátricos a lo largo de los 10 años. Hace tiempo que se sabe que la rentabilidad de la extracción de hemocultivos en edad pediátrica es baja, y la tasa de contaminaciones alta (Hall y Lyman, 2006). Esto es debido a dos razones fundamentalmente. En estos pacientes la etiología vírica predomina sobre la bacteriana (Román Riechmann et al., 2010; García y Fresnadillo, 2002), siendo los hemocultivos pediátricos raramente positivos en infecciones respiratorias y de piel y partes blandas (Parikh et al., 2014). Además, el hecho de que para pacientes pediátricos únicamente se extraiga un hemocultivo hace perder rendimiento a esta petición, cuyo resultado puede ser confuso como consecuencia de la difícil interpretación de los microorganismos que pueden causar contaminaciones. Esto condiciona que, según publicaciones recientes (Parikh et al., 2014), la solicitud de hemocultivos en pacientes pediátricos esté justificada en pocas circunstancias y acaba suponiendo cambios en los protocolos de los servicios pediátricos que llevan a una disminución del número de solicitudes.

c) No se encontró estacionalidad significativa en nuestro estudio al respecto del número de peticiones recibidas. Algunos años sí se encuentra un mayor número de peticiones en los meses de invierno, que se justificaría por un repunte de la patología respiratoria en esa época del año (ya descrito en los años 80 del pasado siglo por Weinstein et al. (1983).

d) Los servicios que solicitaron más hemocultivos no sufrieron modificaciones. En este orden: Medicina Intensiva, Hematología, Medicina Interna, Urgencias Generales y Digestivo; si bien el dato de Urgencias Generales merece un comentario aparte, pues está sesgado hasta la llegada de los nuevos programas informáticos; a partir de 2014, sería el Servicio con mayor número de peticiones. También apreciamos una demanda de peticiones muy superior de los Servicios médicos respecto a los quirúrgicos (Cirugía General es el primer servicio quirúrgico, en la novena posición global). Hay pocas referencias bibliográficas respecto a todo esto; corroboran nuestros datos a nivel de la importancia del Servicio de Urgencias Generales (Weinstein et al., 1997) y también encuentran un número de peticiones más elevado en los servicios médicos (Weinstein et al., 1983; Angus et al., 2001). Estos datos se explican por el hecho de que son servicios que manejan patologías infecciosas que frecuentemente cursan con bacteriemia (Medicina Interna, Urgencias Generales, Digestivo), por ser los servicios en los cuales las bacteriemias nosocomiales son más frecuentes (Medicina Intensiva) o por manejar pacientes de mayor gravedad, en los cuales la solicitud de hemocultivos se justifica con mayor facilidad (Hematología).

e) Con el paso de los años, las solicitudes de Medicina Intensiva, Medicina Interna, Cirugía General y Urología disminuyeron, en tanto que las de Anestesiología, Cardiología y principalmente Hematología subieron su número de peticiones. Una posible causa en M.Intensiva sería la implementación en la misma del programa *Bacteriemia Zero*, pues está demostrada su relación con la disminución de bacteriemias relacionadas con el catéter (Alvarez-Lerma et al., 2014). En el resto de casos no encontramos apoyo bibliográfico ni justificación sencilla.

Limitaciones del estudio: en el año 2014, como consecuencia de la implantación del sistema de gestión de historias clínicas Millennium y el cambio de sistema informático en el laboratorio, ocurrieron una serie de eventos, que no dependieron del Servicio de Microbiología, que justifican alguno de los resultados presentados:

-En el año 2014 el número de peticiones del tipo de servicio Otros/Desconocido es muy superior al resto de años.

-Previamente a 2014, la mayoría de los hemocultivos de Urgencias Generales se terminaban registrando en el servicio destino del paciente, de ahí su bajo número.

-A partir de 2014 todos los servicios pediátricos se van integrando progresivamente, a nivel informático, en uno genérico: Pediatría. En 2016 ya recoge todas las peticiones.

-A partir de 2014 Obstetricia se integra en Ginecología.

-A partir de 2014 los hemocultivos de consultas desaparecen como entidad propia, integrándose en el servicio correspondiente.

Objetivo 2: Evaluar el tiempo de procesamiento del hemocultivo.

El tiempo que se tarda en procesar los hemocultivos puede tener una serie de consecuencias, que relacionamos con nuestro estudio de la siguiente manera:

-Influye de manera evidente en el tiempo de respuesta.

-Puede influir disminuyendo la rentabilidad neta del hemocultivo (porcentaje de hemocultivos positivos) (Saito et al., 2009).

La mayoría de las referencias recientes sugiere un tiempo máximo de procesamiento de 2 horas (Baron et al., 2005) o 4 horas (Isenberg, 2010), mientras que otras guías hablan de un máximo de 18 horas (Loza et al., 2003) sin que suponga pérdida de rendimiento del hemocultivo. En nuestro estudio en el 72,1% de las peticiones el tiempo de procesamiento no superó los estándares de 4 horas, y no hubo influencia en el rendimiento del hemocultivo hasta superar las 18 horas, lo que ocurrió sólo en el 5% de los casos. Acerca de este tema, una revisión reciente coincide con nuestro estudio y sólo ve influencia en la rentabilidad a partir de las 24 horas de retraso (Kirn y Weinstein, 2013).

-Puede influir incrementando los tiempos de positividad (Saito et al., 2009).

Nosotros no hemos encontrado relación entre el tiempo de procesamiento y el tiempo de positividad en los verdaderos positivos. Sí, en cambio, en el caso de las contaminaciones, en las que se aprecia una disminución del tiempo de positividad a medida que el tiempo de procesamiento aumenta; quizá pueda estar relacionado con el menor inóculo presente en las contaminaciones. No se encontraron referencias de este tema concreto.

Por tanto, podemos concluir que, según nuestros datos, el tiempo de procesamiento apenas influye en la rentabilidad del hemocultivo pero sí en los tiempos de respuesta. Para tratar de minimizar el tiempo de procesamiento, es necesario optimizar los flujos de transporte. En nuestro hospital se han realizado actuaciones con este objetivo, principalmente con el uso de botellas de plástico que permiten la utilización del tubo neumático para el transporte, si bien su influencia real no se pudo comprobar pues los tiempos de procesamiento previos a 2014 no fueron conocidos.

Objetivo 3: Evaluar los resultados y contaminaciones del hemocultivo.

Con respecto al análisis de la tasa de positividad, ésta fue de alrededor de un 15%, de manera estable a lo largo de los diez años. Esto coincide con la literatura, que, aunque con variabilidad, se mueve en cifras similares: Cisneros-Herreros et al. (2007) la sitúan entre un 2 y un 20%; Wilson et al. (2015) entre un 8 y un 12%.

Estas tasas de positividad tan bajas se pueden justificar por varias razones:

-Debido a la importancia de la sepsis y a su elevada mortalidad, está justificada la petición de hemocultivos con unos criterios muy laxos (Singer et al., 2016; Cisneros-Herreros et al., 2007). Coburn et al. (2012) encontraron un gran número de peticiones de hemocultivos innecesarias en adultos. Además, hay determinadas patologías que raramente cursan con bacteriemia, pero en las cuales la solicitud de hemocultivos es obligada (Baron et al., 2005), como puede ser la neumonía, la pielonefritis, las infecciones de piel y partes blandas y las infecciones intraabdominales. Para estas patologías se empieza a discutir la necesidad de extraer hemocultivos debido a su bajo rendimiento (Willems et al., 2012).

-El hemocultivo, considerado el patrón oro para el diagnóstico de bacteriemia, quizá no tenga la sensibilidad necesaria, ya que incluso en casos de shock séptico su positividad no supera el 50% (Cohen et al., 2015).

En el estudio global de positividad separamos entre edad pediátrica y adulta. En edades pediátricas el porcentaje global de hemocultivos positivos es más bajo, pero con matices, pues hay una gran diferencia entre los distintos tipos de pacientes pediátricos, que discutiremos posteriormente en el estudio por servicios.

En general, en los hombres se encuentran tasas de positividad ligeramente superiores de manera constante a lo largo del estudio. Algunos autores lo relacionan con el hecho de que los varones sufren con mayor frecuencia bacteriemias nosocomiales (Uslan et al., 2007) y patologías que ocasionan bacteriemia de manera habitual (Mayr et al., 2013).

Las tasas de positividad son mayores en los meses de verano respecto a los de invierno. En invierno hay muchas solicitudes derivadas de infecciones respiratorias, en las cuales la etiología vírica es muy importante (Dolin, 2016); en los meses de verano las infecciones urinarias son más prevalentes (Richet, 2012), y al ser la etiología fundamentalmente bacteriana es más factible el desarrollo de bacteriemia.

En función del servicio solicitante se encuentran diferencias acusadas en la positividad, pues ésta depende del foco, y cada servicio suele manejar unos focos concretos. Esto puede justificar las altas tasas en determinados Servicios (Digestivo, Cirugía General, Urología) respecto a otros, que se ocupan de patologías que habitualmente no cursan con bacteriemia (Neumología, Obstetricia y Ginecología, Neurocirugía) (Willems et al., 2012). Se produjo un aumento llamativo en el porcentaje de positivos en Cirugía General. Las causas no fueron conocidas, pero puede deberse a una solicitud mejor dirigida de los hemocultivos, pues el incremento de la positividad se consigue en base a una disminución de los hemocultivos negativos.

Con respecto al análisis de las contaminaciones, hay que tener en cuenta que para detectarlas se pueden utilizar criterios clínicos o microbiológicos, ya comentados en material y métodos; estos últimos son los utilizados en nuestro caso, y se basan en el tipo de microorganismo aislado y su presencia en uno o varios hemocultivos. No hay muchas referencias que comparen ambos criterios; Hall y Lyman (2006) no ven grandes diferencias (2,1% de contaminaciones utilizando criterios clínicos frente al 2,5% con criterios microbiológicos).

Las tasas de contaminaciones del hemocultivo son un indicador de calidad de la fase preanalítica, y el estándar no debería exceder el 3% según las guías (Wayne, 2007). En nuestro hospital nos encontramos con tasas muy elevadas, del 8,4% de media a lo largo de los 10 años, con una ligera tendencia descendente pero en ningún caso por debajo del 7%. En la literatura se encuentran resultados muy dispares, con cifras por encima y por debajo del estándar del 3%: en una revisión de Hall y Lyman (2006) entre el 0,6% y el 6%; en otra de Dawson (2014) entre el 2,1% y el 10%; la mayoría de los estudios claramente por debajo de nuestros datos.

Las contaminaciones en pacientes pediátricos fueron mayores que en adultos, y así lo corrobora la literatura consultada (Hall y Lyman, 2006). Sin embargo, en la mayoría de ellos únicamente se recibió un hemocultivo por episodio clínico, siendo en estos casos diferente, y no tan fiable (Hall y Lyman, 2006), el criterio de discriminación entre verdadero positivo o contaminante (definimos contaminación como el hecho de que un microorganismo potencialmente contaminante sólo aparezca en una de las dos botellas). Por tanto, nuestra comparación de tasas de contaminación entre pacientes pediátricos y adultos presenta un sesgo claro. Por otra parte, y relacionado con la misma problemática, el primer año de este estudio, 2007, los hemocultivos pediátricos presentaron de manera anormal tasas de positividad muy bajas y de contaminación muy altas respecto a los otros nueve años, en los cuales dichos valores se mantuvieron estables. Esto se debió a un cambio en la interpretación

de los ECN. En dicho año se consideraron contaminantes salvo excepciones condicionadas por la clínica; a partir de dicho año se utilizaron criterios únicamente microbiológicos.

Las contaminaciones en mujeres son más elevadas que en los hombres, de manera significativa. Este hallazgo se comprobó en los Servicios de Medicina Interna y Medicina Intensiva, lo que parece confirmar que esa diferencia es atribuible al sexo y no al peso que las peticiones realizadas en Ginecología y Obstetricia pudiera tener. En las referencias bibliográficas consultadas no hallamos justificación a esto, pues no encuentran relación entre tasas de contaminación y sexo (Roth et al., 2010; Chang et al., 2015).

No hemos encontrado estacionalidad en las contaminaciones. En la literatura no hay apenas referencias al respecto; alguna encuentra relación con el período de verano (Alnami et al., 2015).

Conocer los resultados en función del servicio solicitante fue uno de los objetivos principales del estudio de contaminaciones, puesto que éstas varían en función del personal y del seguimiento de los protocolos de antisepsia. Utilizamos para ello gráficos de control, que minimizan el factor del azar otorgando fiabilidad estadística.

En nuestro caso se observan grandes diferencias en las tasas de contaminación en función del servicio. Una de las más elevadas la encontramos en el Servicio de Urgencias Generales (siempre por encima del 10%); esto está descrito en la literatura (Self et al., 2014), y se justifica por el tipo de actividad que se realiza, la rapidez, la falta de entrenamiento del personal eventual y el flujo de trabajo (Dawson, 2014). Neonatología también presenta un gran número de contaminaciones, lo que también es conocido (Chukwuemeka y Samuel, 2014) y se relaciona con el hecho de que la extracción en este tipo de pacientes suele ser especialmente difícil.

Como vemos en los gráficos de control, hay un descenso simultáneo en las contaminaciones en varios de los servicios con mayor número de peticiones al llegar al nuevo hospital (Medicina Interna, Hematología y Digestivo); en Medicina Intensiva y en el Servicio de Urgencias Generales no se observó dicho descenso. Está descrito que en hospitales nuevos la microbiota inicial del mismo es diferente, con menos presencia de los contaminantes habituales como los ECN, lo que podría justificar este hecho (Lax et al., 2017).

Respecto a los microorganismos contaminantes, los resultados obtenidos son los que cabía esperar (el origen de las mismas suele ser la piel del propio paciente, Hall y Lyman (2006)) y con lo reflejado en la literatura. Los ECN están presentes en más del 90% de las

contaminaciones, siendo muy minoritarios, en este orden, EGV, *Corynebacterium spp.* y *Propionibacterium spp.* Hall y Lyman (2006) encuentran el ECN en el 70-80% de las contaminaciones.

Estos microorganismos potencialmente contaminantes en determinadas ocasiones pueden ser responsables de bacteriemias verdaderas. Es el caso de las bacteriemias por catéter en caso de ECN o las endocarditis en el caso de EGV. Según nuestros datos, el microorganismo más frecuente en las contaminaciones, el ECN, ocasiona bacteriemias verdaderas en menos de un tercio de los casos (30%). Las bacteriemias reales por EGV son más frecuentes (la mitad de los casos). Cockerill et al. (2004) obtienen resultados similares para los ECN y más elevados para los EGV (30% y 70%, respectivamente). Sin embargo, para Weinstein (1996), los ECN sólo representan verdaderas bacteriemias en el 12-15% de los casos, así como para Garcia et al. (2015) que los fijan en un 10-15%. El resto de microorganismos considerados contaminantes, en general, raramente causan bacteriemias verdaderas; habitualmente aparecen como consecuencia de ser microbiota cutánea, sin significación clínica (*Propionibacterium spp.* y *Corynebacterium sp.*). Para Weinstein (1996) los géneros *Corynebacterium*, *Propionibacterium* y *Bacillus* sólo causaron verdaderas bacteriemias en menos del 5% de los casos, reafirmando de esta manera nuestros datos (alrededor del 10% de bacteriemias verdaderas).

La presencia de contaminaciones (pseudobacteriemias o bacteriemias falsas) supone un problema serio (Bates et al., 1991; Dawson, 2014):

-Económico: gasto innecesario en antibióticos y procedimientos diagnósticos, y aumento de las estancias de los pacientes. Importante aumento también a nivel de laboratorio (un 80% de incremento, según estimaciones recientes de Garcia et al. (2015)). El impacto económico de las contaminaciones está estudiado: Garcia et al. (2015) lo estiman entre 4500\$ y 10078 \$ por contaminación; otras referencias lo fijan en 8720\$ (Gander et al., 2009).

-Clínico: aumento de morbilidad por infecciones nosocomiales debido al aumento de las estancias de los pacientes (Garcia et al., 2015). Kothari et al. (2014) relacionan el tratamiento de los ECN contaminantes con un incremento en la estancia.

-Ecológico: aumento de microorganismos multirresistentes por el uso de tratamientos antibióticos innecesarios (Garcia et al., 2015; Bates et al., 1991; Hall y Lyman, 2006).

Por tanto, y centrándonos en nuestro hospital, al haber unas tasas de contaminación tan elevadas el margen de mejora en el momento en el que se apliquen medidas correctoras es muy elevado. Algunas de estas medidas, de eficacia demostrada (Dawson, 2014; Gander et al.,

2009), están incluidas dentro del programa denominado por nosotros “*Contaminación Zero*” que se está poniendo en marcha en el hospital con este objetivo:

-Formación a la hora de realizar las extracciones (seguimiento riguroso de los protocolos de antisepsia).

-Obtención y análisis de indicadores de contaminaciones por servicios.

-Realización de un correcto “*feedback*” de los datos obtenidos, entre el Servicio de Microbiología y los servicios solicitantes a través de la Dirección de Enfermería.

Limitaciones del estudio: como consecuencia del cambio de sistema informático, ocurrieron una serie de eventos ya comentados que justifican la ausencia de resultados en los servicios pediátricos y Obstetricia a partir de 2014.

FASE ANALÍTICA

En el laboratorio de Microbiología Clínica, el hemocultivo es el método de referencia para el diagnóstico de la bacteriemia y la sepsis. El éxito del mismo se define por la tasa de positividad y el tiempo de detección (mayor éxito a mayor tasa de positivos y menor tiempo de detección). Estos son los parámetros a estudiar y optimizar.

Objetivo 4: Analizar las posibles mejoras aportadas por la introducción de nuevos sistemas de incubadores.

Con el perfeccionamiento de los **incubadores**, se intentan conseguir mejoras en los parámetros comentados (tasa de positivos y tiempo de detección), además de en la especificidad (evitar falsos positivos) y la facilidad de uso. El cambio de incubador en 2014 perseguía estos objetivos. Pudimos apreciar una serie de mejoras:

- a) Especificidad, disminuyendo los falsos positivos en más de un 90%. Esto supone un ahorro económico para el laboratorio, tanto a nivel de reactivos como de tiempo de personal facultativo y técnico. No encontramos referencias que cuantifiquen este coste o corroboren nuestros datos.
- b) Facilidad de uso: el incubador nuevo cuenta con un software optimizado, que permite la introducción, obtención y manejo de los datos de manera mucho más intuitiva, así como un manejo de las muestras y del propio aparato mucho más sencillo.

En cambio, la tasa de hemocultivos positivos y los tiempos de respuesta no experimentaron cambios.

En la literatura no encontramos referencias a comparativas entre estos dos incubadores. En la actualidad, en el mercado, encontramos tres tipos de incubadores diferentes, de casas comerciales y métodos de detección diferentes: BACTEC™ (BD; método fluorimétrico), BACT/ALERT® (bioMérieux; método colorimétrico) y VersaTREK™ (Thermo Fisher Scientific; método de diferencias de presión). Existen estudios comparativos de dichos incubadores (Kirn y Weinstein, 2013), pero no comparando dos de la misma casa comercial.

Objetivo 5: Analizar el tiempo de positividad de los microorganismos y su utilidad como herramienta predictiva y diagnóstica.

La incubación máxima de los hemocultivos fue de cinco días por protocolo (salvo excepciones). Sin embargo, las bacteriemias verdaderas fueron detectadas mucho antes, un 72% y un 93,7% en 1 y 2 días, respectivamente. En la literatura se ofrecen resultados similares. Ning et al. (2016) detectan, en los mismos tiempos, el 68% y el 88% respectivamente.

En general, los tiempos de positividad descritos en la literatura (Rocchetti et al., 2016) son parecidos o ligeramente más cortos que los nuestros, que oscilaron entre las 22 y las 27 horas en función del tipo de botella y del incubador.

El análisis en profundidad del tiempo de positividad puede aportar información muy valiosa, tanto de tipo clínico como microbiológico. Sirve para predecir la evolución de la infección y el pronóstico (Martínez et al., 2007; Sowden et al., 2008), y el tiempo de estancia (Martín-Gutiérrez et al., 2017). Orienta también acerca de cuál puede ser el foco de la infección (Martínez et al., 2007), de si ésta es nosocomial o comunitaria (Friedman et al., 2002) y de si el microorganismo es multirresistente (Lai et al., 2011). En nuestro estudio quisimos relacionarlo con lo siguiente:

a) Verdadero positivo y contaminación:

Está descrito que el tiempo de positividad puede permitir diferenciar entre bacteriemia verdadera y contaminación (Kassis et al., 2009; Hall y Lyman, 2006). Nosotros demostramos que, de manera significativa, para un mismo tipo de microorganismo determinado (principalmente de interés son los ECN), el tiempo de positividad cuando la bacteriemia se considera verdadera es inferior a los casos de contaminación: unas 10 horas de diferencia en general, independientemente del tipo de botella e incubador, y entre 5 y 8 horas valorando sólo los ECN. Otros microorganismos considerados contaminantes también presentaron tiempos de positividad muy elevados (*Corynebacterium spp.*, *Propionibacterium spp.*). Esto es debido a que el inóculo bacteriano es inferior en caso de contaminación (Hossain et al., 2016).

b) Tipo de microorganismo:

No todos los microorganismos crecen igual de rápido en el hemocultivo (Martínez et al., 2007). En nuestro caso, los cocos gram positivos en cadenas (estreptococos y enterococos), fueron los microorganismos con tiempos de crecimiento más reducidos (alrededor de 10 horas de promedio). El tiempo de crecimiento de *S.aureus* fue menor (más 5 horas de media) que el de

los ECN valorables, lo cual coincide con la mayoría de referencias bibliográficas (Kim et al., 2010; Park et al., 2010; Ruimy et al., 2005), aunque otros autores no encuentran diferencias (Ning et al., 2016).

Dentro de los bacilos gram negativos, las enterobacterias también presentan tiempos de positividad muy bajos (≤ 15 horas), inferiores a los BGN-NFs (*P.aeruginosa* y similares). Ning et al. (2016) comparan *E.coli* y *P.aeruginosa* y obtienen resultados semejantes.

Los microorganismos valorables de crecimiento más lento, coincidiendo con las referencias encontradas (Ning et al., 2016), fueron las levaduras y las bacterias anaerobias. En nuestro estudio *C.parapsilosis* presentó tiempos de positividad más cortos que *C.albicans*. En la literatura no se hallan diferencias entre *C.albicans* y *C.parapsilosis*, lo que se refleja principalmente es que *C.glabrata* presenta los tiempos de crecimiento más cortos, (Lai, 2012; Cobos-Trigueros, 2014); no tuvimos casuística suficiente para confirmar este hecho.

c) El modelo de incubador:

El nuevo incubador no disminuye los tiempos de positividad (de hecho, es ligeramente más lento que el antiguo), con la excepción de *P.aeruginosa*, en la que se pasa de 30 a 20 horas con el cambio de incubador, sin explicación sencilla ni apoyo bibliográfico al respecto. Para los otros microorganismos en los que se observan diferencias entre incubadores (*C.parapsilosis*, *A.baumannii* y *Bacteroides spp.*) el número de aislados es insuficiente para hacer una valoración. El hecho de que los tiempos en general no varíen de forma significativa es lógico, puesto que los dos incubadores comparados utilizan el mismo tipo de tecnología.

d) El tipo de botella

Las botellas anaerobias ofrecen tiempos de positividad más bajos que las aerobias en aquellos microorganismos que pueden crecer en los dos medios (anaerobios facultativos). Especialmente en enterobacterias, *S.aureus* y enterococos. La diferencia entre las dos botellas no es sólo el tipo de atmósfera; las botellas anaerobias llevan un medio ligeramente diferente, con la adición de un agente lisante (saponina) y con un volumen también diferente (30 ml. la botella aerobia por 40 ml. la anaerobia). En una revisión muy reciente también se percibe que los tiempos de positividad son inferiores en los medios anaerobios (Rocchetti et al., 2016).

Una aportación muy importante de estos tiempos de positividad es su **combinación con la tinción de Gram del hemocultivo positivo**. De esta manera podemos llegar a conocer las probabilidades de encontrarnos ante un microorganismo concreto con un determinado grado

de fiabilidad. Este tipo de algoritmos está descrito en la literatura (Ruimy et al., 2005; Martínez et al., 2007; Martín-Gutiérrez et al., 2017), habitualmente para diferenciar entre bacteriemias verdaderas y contaminaciones por ECN.

En nuestro propio algoritmo diagnóstico, después de analizar los resultados, utilizamos un **punto de corte de 12 horas** para el tiempo de positividad, puesto que:

a) Para los cocos gram positivos en grupos proporciona una discriminación fiable entre microorganismos contaminantes y valorables, incluido *S.aureus* (muy improbables por encima de 12 horas).

b) Los cocos gram positivos en cadenas, con < 12 horas, son prácticamente siempre valorables.

c) Respecto a los bacilos gram negativos, por debajo de 12 horas aseguramos con más un 93% de probabilidades que se trata de una enterobacteria.

Objetivos 6 y 7: Evaluar la fiabilidad e impacto de MALDI-TOF MS en los flujos de trabajo y el tiempo de respuesta. Evaluar la fiabilidad e impacto de los antibiogramas rápidos a partir de hemocultivo positivo.

Como ya hemos comentado, en el manejo de las bacteriemias es fundamental pasar a tratamiento dirigido lo antes posible. Esto se consigue reduciendo los tiempos de respuesta hasta la obtención de la identificación y el antibiograma del microorganismo, para lo cual son necesarios métodos diagnósticos más rápidos que los clásicos, y cuyas características ideales serían, según Sinha et al. (2018), una alta sensibilidad y especificidad, capacidad de detectar un amplio espectro de patógenos, rapidez (menos de 3 horas) y fácil integración en los flujos de trabajo del laboratorio. Con este fin, han aparecido distintas técnicas en el mercado (Kothari et al., 2014), basadas en la amplificación genómica, la proteómica (MALDI-TOF MS) y en otro tipo de técnicas.

Algunas pueden utilizarse directamente desde la muestra directa (Sinha et al., 2018); otras a partir del hemocultivo positivo, pero sin subcultivo del mismo; y otras a partir del microorganismo ya crecido en cultivo en medio sólido. Cuanto antes se introduzca la técnica rápida en el flujo de trabajo, mayor será la ganancia de tiempo.

Por el momento, el impacto más elevado e inmediato en los laboratorios de Microbiología Clínica lo ha proporcionado el uso del MALDI-TOF MS.

MALDI-TOF MS surgió recientemente como un método totalmente nuevo de identificación bacteriana que presenta la ventaja fundamental respecto a los métodos tradicionales de ser mucho más rápido (minutos frente a aproximadamente un día partiendo de un subcultivo crecido).

Además ofrece la posibilidad de trabajar directamente sobre el hemocultivo positivo, sin subcultivo a medio sólido, con lo que la ganancia de tiempo todavía sería mayor. Este es un proceso complejo debido a que nos encontramos, además de las proteínas bacterianas, una gran celularidad proveniente del propio paciente y muchos otros compuestos que están presentes en dicho medio que interfieren en la identificación. Los resultados publicados en la literatura acerca de este tipo de utilización de MALDI-TOF MS no han sido de momento muy prometedores (Verroken et al., 2016). Una alternativa consiste en realizar el MALDI-TOF MS del microorganismo con escaso tiempo de incubación (3-4 horas). Es ligeramente más lenta, pero se obtienen mejores resultados y su realización es mucho más simple y operativa. Esta fue la opción elegida en nuestro laboratorio.

En primer lugar, evaluamos la capacidad de identificación de MALDI-TOF MS sobre microorganismos con un tiempo de crecimiento óptimo (24 horas). La concordancia fue muy buena respecto a los métodos clásicos y cuando hubo discrepancias, principalmente a nivel de especie dentro del género *Staphylococcus*, la secuenciación del ARNr 16S otorgó más fiabilidad a MALDI-TOF MS que a los métodos tradicionales. En la literatura, desde el primer momento en que se empezó a utilizar como rutina en Microbiología Clínica (Seng et al., 2009), numerosos estudios realizados reflejan la fiabilidad de la identificación por MALDI-TOF MS. Revisiones recientes la sitúan mayoritariamente por encima del 90% (Rodríguez-Sánchez et al., 2014; van Belkum et al., 2015). Además, al crearse o ampliarse bases de datos específicas de ciertos microorganismos las identificaciones son aún más completas (Schulthess et al., 2014; Girard et al., 2017) presentándose únicamente dificultades con determinadas especies (ciertas especies de estreptococos, *Shigella spp.*, etc.) (Hernández, 2016).

Posteriormente, se estudió la validez de las identificaciones de microorganismos con entre 3 y 4 horas de incubación. Los resultados obtenidos fueron muy buenos. En la mayoría de los casos se obtuvo identificación, y ésta fue correcta, concordante con la realizada a las 24 horas de incubación por el mismo método (96,1% para gram negativos y 84% para gram positivos, a nivel de especie). Estos porcentajes son similares o incluso mejores que los presentes en la literatura: Verroken et al. (2015) los sitúan en un 81,1% con 5 horas de incubación, y Curtoni et al. (2017) en un 64,1% y 85,0% con 3 y 5 horas de incubación, respectivamente. Las identificaciones, al igual que nos ocurre a nosotros, son mejores para microorganismos gram negativos (Schulthess et al., 2014).

Por otra parte, a lo largo del desarrollo de este trabajo, hemos visto que con la utilización de MALDI-TOF MS aumenta el abanico de microorganismos que están implicados en las bacteriemias (los microorganismos agrupados bajo la denominación “Otros” pasó de un 5% a un 15% del total de bacteriemias aproximadamente). En determinados géneros, como *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter* y otros han empezado a “aparecer” especies que anteriormente no estaban presentes, seguramente porque no se identificaban como tales sino como especies más comunes. En la literatura hemos encontrado referencias a este respecto, pero relativas a hongos (Gautier et al., 2014), no así para bacterias.

Podemos concluir, por tanto, que MALDI-TOF MS ha supuesto una revolución para la Microbiología Clínica, con identificaciones fiables y rápidas (Rodríguez-Sánchez et al., 2014), así como coste-efectivas y simples comparadas con los métodos clásicos basados en pruebas bioquímicas.

Sin embargo MALDI-TOF MS presenta la limitación de no proporcionar la susceptibilidad antibiótica del microorganismo. La identificación en sí ya es una ayuda importante a este nivel, puesto que hay muchas bacterias que presentan patrones de resistencia innata muy característicos, pero en muchos otros casos no es así, sobre todo aquellos microorganismos capaces de adquirir con facilidad factores de resistencia, y que por tanto pueden tener patrones de sensibilidad muy variables (*E.coli* y *K.pneumoniae* pueden ser sensibles a casi todos los antimicrobianos o multirresistentes).

Es cierto que hay estudios según los cuales MALDI-TOF MS puede ser utilizado en solitario para detectar resistencias, como ya comentamos en la introducción. Sin embargo, estos estudios aún son escasos, difíciles de realizar y de interpretar, con resultados muy variables y con una fiabilidad cuestionable (De Carolis et al., 2014).

Para que las ventajas que proporciona MALDI-TOF MS a nivel de rapidez de identificación tengan más repercusión a nivel clínico resultaría interesante contar con algún método que proporcionara información rápida acerca de la sensibilidad del microorganismo en cuestión. Existen distintas técnicas rápidas para la detección de resistencias (March Rosselló y Bratos Pérez, 2016), basadas principalmente en la PCR. Pero presentan dos problemas: son técnicas con un coste elevado, y no proporcionan un antibiograma como tal, sino que únicamente informan de la presencia o no de determinados genes de resistencia.

Otra opción es tratar de recortar los tiempos utilizando los métodos clásicos de antibiograma ya disponibles. Utilizando el método de referencia para la obtención de las susceptibilidades antibióticas, la microdilución en caldo, no es posible hacerlo puesto que los protocolos están estandarizados y requieren, en primer lugar, el crecimiento del microorganismo en subcultivo (aproximadamente un día), y posteriormente un mínimo de 16 horas de incubación.

Existe otra alternativa. Desde hace tiempo, y dada la importancia que tiene la rapidez en el diagnóstico de las bacteriemias, en los laboratorios de Microbiología Clínica se realizan antibiogramas provisionales de difusión disco-placa a partir del hemocultivo positivo, sin esperar al subcultivo, cuya lectura se realiza entre 16 y 24 horas después. Estos antibiogramas se realizaban sin ajustarse a criterios CLSI o EUCAST, y por tanto, sin estandarización. Los resultados de estos métodos, respecto al de referencia, han sido razonablemente buenos. Mirrett y Reller (1979) ya publicaron estudios, con un 5% de error por antibiótico testado. En una revisión muy reciente -(Menon et al., 2016)- se encuentra un 9% de error por antibiótico analizado, con errores graves o muy graves en un 8,1% de los microorganismos. Dependiendo del mismo, éstos variaron desde el 1,5% en caso de estafilococos al 16% para los

estreptococos/ enterococos, pasando por el 8,3% en BGNs. Otros estiman un porcentaje de errores entre el 5,3% y el 8,2% en función del microorganismo (Edelmann et al., 2007). El CLSI, en una publicación muy reciente, valora la fiabilidad de este tipo de antibiogramas en un 90%, sin errores muy graves (Chandrasekaran et al., 2018).

Con el objetivo de acortar aún más los tiempos y adaptarnos a las posibilidades de MALDI-TOF MS, nos propusimos intentar la lectura de dichos antibiogramas simultáneamente a la identificación del microorganismo por MALDI-TOF MS (3-4 horas de incubación). Con tan poco tiempo, en muchos de los casos los halos de inhibición no fueron interpretables (un 50,8%), si bien fue muy dependiente del tipo de microorganismo: en un 72,2% la lectura fue posible para los gram negativos (74,5% para enterobacterias, 57,1% para BGN-NF) por sólo un 16% para los gram positivos (excepción hecha de *S.aureus*, que sí suele presentar un crecimiento suficiente como para evaluar los halos de inhibición -75%-). Chandrasekaran et al. (2018) estudia los antibiogramas de gram negativos a las 6 horas de incubación y los encuentra interpretables en un 80,1% de los casos, más para las enterobacterias respecto a los BGN-NF (*E.coli* un 83,8%, *P.aeruginosa* un 7,6%), reafirmando de esta manera nuestros datos. Cuando la lectura del antibiograma fue posible, nuestro porcentaje de error fue ligeramente superior (7,8% de errores muy graves frente al 1,8-3%, 13,3% de errores graves frente al 2,8-25,4%) (Chandrasekaran et al., 2018).

La conclusión a la que llegamos es que, aunque la fiabilidad es mejorable, el antibiograma rápido es extremadamente rentable en la mayoría de los microorganismos que causan bacteriemias graves, como es el caso de los bacilos gram negativos y *S.aureus*. Con su utilización se produce un incremento en la supervivencia (Barefanger et al., 1999), una disminución del tiempo necesario para la aplicación de una adecuada terapia antibiótica (Verroken et al., 2016), con cambios en el tratamiento antibiótico en el 28,1% de los casos (Menon et al., 2016). También influye en una menor generación de resistencias y en la reducción de costes (Barefanger et al., 1999).

Hay que tener en cuenta que el antibiograma rápido es menos útil si no se dispone de la identificación del microorganismo (March Rosselló y Bratos Pérez, 2016), debido a las resistencias intrínsecas de algunos de ellos, que no siempre pueden observarse en el antibiograma. De ahí la importancia de combinarlo con la identificación por MALDI-TOF MS.

Objetivo 8: Evaluar RAPIDEC® CARBA NP como método diagnóstico rápido de detección de carbapenemasas.

Existen otras tecnologías que pueden ser de ayuda en el manejo de las resistencias antibióticas. Como parte de este trabajo, evaluamos un tipo de técnica colorimétrica basada en principios bioquímicos–RAPIDEC® Carba NP-. Desde el año 2012, en nuestro hospital, nos encontramos con el creciente problema de los microorganismos gram negativos productores de carbapenemasas (principalmente *K.pneumoniae* y *E.cloacae*). Representa un gran problema a nivel mundial (el CDC en las “Amenazas de resistencia antibiótica 2013” clasifica la resistencia a los carbapenemes en su categoría más grave – amenaza urgente –) a distintos niveles:

-Tratamiento, puesto que los antibióticos carbapenémicos suelen ser la última o penúltima alternativa antibiótica. Muchas de las opciones de tratamiento empírico en infecciones o pacientes complicados pasan por la utilización de estos antibióticos.

-Diseminación de resistencias, puesto que los genes que las codifican suelen estar situados en elementos genéticos móviles que hacen que su propagación intra- e interespecie sea posible e incluso frecuente (Queenan y Bush, 2007).

Habitualmente, para la confirmación de que un microorganismo es productor de carbapenemasas el tiempo requerido desde la positividad del hemocultivo puede ser hasta de 48 horas, con el problema añadido de que no puede ser recortado ni mediante la utilización de MALDI-TOF MS ni mediante los antibiogramas disco-placa rápidos, pues requiere de procedimientos más específicos y complejos (EUCAST. Detección de mecanismos de resistencia).

Se realiza, en principio, a partir del microorganismo ya crecido en medio sólido. Con el objetivo de combinar estos resultados con la identificación por MALDI-TOF MS, se realizó simultáneamente a la identificación rápida (3-4 horas). Se demostró que, en estas circunstancias, su fiabilidad (sensibilidad y especificidad) es muy elevada (por encima del 95%), de acuerdo con otras publicaciones (Hombach et al., 2015; Fernández et al., 2016).

Teniendo en cuenta estos resultados, el hecho de que Carba NP permite detectar cualquier tipo de carbapenemasa (al contrario que las técnicas de PCR, que detectan dianas concretas) y que además es mucho más económico, su implantación en los Servicios de Microbiología es interesante, principalmente si la prevalencia de bacterias productoras de carbapenemasas es elevada, como es en nuestro caso.

FASE POSTANALÍTICA

Objetivo 9: Conocer la etiología de las bacteriemias y su evolución a lo largo de la década a estudio.

En nuestro estudio los microorganismos gram positivos causaron más bacteriemias que los gram negativos, aunque a partir del año 2013 esta tendencia empieza a cambiar y a partir de 2015 son éstos los mayoritarios. Numerosos estudios apoyan estos datos (Oriol et al., 2017; Mikulska et al., 2013; Vincent et al., 2009) y atribuyen estos cambios al aumento de resistencias en gram negativos y a la disminución del uso de catéteres vasculares. Estos dos factores concurren en nuestro caso: comentaremos posteriormente el incremento de las resistencias en gram negativos, mientras que el proyecto *Bacteriemia Zero*, iniciado en el hospital en el año 2012, tiene como objetivo la disminución de las bacteriemias relacionadas con el catéter.

Las fungemias se mantuvieron estables con los años, algo que ya es conocido en el presente siglo (Arendrup, 2013), y se demostraron ligeros cambios en la etiología a nivel de especie, con un aumento de las fungemias por *C.parapsilosis*, lo que concuerda con la bibliografía consultada (Pemán et al., 2012).

Las bacteriemias por microorganismo anaerobios estrictos no presentaron grandes variaciones en la década. Representaron sólo entre el 1,4% y el 2,4% del total de las mismas, muy por debajo de lo registrado en nuestro mismo hospital en la década de los 80, que fue del 5,4% (Vázquez et al., 1994). Es conocido el descenso de la incidencia por bacterias anaerobias en los años 90 (Rosenblatt, 1997), mientras que ya en épocas más recientes una mayoría de estudios las considera estables (Vena et al., 2015). Estas dos afirmaciones reafirman nuestros hallazgos.

Las bacteriemias mixtas significaron de manera constante un 10% del total. En la literatura los valores son similares (una revisión de Reimer et al. (1997) las sitúa entre el 6% y el 18%).

En lo que se refiere a agentes etiológicos concretos, en nuestro estudio los mayoritarios son similares a los descritos en la literatura en nuestro entorno (Rodríguez Díaz et al., 2017).

S.epidermidis y *E.coli* fueron los más frecuentes, presentes cada uno en un 20% de las bacteriemias, seguidos por otros estafilococos (tanto coagulasa negativa como *S.aureus*), *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *E.faecalis*, *S.pneumoniae*, *E.faecium*, *E.cloacae* y *A.baumannii*.

S.epidermidis y *E.coli* están presentes como agentes etiológicos de bacteriemia con tanta asiduidad debido a causas muy diferentes. *S.epidermidis* suele ocasionar bacteriemias

relacionadas con el catéter, al ser un colonizante habitual de la piel, lo que le convierte en el mayor agente de bacteriemia de origen nosocomial (Cisneros-Herreros et al., 2007). Por otra parte, *E.coli* suele ocasionar bacteriemias con foco urinario o intraabdominal, y es el principal causante de bacteriemia de origen comunitario (Cisneros-Herreros et al., 2007).

A lo largo de los 10 años se produjeron los siguientes cambios:

a) Disminución de *S.epidermidis*. Principal bacteria gram positiva implicada en las bacteriemias, su descenso y la justificación del mismo a partir de 2013 (pasa de ocasionar el 22,6% del total de bacteriemias a menos del 15%) coincide con la incorporación de nuestro hospital al proyecto *Bacteriemia Zero*.

b) Incremento en el porcentaje de bacteriemias por *E.coli*, probablemente vinculado con el envejecimiento paulatino de la población, pues se sabe que la incidencia de bacteriemia por *E.coli* aumenta con la edad (Siegman-Igra et al., 2002).

c) Las bacteriemias por *K.pneumoniae* suben de manera muy significativa, favorecidas por la aparición de multirresistencias, que lo han convertido en patógeno nosocomial además de comunitario.

d) Lo mismo ocurre con *E.cloacae*; además del desarrollo de multirresistencias, ha aumentado con el descenso de *A.baumannii*, ocupando parcialmente el espacio dejado por el mismo en el Servicio de Medicina Intensiva.

Todos estos comentarios coinciden con el incremento de bacteriemias por enterobacterias descrito en la literatura (Oriol et al., 2017; Mikulska et al., 2014; Vincent et al., 2009).

e) *A.baumannii* es considerado como un patógeno fundamentalmente nosocomial (Cisneros-Herreros et al., 2007). En nuestro hospital ha tenido siempre una gran relevancia, con un alto porcentaje de pacientes colonizados e infectados (pacientes de larga estancia, especialmente en Medicina Intensiva), además de ser extremadamente resistente a los antimicrobianos.

Durante el año 2012 se empezaron a tomar medidas en dicho servicio para tratar de erradicarlo y a partir del año 2015, aprovechando el cambio de hospital, ese objetivo se consiguió casi totalmente, como se puede observar en las cifras del último año.

f) *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.faecalis*, *E.faecium* y *S.pneumoniae* mantuvieron una frecuencia estable a lo largo de los diez años del estudio.

Más a largo plazo, si comparamos este patrón etiológico con lo publicado por Vázquez et al. (1994) sobre los años 80, podemos apreciar de manera destacada lo siguiente:

-Aumento muy acusado del porcentaje de bacteriemias por ECN (más del doble), y más discreto de *E.coli*, *P.aeruginosa*, *E.faecium* y de las fungemias.

-Disminución del porcentaje de enterobacterias distintas de *E.coli* y *K.pneumoniae*, y de *S.aureus*, así como de *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus spp.*

Respecto a la influencia de la edad en la etiología, ya en los años 80 se relacionaban las bacteriemias con las edades extremas de la vida (Weinstein et al., 1983). Esto continúa siendo así en la actualidad (Sinha et al., 2018). En nuestro estudio, el rango de edad más afectado fueron los mayores de 65 años. Si bien es cierto que en los pacientes pediátricos, en general, las bacteriemias fueron muy poco frecuentes ocurrió lo contrario en los recién nacidos, lo que apoya la teoría de las edades extremas. Conclusiones relevantes fueron:

a) Las bacteriemias por *E.coli* aumentan significativamente con la edad. Esto ya estaba descrito en los años 80 (Weinstein et al., 1983) para los gram negativos en general. Bou-Antoun et al. (2016) lo describen muy recientemente para *E.coli* en un estudio multicéntrico.

b) *S.epidermidis* es mucho más frecuente en menores de quince años (31,6% frente al 21% en el total). Esto se apoya mayoritariamente en las bacteriemias nosocomiales en Neonatología (apenas hay bacteriemias en Urgencias de Pediatría). En la literatura está descrito que la gran mayoría de este tipo de infecciones están causadas por ECN con origen en el catéter (Pérez-López et al., 2013), como es nuestro caso.

c) También es significativa una incidencia muy superior en edad pediátrica para *E.faecalis* (el doble respecto a su incidencia global), *E.cloacae* y *S.pneumoniae*. Se han publicado datos similares (Irwin et al., 2015).

d) Por el contrario, *A.baumannii* y *P.aeruginosa* están prácticamente ausentes en pediatría. Suelen ser patógenos nosocomiales y en los pacientes pediátricos la gran mayoría de estas infecciones están causadas por ECN, siendo el resto de microorganismos muy minoritarios (Pérez-López et al., 2013).

e) *S.aureus* presentó una ligera relación con la edad entre 15 y 65 años. Algunos estudios lo asocian con picos en edades entre 20-30 años y mayores de 65 (Bryan, 1989).

f) *K.pneumoniae* no presentó asociación significativa con la edad.

g) *E.faecium* presenta un número significativamente bajode bacteriemias en los rangos de edad extremos del estudio, de manera muy significativa. Parece que se complementa con *E.faecalis*, cuyo comportamiento es exactamente a la inversa, con menor porcentaje de bacteriemias en el rango intermedio de edad. En la literatura no hay apenas referencias al respecto, y las que comparan las dos especies no encuentran estas diferencias (Tedim et al., 2015).

Respecto al sexo, se aprecia de manera significativa un mayor número de bacteriemias en varones (en nuestro caso, además, la diferencia a lo largo de los años se va haciendo más acusada), lo que es conocido y está publicado (Uslan et al., 2007).

S.epidermidis y *E.coli* se aíslan en mayor porcentaje en mujeres, mientras que en hombres lo hacen *S.aureus* y *P.aeruginosa*, y en los últimos años *K.pneumoniae*. La relación del sexo con la etiología es estudiada por varios autores (Uslan et al., 2007; Moon et al., 2014). Observaron como *E.coli* predomina en mujeres, pero no *S.epidermidis* (como es nuestro caso), y el resto de microorganismos en hombres.

A nivel de estacionalidad, el número de bacteriemias confirmadas fue estable en función del mes; hubo un mayor número de sospechas de enero a mayo (invierno-primavera), en relación con el mayor número de casos de patología respiratoria en esa época.

Respecto a microorganismos concretos, hay cierta estacionalidad relacionada con el tipo de patología origen de la bacteriemia. En los meses de invierno, con predominio de las infecciones respiratorias, hay un aumento de *S.pneumoniae*, mientras que en los meses de verano encontramos un incremento de bacteriemias por *E.coli*. Esto es habitual y se refleja en numerosos estudios, tanto antiguos (Weinstein et al., 1983) como recientes (Gradel et al., 2016; Al-Hasan et al., 2009). *A.baumannii* no presenta estacionalidad en nuestros datos; en la literatura algunos autores la asocian al verano (Eber et al., 2011; McDonald et al., 1999). El mismo autor (Eber et al., 2011) ve disminución de *Enterococcus spp.* en verano. En nuestra serie no se observa este patrón.

La etiología varía en función del **servicio solicitante**, debido al diferente tipo de pacientes y principalmente a los diferentes focos infecciosos relacionados. Algunos servicios manejan principalmente bacteriemias de origen comunitario (Servicio de Urgencias Generales) mientras las bacteriemias nosocomiales se suelen concentrar en los Servicios de Medicina Intensiva (EPINE 2017). De manera general, está descrito (Cisneros-Herreros et al., 2007) que en las bacteriemias comunitarias predominan las bacterias gram negativas, *S.aureus* y *S.pneumoniae*,

mientras que en las bacteriemias nosocomiales lo más habitual son las bacterias gram positivas.

Nuestros hallazgos corroboran estas afirmaciones. En Medicina Intensiva destacaron *S.epidermidis* y *P.aeruginosa*, como también se comenta en la literatura (Wisplinghoff et al., 2004) y tienen lugar la mayoría de bacteriemias por *A.baumannii* (también es conocido) (Garnacho-Montero et al., 2015). En otros servicios que atienden a pacientes graves y en los que se originan bacteriemias nosocomiales como consecuencia del uso de catéteres, como son Hematología y Neonatología, *S.epidermidis* fue, con mucha diferencia, el microorganismo más frecuente.

En el resto de servicios el microorganismo más usual fue *E.coli*, como causante de bacteriemias de origen urinario o intraabdominal, y fundamentalmente comunitarias (patologías atendidas en Urgencias Generales, Digestivo y Urología).

Como excepciones nos encontramos el Servicio de Nefrología, donde *S.aureus* es el microorganismo más prevalente. Esto es debido a las infecciones del catéter de hemodiálisis (tunelitis), donde *S.aureus* iguala o incluso supera en incidencia a los ECN (Fariñas et al, 2008). En Urgencias de Pediatría, servicio con un número de bacteriemias muy bajo, destaca *S.pneumoniae* debido a lo habitual de la patología respiratoria en estos pacientes (Irwin et al., 2015).

Dentro del género *Enterococcus*, *E.faecium* esté presente de una manera más acusada en los Servicios de Hematología y Digestivo respecto a los demás. Por un lado, debido a su elevado perfil de resistencia antibiótica es un microorganismo habitual en pacientes multitratados (Hematología); por otro lado está descrito (Billington et al., 2014; Pinholt et al., 2014) que en las infecciones con foco en el tracto gastrointestinal (Digestivo) predomina frente a *E.faecalis*, que hace lo propio en el foco genitourinario.

Objetivo 10: Estudiar los patrones de resistencia de dichos microorganismos y su evolución a lo largo de los 10 años.

La instauración de un tratamiento antibiótico correcto es la medida, dentro del manejo del paciente, que más disminuye la mortalidad (Sinha et al., 2018), además de reducir los tiempos de estancia hospitalaria, el gasto en antibióticos y la aparición de resistencias (Orsi et al., 2015). En la actualidad, los fenómenos de multirresistencia bacteriana son un fenómeno muy frecuente (Bhattacharya, 2013), lo que dificulta enormemente su elección, principalmente en las infecciones nosocomiales (Cisneros-Herreros et al., 2007).

Es importante tanto el tratamiento empírico como el dirigido:

-El tratamiento empírico se establece sin conocer cuál es el microorganismo causante de la bacteriemia ni su patrón de sensibilidad antibiótica. Para poder ajustarlo lo máximo posible es por tanto necesario tanto conocer la etiología, como los patrones de resistencia.

-El tratamiento dirigido es aquél en el cual ya se conoce tanto el microorganismo responsable del cuadro clínico como su sensibilidad antibiótica. Es un tratamiento que por tanto ya está optimizado en las guías clínicas en lo que respecta al antibiótico, la dosificación y la duración.

Desde el Servicio de Microbiología se contribuye a una elección correcta de los tratamientos empíricos con un mayor conocimiento de la etiología, de los patrones de resistencia locales y de su evolución a lo largo del tiempo. Hay que tener en cuenta que las resistencias antimicrobianas para cada microorganismo dependen fundamentalmente del factor geográfico; puede haber diferencias enormes en las tasas de resistencia en función del país en el que nos encontremos, entre hospitales de la misma región e incluso intrahospitalarias (Calvo Montes et al., 2014).

A lo largo de la década pudimos apreciar lo siguiente:

a) El nivel de resistencias detectado en las cepas de nuestro hospital es, en general, alto. Las resistencias en gram positivos se mantuvieron estables, mientras que en gram negativos aumentaron considerablemente. Comparado con lo hallado en nuestro mismo entorno hace 30 años (Vázquez et al., 1994), el porcentaje de cepas resistentes en la actualidad es muy superior independientemente del microorganismo. A nivel mundial, en la actualidad, se puede apreciar variabilidad en las tasas de resistencia, siempre siendo elevadas (Mikulska et al., 2014; Montassier et al., 2013), e incrementándose principalmente en gram negativos (Vasoo et al., 2015). En otros estudios en España (Cantón et al., 2011), se pueden observar resultados

similares: alta resistencia y aumento de la misma en gram negativos. Esta apreciación general es consecuencia de que los elementos genéticos responsables de dichas resistencias son más fácilmente transmisibles en el caso de bacterias gram negativas (Bhattacharya, 2013).

b) El porcentaje de cepas de *S.aureus* resistentes a meticilina se mantuvo estable -alrededor del 30%-, en rangos similares a lo encontrado en la literatura española (Vindel et al., 2009, Treviño et al., 2015) y sin aparición de resistencias a vancomicina, linezolid o daptomicina, las últimas alternativas de tratamiento. Hubo muy pocas cepas sensibles a penicilina; en los años 90 del siglo pasado las tasas de resistencia ya superaban el 90% (Lowy, 1998).

Respecto a *S.epidermidis*, en la literatura consultada las tasas de resistencia a oxacilina suelen ser elevadas, entre el 50 y el 80% (García de la Mària et al., 2015; Mikulska et al., 2014), en general inferiores a las nuestras (alrededor del 80%). Hemos empezado a encontrar resistencias a linezolid, en casi el 15% de las cepas, lo que ya se refleja en la literatura (Baos et al., 2013).

En *Enterococcus spp.* también destacó la aparición de resistencias a linezolid, descritas ya hace tiempo a nivel mundial (Ross et al., 2011).

Para *S.pneumoniae* no se apreciaron cambios en los niveles de resistencia. Si nos referimos a la penicilina, incluso las resistencias disminuyeron a partir de 2008. Sin embargo, esto es atribuible principalmente a cambios en los puntos de corte por parte del CLSI en dicho año (Al-Waili et al., 2013).

c) En gram negativos, se ha producido un incremento preocupante de las resistencias en estos diez años con un incremento notable de las cepas productoras de BLEEs y la aparición y diseminación de las productoras de carbapenemasas. Se produjo también un incremento de las resistencias a otros antimicrobianos, en muchos de los casos asociadas a las anteriores pues se pueden transmitir en los mismos elementos genéticos móviles (Vasoo et al., 2015).

En el caso de *E.coli* se produce un incremento en los primeros años del estudio de las cepas productoras de BLEEs, refrendado en la bibliografía consultada (Angel et al., 2009). Respecto a los demás antibióticos, las tasas de resistencia se han mantenido relativamente estables, y no han aparecido cepas productoras de carbapenemasas.

K.pneumoniae es el microorganismo que mayores problemas ha generado a nivel de resistencias en la última década. Se produjo un gran aumento de cepas productoras de BLEEs y

aparición de productoras de carbapenemasas (Oteo et al., 2014; Chong et al., 2018). En nuestro caso, mayoritariamente se trató de carbapenemasas OXA-48.

Respecto a *E. cloacae*, sus tasas de resistencia se han incrementado de manera significativa, principalmente para las cefalosporinas de tercera generación (representadas por la cefotaxima en resultados). También aparecieron cepas productoras de carbapenemasas del tipo OXA-48, como también comentan otros autores (Oteo et al., 2014).

P. aeruginosa repite la tendencia que hemos visto anteriormente. Aumento de la resistencia, en este caso a los carbapenémicos y aminoglucósidos. En una revisión muy reciente (Mikulska et al., 2014) se encuentran tasas muy similares de resistencia a carbapenemes (44%).

Para *A. baumannii* la situación se ha mantenido estable: desde principio del estudio las cepas fueron multirresistentes, habitualmente sólo sensibles a colistina, y así se han mantenido.

Como comentamos previamente, la microbiota puede ser variable incluso entre Servicios del mismo hospital (Cisneros-Herreros et al., 2007), por lo que resulta interesante estudiar a este nivel tanto las resistencias como su evolución. La limitación con la que nos encontramos es que el número de aislados requeridos para hacer un estudio de resistencias valorable es de 30 anuales (Calvo Montes et al., 2014); nosotros lo redujimos a 15 para poder realizar un estudio un poco más amplio. Aún así, esto se pudo realizar únicamente para servicios y microorganismos puntuales. En general no se observaron diferencias respecto a las tendencias ya comentadas: estabilidad en gram positivos, y aumento de resistencias en gram negativos; sí destacaron *S. epidermidis* en Medicina Intensiva y *S. aureus* en Medicina Interna al presentar cepas aún más resistentes que el promedio general.

Durante 2016 quisimos comparar la resistencia de los aislados obtenidos en el Servicio de Urgencias Generales frente a los del resto del hospital. El fundamento es comparar cepas comunitarias con nosocomiales de manera tentativa, basados en el hecho de que en el Servicio de Urgencias los aislados son en su mayoría de origen comunitario mientras que en el resto del hospital los aislados puede ser de origen comunitario, pero es muy posible que sean de origen nosocomial. Se sabe, desde hace muchos años, (McGowan et al., 1989) que la microbiota nosocomial puede presentar mayores resistencias que la comunitaria. En nuestro caso, esto únicamente fue significativo para *S. epidermidis* (no para *E. coli*, *S. aureus* y *S. pneumoniae*).

Objetivo 11: Evaluar la influencia de los cambios tecnológicos habidos en el laboratorio en los tiempos de respuesta de emisión de informes de resultados.

De nada sirven las mejoras diagnósticas comentadas en las fases preanalítica y analítica, con las que se pueden conseguir resultados más fiables y rápidos, si dicha información no llega al clínico responsable del paciente a tiempo y supone una mejora en el manejo del mismo. Por ello evaluamos lo que los avances ya analizados supusieron a nivel del tiempo de respuesta necesario para proporcionar información sensible, comparando los algoritmos de trabajo antes y después de la aplicación de los cambios señalados.

La información fue facilitada con una ganancia de tiempo muy importante con los nuevos algoritmos de trabajo, principalmente la identificación del agente causal de la bacteriemia (entre 10 y 30 horas de mejora), pero también el antibiograma, con más de cinco horas de reducción. Esta disminución en el tiempo necesario para informar el antibiograma se debe a su asociación con MALDI-TOF MS, pues como acabamos de comentar ambas informaciones son necesarias y complementarias, e idealmente deberían ser simultáneas. En la literatura hay descritos estudios similares al nuestro, en los que se consiguen mejoras de 18 horas para la identificación y de 12 horas para la susceptibilidad antibiótica (Verroken et al., 2016). Con ello podemos concluir que el trabajo de mejora realizado en el Servicio de Microbiología tuvo un reflejo real en el manejo de la sepsis; lo que teniendo en cuenta la gravedad de dicha patología y lo fundamental de los tiempos de respuesta en la misma es un buen punto de partida de cara al futuro.

Un futuro en el que, combinando las nuevas tecnologías, como MALDI-TOF MS y las basadas en la PCR (el panel de PCR múltiple FilmArray de Sepsis acaba de ser aprobado para su uso en el hospital), y las mejoras en los flujos de trabajo (trabajar 24 horas los hemocultivos realizando identificaciones y antibiogramas tiene unas repercusiones muy positivas -Eveillard et al., 2010-) y en la fase preanalítica esperamos contribuir a un mejor manejo de la sepsis, disminuyendo los costes y principalmente la mortalidad de los pacientes con esta patología.

CONCLUSIONES

1. Las solicitudes de estudio de bacteriemia se han incrementado un 17% en la última década, aumentando en población adulta y disminuyendo en la población pediátrica.
2. El incremento del tiempo de procesamiento de las muestras no se relacionó con una disminución de la recuperación de hemocultivos positivos para períodos de tiempo inferiores a 18 horas.
3. El porcentaje de resultados positivos del hemocultivo (15,2%) estuvo en los rangos habituales conocidos, y fue ligeramente superior en hombres y en pacientes de más de 65 años.
4. El porcentaje de hemocultivos contaminados en nuestro hospital (8,4%) estuvo muy por encima de los estándares máximos recomendados, lo que supone una gran oportunidad de mejora a nivel clínico y económico.
5. El cambio de incubador supuso menos falsos positivos, pero no aumentó la sensibilidad ni redujo los tiempos de respuesta.
6. El estudio del tiempo de positividad del hemocultivo en combinación con la tinción de Gram facilitó la realización de algoritmos diagnósticos muy útiles. El punto de corte de 12 horas permitió distinguir entre bacteriemias verdaderas y contaminaciones y orientar acerca del microorganismo causante de la bacteriemia.
7. La identificación de los microorganismos por MALDI-TOF MS fue más rápida y fiable que la realizada por métodos tradicionales, incluso con muy pocas horas de incubación del microorganismo.
8. Los antibiogramas directos de lectura rápida fueron interpretables y fiables principalmente para enterobacterias.
9. RAPIDEC® CARBA NP se demostró como un buen método para la detección de carbapenemasas, rápido y con un 95% de sensibilidad y 100% de especificidad.
10. La mayoría de las bacteriemias tuvieron lugar o fueron atendidas en los Servicios de Medicina Intensiva, Hematología, Medicina Interna, Urgencias Generales y Digestivo, como cabía esperar puesto que atienden a pacientes más graves o proclives a infecciones.
11. Las bacteriemias fueron más frecuentes en hombres y en pacientes de más de 65 años, y no se relacionaron con el mes de petición. Fueron infrecuentes en población pediátrica, principalmente en los niños atendidos en Urgencias de Pediatría, exceptuando en los pacientes neonatos.
12. Los microorganismos que se aislaron con mayor frecuencia fueron *S.epidermidis* y *E.coli*. A lo largo de los 10 años, se produjo un descenso significativo de las bacteriemias por gram positivos y también por *A.baumannii*, coincidiendo con el

aumento de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, principalmente *E.coli*, *K.pneumoniae* y *E.cloacae*.

13. Las resistencias antibióticas mostraron un ascenso en las bacterias gram negativas, en base al gran aumento de las BLEEs en *E.coli* y *K.pneumoniae*, a la aparición de las carbapenemasas en *K.pneumoniae* y *E.cloacae*, y a la disminución de la sensibilidad a carbapenémicos en *P.aeruginosa*. En cambio, en gram positivos se han mantenido estables, siendo lo único reseñable la aparición de resistencias a linezolid en *S.epidermidis* y *Enterococcus spp.*
14. Las innovaciones tecnológicas habidas en el laboratorio, junto con los cambios en los flujos de trabajo asociados a las mismas, han supuesto una reducción muy sustancial de los tiempos de respuesta, contribuyendo con informaciones más rápidas (entre 5,3 y 33,2 horas) y fiables al manejo de los pacientes con sepsis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- * Al-Hasan MN, Lahr BD, Eckel-Passow JE, Baddour LM. Seasonal variation in *Escherichia coli* bloodstream infection: a population-based study. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(10):947-50.
- * Al-Soud WA, Rådström P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol*. 2001; 39:485–93.
- * Al-Waili BR, Al-Thawadi S, Hajjar SA. Impact of the revised penicillin susceptibility breakpoints for *Streptococcus pneumoniae* on antimicrobial resistance rates of meningeal and non-meningeal pneumococcal strains. *Ann Saudi Med*. 2013; 33(2):111-5.
- * Alahmadi YM, Aldeyab MA, McElnay JC, Scott MG, Darwish Elhajji FW, Magee FA, Dowds M, Edwards C, Fullerton L, Tate A, Kearney MP. Clinical and economic impact of contaminated blood cultures within the hospital setting. *J Hosp Infect*. 2011; 77:233e236.
- * Abdulaziz YA, Abdulrahman AA, Raed MA, Armen AT, Abdulaziz AB, Ali MA, Ali MS. Rate of blood culture contamination in a teaching hospital: A single center study. *Journal of Taibah University Medical Sciences*. 2015; 10(4):432-6.
- * Alvarez-Lerma F, Oliva G, Ferrer JM, Riera A, Palomar M; Consell Assessor del Proyecto *Bacteriemia Zero* en Catalunya. Resultados de la aplicación del proyecto *Bacteriemia Zero* en Catalunya. *Med Clin (Barc)*. 2014; 143 Suppl 1:11-6.
- * Amenazas de resistencia antibiótica. Centers for Disease Control and Prevention. 2013. Acceso 20 de junio de 2018. Disponible en: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.
- * Angel Díaz M, Ramón Hernández J, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual A; Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: segundo estudio multicéntrico (proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; 27(9):503-10.
- * Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001; 29(7):1303-10.
- * Angus DC, van der Poll T: Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013; 369:2063.
- * Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med*. 2001; 29(7 Suppl):S109-16. Review.

- *Anhalt JP and Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1975;47:219–225.
- *Arendrup MC. *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. *Dan Med J.* 2013;60(11):B4698.
- * Ausina Ruiz V. y Moreno Guillén S. (2005). *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- * Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG Jr, Tleyjeh IM, Rybak MJ, Barsic B, Lockhart PB, Gewitz MH, Levison ME, Bolger AF, Steckelberg JM, Baltimore RS, Fink AM, O'Gara P, Taubert KA; American Heart Association Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and Stroke Council. Infective Endocarditis in Adults: Diagnosis, Antimicrobial Therapy, and Management of Complications: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation.* 2015 13;132(15):1435-86. Review.
- * Baos E, Candel FJ, Merino P, Pena I, Picazo JJ. Characterization and monitoring of linezolid-resistant clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* in an intensive care unit 4 years after an outbreak of infection by *cfr*-mediated linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;76(3):325-9.
- * Barenfanger J, Drake C, Kacich G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* 1999;37(5):1415-8.
- * Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson RB Jr, Bourbeau P, Carroll KC, Kehl SC, Dunne WM, Robinson-Dunn B, Schwartzman JD, Chapin KC, Snyder JW, Forbes BA, Patel R, Rosenblatt JE, Pritt BS. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)(a). *Clin Infect Dis.* 2013;57(4):e22-e121.
- * Baron, E.J., M.P.Weinstein, W.M.Dunne, Jr., P.Yagupsky, D.F.Welch, and D.M.Wilson. 2005. *Cumitech 1C, Blood Cultures IV*. Coordinating ed., E.J.Baron. ASM Press, Washington, D.C.
- * Bates DW, Goldman L, Lee TH. Contaminant blood cultures and resource utilization. The true consequences of false-positive results. *JAMA.* 1991 16;265(3):365-9.

- * Bekeris LG, Tworek JA, Walsh MK, Valenstein PN. Trends in blood culture contamination: a College of American Pathologists Q-Tracks study of 356 institutions. *Arch Pathol Lab Med*. 2005;129(10):1222-5.
- * Bhattacharya S. Early diagnosis of resistant pathogens: how can it improve antimicrobial treatment?. *Virulence*. 2013 15;4(2):172-84.
- *Billington EO, Phang SH, Gregson DB, Pitout JD, Ross T, Church DL, Laupland KB, Parkins MD. Incidence, risk factors, and outcomes for *Enterococcus spp.* blood stream infections: a population-based study. *Int J Infect Dis*. 2014;26:76-82.
- * Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol infect*. 2010; 16:1614–19.
- * Bone RC. Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). *JAMA*. 1992 23-30;268(24):3452-5. Review.
- * Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. 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*. 1992;101(6):1644-55. Review.
- * Bosshard PP, Abels S, Zbinden R, Böttger EC, Altwegg M. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). *J. Clin. Microbiol*. 2003;41:4134–4140.
- * Bou-Antoun S, Davies J, Guy R, Johnson AP, Sheridan EA, Hope RJ. Descriptive epidemiology of *Escherichia coli* bacteraemia in England, April 2012 to March 2014. *Euro Surveill*. 2016 1;21(35).
- * Bryan CS. Clinical implications of positive blood cultures. *Clin Microbiol Rev*. 1989;2(4):329-53. Review.
- * Calvo Montes J, Canut Blasco A, Martínez-Martínez L, Rodríguez Díaz JC. Preparación de informes acumulados de sensibilidad a los antimicrobianos. 51. Martínez-Martínez L (coordinador). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014.

- * Cantón R, Loza E, Aznar J, Calvo J, Cercenado E, Cisterna R, Romo FG, Hontangas JL, Calvo CR, Barrenechea AI, Tubau F, Weber I, Yuste P, Cavanillas R; SMART-Spain Working Group. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms from intraabdominal infections and evolution of isolates with extended spectrum β -lactamases in the SMART study in Spain (2002-2010). *Rev Esp Quimioter*. 2011;24(4):223-32.
- * Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti JL, Ferroni A, Gutmann L, Nassif X. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin Biochem*. 2011;44(1):104-9.Review.
- * Carroll K. y Weinstein M.P. (2007). Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms. En: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, M.A. Pfaller (Ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Edition. Washington, DC, EE.UU.: ASM Press.
- * Chandrasekaran S, Abbott A, Campeau S, Zimmer BL, Weinstein M, Thrupp L, Hejna J, Walker L, Ammann T, Kirn T, Patel R, Humphries RM. Direct-from-Blood-Culture Disk Diffusion To Determine Antimicrobial Susceptibility of Gram-Negative Bacteria: Preliminary Report from the Clinical and Laboratory Standards Institute Methods Development and Standardization Working Group. *J Clin Microbiol*. 2018 22;56(3).
- * Chang CJ, Wu CJ, Hsu HC, Wu CH, Shih FY, Wang SW, Wu YH, Chang CM, Tu YF, Chi CH, Shih HI. Factors Associated with Blood Culture Contamination in the Emergency Department: Critical Illness, End-Stage Renal Disease, and Old Age. *PLoS One*. 2015 8;10(10):e0137653.
- * Chong Y, Shimoda S, Shimono N. Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Genet Evol*. 2018;61:185-188.
- * Chukwuemeka IK, Samuel Y. Quality assurance in blood culture: A retrospective study of blood culture contamination rate in a tertiary hospital in Nigeria. *Niger Med J*. 2014;55(3):201-3.
- * Cisneros JM, Sánchez-González M, Prados MT, Llanos C, Vigil E, Soto-Espinosa B, Pachón-Díaza J. Hemocultivos en el servicio de Urgencias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;23:135-9.
- * Cisneros-Herreros JM, Cobo-Reinoso J, Pujol-Rojo M, Rodríguez-Baño J, Salavert-Lletí M. Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. Guías de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25(2):111-30.

- * Cobos-Trigueros N, Kaasch AJ, Soriano A, Torres JL, Vergara A, Morata L, Zboromyrska Y, De La Calle C, Alejo I, Hernández C, Cardozo C, Marco F, Del Río A, Almela M, Mensa J, Martínez JA. Time to positivity and detection of growth in anaerobic blood culture vials predict the presence of *Candida glabrata* in candidemia: a two-center European cohort study. *J Clin Microbiol.* 2014;52(8):3082-4.
- * Coburn B, Morris AM, Tomlinson G, Detsky AS. Does this adult patient with suspected bacteremia require blood cultures?. *JAMA.* 2012;308:502–511.
- * Cockerill FR 3rd, Wilson JW, Vetter EA, Goodman KM, Torgerson CA, Harmsen WS, Schleck CD, Ilstrup DM, Washington JA 2nd, Wilson WR. Optimal testing parameters for blood cultures. *Clin Infect Dis.* 2004 15;38(12):1724-30.
- * *Código Sepsis.* Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud. Acceso 20 de junio de 2018. Disponible en: <https://www.seguridaddelpaciente.es/resources/documentos/2016/SEPSIS-DOCUMENTO-DE-CONSENSO.pdf>.
- * *Código Sepsis.* Declaración de Mallorca. Sociedad Española de Quimioterapia. Acceso 20 de junio de 2018. Disponible en: <http://seq.es/wp-content/uploads/2012/10/DECLARACION%20MALLORCA%20SEPSIS%202012.pdf>.
- * Cohen J, Vincent JL, Adhikari NK, Machado FR, Angus DC, Calandra T, Jaton K, Giulieri S, Delaloye J, Opal S, Tracey K, van der Poll T, Pelfrene E. Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(5):581-614.
- * Conway GC, Smole SC, Sarracino DA, Arbeit RD, Leopold PE. Phyloproteomics: species identification of Enterobacteriaceae using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2001;3(1):103-12.
- * Cross A y Levine MM. Patterns of bacteraemia aetiology. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(10):1005-1006.
- * Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 Mar;36(2):380-407. Review.
- * Curtioni A, Cipriani R, Marra ES, Barbui AM, Cavallo R, Costa C. Rapid Identification of Microorganisms from Positive Blood Culture by MALDI-TOF MS After Short-Term Incubation on Solid Medium. *Curr Microbiol.* 2017;74(1):97-102.
- * Davies A, Green C, Hutton J, Chinn C. Severe sepsis: a european estimate of the burden of disease in ICU. *Intensive Care Med* 2001;27(Suppl 2):581A.

- * Dawson S. Blood culture contaminants. *J Hosp Infect.* 2014;87(1):1-10. Review.
- * De Carolis E, Vella A, Vaccaro L, Torelli R, Spanu T, Fiori B, Posteraro B, Sanguinetti M. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *J Infect Dev Ctries.* 2014 12;8(9):1081-8. Review.
- * Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, Levy MM; *Surviving Sepsis Campaign* Management Guidelines Committee. *Surviving Sepsis Campaign* guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med.* 2004;32(3):858-73.
- * Dellinger R, Levy M, Carlet J, Bion J, Parker M, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent JL. *Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008.* *Intensive Care Med.* 2008;34:17–60.
- * Department of Health (United Kingdom). 2007. Taking blood cultures. A summary of Best Practice. Acceso 20 de junio de 2018. Disponible en: http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20120118171812/http://hcai.dh.gov.uk/files/2011/03/Document_Blood_culture_FINAL_100826.pdf.
- * Dolin R. (2016). Infecciones respiratorias virales frecuentes. En Kasper D., Fauci A., Hauser S., Longo D., Jameson J.L. y Loscalzo J., *Harrison. Principios de Medicina Interna.* 19th Edition. Nueva York, EE.UU.: McGraw-Hill Medical.
- * Eber MR, Shardell M, Schweizer ML, Laxminarayan R, Perencevich EN. Seasonal and temperature-associated increases in gram-negative bacterial bloodstream infections among hospitalized patients. *PLoS One.* 2011;6(9):e25298.
- * Edelmann, A., Pietzcker, T. & Wellinghausen, N. Comparison of direct disk diffusion and standard microtitre broth dilution susceptibility testing of blood culture isolates. *J Med Microbiol.* 2007; 56:202–207.
- * Elliott TS, Stevens CM, Macrae F, Hart IT, Healing DE, Palmer M, Catchpole CR. Improved recovery of antibiotic-stressed microorganisms on inclusion of saponin in aerobic blood culture media. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998;17(8):566-9.
- * EPINE 2017. Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene. Acceso 20 de junio de 2018. Disponible en: <http://hws.vhebron.net/epine/Global/EPINE-EPPS%202017%20Informe%20Global%20de%20Espa%C3%B1a%20Resumen.pdf>.

- * EUCAST. Detección de mecanismos de resistencia. Acceso 20 de junio de 2018. Disponible en: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf.
- * Eveillard M, Lemarié C, Cottin J, Hitoto H, Mahaza C, Kempf M, Joly-Guillou ML. Assessment of the usefulness of performing bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing 24 h a day in a clinical microbiology laboratory. *Clin Microbiol Inf.* 2010; 16:1084–1089.
- * Fariñas MC, García-Palomo JD, Gutiérrez-Cuadra M. Infecciones asociadas a los catéteres utilizados para la hemodiálisis y la diálisis peritoneal. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008;26(8):518-26.
- * Faron ML, Buchan BW, Ledebor NA. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Use with Positive Blood Cultures: Methodology, Performance, and Optimization. *J Clin Microbiol.* 2017;55(12):3328-3338.
- * Fay D, Oldfather JE. Standardization of direct susceptibility test for blood cultures. *J Clin Microbiol.* 1979;9(3):347-50.
- * Fernández J, Rodríguez-Lucas C, Fernández-Suárez J, Vazquez F, Rodicio MR. Identification of *Enterobacteriaceae* and detection of carbapenemases from positive blood cultures by combination of MALDI-TOF MS and Carba NP performed after four hour subculture in Mueller Hinton. *J Microbiol Methods.* 2016;129:133-135.
- * Ferreira FL, Bota DP, Bross A, Mélot C, Vincent JL. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *JAMA.* 2001 Oct 10;286(14):1754-8.
- * Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K; International Forum of Acute Care Trialists. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 193(3): 259-72.
- * Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, Lamm W, Clark C, MacFarquhar J, Walton AL, Reller LB, Sexton DJ. Health care-associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med.* 2002 19;137(10):791-7.
- * Gander RM, Byrd L, Decrescenzo M, Hirany S, Bowen M, Baugman J. Impact of blood cultures drawn by phlebotomy on contamination rates and health care costs in a hospital emergency department. *J Clin Microbiol.* 2009;47:1021–4.

- * García de la Mària C, Cervera C, Pericàs JM, Castañeda X, Armero Y, Soy D, Almela M, Ninot S, Falces C, Mestres CA, Gatell JM, Moreno A, Marco F, Miró JM; Hospital Clinic Endocarditis Study Group. Epidemiology and prognosis of coagulase-negative staphylococcal endocarditis: impact of vancomycin minimum inhibitory concentration. *PLoS One*. 2015 11;10(5):e0125818.
- * Garcia RA, Spitzer ED, Beaudry J, Beck C, Diblasi R, Gilleeny-Blabac M, Haugaard C, Heuschneider S, Kranz BP, McLean K, Morales KL, Owens S, Paciella ME, Torregrosa E. Multidisciplinary team review of best practices for collection and handling of blood cultures to determine effective interventions for increasing the yield of true-positive bacteremias, reducing contamination, and eliminating false-positive central line-associated bloodstream infections. *Am J Infect Control*. 2015;43(11):1222-37. Review.
- * García-Rodríguez J.A. y Fresnadillo Martínez M.J. Microbiología de la infección respiratoria pediátrica. *An Esp Pediatr* 2002; 56 [supl 1]: 2-8.
- * Garnacho-Montero J, Dimopoulos G, Poulakou G, Akova M, Cisneros JM, De Waele J, Petrosillo N, Seifert H, Timsit JF, Vila J, Zahar JR, Bassetti M; European Society of Intensive Care Medicine. Task force on management and prevention of *Acinetobacter baumannii* infections in the ICU. *Intensive Care Med*. 2015;41(12):2057-75.
- * Gautier M, Ranque S, Normand AC, Becker P, Packeu A, Cassagne C, L'Ollivier C, Hendrickx M, Piarroux R. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: revolutionizing clinical laboratory diagnosis of mould infections. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(12):1366-71.
- * Girard V, Mailler S, Polsinelli S, Jacob D, Saccomani MC, Celliere B, Monnin V, van Belkum A, Hagen F, Meis JF, Durand G. Routine identification of *Nocardia* species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017;87(1):7-10.
- * Goto M, Al-Hasan MN. Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(6):501-9.
- * Gradel KO, Nielsen SL, Pedersen C, Knudsen JD, Østergaard C, Arpi M, Jensen TG, Kolmos HJ, Sjøgaard M, Lassen AT, Schønheyder HC; Danish Collaborative Bacteraemia Network (DACOBAN) and the Danish Observational Registry of Infectious Syndromes (DORIS). Seasonal Variation of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus pneumoniae* Bacteremia According to Acquisition and Patient Characteristics: A Population-Based Study. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2016;37(8):946-53.

- * Gross PA, Barrett TL, Dellinger P, Krause PJ, Martone WJ, McGowan JE Jr, Sweet RL, Wenzel RP. Purpose of quality standards for Infectious Diseases. *Clin Infect Dis*. 1994;18:421.
- * Hall KK, Lyman JA. Updated review of blood culture contamination. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(4):788-802.
- * Hall MJ, Williams SN, DeFrances CJ, Golosinskiy A. Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals. *NCHS Data Brief*. 2011:1–8.
- * Henriksen DP, Pottegård A, Laursen CB, Jensen TG, Hallas J, Pedersen C, Lassen AT. Risk factors for hospitalization due to community-acquired sepsis - a population-based case-control study. *PLoS One*. 2015 21;10(4):e0124838.
- * Hernández ÁP, Ballester-Téllez M, Galán-Sánchez F, Iglesias MR. Aplicación de la espectrometría de masas en la identificación de bacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016;34 Suppl 2:8-18.
- * Hernández Botero, J. y Florián Pérez, M. (2012). *The History of Sepsis from Ancient Egypt to the XIX Century*. INTECH Open Access Publisher.
- * Hombach M, von Gunten B, Castelberg C, Bloemberg GV. Evaluation of the Rapidec Carba NP Test for Detection of Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. 2015;53(12):3828-33.
- * Hossain B, Islam MS, Rahman A, Marzan M, Rafiqullah I, Connor NE, Hasanuzzaman M, Islam M, Hamer DH, Hibberd PL, Saha SK. Understanding Bacterial Isolates in Blood Culture and Approaches Used to Define Bacteria as Contaminants: A Literature Review. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35(5 Suppl 1):S45-51.
- * Hoyos-Mallecot Y, Riazco C, Miranda-Casas C, Rojo-Martín MD, Gutiérrez-Fernández J, Navarro-Marí JM. Rapid detection and identification of strains carrying carbapenemases directly from positive blood cultures using MALDI-TOF MS. *J Microbiol Methods*. 2014;105:98-101.
- * Huang AH, Yan JJ, Wu JJ. Comparison of five days versus seven days of incubation for detection of positive blood cultures by the Bactec 9240 system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1998;17(9):637-41.
- * Iñigo J, Sendra JM, Díaz R, Bouza C, Sarría-Santamera A. Epidemiología y costes de la sepsis grave en Madrid. Estudio de altas hospitalarias. *Med Intensiva*. 2006;30(5):197-203.

- * Irwin AD, Drew RJ, Marshall P, Nguyen K, Hoyle E, Macfarlane KA, Wong HF, Mekonnen E, Hicks M, Steele T, Gerrard C, Hardiman F, McNamara PS, Diggle PJ, Carrol ED. Etiology of childhood bacteremia and timely antibiotics administration in the emergency department. *Pediatrics*. 2015;135(4):635-42.
- * Isenberg H.D. (2010). *Clinical microbiology procedures handbook*. En: M.K.York , M.Henry, P.Gilligan, (Ed.), Section 3.4.1 Aerobic bacteriology, blood cultures, general detection and interpretation. Washington, DC, EE.UU.: ASM Press.
- * Kassis C, Rangaraj G, Jiang Y, Hachem RY, Raad I. Differentiating culture samples representing coagulase-negative staphylococcal bacteremia from those representing contamination by use of time-to-positivity and quantitative blood culture methods. *J Clin Microbiol*. 2009; 47(10):3255–3260.
- * Kaukonen KM, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *N Engl J Med*. 2015 23;372(17):1629-38.
- * Kim J, Gregson DB, Ross T, Lauplant KB. Time to blood culture positivity in *Staphylococcus aureus* bacteremia: association with 30-day mortality. *J Infect* 2010;61:197e204.
- * Kirn TJ y Weinstein MP. Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(6):513-20. Review.
- * Kothari A, Morgan M, Haake DA. Emerging technologies for rapid identification of bloodstream pathogens. *Clin Infect Dis*. 2014 Jul 15;59(2):272-8. Review.
- * Kumar MP, Vairamani M, Raju RP, Lobo C, Anbumani N, Kumar CP, Menon T, Shanmugasundaram S. Rapid discrimination between strains of beta haemolytic streptococci by intact cell mass spectrometry. *Indian J Med Res*. 2004;119(6):283-8.
- * Kumar A, Roberts D: Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit. Care Med*. 2006; 34(6):1589–1596.
- * Lagacé-Wiens PR, Adam HJ, Karlowsky JA, Nichol KA, Pang PF, Guenther J, Webb AA, Miller C, Alfa MJ. Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: analysis of performance, cost, and turnaround time. *J Clin Microbiol*. 2012;50(10):3324-8.

- * Lai CC, Wang CY, Liu WL, Huang YT, Liao CH, Hsueh PR. Time to positivity in blood cultures of staphylococci: clinical significance in bacteremia. *J Infect.* 2011;62(3):249-51.
- * Lai CC, Wang CY, Liu WL, Huang YT, Hsueh PR. Time to positivity of blood cultures of different *Candida* species causing fungaemia. *J Med Microbiol.* 2012;61(Pt 5):701-4.
- * Lax S, Sangwan N, Smith D, Larsen P, Handley KM, Richardson M, Guyton K, Krezalek M, Shogan BD, Defazio J, Flemming I, Shakhsheer B, Weber S, Landon E, Garcia-Houchins S, Siegel J, Alverdy J, Knight R, Stephens B, Gilbert JA. Bacterial colonization and succession in a newly opened hospital. *Sci Transl Med.* 2017 24;9(391).
- * Lever, A., and I. Mackenzie. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *BMJ.* 2007; 335:879–883.
- * Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; International Sepsis Definitions Conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 2003;29(4):530-8. Review.
- * López Roa P, Sánchez Carrillo C, Marín M, Romero F, Cercenado E, Bouza E. Value of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight for routine identification of viridans group streptococci causing bloodstream infections. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(5):438-44.
- * Lowy F. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 1998; 339: 520-32.
- * Loza Fernández de Bobadilla E, Planes Reig A, Rodríguez Creixems M. Hemocultivos. 3a. Loza Fernández de Bobadilla E (coordinador). *Procedimientos en Microbiología Clínica.* Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2003.
- * Macgowan AP; BSAC Working Parties on Resistance Surveillance. Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62 Suppl 2:ii105-14. Review.
- * Mancini N, Carletti S, Ghidoli N, Cichero P, Burioni R, Clementi M. The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(1):235-51. Review.
- * March Rosselló GA y Bratos Pérez MÁ. Antibiograma rápido en Microbiología Clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34(1):61-8.
- * Marco F. Molecular methods for septicemia diagnosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017;35(9):586-592.

- * Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The Epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003;348: 1546-54.
- * Martín-Gutiérrez G, Martín-Pérez C, Gutiérrez-Pizarra A, Lepe JA, Cisneros JM, Aznar J. Time to positivity of blood cultures in patients with bloodstream infections: A useful prognostic tool. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35(10):638-644.
- * Martínez JA, Pozo L, Almela M, Marco F, Soriano A, López F, Balasso V, Aguilar J, Mensa J. Microbial and clinical determinants of time-to-positivity in patients with bacteraemia. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(7):709-16.
- * Mayr F, Yende S, Angus D. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 2013;5:4–11.
- * McDonald LC, Banerjee SN, Jarvis WR. Seasonal variation of *Acinetobacter* infections: 1987-1996. Nosocomial Infections Surveillance System. *Clin Infect Dis*. 1999;29(5):1133-7.
- * McGowan JE Jr, Barnes MW, Finland M. Bacteremia at Boston City Hospital: Occurrence and mortality during 12 selected years (1935-1972), with special reference to hospital-acquired cases. *J Infect Dis*. 1975;132(3):316-35.
- * McGowan JE Jr, Hall EC, Parrott PL. Antimicrobial susceptibility in gram-negative bacteremia: are nosocomial isolates really more resistant?. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989;33(11):1855-9.
- * Menon V, Lahanas S, Janto C, Lee A. Utility of direct susceptibility testing on blood cultures: is it still worthwhile?. *J Med Microbiol*. 2016;65(6):501-9.
- * Mikulska M, Viscoli C, Orasch C, Livermore DM, Averbuch D, Cordonnier C, Akova M; Fourth European Conference on Infections in Leukemia Group (ECIL-4), a joint venture of EBMT, EORTC, ICHS, ELN and ESGICH/ESCMID. Aetiology and resistance in bacteraemias among adult and paediatric haematology and cancer patients. *J Infect*. 2014;68(4):321-31.
- * Mirrett S, Reller LB, Petti CA, Woods CW, Vazirani B, Sivadas R, Weinstein MP. Controlled clinical comparison of Bact/ALERT standard aerobic medium with BACTEC standard aerobic medium for culturing blood. *J Clin Microbiol*. 2003;41(6):2391-4.
- * Mirrett S, Reller LB. Comparison of direct and standard antimicrobial disk susceptibility testing for bacteria isolated from blood. *J Clin Microbiol*. 1979;10(4):482-7.
- * Montassier E, Batard E, Gastinne T, Potel G, de La Cochetière MF. Recent changes in bacteremia in patients with cancer: a systematic review of epidemiology and antibiotic resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32(7):841-50.

- * Moon HW, Ko YJ, Park S, Hur M, Yun YM. Analysis of community- and hospital-acquired bacteraemia during a recent 5-year period. *J Med Microbiol.* 2014;63(Pt 3):421-6.
- * Ning Y, Hu R, Yao G, Bo S. Time to positivity of blood culture and its prognostic value in bloodstream infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35(4):619-24.
- * OMS, 2004. The global burden of disease: 2004 update. Acceso 20 de junio de 2018. Disponible en: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf?ua=1.
- * OMS, 2017. Improving the prevention, diagnosis and clinical management of sepsis. Acceso 20 de junio de 2018. Disponible en: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA70/A70_13-en.pdf?ua=1. 2017.
- * Oriol I, Sabé N, Simonetti AF, Lladó L, Manonelles A, González J, Tubau F, Carratalà J. Changing trends in the aetiology, treatment and outcomes of bloodstream infection occurring in the first year after solid organ transplantation: a single centre prospective cohort study. *Transpl Int.* 2017;30(9):903-913.
- * Orsi GB, Giuliano S, Franchi C, Ciorba V, Protano C, Giordano A, Rocco M, Venditti M. Changed epidemiology of ICU acquired bloodstream infections over 12 years in an Italian teaching hospital. *Minerva Anesthesiol.* 2015;81(9):980-8.
- * Oteo J, Miró E, Pérez-Vázquez M, Navarro F. Evolution of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at the global and national level: what should be expected in the future?. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32 Suppl 4:17-23.
- * Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD; Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009;48(5):503-35.
- * Parikh K, Davis AB, Pavuluri P. Do we need this blood culture?. *Hosp Pediatr.* 2014;4(2):78-84.
- * Park SH, Shim H, Yoon NS, Kim MN. Clinical relevance of time to positivity in BACTEC9240 blood culture system. *Korean J Lab Med.* 2010;30(3):276-83.

- * Pemán J, Cantón E, Quindós G, Eraso E, Alcoba J, Guinea J, Merino P, Ruiz-Pérez-de-Pipaon MT, Pérez-del-Molino L, Linares-Sicilia MJ, Marco F, García J, Roselló EM, Gómez-G-de-la-Pedrosa E, Borrell N, Porras A, Yagüe G; FUNGEMYCA Study Group. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(5):1181-7.
- * Pérez López A, Ladhani SN, Breathnach A, Planche T, Heath PT, Sharland M. Trends in paediatric nosocomial bacteraemia in a London tertiary hospital. *Acta Paediatr.* 2013;102(10):1005-9.
- * Peters RP, van Agtmael MA, Danner SA, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM. New developments in the diagnosis of bloodstream infections. *Lancet Infect Dis* 2004;4(12):751-60.
- * Pien BC, Sundaram P, Raoof N, Costa SF, Mirrett S, Woods CW, Reller LB, Weinstein MP. The clinical and prognostic importance of positive blood cultures in adults. *Am J Med.* 2010; 123:819–828.
- * Pinholt M, Ostergaard C, Arpi M, Bruun NE, Schønheyder HC, Gradel KO, Søgaaard M, Knudsen JD; Danish Collaborative Bacteraemia Network (DACOBAN). Incidence, clinical characteristics and 30-day mortality of enterococcal bacteraemia in Denmark 2006-2009: a population-based cohort study. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(2):145-51.
- * Proyecto *Bacteriemia Zero*. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud. Acceso 20 de junio de 2018. Disponible en: <https://www.seguridaddelpaciente.es/es/proyectos/financiacion-estudios/proyecto-bacteriemia-zero/>.
- * Queenan AM y Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:440-458.
- * Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(3):444-65.
- * Richet H. Seasonality in Gram-negative and healthcare-associated infections. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Oct;18(10):934-40.
- * Riedel S, Carroll KC. Blood cultures: key elements for best practices and future directions. *J Infect Chemother.* 2010;16(5):301-16. Review.

- * Rocchetti A, Di Matteo L, Bottino P, Foret B, Gamalero E, Calabresi A, Guido G, Casagrande I. Prospective study of the clinical performance of three BACTEC media in a modern emergency department: Plus Aerobic/F, Plus Anaerobic/F, and Anaerobic Lytic/F. *J Microbiol Methods*. 2016;130:129-132.
- * Rodicio M del R y Mendoza M del C. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22(4):238-45. Review.
- * Rodríguez Díaz JC, Guna Serrano MR, Larrosa Escartín N, Marín Arriaza M. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. *Procedimientos en Microbiología Clínica SEIMC* 62. 2017.
- * Rodríguez-Sánchez B, Marín M, Sánchez-Carrillo C, Cercenado E, Ruiz A, Rodríguez-Créixems M, Bouza E. Improvement of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of difficult-to-identify bacteria and its impact in the workflow of a clinical microbiology laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;79(1):1-6.
- * Román Riechmann E, Barrio Torres J, López Rodríguez MJ. Diarrea aguda. *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNP-AEP* (2010).
- * Rosenblatt JE. Can we afford to do anaerobic cultures and identification? A positive point of view. *Clin Infect Dis*. 1997;25 Suppl 2:S127-31.
- * Ross JE, Farrell DJ, Mendes RE, Sader HS, Jones RN. Eight-year (2002–2009) summary of the linezolid (Zyvox Annu. Appraisal of Potency and Spectrum; ZAAPS) program in European countries. *J. Chemother*. 2011;23:71–76 .
- * Roth A, Wiklund AE, Pålsson AS, Melander EZ, Wullt M, Cronqvist J, Walder M, Sturegård E. Reducing blood culture contamination by a simple informational intervention. *J Clin Microbiol*. 2010;48(12):4552-8.
- * Ruimy R, Armand-Lefevre L, Andremont A. Short time to positivity in blood culture with clustered gram-positive cocci on direct smear examination is highly predictive of *Staphylococcus aureus*. *Am J Infect Control*. 2005;33(5):304-6.
- * Saito T, Iinuma Y, Takakura S, Nagao M, Matsushima A, Shirano M, Ichiyama S. Delayed insertion of blood culture bottles into automated continuously monitoring blood culture systems increases the time from blood sample collection to the detection of microorganisms in bacteremic patients. *J Infect Chemother*. 2009;15(1):49-53.

- * Schulthess B, Bloemberg GV, Zbinden R, Böttger EC, Hombach M. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2014;52(4):1089-97.
- * Scott EG. A practical blood culture procedure. *Am J Clin Pathol.* 1951;21(3):290-4.
- * Self WH, Mickanin J, Grijalva CG, Grant FH, Henderson MC, Corley G, Blaschke DG, McNaughton CD, Barrett TW, Talbot TR, Paul BR. Reducing blood culture contamination in community hospital emergency departments: a multicenter evaluation of a quality improvement intervention. *Acad Emerg Med.* 2014;21(3):274-82.
- * Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D. Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009 15;49(4):543–51.
- * Siegman-Igra Y, Fourer B, Orni-Wasserlauf R, Golan Y, Noy A, Schwartz D, Giladi M. Reappraisal of community-acquired bacteremia: A proposal of a new classification for the spectrum of acquisition of bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2002;34:1431-9.
- * Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016 23;315(8):801-10.
- * Sinha M, Jupe J, Mack H, Coleman TP, Lawrence SM, Fraley SI. Emerging Technologies for Molecular Diagnosis of Sepsis. *Clin Microbiol Rev.* 2018 Feb 28;31(2).
- * Smith-Elekes S y Weinstein MP. Blood cultures. *Infect Dis Clin North Am.* 1993;7(2):221-34.
- * Sowden D, Anstey C, Faddy M (2008) Blood culture time to positivity as a predictor of mortality in community acquired methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Infect* 56(4):295–296.
- * Tedim AP, Ruiz-Garbajosa P, Corander J, Rodríguez CM, Cantón R, Willems RJ, Baquero F, Coque TM. Population biology of intestinal enterococcus isolates from hospitalized and non hospitalized individuals in different age groups. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(5):1820-31.
- * Thomas L. Germs. *N Engl J Med.* 1972 14;287(11):553-5.

- * Treviño M, Losada I, Pallarés MA, Vasallo FJ, Coira A, Fernández-Pérez B, Paz I, Peña F, Romero PA, Martínez-Lamas L, Naveira G, Hervada X. Vigilancia de la resistencia a los antibióticos en *Staphylococcus aureus* en Galicia: 2007-2012. *Rev Esp Quimioter*. 2015;28(6):289-94.
- * Uslan DZ, Crane SJ, Steckelberg JM, Cockerill FR 3rd, St Sauver JL, Wilson WR, Baddour LM. Age- and sex-associated trends in bloodstream infection: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Arch Intern Med*. 2007 23;167(8):834-9.
- * van Belkum A, Chatellier S, Girard V, Pincus D, Deol P, Dunne WM Jr. Progress in proteomics for clinical microbiology: MALDI-TOF MS for microbial species identification and more. *Expert Rev Proteomics*. 2015;12(6):595-605.
- * Vasoo S, Barreto JN, Tosh PK. Emerging issues in gram-negative bacterial resistance: an update for the practicing clinician. *Mayo Clin Proc*. 2015;90(3):395-403.
- * Vazquez F, Mendez FJ, Perez F, Mendoza MC. Anaerobic bacteremia in a general hospital: retrospective five-year analysis. *Rev Infect Dis*. 1987;9(5):1038-43.
- * Vázquez F, Mendoza MC, Villar MH, Pérez F, Méndez FJ. Survey of bacteraemia in a Spanish hospital over a decade (1981-1990). *J Hosp Infect*. 1994;26(2):111-21.
- * Vena A, Muñoz P, Alcalá L, Fernandez-Cruz A, Sanchez C, Valerio M, Bouza E. Are incidence and epidemiology of anaerobic bacteremia really changing?. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(8):1621-9.
- * Verroken A, Defourny L, le Polain de Waroux O, Belkhir L, Laterre PF, Delmée M, Glupczynski Y. Clinical Impact of MALDI-TOF MS Identification and Rapid Susceptibility Testing on Adequate Antimicrobial Treatment in Sepsis with Positive Blood Cultures. *PLoS One*. 2016 26;11(5): e0156299.
- * Verroken A, Defourny L, Lechgar L, Magnette A, Delmee M, Glupczynski Y. Reducing time to identification of positive blood cultures with MALDI-TOF MS analysis after a 5-h subculture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015; 34(2):405–13.
- * Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, Moreno R, Lipman J, Gomersall C, Sakr Y, Reinhart K; EPIC II Group of Investigators. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 2009; 302: 2323–29.

- * Vindel A, Cuevas O, Cercenado E, Marcos C, Bautista V, Castellares C, Trincado P, Boquete T, Pérez-Vázquez M, Marín M, Bouza E; Spanish Group for the Study of *Staphylococcus*. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: molecular epidemiology and utility of different typing methods. *J Clin Microbiol*. 2009;47(6):1620-7.
- * Walkey AJ, Lagu T, Lindenauer PK. Trends in sepsis and infection sources in the United States. A population-based study. *Ann Am Thorac Soc*. 2015; 12: 216–20.
- * Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute. Principles and Practice of Blood Cultures. Document M-47. 2007. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- * Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 18th Edition. 2008. CLSI document M100-S18.
- * Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 28th Edition. 2018. CLSI document M100-S25.
- * Weinbren MJ, Collins M, Heathcote R, Umar M, Nisar M, Ainger C, Masters P. Optimization of the blood culture pathway: a template for improved sepsis management and diagnostic antimicrobial stewardship. *J Hosp Infect*. 2018 Mar;98(3):232-235.
- * Weinstein MP. Current blood culture methods and systems: clinical concepts, technology, and interpretation of results. *Clin Infect Dis*. 1996;23(1):40-6.
- * Weinstein MP, Murphy JR, Reller LB, Lichtenstein KA. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I. Laboratory and epidemiologic observations. *Rev Infect Dis*. 1983;5(1):54-70.
- * Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM, Mirrett S, Reimer LG, Parmigiani G, Reller LB. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin Infect Dis*. 1997;24(4):584-602.
- * Wesley E., Richert E. y Goyette E. (2005). Sepsis with Acute Organ Dysfunction. En Hall J.B., Schmidt G.A. y Wood L.D.H., *Principles of Critical Care*, 3^a Edition, Nueva York, EE.UU.: McGraw-Hill Medical.
- * Willems E, Smismans A, Cartuyvels R, Coppens G, Van Vaerenbergh K, Van den Abeele AM, Frans J; Bilulu Study Group. The preanalytical optimization of blood cultures: a review and the clinical importance of benchmarking in 5 Belgian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;73(1):1-8.

* Wilson M.L., Weinstein M.P. y Reller L.B. (2015). Laboratory Detection of Bacteremia and Fungemia. En J.H. Jorgensen y M.A. Pfaller (Ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 11th Edition. Washington, DC, EE.UU.: ASM Press.

* Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004 1;39(3):309-17.

* Xu J, Millar BC, Moore JE, Murphy K, Webb H, Fox AJ, Cafferkey M, Crowe MJ. Employment of broad-range 16S rRNA PCR to detect aetiological agents of infection from clinical specimens in patients with acute meningitis--rapid separation of 16S rRNA PCR amplicons without the need for cloning. *J Appl Microbiol*. 2003;94(2):197-206.

ANEXOS



Note

Identification of *Enterobacteriaceae* and detection of carbapenemases from positive blood cultures by combination of MALDI-TOF MS and Carba NP performed after four hour subculture in Mueller Hinton



Javier Fernández^{a,b,*,1}, Carlos Rodríguez-Lucas^{b,1}, Jonathan Fernández-Suárez^b, Fernando Vazquez^{a,b,c}, M. Rosario Rodicio^a

^a Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Universidad de Oviedo, Spain

^b Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias, Spain

^c Instituto Universitario Oftalmológico Fernández-Vega, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 July 2016

Received in revised form 16 August 2016

Accepted 18 August 2016

Available online 19 August 2016

Keywords:

MALDI-TOF MS

Carba NP

Blood cultures

Carbapenemase detection

ABSTRACT

A new protocol for *Enterobacteriaceae* identification and detection of carbapenemase-producing isolates from blood cultures by combining MALDI-TOF MS and the Carba NP test has been evaluated. Bacterial identification was correct in 129 of the 130 isolates tested while the Carba NP detected 28 out of the 29 carbapenemase producers.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Identification of the etiologic agent and rapid establishment of appropriate antimicrobial therapy are essential to increase the survival rate of patients with sepsis [1,2]. Several methods have been developed aimed at the prompt identification of bacterial pathogens and definition of their antimicrobial susceptibility directly from positive blood culture bottles. MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) can be used for rapid identification of bacteria in positive blood cultures [3,4].

Gram negative bacilli, particularly species belonging to *Enterobacteriaceae*, are among the most common causative agents of sepsis [2,5]. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* have emerged in recent years, compromising the traditional therapeutic arsenal [6]. Accordingly, rapid detection of this type of resistance is essential to implement early and effective treatment and to establish infection prevention and control measures to limit the spread of resistant microorganisms [6].

Several methods have been proposed for the rapid detection of carbapenemases. Some molecular methods have been validated to be applied directly to clinical specimens, but they are expensive and require specialized personnel [7,8]. Other methods involve bacterial growth, delaying diagnosis at least 18–24 h [7,8]. Recently, the Carba

NP test, based on phenotypic detection of carbapenemases, has been evaluated directly on blood cultures, showing excellent results [9].

The aim of this study was to evaluate a protocol applicable to the routine work of clinical microbiology laboratories, both for the rapid identification of *Enterobacteriaceae* and also for the prompt detection of carbapenemase-producing isolates in positive blood cultures, by combining MALDI-TOF MS with the Carba NP test after four hour subculture in Mueller Hinton.

Over a three month period (June–August 2015), all blood cultures recovered in a Spanish hospital (Central University Hospital of Asturias), which were positive for Gram negative bacilli by Gram staining, were included in the study. A single specimen per patient was studied, except when a period of at least one week had passed since the last positive culture. With these criteria, a total of 149 samples from 137 patients were selected, of which 122 were positive for *Enterobacteriaceae*, with 110 corresponding to monomicrobial cultures.

Blood cultures were performed as part of routine clinical practice using the Plus Aerobic/F Blood Culture Plastic Bottles and the BD BACTEC FX system (Becton Dickinson, Sparks, Maryland, USA). After subculture, bacterial identification was done with the MicroScan System (MicroScan; Beckman Coulter, CA, USA), which was also applied for determination of the minimal inhibitory concentrations (MIC) to a panel of 21 antimicrobials. The modified Hodge and Carba NP tests [8], were applied for phenotypic detection of carbapenemases in all enterobacterial isolates non-susceptible to ertapenem and/or imipenem. The

* Corresponding author at: Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología, Universidad de Oviedo, Facultad de Medicina, Julián Clavería 6, 33006 Oviedo, Spain.

E-mail address: javifdom@gmail.com (J. Fernández).

¹ Both authors have equally contributed to this work.

presence of genes responsible for carbapenemase production was confirmed by Carba-R Xpert PCR (Cepheid, Sunnyvale, CA) following the manufacturer's instructions.

In parallel, and as an objective of the present study, eight drops (~200 µL) of each of the selected positive blood culture bottles contents were inoculated on two Mueller-Hinton plates (MH; Becton Dickinson, Sparks, MD) and incubated at 37 °C in a CO₂ atmosphere for 4 h. Then, MALDI-TOF MS (Microflex™; Bruker Daltonik GmbH, Bremen Germany) was applied to the bacterial growth. The Carba NP test was performed on all bacteria identified as *Enterobacteriaceae* using as much inoculum as possible from the two MH agar plates. In cases in which there was disagreement between the MALDI-TOF MS identification and the routine identification, PCR amplification of the gene encoding 16S ribosomal RNA and subsequent sequencing was performed as previously described [10].

As shown in Table 1, a total of 110 isolates were directly identified from monomicrobial cultures. The MALDI-TOF MS identification after four hour incubation coincided with results obtained with MicroScan for all isolates except three. A single isolate identified as *Citrobacter braakii* by MALDI-TOF MS was identified as *Citrobacter freundii* by the MicroScan system, and two isolates from the same patient identified as *Pantoea dispersa* by MALDI-TOF MS, were assigned to *Enterobacter agglomerans* by the MicroScan after the MH subculture. The same MALDI-TOF MS results were obtained from blood culture bottles and pure isolates. Subsequent sequencing of the 16S rDNA confirmed the former as *C. freundii* and the latter as

Table 1
Direct bacterial identification and carbapenemase detection in blood subcultures using MALDI-TOF MS and the Carba NP test in comparison with alternative methods.

N	MALDI TOF-MS ^a	MicroScan identification	rRNA 16S PCR	H/Carba NP ^c	Carba NP ^a	OXA-48 PCR ^d
1	<i>C. braakii</i>	<i>C. freundii</i>	<i>C. freundii</i>	-/-	-	NA
4	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. aerogenes</i>	NA ^e	-/-	-	NA
2	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	NA	-/-	-	NA
59	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	NA	-/-	-	NA
3	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. oxytoca</i>	NA	-/-	-	NA
13	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	NA	-/-	-	NA
7	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	NA	+/+	+	+
1	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	NA	+/+	-	+
6	<i>M. morgani</i>	<i>M. morgani</i>	NA	-/-	-	NA
2	<i>P. dispersa</i> ^b	<i>E. agglomerans</i>	<i>P. dispersa</i>	-/-	-	NA
5	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. mirabilis</i>	NA	-/-	-	NA
6	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>	NA	-/-	-	NA
1	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>	NA	+/+	+	+
1	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. aerogenes, E. faecium</i>	NA	-/-	-	NA
1	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae, E. faecalis</i>	NA	-/-	-	NA
1	<i>E. coli</i>	<i>E. coli, E. faecium</i>	NA	-/-	-	NA
1	<i>E. coli</i>	<i>E. coli, P. mirabilis</i>	NA	-/-	-	NA
2	<i>E. coli</i>	<i>E. coli, CoNS</i>	NA	-/-	-	NA
1	<i>E. coli</i>	<i>E. coli, A. baumannii</i>	NA	-/-	-	NA
1	<i>E. coli</i>	<i>E. coli, E. faecalis</i>	NA	-/-	-	NA
2	<i>E. coli</i>	<i>E. coli, K. pneumoniae</i>	NA	-/-	-	NA
1	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae, E. coli</i>	NA	+/+ ^d	+	+ ^e
1	<i>M. morgani</i>	<i>M. morgani, B. fragilis</i>	NA	-/-	-	NA

N, number of isolates; CoNS, coagulase-negative staphylococci, not identified for being considered as contaminants; -, negative result; +, positive result; NA, not applicable.

^a MALDI-TOF MS and Carba NP performed after 4 h of incubation.

^b Isolates belonging to the same patient.

^c Results of the Hodge (H) and Carba NP tests.

^d PCR performed in isolated colonies of all enterobacteria displaying increased MICs to imipenem and/or ertapenem.

^e Hodge test, Carba NP test and PCR positives in *K. pneumoniae* isolate.

P. dispersa. Twelve mixed blood cultures were also analyzed but, after four hour incubation, only one of the bacterium could be identified by MALDI-TOF MS in each case.

Concerning carbapenemase detection, 10 isolates (nine *Klebsiella pneumoniae* and one *Serratia marcescens*) showed increased MICs to at least one of the test carbapenems. All of them gave a positive result when analyzed with the modified Hodge and the Carbs NP tests, and the presence of the *bla*_{OXA-48} gene was revealed by PCR. The Carba NP test performed on blood culture bottles after MH subculture was positive in nine out of 10 instances (Table 1). Bacterial identification and carbapenemase detection according to the aforementioned protocols were also applied to a collection of 19 previously characterized *Enterobacteriaceae*, belonging to eight species and producing diverse carbapenemases (OXA-48, KPC, VIM or NDM). For each bacterium, vials containing 10 mL of sterile total human blood were inoculated with 10³ CFU (colony forming units), prepared as previously reported [9]. After four hour incubation in MH, all were accurately identified by MALDI-TOF MS and, independently of the enzyme, all tested positive with the Carba NP (Table 2).

The protocol studied herein is economical, simple and effective. Other methods for bacterial identification from spiked-blood culture have been proposed, but they are not always practical for routine use in clinical microbiology laboratories, since they include numerous steps of washing and centrifugation, and sensitivity may be suboptimal [11,12]. A limitation of this study was the MALDI-TOF MS bacterial identification in mixed blood cultures, which still remains problematic as previously reported [11]. Also, the discrepancies in the identification of *C. freundii* and *P. dispersa* between MALDI-TOF MS and traditional methods based on biochemical tests, have been previously reported [13,14].

Regarding the Carba NP, the method here presented provides results in about the same time (4 h) as the protocol described by Dortet et al. [9] Unlike the latter, the incubation in enriched media, centrifugation and washing steps are unnecessary, making its performance considerably easier, and values of 96.5% sensitivity and 100% specificity were achieved. The negative result obtained for a single OXA-48 producer could be due either to insufficient inoculum or to occasional failures of the Carba NP test in detecting this enzyme [7,9].

In conclusion, the implementation of this protocol in clinical microbiology laboratories could contribute to an improvement in the early management of sepsis and to establish infection prevention and control measures to prevent the spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in hospitals.

Table 2

MALDI-TOF MS identification and Carba NP test results after four hour incubation of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* isolates artificially inoculated in blood culture vials.

N	Species	MALDI-TOF MS	Carbapenemase	Carba NP
3	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	VIM	+
1	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	NDM	+
1	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	KPC	+
1	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. aerogenes</i>	KPC	+
1	<i>E. asburiae</i>	<i>E. asburiae</i>	KPC	+
4	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	OXA-48	+
3	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	OXA-48	+
2	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>	OXA-48	+
1	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. oxytoca</i>	OXA-48	+
1	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	OXA-48	+
1	<i>C. koseri</i>	<i>C. koseri</i>	OXA-48	+

N, number of isolates.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Werfen Group for the supply of Xpert Carba-R used in this work and Dr. Maria Isabel Morosini and Dr. Rafael Cantón (Hospital Ramón y Cajal, Madrid) for the gift of some of the strains. We also thank Dr. Robin Patel (Mayo Clinic, USA) and Drs. P. Nordmann and L. Poirel of the University of Fribourg (Switzerland) for their invaluable help and advice.

References

- [1] Kumar, A., Ellis, P., Arabi, Y., Roberts, D., Light, B., Parrillo, J.E., et al., 2009]. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest* 136, 1237–1248.
- [2] Nguyen, H.B1., Rivers, E.P., Abrahamian, F.M., 2006]. Severe sepsis and septic shock: review of the literature and emergency department management guidelines. *Ann. Emerg. Med.* 48, 28–54.
- [3] Stevenson, L.G., Drake, S.K., Murray, P.R., 2010]. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 48, 444–447.
- [4] Clerc, O., Prod'hom, G., Vogne, C., Bizzini, A., Calandra, T., Greub, G., 2013]. Impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with gram-negative bacteremia: a prospective observational study. *Clin. Infect. Dis.* 56, 1101–1107.
- [5] Bouza, C., López-Cuadrado, T., Saz-Parkinson, Z., Amate-Blanco, J.M., 2015]. Epidemiology and recent trends of severe sepsis in Spain: a nationwide population-based analysis (2006–2011). *BMC Infect. Dis.* 14, 717.
- [6] Patel, G., Bonomo, R.A., 2013]. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Front. Microbiol.* 14, 4–48.
- [7] Hrabák, J., Chudáčková, E., Papagiannitsis, C.C., 2014]. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 839–853.
- [8] Nordmann, P., Poirel, L., 2013]. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 487–489.
- [9] Dortet, L., Brécard, L., Poirel, L., Nordmann, P., 2014]. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from blood cultures. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 340–344.
- [10] Xu, J., Millar, B.C., Moore, J.E., Murphy, K., Webb, H., Fox, A.J., et al., 2003]. Employment of broad-range 16S rRNA PCR to detect etiological agents of infection from clinical specimens in patients with acute meningitis – rapid separation of 16S rRNA PCR amplicons without the need for cloning. *J. Appl. Microbiol.* 94, 197–206.
- [11] Drancourt, M., 2010]. Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a review. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 1620–1625.
- [12] Hoyos-Mallecot, Y., Miranda-Casas, C., Cabrera-Alvargonzalez, J., Gómez-Camarasa, C., Pérez-Ramirez, M.D., Navarro-Marí, J.M., 2013]. Identificación bacteriana directamente del hemocultivo mediante una técnica rápida de espectrometría de masas matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 31, 152–155.
- [13] Rezzonico, F., Vogel, G., Duffy, B., Tonolla, M., 2010]. Application of whole cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification and clustering analysis of *Pantoea* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4497–4509.
- [14] Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J., Greub, G., Prod'hom, G., 2010]. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1549–1554.

IDENTIFICATION AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF POSITIVE BLOOD CULTURES AFTER A 3 HOURS SUBCULTURE

Rojo

Jonathan Fernandez-Suarez, Ana Perez-Garcia, Carlos Rodriguez-Lucas, Javier Fernandez, Rosario Fernandez-Santiago, Fernando Vazquez, Susana

Microbiology Department. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo. Spain

BACKGROUND

One of the critical factors in reducing mortality of bacteremia is the speed in obtaining the identification and susceptibility of the microorganism. MALDI-TOF/MS technology has achieved significant reduction in the time necessary for identification, but without the antibiotic susceptibility information. This can be solved in several ways, one of which is the realization of disk diffusion susceptibility testing methods from positive blood cultures making the reading of them as soon as possible.

MATERIAL AND METHODS

In our hospital (a tertiary hospital in northern Spain), from January 1st to October 31th of 2015, microorganisms causing bacteremia were studied. Bacterial growth was detected with the BACTEC Plus Aerobic/Aerobic system (BD®) and then were subcultured and disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method was performed. In the case of Gram+, 7 antibiotics were tested and in the case of Gram-, 14 antibiotics.

Identification by MALDI-TOF/MS (Bruker Daltonik GmbH®) and reading of susceptibility testing method was performed, if possible, 3 hours after inoculation.

Results were compared with those obtained by conventional methods (MicroScan WalkAway Beckman Coulter®) to assess the reliability of MALDI-TOF and disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method as predictors for identification and antimicrobial susceptibilities.

RESULTS

In the study period, 183 microorganisms responsible for episodes of bacteremia were studied.. Identification results are shown in Table 1.

IDENTIFICATION BY MALDI-TOF (3 h.)			
TOTAL ISOLATES STUDIED	IDENTIFICATION POSSIBLE	CORRECT IDENTIFICATION (GENUS LEVEL)	%
Gram- 108	101	101	93.5
Gram+ 75	71	71	94.7
TOTAL 183	172	172	94.0

Table 1

Of these 172 matching identification to genus level was complete (172/172); at the species level was 94.2% (162/172), 63/71 in Gram+ and 99/101 in Gram-.

The susceptibility testing could be read at 3 hours in 47.5% of cases (87/183). Results are shown in Table 2.

SUSCEPTIBILITY TESTING (3 h.)

	TOTAL ISOLATES STUDIED	SUSCEPTIBILITY TESTING POSSIBLE TO READ	%
Gram -	108	78	72.2
Enterobacteriaceae	94	70	74.5
Non-fermentative Gram- bacilli	14	8	57.1
Gram+	75	9	12
<i>Staphylococcus aureus</i> .	8	5	62.5
Coagulase-negative staphylococci	23	4	17.4
Enterococci	18	0	0
Streptococci	20	0	0
Other microorganisms Gram+	6	0	0
TOTAL	183	87	47.5

Table 2

The susceptibility was identical in 56/87 cases (64.4%), 48/78 in Gram- and 8/9 in Gram+. In the 31 different susceptibilities the differences were minimal, mostly (23/31) in a single antibiotic without clinical consequences for the patient.

CONCLUSIONS

*MALDI-TOF/MS enables very reliable identification of microorganisms responsible for bacteremia in only 3h.

*The combination with a disk diffusion susceptibility testing method allows in 3h. antibiotic susceptibilities in Gram- microorganisms with a high degree of reliability; in Gram+ usually growth in 3h. is insufficient, with the exception of *Staphylococcus aureus*.

CLINICAL RELEVANCE OF THE STUDY OF THE POSITIVITY TIMES OF BLOOD CULTURES

Jonathan Fernandez-Suarez, Ana Perez-Garcia, Carlos Rodriguez-Lucas, Christian Sabater, Rosario Fernandez-Santiago, Azucena Rodriguez-Guardado, Susana Rojo
Microbiology Department. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo. Spain

BACKGROUND

Bacteremia is a very important disease that causes high mortality. Microbiological diagnostic methods are based on blood culture, posing the problem that they are not always represent a true positive bacteremia because contamination thereof are possible. The study of the time to positivity of blood cultures can be used to distinguish between positive and contaminated blood cultures, as well as guidance on the causative microorganism.

MATERIAL AND METHODS

In our hospital (a tertiary hospital in northern Spain), during 1 year (July 2013-June 2014) times to positivity of blood culture bottles (2 blood culture bottles: Plus Aerobic / F and Plus Anaerobic / F BD®) were studied. BACTEC9240 automatic incubator (BD®) was used. The maximum incubation period of blood cultures was 5 days. These times to positivity was subsequently correlated with the microorganism identified by conventional techniques (MicroScan WalkAway Beckman Coulter®). The coagulase-negative staphylococci and viridians-group streptococci were considered contaminants and are not identified to species level if not detected in two different blood cultures with the same biochemical and antibiotic sensitivity profile. In this study the positive blood cultures with more than one microorganism were discarded.

RESULTS

Time to positivity of 764 blood culture bottles (412 aerobic and 352 anaerobic) from 569 extractions were studied. The average time to positivity was 23.3 hours (22h. aerobic bottles and 24.6h. anaerobic bottles). Positive bottles considered contaminants were significantly slower (30.3h.) that considered true positives (20.1h.) ($p < 0.05$). In facultative microorganisms there were no significant differences in the time to positivity between aerobic and anaerobic bottles.

Microorganisms isolated in greater numbers were *Escherichia coli* (243), *Staphylococcus epidermidis* (169), *Staphylococcus aureus* (160) and *Pseudomonas aeruginosa* (71).

Microorganisms showed faster growth rate were *Streptococcus pyogenes* (6.4h.), *Streptococcus agalactiae* (8.1h.) as we can see in Figure 1.

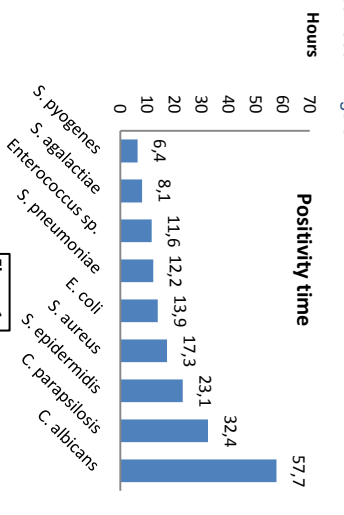


Figure 1

-Regarding coagulase-negative staphylococci contaminants presented a measured time to positivity significantly higher than considered true positive (30h. vs. 22.2h., $p < 0.05$).

-Candida species were slower (47.8h.), with a statistically significant difference ($p < 0.05$) between *Candida albicans* (57.7h.) and *Candida parapsilosis* (32.4h.).

-Considered contaminants streptococci showed positivity time 25.6h.

CONCLUSIONS

*The study of the times to positivity of blood cultures may be useful for important information in the management of bacteremia.

*Provides guidance on the type of microorganism may be involved, and, most importantly, about if blood culture is or not contaminated (time positivity of contaminated blood cultures is significantly higher), mainly in the case of staphylococci and streptococci, which can cause true bacteremia and blood culture contamination.

