



OPTIMITZACIÓ DEL DIAGNÒSTIC MICROBIOLÒGIC DE LA  
BACTERIÈMIA EN UN HOSPITAL SENSE ATENCIÓ  
CONTINUADA. APLICACIÓ D'UNA PCR *MULTIPLEX* SOBRE  
FRASC D'HEMOCULTIU

Tesi Doctoral

Maria Gil Fortuño

Directora de la tesi

D<sup>a</sup> Rosario Moreno Muñoz

Març de 2022





ESCOLA DE DOCTORAT DE LA UNIVERSITAT JAUME I  
PROGRAMA DE DOCTORAT EN CIÈNCIES DE LA INFERMERIA

OPTIMITZACIÓ DEL DIAGNÒSTIC MICROBIOLÒGIC DE LA  
BACTERIÈMIA EN UN HOSPITAL SENSE ATENCIÓ  
CONTINUADA. APLICACIÓ D'UNA PCR *MULTIPLEX* SOBRE  
FRASC D'HEMOCULTIU

Memòria presentada per Maria Gil Fortuño  
per a optar al grau de doctora per la Universitat Jaume I

Maria Gil Fortuño

Dra. Rosario Moreno Muñoz

Castelló de la Plana, Març de 2022

Aquesta tesi no ha rebut cap tipus de finançament per part d'institucions públiques o privades.



Aquesta obra està subjecta a una llicència de Reconeixement-NoComercial 4.0 Internacional de Creative Commons

Als meus pares i a Clara.

A Mariona i Alba pel temps robat.

A Xavi per estar ahí sempre.

*L'aprenentatge demana lentitud, reflexió, silenci, recolliment.*

*Renunciar a la lentitud, renunciar als sabers humanístics,  
significa renunciar a l'exercici de la crítica i a la recerca de la pròpia llibertat.*

Nuccio Ordine. *La utilitat de l'inútil.*



## AGRAÏMENTS

Aquesta tesi porta un trosset de molta gent...

De Chelo perquè sempre m'ha ajudat a escalar muntanyes.

De Marosi per la seua contagiosa passió per la Microbiologia.

D'Òscar pel plaer de treballar junts (de nou).

De Bartolomé i Rafa per aventurar-se a llegir-la en plena canícula.

De Susana, Lola, Bárbara, Aurora i Ana pels temps en què fèiem tan bon equip.

De Marta, Raquel i Laura per ser unes residents modèliques.

De Silvia, Mensín, Isa, Sandra, Manoli, Elena, Toya... i tot l'equip tècnic de Microbiologia de l'Hospital General, per fer-me sentir sempre com a casa.

Dels companys i companyes del laboratori de Microbiologia de l'Hospital de La Plana pel sobreesforç que han fet durant la pandèmia.

De l'equip PROA de La Plana per la seua implicació en tots i cadascun dels pacients.

De la gent d'ACDESA-Castelló i de tots aquells qui lluiten per mantenir una Sanitat Pública de qualitat.

De Merxe, África...i tots els Microbiòlegs i Microbiòlogues sense veu.





## ÍNDEX

ABREVIATURES .....	1
RESUM.....	4
INTRODUCCIÓ .....	8
1.Consideracions generals .....	8
2.Bacterièmia, fungèmia, sèpsia i shock sèptic .....	11
3.Patogènia .....	18
4.Etiologia .....	22
5.Diagnòstic microbiològic .....	25
5.1. Indicacions de l'hemocultiu.....	26
5.2. Presa de mostra .....	26
5.3. Processament tradicional del hemocultiu.....	28
5.4.Nous mètodes de diagnòstic.....	32
6.Biomarcadors .....	40
7.Tractament empíric .....	42
8.Implicacions del diagnòstic sobre el tractament i impacte sobre el PROA.....	45
9.Bacterièmia durant la primera onada de la pandèmia de COVID-19 .....	50
10.Nova versió de FilmArray (BCID2): Ampliació de microorganismes i mecanismes de resistència .....	52
OBJECTIUS .....	55
JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI .....	55
HIPÒTESI .....	56
OBJECTIU PRINCIPAL .....	56
OBJECTIUS SECUNDARIS .....	56
MATERIAL I MÈTODE.....	58
1.DISSENY I POBLACIÓ A ESTUDI .....	58
2.CRITERIS DE SELECCIÓ.....	58
3. ASPECTES ÈTICS I PROTECCIÓ DE DADES .....	59
4.DIAGNÒSTIC DE LA BACTERIÈMIA AMB ESPECTROMETRIA DE MASSES A L'HGUC.....	60

5.ADAPTACIÓ A LA LIMITACIÓ HORÀRIA. PCR MULTIPLEX SOBRE HEMOCULTIU...	62
6.LIMITACIONS DE FILMARRAY-BCID .....	65
7.APLICACIÓ DE FILMARRAY-BCID FORA DE FITXA TÈCNICA.....	65
RESULTATS .....	68
1. ANÁLISI DESCRIPTIVA.....	68
2. DEMORA EN L'EMISSIÓ DE RESULTATS .....	74
2.1. Globalment, entre PCR i hemocultiu convencional .....	74
2.2 Entre GRAM i validació de PCR.....	77
3. MODIFICACIÓ DEL TRACTAMENT SEGONS EL RESULTAT DE LA PCR .....	78
4. CONCORDANÇA DE LA PCR I L'HEMOCULTIU TRADICIONAL .....	79
4.1. PCR sobre hemocultiu positiu .....	79
4.2. PCR sobre hemocultiu <i>en curs</i> .....	81
4.3. Concordança parcial.....	83
5. ESTIMACIÓ DE PARÀMETRES PER A LA REALITZACIÓ DE LA PCR .....	84
5.1. PCR realitzada globalment.....	84
5.2. PCR sobre hemocultiu <i>en curs</i> .....	87
DISCUSSIÓ I LIMITACIONS DE L'ESTUDI .....	90
CONCLUSIONS .....	105
BIBLIOGRAFIA.....	108
ANNEXOS.....	117

## ABREVIATURES

AN- Àcid Nucleic

ATB- Antibiòtic

ATU- *Area of Technical Uncertainty*

BCID- *Blood Culture Identification Panel*

BGN- Bacil Gram-negatiu

BLEE- Betalactamasa d'Espectre Estès

BRC- Bacterièmia relacionada amb el catèter

C3G- Cefalosporines 3<sup>a</sup> generació

CGP- Coc Gram-positiu

CI- Control Intern

CLSI- *Clinical and Laboratory Standards Institute*

COVID 19- *Coronavirus Disease 2019*

CRE- Enterobacteris Resistent a Carbapenem

DAMP- *Danger-Associated Molecular Pattern*

DNA- *Desoxiribonucleic acid*

DT- Desviació Típica

EARS-Net- *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*

ECDC- *European Centre for Disease Prevention and Control*

EPI- Equip de Protecció Individual

EPINE- Estudi de Prevalença de les Infeccions Nosocomials a Espanya

ESCMID- *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*

EUA- Estats Units d'Amèrica

EUCAST- *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FISH- *Fluorescence in situ hybridization*

FOD- Febre d'Origen Desconegut

HGUC- Hospital General Universitari de Castelló

IDSA- *Infectious Diseases Society of America*

IIA- Infecció Intraabdominal

IPPT- Infecció de pell i parts toves

IQR-Rang Interquartílic

ITS- *Internal Transcribed Spacer*

ITUc- Infecció del Tracte Urinari complicada

MALDI-TOF MS- *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*

MDR- *Multidrug Resistant*  
NGS- *Next-Generation Sequencing*  
OMS- Organització Mundial de la Salut  
ORL- Otorrinolaringològic  
PAMP- *Pathogen-Associated Molecular Pattern*  
PCR- Reacció en Cadena de la Polimerasa  
PCT- Procalcitonina  
PROA- Programa d'Optimització de l'ús d'Antimicrobians  
PRR- *Pattern-Recognition Receptors*  
RAST- *Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing*  
rpm- respiracions per minut  
SARM- *Staphylococcus aureus* Resistent a Meticil·lina  
SARS-CoV-2- *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*  
SCN- *Staphylococcus coagulasa-negatiu*  
SEIMC- *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*  
SIL- Sistema d'Informació del Laboratori  
SIRS- *Systemic Inflammatory Response Syndrome*  
SNC- Sistema Nerviós Central  
SOFA- *Sequential Organ Failure Assesment*  
TAT- *Turnaround Time*  
TEL- Tècnic Especialista en Laboratori  
TLR- *Toll-Like Receptors*  
Tm- *Melting Temperature*  
UCI- Unitat de Cures Intensives  
VPN- Valor Predictiu Negatiu  
VRE- *Vancomycin Resistant Enterococcus*

# RESUM

---

## RESUM

L'estudi que presentem posa de manifest com n'és d'important que els Laboratoris de Microbiologia disposen de recursos tant personals como tecnològics per donar una resposta ràpida davant d'infeccions amenaçants per a la vida, com és la sèpsia. Mostra l'experiència d'un hospital sense Atenció Continuada en Microbiologia al moment d'iniciar la recollida de dades i la seua adaptació a aquesta limitació, instaurant un mètode ràpid de diagnòstic molecular sindròmic, capaç de detectar els principals microorganismes productors de bacterièmia en poc més d'una hora. Es descriuen els principals mètodes de diagnòstic de la bacterièmia, la necessitat d'identificar precoçment la causa de la sèpsia o la importància dels equips PROA en la instauració i l'ajust del tractament.

S'inclouen 133 pacients amb hemocultius consecutius als que se'ls realitza una PCR multiplex a més del cultiu tradicional. Es realitza un estudi descriptiu de les variables observades: edat, sexe, demora en les proves (PCR vs Gram vs hemocultiu tradicional), servei, probable focus, valors de procalcitonina, pcr i leucòcits i evolució. Es descriu l'ATB utilitzat empíricament i si ha estat modificat segons el resultat de la PCR. Açò va succeir en el 24% (29/133) dels pacients. Es compara la demora en l'emissió de resultats entre la PCR i l'hemocultiu tradicional, obtenint-se una mediana de 55 hores (IC 95% (43-68),  $p < 0.001$ , a favor de la primera en els casos concordants. Com a característica innovadora, en 68 pacients amb una situació clínica que requeria esgotar tots els recursos disponibles, es realitza la PCR sobre hemocultiu *en curs* (encara no detectat com a positiu pel sistema de monitorització contínua), trobant-se sis resultats positius i una concordança del 82,3% quan l'hemocultiu era negatiu. Mitjançant un model de regressió logística es tracta de definir si existeix algun paràmetre que pugui predir un resultat positiu de la PCR. A nivell global, únicament l'edat i el percentatge de polimorfonuclears podrien determinar aquest resultat (OR 1.01 i 1.04), però aplicant aquest model en la PCR sobre hemocultiu *en curs*, aquestes dues variables deixen de ser significatives. Les tècniques ràpides com la PCR o les basades en la proteòmica constitueixen ferramentes excel·lents per a optimitzar el diagnòstic de la bacterièmia, però es troben encara lluny de substituir l'hemocultiu convencional com a *gold standard*. A més, aquestes tecnologies tindrien molt més sentit si la disponibilitat del microbiòleg o microbiòloga fora de 24/7, perquè es reduiria considerablement el temps en l'emissió dels resultats i s'instauraria abans el tractament correcte.

## RESUMEN

El estudio que presentamos pone de manifiesto la importancia de que los Laboratorios de Microbiología dispongan de recursos tanto personales como tecnológicos para dar una respuesta rápida ante infecciones amenazantes para la vida, como es la sepsis. Muestra la experiencia de un hospital sin Atención Continuada en Microbiología en el momento de iniciar la recogida de datos y su adaptación a esta limitación, instaurando un método rápido de diagnóstico molecular sindrómico, capaz de detectar los principales microorganismos productores de bacteriemia en poco más de una hora. Se describen los principales métodos de diagnóstico de la bacteriemia, la necesidad de identificar precozmente la causa de la sepsis o la importancia de los equipos PROA en la instauración y el ajuste del tratamiento.

Se incluye a 133 pacientes con hemocultivos consecutivos sobre los que se aplica una PCR multiplex además del cultivo tradicional. Se realiza un estudio descriptivo de las variables observadas: edad, sexo, demora en las pruebas (PCR vs Gram vs hemocultivo tradicional), servicio, probable foco, valores de procalcitonina, pcr y leucocitos y evolución. Se describe el ATB utilizado empíricamente y si se ha modificado tras la PCR. Esto sucede en el 24% (29/133) de los pacientes. Se compara globalmente la demora en la emisión de resultados entre la PCR y el hemocultivo tradicional, obteniéndose una mediana de 55 horas (IC 95% (43-68),  $p < 0.001$  a favor de la primera en casos concordantes. Como característica innovadora, en 68 pacientes cuya situación clínica requería agotar todos los recursos disponibles, se realiza la PCR sobre hemocultivo *en curso* (todavía no detectado como positivo por el sistema de monitorización continua), encontrándose seis resultados positivos y una concordancia del 82,3% cuando el hemocultivo era negativo. Mediante un modelo de regresión logística se trata de definir si existe algún parámetro que pueda predecir un resultado positivo de la PCR. A nivel global, únicamente la edad y el porcentaje de polimorfonucleares podrían determinar este resultado (OR 1.01 y 1.04), pero aplicando este modelo ante la PCR sobre hemocultivo *en curso*, estas dos variables dejan de ser significativas. Las técnicas rápidas como la PCR o la proteómica constituyen herramientas excelentes para optimizar el diagnóstico de la bacteriemia, pero están todavía lejos de sustituir al hemocultivo convencional como *gold standard*. Además, estas tecnologías cobrarían mucho más sentido si la disponibilidad del microbiólogo o microbióloga fuese de 24/7, porque se reduciría considerablemente el tiempo en la emisión de resultados y se instauraría antes el tratamiento adecuado.



## ABSTRACT

The study we present highlights the importance of Microbiology Laboratories having both personal and technological resources to provide a rapid response to life-threatening infections, such as sepsis. It shows the experience of a hospital without Continuous Care in Microbiology at the time of starting data collection and its adaptation to this limitation, establishing a rapid method of syndromic molecular diagnosis, capable of detecting the main microorganisms that produce bacteremia in about an hour. The main methods for the diagnosis of bacteremia, the need of an earlier identification of the cause of sepsis, or the importance of an Antimicrobial Stewardship Team in the establishment and adjustment of treatment are described. 133 patients were included, with consecutive blood cultures on whom multiplex PCR was applied in addition to the traditional culture. A descriptive study of the observed variables was carried out: age, sex, delay in tests (PCR vs Gram vs traditional blood culture), service, probable focus, procalcitonin, pcr and leukocyte values and evolution. It is described which ATB has been used empirically and whether it has been modified depending on the PCR results. This happens in 24% (29/133) of patients. The delay of the results between PCR and traditional blood culture is compared, obtaining a median of 55 hours (95% CI (43-68),  $p < 0.001$ , in favor of the former in concordant cases. As an innovative characteristic, in 68 patients whose clinical situation required exhausting all available resources, PCR was performed on blood culture in progress (not yet detected as positive by the continuous monitoring system), finding a positive result in six cases and a concordance of 82.3% when the blood culture was negative. Using a logistic regression model, we try to define if there is any parameter that can predict a positive PCR result. At the global level, only age and the percentage of polymorphonuclear cells could determine this result (OR 1.01 and 1.04), but applying this model to the PCR on blood culture in progress, these two variables are no longer significant. Rapid techniques such as PCR or proteomics are excellent tools to optimize the diagnosis of bacteremia, but they are still far from replacing conventional blood culture as the gold standard. In addition, these technologies would make much more sense if the availability of the microbiologist were 24/7, because the time in the issuance of results would be considerably reduced and the appropriate treatment would be established earlier.

# INTRODUCCIÓ

---

# INTRODUCCIÓ

## 1.Consideracions generals

El diagnòstic de la bacterièmia és un dels principals reptes, si no el més gran, per als/les especialistes en Microbiologia Clínica. Per tal d'adequar el tractament antibiòtic cal un diagnòstic microbiològic precoç però el cultiu bacteriològic emprat tradicionalment, encara que continua sent el *gold standard*, no hi facilita la identificació ràpida de l'agent causal.

En quadres greus com la sèpsia, s'ha demostrat que demorar l'administració d'un tractament correcte augmenta la mortalitat. Si s'actua donant suport hemodinàmic i iniciant l'antibioteràpia en la primera hora, la mortalitat es limita al 20%. Però aquesta xifra augmenta aproximadament un 7,6% per cada hora de retard en instaurar un tractament adequat (1).

La sèpsia suposa la primera causa de mort hospitalària. Afecta anualment fins a 50 milions de persones de les quals el 40% són menors de 5 anys. La mortalitat supera el 20%, amb una mort per sèpsia cada 3 segons, afectant enormement els països de l'Àfrica Subsahariana (2).

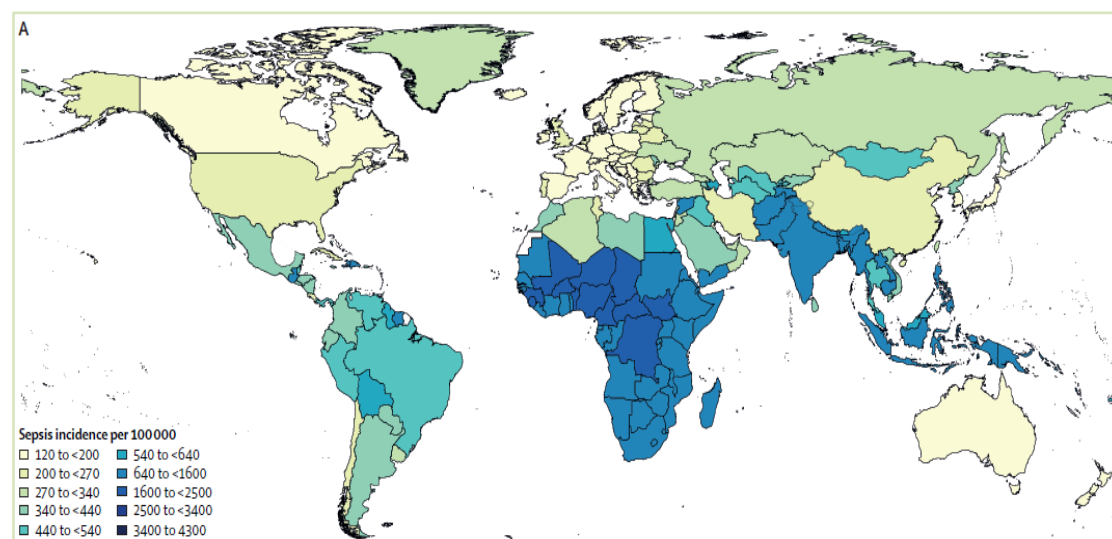


Figura 1. Incidència de sèpsia al món. Pres de Rudd et al. The Lancet 2020

Un percentatge gens despreciable dels pacients amb bacterièmia rep un tractament inadequat o administrat en retard (entre d'altres factors per la lentitud i baixa sensibilitat dels hemocultius), i això és un factor predictor independent de mala evolució i mortalitat (3). El tractament empíric no serà ajustat fins obtenir la identificació i l'estudi de sensibilitat o, almenys, alguna dada sobre si pot tractar-se d'una infecció per microorganismes multi-resistents (MDR).

Per això, una resposta ràpida permet ajustar precoçment l'ATB, limitar la selecció de mutants resistents i reduir la toxicitat i l'efecte negatiu sobre la flora beneficiosa per a l'organisme, evitant infeccions com per exemple les causades per *C.difficile* toxigènica (4).

L'aplicació de l'espectrometria de masses o dels mètodes moleculars al diagnòstic microbiològic ha capgirat la rutina als laboratoris i està reduint considerablement el temps emprat en la identificació precisa dels microorganismes (5).

Les tècniques de reacció en cadena de la polimerasa (PCR) amb extracció, amplificació i detecció en un mateix assaig, a més de permetre la seua implantació en centres amb manca de personal, minimitzen el risc de contaminació per amplicons. Aquelles PCR basades en tecnologia *multiplex* permeten, a més, un diagnòstic sindròmic amb la consegüent optimització tant del volum de la mostra com dels recursos.

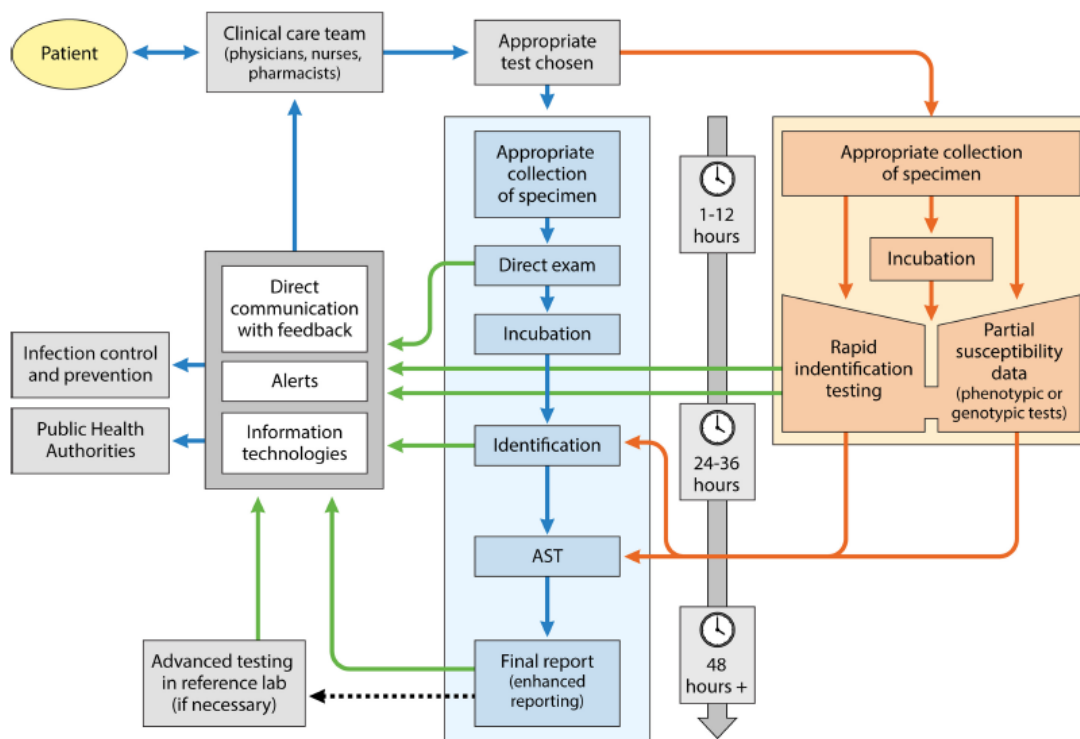


Figura 2. Microbiologia convencional vs aplicació del diagnòstic ràpid. Pres de Morency-Potvin et al. Clin Microbiol Rev. 2016

Aquestes tecnologies s'haurien d'associar a la total disponibilitat horària als Laboratoris de Microbiologia per tal de beneficiar equitativament tots els pacients. Però en ple segle XXI, encara trobem un enorme desequilibri pel que fa a la situació dels Laboratoris de Microbiologia al nostre país.

La Microbiologia Clínica és una especialitat amb entitat pròpia, que es va definir a finals del segle XIX, amb el descobriment de nombrosos bacteris com els agents causals de les malalties infeccioses que afectaven l'ésser humà, i va ser desenvolupada a partir de la Segona Guerra Mundial amb el propòsit d'estudiar la sensibilitat als diferents antimicrobians que s'anaven descobrint (Penicil·lina, Estreptomicina, Cloramfenicol, Tetraciclina i Eritromicina) (6).

Malgrat la importància de l'especialista en Microbiologia Clínica en permetre un diagnòstic ràpid per ajustar els tractaments disponibles, o en identificar amb la major celeritat microorganismes emergents o patògens MDR que podrien causar brots amb nefastes repercussions per als malalts, en molts hospitals no existeix el Servei de Microbiologia com a tal, ni tan sols com a Secció. Continua la dependència administrativa dels Serveis d'Anàlisis Clíniques i, per tant, no està a l'abast dels microbiòlegs o microbiòlogues ni la gestió dels recursos en personal tècnic o facultatiu ni, com a conseqüència d'això, la possibilitat d'ampliar l'horari per tal que els pacients es puguin beneficiar al màxim. Malauradament doncs, la revolució tecnològica dels darrers anys només és beneficiosa en part, perquè els horaris limitats n'impedeixen l'atenció continuada. Aquest panorama ha millorat en alguns hospitals arran de la pandèmia de la COVID-19. Un exemple és l'Hospital General Universitari de Castelló (HGUC) que, malgrat ser el centre de referència de les comarques castellonenques, no havia pogut prestar atenció microbiològica les 24 hores fins a Octubre de 2020.

La motivació d'aquesta tesi parteix de la necessitat de donar una identificació microbiològica el més ràpidament possible, utilitzant una tècnica molecular de diagnòstic sindròmic, emprada en ocasions fora de fitxa tècnica degut a la limitació horària del laboratori. Especialment en les infeccions al torrent sanguini, que poden anar des d'una bacterièmia transitòria sense cap conseqüència fins a la mort per shock sèptic amb fracàs multiorgànic, és on la rapidesa del diagnòstic i la instauració d'un tractament correcte adquireix més importància.

## 2. Bacterièmia, fungèmia, sèpsia i shock sèptic

El reconeixement de la presència de microorganismes al torrent sanguini és una de les tasques més importants del Laboratori de Microbiologia. De la seua rapidesa i precisió dependrà, en gran mesura, l'evolució del pacient. A continuació es defineixen alguns conceptes relacionats amb aquesta interacció del microorganisme amb la sang.

**Bacterièmia** és la presència de bacteris a la sang que es pot evidenciar amb l'aïllament d'aquests als hemocultius.

**Fungèmia** és la presència de fongs a la sang, que generalment són llevats del gènere *Candida*.

Es tracta de complicacions d'infeccions localitzades que apareixen quan els microorganismes envaeixen i es multipliquen al torrent sanguini, superant la capacitat del sistema retículo-endotelial per tal d'eliminar-les.

Podem classificar les bacterièmies segons:

-Moment d'aparició: es classifiquen en *nosocomials*, *comunitàries* o *associades a les cures sanitàries*.

-Origen: es classifiquen en *primàries* (focus desconegut) o *secundàries* a una infecció localitzada.

-Patró clínic: una bacterièmia es diferencia en *transitòria* (la més freqüent, i es dona a l'inici d'infeccions com la pneumònia, la meningitis o les ITUc), *intermitent* (apareixen recurrències pel mateix microorganisme i tradueix una infecció tancada com un abscess), *persistent* (per una endocarditis o una infecció intravascular), *de bretxa* (apareix en un pacient correctament tractat, amb hemocultius prèviament negatius) i *complicada* (quan en un pacient sota tractament ATB continua aïllant-se el mateix microorganisme als hemocultius de control extrets a les 48-72 hores) (7).

**Sèpsia** és la disfunció orgànica, amenaçant per a la vida, causada per una resposta no regulada de l'individu front a la infecció (8).

És la principal causa infecciosa de mortalitat al món provocant prop de 6 milions de morts a l'any (9). Al nostre país afecta més de 50.000 persones l'any, de les quals més d'un terç acabarà morint (7).

Molts dels supervivents arrossegaran importants seqüeles físiques i cognitives que minven la seua qualitat de vida, relacionades amb l'accelerada progressió de la patologia crònica subjacent, al dany orgànic residual i a l'afectació del sistema immunitari (10).

El mot sèpsia deriva del grec antic, *σῆψις*, i significa *descomposició i putrefacció de la matèria*. Al segle IV aC Hipòcrates ja la va definir com un procés mitjançant el qual "la carn es descompon i les ferides supuren". Més de 2.000 anys després encara no s'ha trobat un *gold standard* clar per qualificar als pacients de risc.

Des d'un punt de vista clínic, és necessari un ràpid reconeixement del quadre per tal de donar una resposta ràpida, però com que no es tracta d'una malaltia concreta sinó d'una síndrome de patobiologia incerta, és necessari definir un grup de criteris clínics (signes i símptomes) en un pacient amb sospita d'infecció (8).

L'any 1992, a la reunió de consens entre l'*American College of Chest Physicians* i la *Society of Critical Care Medicine*, es van establir unes definicions (SEPSIS-1) basades en la concepció de què la sèpsia era el resultat de la resposta inflamatòria sistèmica de l'hospedador front a la infecció (SIRS), i que podia objectivar-se per l'alteració en la temperatura, la taquicàrdia, la taquipnea o la xifra de leucòcits. Quan hi havia disfunció d'algun òrgan el quadre s'anomenava sèpsia severa, i podia desembocar en un shock sèptic, que es definia com la hipotensió induïda per la sèpsia malgrat la reposició volèmica (11).

Two or more of:  
Temperature >38°C or <36°C  
Heart rate >90/min  
Respiratory rate >20/min or  $Paco_2$  <32 mm Hg (4.3 kPa)  
White blood cell count >12 000/mm<sup>3</sup> or <4000/mm<sup>3</sup>  
or >10% immature bands

Figura 3. SIRS. Pres de Bone *et al.* 1992

L'any 2001, es va fer la primera revisió (SEPSIS-2). El concepte de SIRS mostrava baixa especificitat i sensibilitat per al diagnòstic de la sèpsia, i poc valor per discriminar els pacients amb infecció d'aquells amb altres processos inflamatoris que manifestaven una resposta adaptativa, com la pancreatitis, la isquèmia, els politraumatismes o el dany tissular.

L'absència de noves evidències, però, va deixar aquestes definicions vigents fins la revisió de la *European Society of Intensive Care Medicine* i la *Society of Critical Care Medicine*, que entre 2014 i 2015, encara sense un test diagnòstic estandaritzat, van revisar els conceptes relacionats amb la sèpsia, que es va definir com a una resposta sistèmica a la infecció.

Al document de consens SEPSIS-3, vigent en l'actualitat i publicat en febrer de 2016,(8) es va eliminar el concepte *sèpsia severa* per considerar-lo redundant i es van establir uns criteris per afavorir el diagnòstic precoç inclús fora de l'àmbit hospitalari, i que es centren ja no en la resposta sistèmica a la infecció sinó en la disfunció orgànica.

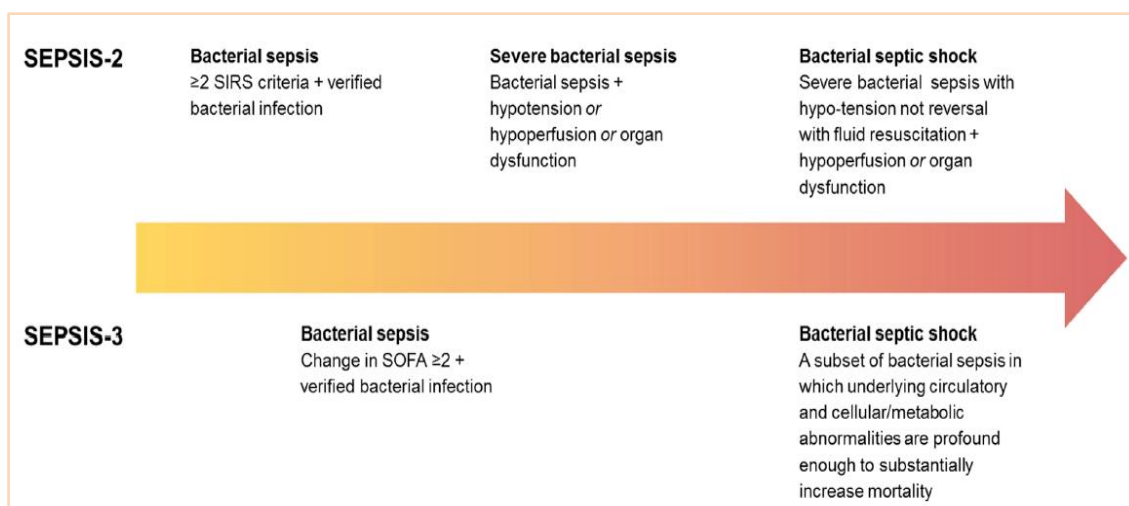


Figura 4. Definicions relacionades amb la sèpsia. Pres de Ljungström *et al.* Plos one. 2017

Aquesta disfunció orgànica amb què es defineix la sèpsia es pot avaluar per un increment en dos o més punts en el *Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)*, com a conseqüència de la infecció, que s'associaria a un percentatge de mortalitat pròxim al 10%.

El score SOFA inclou variables relacionades amb el fracàs respiratori, renal, de la coagulació, de la funció hepàtica, cardiovascular o del SNC. (veure figura 5)



System	Score				
	0	1	2	3	4
Respiration					
PaO <sub>2</sub> /Fio <sub>2</sub> , 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 <sup>3</sup> /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) <sup>b</sup>	Dopamine 5.1-15 or epinephrine ≤0.1 or norepinephrine ≤0.1 <sup>b</sup>	Dopamine >15 or epinephrine >0.1 or norepinephrine >0.1 <sup>b</sup>
Central nervous system					
Glasgow Coma Scale score <sup>c</sup>	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: Fio <sub>2</sub> , fraction of inspired oxygen; MAP, mean arterial pressure; PaO <sub>2</sub> , partial pressure of oxygen.			<sup>b</sup> Catecholamine doses are given as μg/kg/min for at least 1 hour.		
<sup>a</sup> Adapted from Vincent et al. <sup>27</sup>			<sup>c</sup> Glasgow Coma Scale scores range from 3-15; higher score indicates better neurological function.		

Figura 5. Sequential Organ Failure Assessment (SOFA). Pres de Singer *et al.* JAMA 2016.

Al medi extrahospitalari, pot aplicar-se el *quickSOFA* (qSOFA), que conjuga la presència d'infecció amb almenys dos dels següents criteris:

- freqüència respiratòria major o igual a 22 rpm
- alteració de la consciència
- pressió arterial sistòlica de 100 mmHg o menys. (8)

En pediatria, com que existeix una resposta fisiològica i immune diferent i poden existir comorbiditats de base que modifiquen aquesta resposta (12), els criteris varien i encara estan vigents els basats en el SIRS. Segons l'estudi global fet a 26 països SPROUT, s'ha trobat una prevalença de sèpsia del 8,2% en menors de 18 anys (l'edat pediàtrica en molts països) ingressats a la UCI (13).

Els nounats (menors de 28 dies de vida) suposen un grup d'especial risc per la immaduresa de la resposta immune innata i la deficient resposta adaptativa deguda a l'absència d'estímul antigènic prenatal. Poden adquirir la infecció bé intraúter, de forma perinatal per contacte amb la flora materna o postnatal per l'entorn hospitalari o comunitari. Als EUA el 25% dels nounats ingressats a l'UCI són diagnosticats de sèpsia. S'ha calculat que entre un 18%-35% (21.000 nounats/any) moriran a causa de la infecció, sobretot als països amb rendes més baixes (14).

Els prematurs tenen un risc d'infecció greu 10 vegades major (15), fonamentalment els de baix pes (<499 g) (13), perquè tenen estades hospitalàries més llargues i estan sotmesos a procediments invasius (14). A més, la simptomatologia és indiferenciable d'altres patologies no infeccioses, com el distress respiratori. Els microorganismes més freqüents en nounats són *E.coli*, *S. agalactiae*, *L.monocytogenes* i *S.aureus* (14). A continuació podem veure les característiques que fan sospitar la sèpsia neonatal.

### SPOT NEONATAL SEPSIS

Any neonate with suspected infection, manifest by fever (> 38.5°C) or hypothermia (< 36.0°C), who has any of the following...

- abnormal behavior
- rapid or feeble pulse
- mottled or cold extremities
- respiratory rate (RR>60) or severe respiratory distress
- convulsions or bulging fontanelle
- poor feeding or no sucking
- diarrhea

...might have sepsis.  
Act fast when sepsis is suspected.  
Mortality increases every hour.

Figura 6. Criteris de sospita de sèpsia en nounats. Extret en gener de 2021 de [www.worldsepsisday.org](http://www.worldsepsisday.org)

I les condicions per a la resta de pacients pediàtrics.

### SPOT PEDIATRIC SEPSIS

Any child with suspected infection, manifest by fever (> 38.5°C) or hypothermia (< 36.0°C), who has any of the following...

- abnormal behavior or decreased consciousness
- rapid or feeble pulse
- mottled or cold extremities
- severe respiratory distress
- flash capillary refill or prolonged capillary refill (> 3 sec.)
- bounding peripheral pulses
- decreased urine output (< 1 mL/kg/hr)

Figura 7. Criteris de sospita de sèpsia en xiquets i xiquetes. Extret en gener de 2021 de [www.worldsepsisday.org](http://www.worldsepsisday.org)

Com que cal millorar els mecanismes de detecció precoç en pediatria, estan desenvolupant-se eines basades en les dades recollides a la història clínica electrònica que són més objectives i permeten obtenir conclusions orientades a aquest tipus de població (12).

**Shock sèptic** és l'agreujament de la sèpsia fins al punt de causar unes alteracions circulatòries, cel·lulars i metabòliques tals que augmenten la mortalitat a més del 40%. S'identifica per la necessitat de tractament vasopressor per tal de mantenir una pressió arterial almenys de 65 mmHg, i per uns nivells de lactat superiors a 2 mmol/L malgrat una adequada reposició hidrolítica (8).

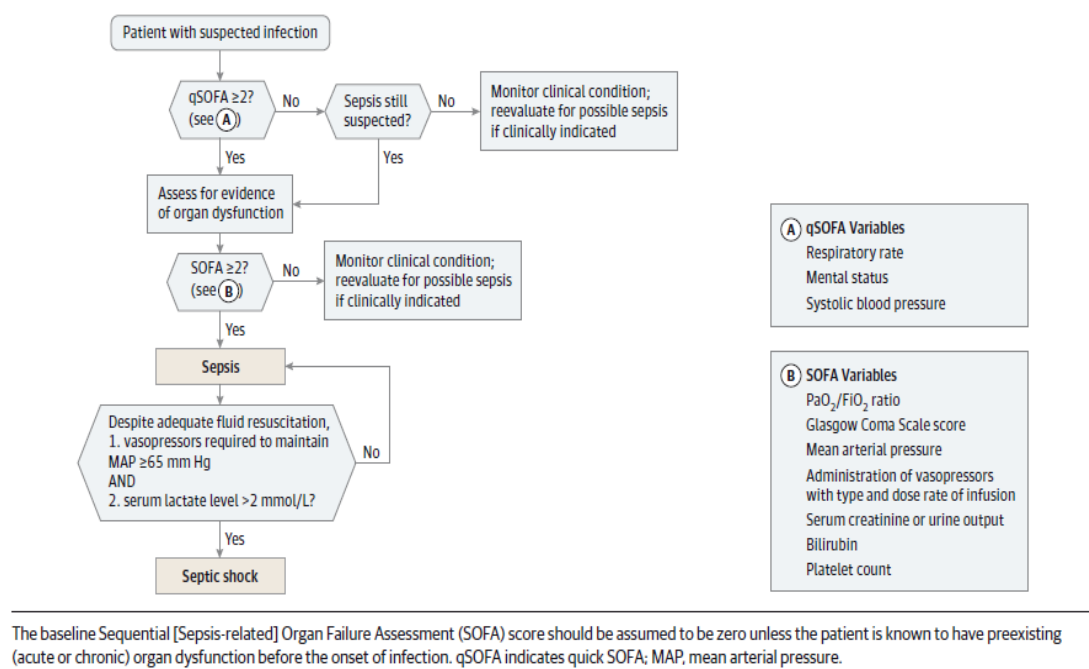


Figura 8. Criteris per identificar sèpsia i shock sèptic. Pres de Singer *et al.* JAMA 2016.

La *Surviving Sepsis Campaign* és una col·laboració entre la *Society of Critical Care Medicine* i la *European Society of Intensive Care* creada per a reduir la mortalitat i morbiditat causada per la sèpsia a nivell mundial. Recomana un *bundle* o paquet de mesures que haurien de ser aplicades en la primera hora.

Aquestes són:

1. Mesurar el lactat (indicatiu del grau d'hipoperfussió tissular)
2. Obtenir 2 parelles d'hemocultius
3. Administrar ATB d'ampli espectre
4. Fluïdoteràpia si ha hipotensió arterial o lactat  $\geq 4$  mmol/L
5. Vasopressors si persisteix hipotensió

I control del focus una vegada estabilitzat el pacient.

Aquestes mesures han estat adaptades a nivell estatal per l'anomenat "Código Sépsis" (16)

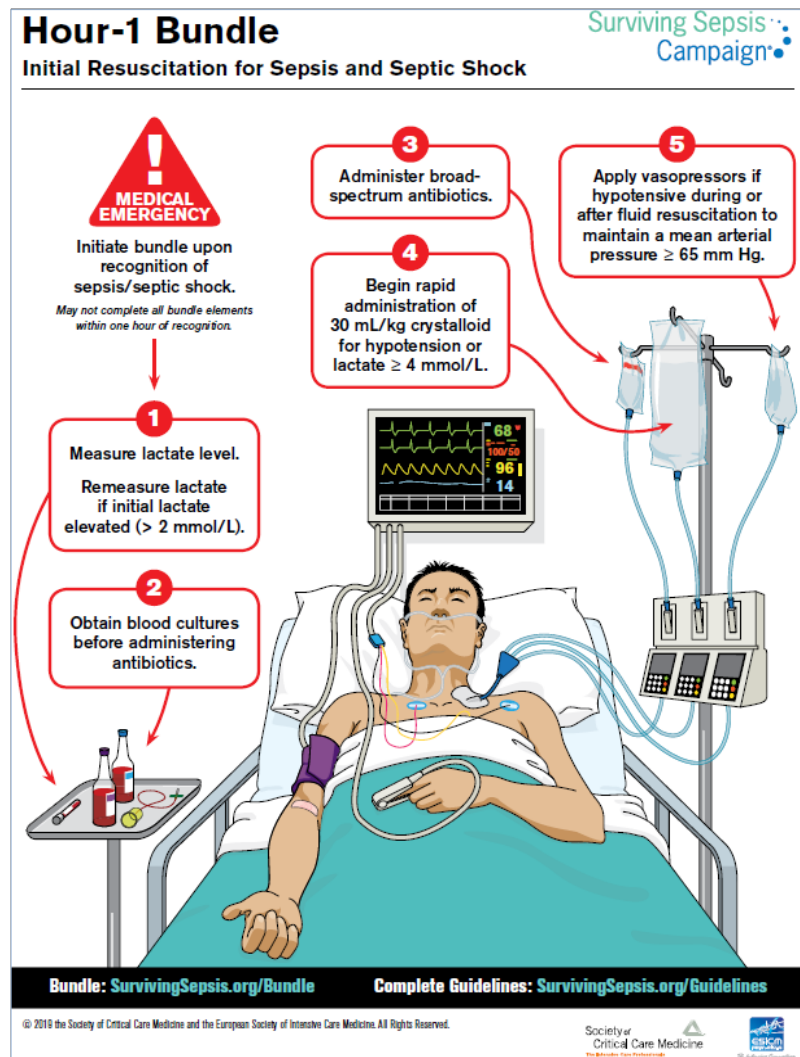


Figura 9. Paquet de mesures (*bundle*) de la *Surviving Sepsis Campaign*.  
Pres de *Society of Critical Care Medicine and European Society of Intensive Care*

### 3.Patogènia

Després de segles amb la teoria del *germen* com a predominant, que considerava la sèpsia com una infecció sistèmica resultat de la invasió de la sang per un patogen, amb l'aparició dels antibiòtics a mitjan segle XX es va veure que no s'explicava del tot la fisiopatologia del quadre, perquè molts pacients morien malgrat l'eliminació del microorganisme causal. Així es va passar a responsabilitzar *l'hospedador* de la patogènesi de la sèpsia.

Els coneixements actuals demostren que es tracta d'una resposta multifactorial a un agent infecció que es veu amplificada per factors endògens, i inclou tant una resposta proinflamatòria com una altra d'antiinflamatòria, junt a modificacions a nivell de la coagulació, cardiovascular, neuronal, autonòmic, hormonal o metabòlic (8).

#### *-Resposta de l'hospedador*

Sembla que la infecció inicial desencadena una complexa i perllongada resposta on conviuen mecanismes proinflamatoris (on participen citoquines i que són capaços d'eliminar l'agent infecció encara que provocant un dany tissular col·lateral), i mecanismes antiinflamatoris (responsables de limitar el dany tissular però afavorint les infeccions secundàries degudes a la immunosupressió i causades per organismes que no són habitualment patògens en persones immunocompetents o bé afavorint les reactivacions de virus latents) (17).

Alguns factors de risc en l'hospedador són la comorbiditat i l'ús d'agents immunosupressors. L'edat (infants i vells), el gènere (masculí) i el grup ètnic (negres) afavoreixen també el desenvolupament de la sèpsia (18).

#### *-L'agent patogen*

Els agents infecciosos, en major o menor mesura segons la càrrega infectiva o la virulència que presenten, activen les cèl·lules immunitàries mitjançant la interacció de llocs comuns anomenats patrons moleculars associats al patogen o PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) amb receptors de reconeixement de patrons o PRR (*pattern-recognition receptors*), i que són de 4 tipus principals: tipus Toll o TLR (*Toll-like receptors*) i C-lectina (CLR) expressats a la superfície cel·lular o a l'endosoma o, en el cas dels receptors inductors del gen-1 de l'àcid retinoic (RLR) i dels llocs d'unió al domini d'oligomerització del nucleòtid (NLR), al citoplasma cel·lular. Aquesta unió inicia el procés d'immunitat innata.

A la vegada, els receptors alliberen molècules de les cèl·lules danyades, anomenades *alarmines* o DAMPs (*danger associated molecular pattern*) que també són alliberades en altres processos.

Un dels efectes col·laterals de la resposta immunitària exagerada és el dany tissular i la necrosi cel·lular, que afavoreix l'alliberament de patrons moleculars associats al dany (*damage-associated molecular patterns*) que perpetuen la inflamació actuant sobre els mateixos PRR sobre els que actuaven els agents infecciosos.

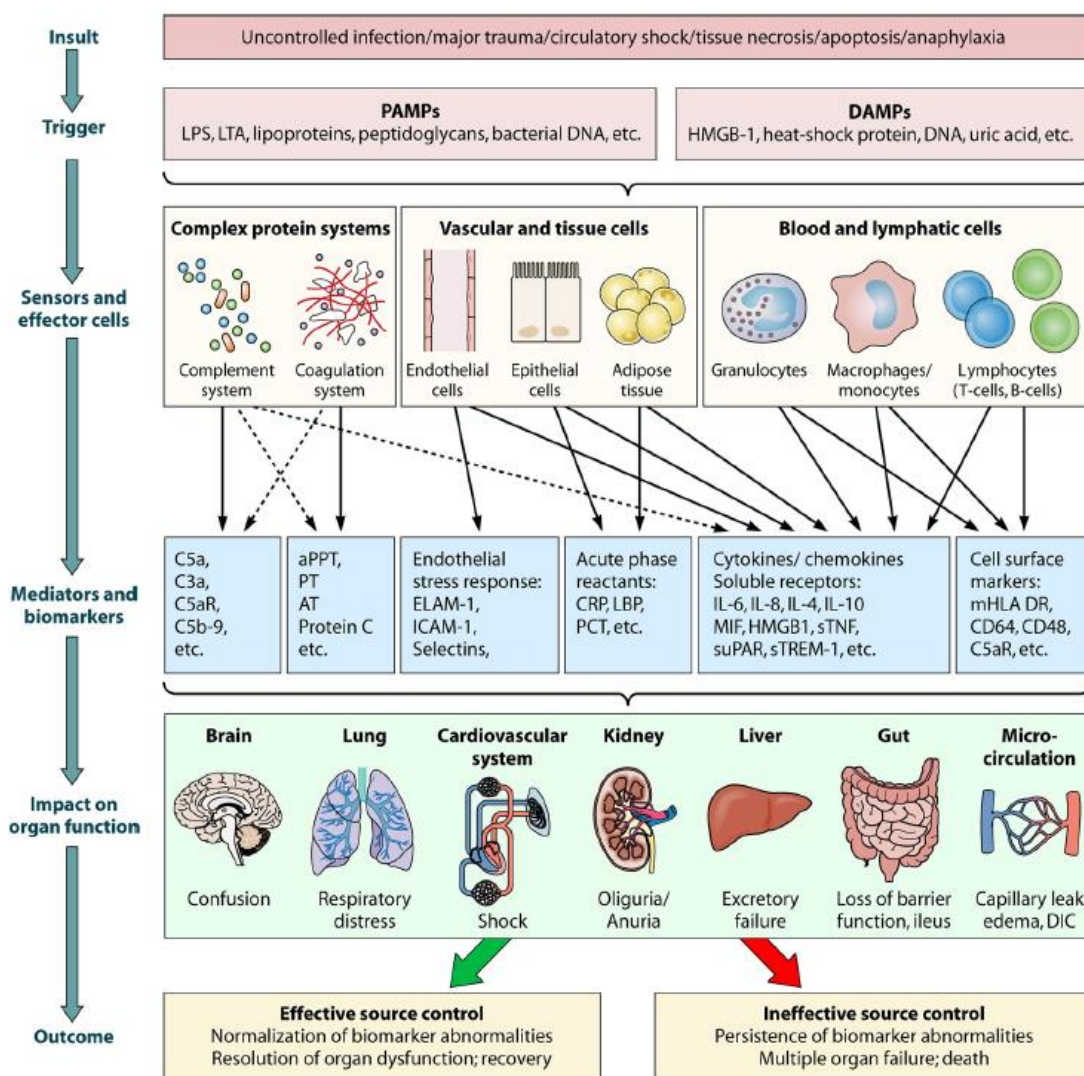


Figura 10. La resposta inflamàtoria. Pres de Reinhart *et al.* Clin Microbiol Rev 2012



### -Alteracions en la coagulació

La sèpsia està relacionada amb la coagulació intravascular disseminada, provocant un excés de fibrina, danyant els mecanismes anticoagulants com la proteïna C i l'antitrombina, i deteriorant el sistema de fibrinòlisi.

Els receptors activadors de la proteasa, en particular PAR-1 conformen el nexa entre inflamació i coagulació.

### -Mecanismes antiinflamatoris

Apareixen tres mecanismes principals per contrastar l'efecte proinflamatori: humoral, cel·lular i neural. Els fagòcits poden adquirir un fenotip antiinflamatori que afavoreix la reparació dels teixits. El reflex neuroinflamatori mitjançant la rama eferent del nervi vague, activa el nervi esplènic i l'alliberament de noradrenalina a la melsa amb la secreció d'acetilcolina, que suprimeix l'alliberament de citocines proinflamatòries per part dels macròfags (18).

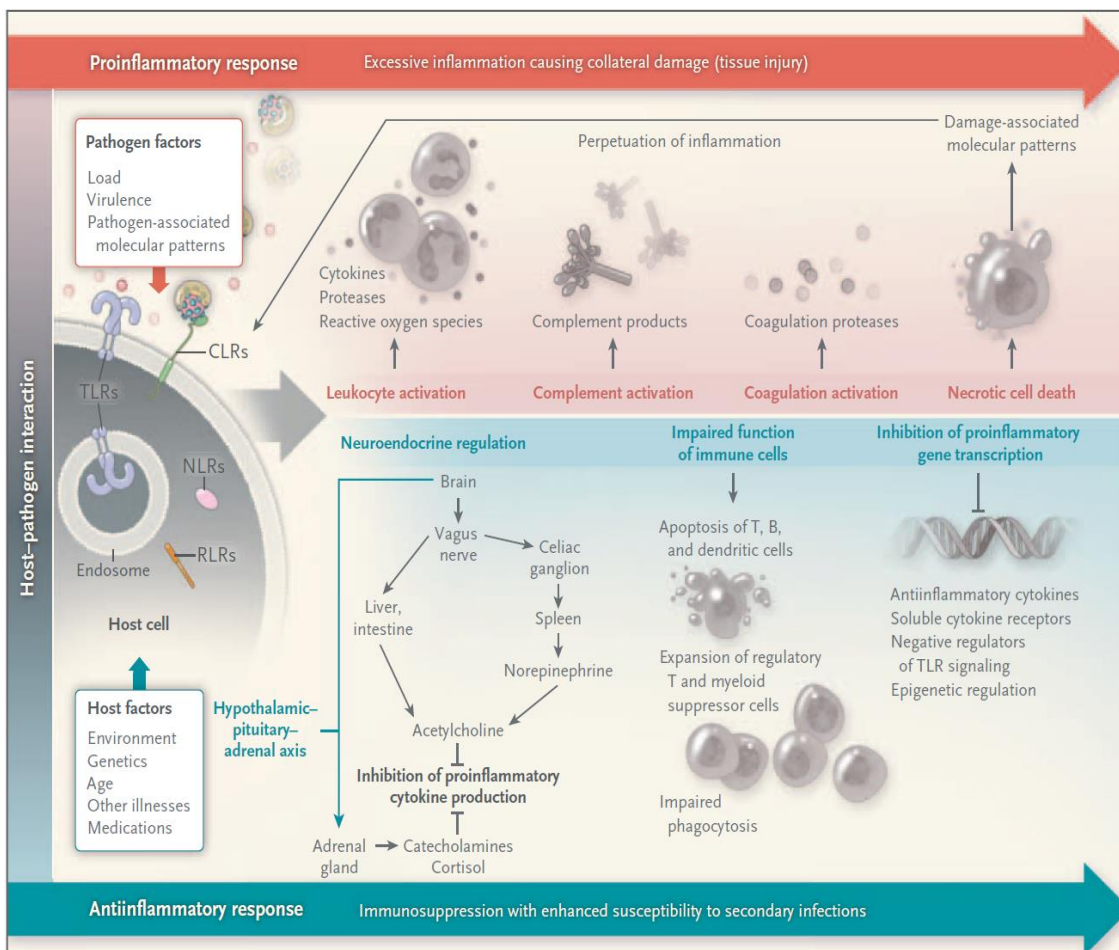


Figura 11. La interacció hospedador-patogen en la sèpsia. Pres d'Angus *et al.* 2013.

*-Disfunció orgànica*

Sembla que el compromís en l'oxigenació dels teixits juga un paper important en la patogènia de la sèpsia. Es troba afavorit per la hipotensió, la pèrdua de l'elasticitat dels hematies i la trombosi microvascular. A banda, la inflamació origina disfunció de l'endoteli vascular, amb pèrdua de la integritat, que afavoreix l'aparició d'edemes. El dany mitocondrial allibera també alarmines que activen neutròfils i perpetuen el dany tissular (18).



## 4.Etiologia

Segons l'EPINE 2019, a l'estat espanyol la bacterièmia va ser la tercera causa d'infecció relacionada amb les cures sanitàries, després de la infecció quirúrgica i la ITU (19).

A Europa i els EUA, una estimació feta a partir d'estudis poblacionals donava una incidència entre 113 i 204 episodis per 100.000 habitants (20).

El programa SENTRY, que monitoritza els patògens que causen bacterièmia i el seu perfil de resistència a nivell mundial, al darrer informe (2012-2017) mostra les dades de 10 centres dels EUA, 4 d'Europa (França, Alemanya, Irlanda i Itàlia), 1 de Mèxic i 1 de Corea del Sud. Cada centre definia si la bacterièmia era d'origen comunitari o nosocomial (si apareixia abans o després de les 48 hores des de l'ingrés). Els microorganismes aïllats amb més freqüència van ser *S.aureus* (22.5%), *E.coli* (21.2%) i *Enterococcus spp* (10%) en tot el període a estudi. *Klebsiella spp* ocupa el quart lloc, seguida de SCN, i de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítics. *Pseudomonas spp* i *Enterobacter spp* ocupen el setè i vuitè lloc, seguits de *Candida spp* i *S.viridans* group. *S. pneumoniae* ocuparia l'11è lloc, amb un 2.1% de les bacterièmies.

Rank	Organism	Total (%)	2012	2013	2014	2015	2016	2017
1	<i>S. aureus</i>	1567 (22.5)	200 (24.4)	206 (23.3)	216 (24)	297 (19.9)	307 (20.8)	341 (24.5)
2	<i>Escherichia coli</i>	1473 (21.2)	177 (21.6)	163 (18.5)	167 (18.6)	327 (21.9)	313 (21.2)	326 (23.5)
3	<i>Enterococcus spp.</i>	695 (10)	70 (8.6)	103 (11.7)	89 (9.9)	145 (9.7)	153 (10.4)	135 (9.7)
4	<i>Klebsiella spp.</i>	636 (9.1)	70 (8.6)	72 (8.2)	86 (9.6)	131 (8.8)	146 (9.9)	131 (9.4)
5	CoNS	604 (8.7)	58 (7.1)	78 (8.8)	81 (9)	150 (10)	155 (10.5)	82 (5.9)
6	BHS	309 (4.4)	37 (4.5)	30 (3.4)	39 (4.3)	73 (4.9)	67 (4.5)	63 (4.5)
7	<i>P. aeruginosa</i>	293 (4.2)	44 (5.4)	43 (4.9)	29 (3.2)	70 (4.7)	46 (3.1)	61 (4.4)
8	<i>Enterobacter spp.</i>	261 (3.7)	39 (4.8)	24 (2.7)	37 (4.1)	49 (3.3)	62 (4.2)	50 (3.6)
9	<i>Candida spp.</i>	216 (3.1)	17 (2.1)	37 (4.2)	24 (2.7)	46 (3.1)	52 (3.5)	40 (2.9)
10	VGS	173 (2.5)	14 (1.7)	27 (3.1)	27 (3)	27 (1.8)	44 (3)	34 (2.4)
	<b>Total</b>	<b>6963</b>	<b>818</b>	<b>883</b>	<b>899</b>	<b>1495</b>	<b>1478</b>	<b>1390</b>

Figura 12. Microorganismes més freqüents durant el període 2012-2017. Programa SENTRY de vigilància antimicrobiana. Pres de Pfaller. 2020

Si ens basem en característiques demogràfiques, el patògen més freqüent en majors de 64 anys és *E.coli* (26.7%). I els *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítics són més habituals en menors de 18 anys (3).

La sèpsia afecta principalment a pacients amb malalties de base i alteracions als mecanismes de defensa. Pot ocórrer després d'una infecció adquirida a nivell comunitari, hospitalari o relacionada amb les cures sanitàries (relacionada amb tractament intravenós o amb la cura de ferides a domicili, cirurgia major, hemodiàlisi o diàlisi peritoneal, radioteràpia, quimioteràpia, residir en una residència o un centre de llarga estada o haver estat hospitalitzat més de dos dies en els tres mesos anteriors) (21). En aquells quadres d'infecció adquirida a la comunitat *E.coli* és el patògen més freqüentment aïllat en nombrosos estudis (com també ho és *S.pneumoniae*) mentre que *S.aureus* i *P.aeruginosa* són els més relacionats amb la mortalitat.

Alguns clons hipervirulents de *K.pneumoniae*, poden produir shock sèptic amb complicacions metastàtiques en individus sans. *Enterococcus spp*, *SCN*, *Candida* i *P.aeruginosa* són, fonamentalment, causants d'infeccions relacionades amb les cures sanitàries (20).

En països de baixos recursos, *Salmonella spp* origina quasi el 50% dels episodis, sobretot en algunes regions d'Àfrica, on en xiquets la incidència anual pot superar els 4000 casos/100.000, major inclús que la malària (20).

Les principals causes de sèpsia són la pneumònia, les infeccions del tracte urinari, les infeccions intraabdominals (IIA) o les relacionades amb catèters intravasculars. Malgrat això, només en un terç dels casos trobem hemocultius positius (18). I fins a un 25% dels casos, no s'arriba a conèixer el focus (7).

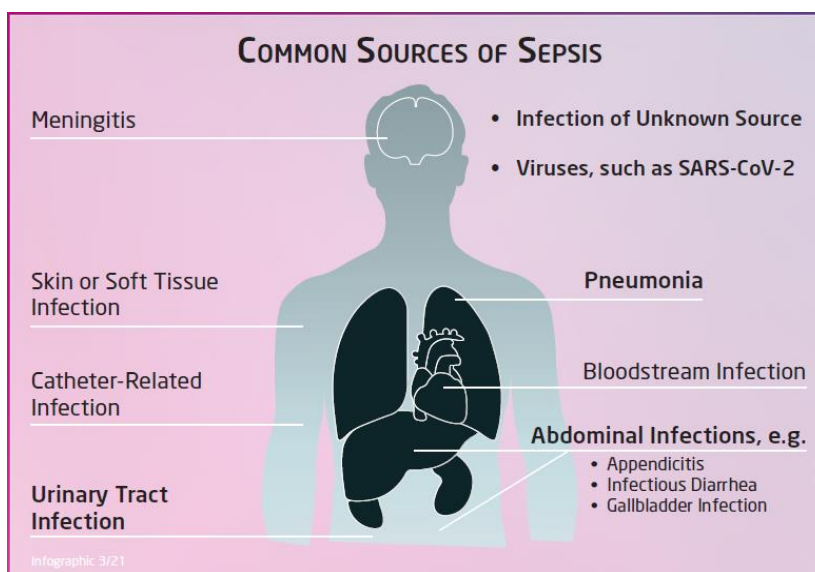


Figura 13. Causes més comunes de sèpsia. Extret de [www.worldsepsisday.org](http://www.worldsepsisday.org)  
Consultada en febrer de 2021

Segons un estudi multicèntric fet a Andalusia (21) sobre dos cohorts (2006-2007 vs 2016-2017) per conèixer els canvis en l'epidemiologia de la bacterièmia en els últims 10 anys, actualment l'edat és més avançada, hi ha més bacterièmies associades a ITU, d'origen biliar i relacionades amb catèter. Per microorganismes, disminueixen les causades per SCN, mentre que augmenten els BGN (especialment de l'ordre *Enterobacterales*). *E.coli* és el microorganisme més freqüent a les dos cohorts, però s'observa un augment significatiu de *Klebsiella spp*, que era el quart i ara és el segon en freqüència, així com de *Proteus spp* i *Candida spp*.

## 5. Diagnòstic microbiològic

Des de l'aparició dels sistemes d'incubació dels hemocultius, als anys 70, i l'automatització en la identificació i l'estudi de sensibilitat als anys 80, la Microbiologia moderna havia sofert pocs canvis, i l'interval entre la presa de la mostra i la disponibilitat de l'antibiograma era de 3 o 4 dies de mitjana (22). Però la introducció de la proteòmica amb l'espectrometria de masses MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) als laboratoris de Microbiologia Clínica en la darrera dècada ha suposat la innovació més revolucionària dels últims temps, perquè permet disposar de la identificació dels microorganismes a les poques hores de la positivització de l'hemocultiu. Tot i així, el temps fins a la validació definitiva dels resultats, depèn també de paràmetres de la fase preanalítica, com la correcta presa de mostra per evitar contaminacions, la quantitat adient de sang per frasc, el nombre suficient d'hemocultius i el temps que transcorre fins a la incubació d'aquests.

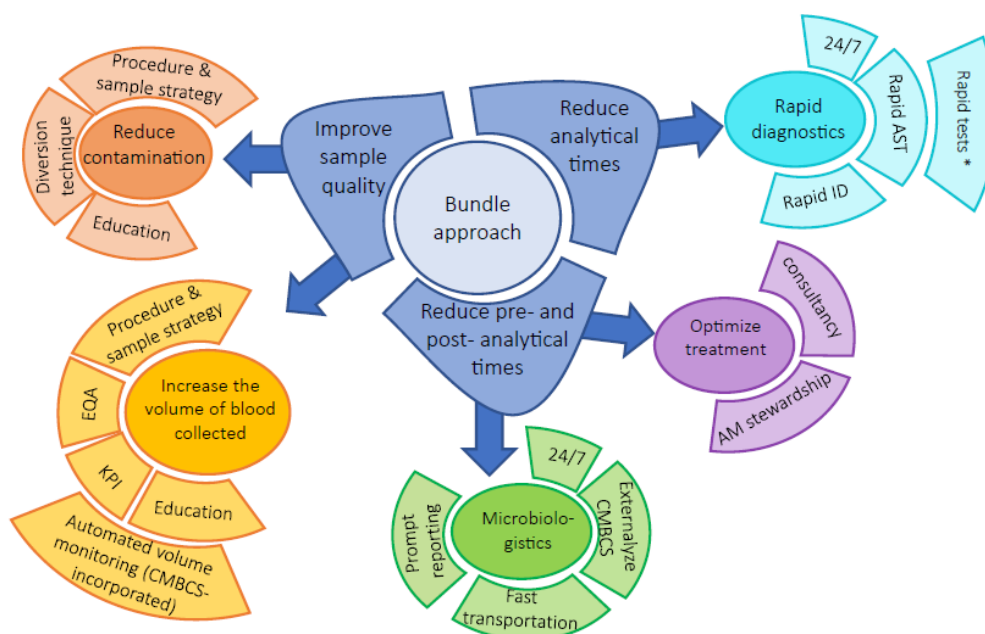


Figura 14. Accions per a millorar el diagnòstic de les bacterièmies. Pres de Lamy et al . Clin Microbiol Inf 2020

## 5.1. Indicacions de l'hemocultiu

Estaria indicada l'obtenció d'hemocultius davant d'una sospita de sèpsia per l'aparició de calfreds, febre (a partir de 38°C) o hipotèrmia en ancians o nounats, leucopènia o leucocitosi, trombopènia no filiada o PCT>0,5 ng/mL.

També en el cas d'infeccions com la meningitis, pneumònia, pielonefritis, infecció intraabdominal, infecció de la pell i parts toves, osteomielitis, BRC, endocarditis o FOD. S'ha d'acompanyar sempre d'altres mostres representatives del probable focus de la infecció (7).

## 5.2. Presa de mostra

Es recomana extreure de dos a tres hemocultius (entenen un *hemocultiu* com una parella formada per un frasc d'atmosfera aeròbia i un d'anaeròbia, excepte en pacients pediàtrics en què sols s'inocularà un frasc aerobi) de manera precoç, preferiblement abans de l'inici del tractament antimicrobià (o just abans de la següent dosi) i al moment en què es pateixen calfreds (que precedeixen a l'aparició de la febre) perquè el nombre de microorganismes circulants és major.

El percentatge de recuperació varia amb el nombre d'hemocultius: del 60-80% si en prenem només un fins al 95-99% si en prenem tres. En nounats, aquest percentatge disminueix enormement. Només es detecten microorganismes clínicament significatius en el 10 al 15% dels pacients simptomàtics (15) perquè la bacterièmia és de baix nivell (amb <10 UFC/mL) en més casos dels esperats. Alguns estudis mostren que fins a un 68% dels hemocultius positius tenien menys de 10 UFC/mL (23).

S'ha d'extreure sang perifèrica per venopunció, evitant fer-ho a través de dispositius intravasculars (només si se sospita BRC). Es recomana canviar de localització anatòmica per a cada hemocultiu.

El *volum* es relaciona amb el pes del pacient i es considera el factor més important per a la recuperació de microorganismes, perquè determina la sensibilitat, especificitat i el temps de positivització (13)(24). Cal extreure el volum aconsellat perquè la dilució de la sang amb el medi de cultiu siga correcta i es pugui neutralitzar el poder bactericida del sèrum i l'ATB rebut. Estaria indicat extreure de 10-20 mL (dilució 1:10) en adults, que es repartiran en dos frascos. Per tal d'assegurar una sensibilitat òptima en adults el volum total seria de 40 mL (25).

En xiquets, es recomana inocular d'1 a 5 mL (dilució 1:5) en un sol frasc, però aquest és un tema controvertit, perquè el volum de sang està clarament limitat en nounats, que presenten un baix volum intravascular.

A més, les extraccions repetides en pacients crítics podrien afavorir l'aparició d'anèmia o d'altres problemes circulatoris, els sotmeten a *stress* i cal que les efectue personal entrenat per evitar les contaminacions. Segons una revisió feta per Huber et al, sembla que l'adició d'1 mL més de sang augmentaria la recuperació fins a un 4,7% (13). No obstant, les recomanacions se centren en no sobrepassar el 4% del volum sanguini total del xiquet, que seria el límit del recanvi fisiològic. Així, segons la IDSA (22) es recomana extreure 2 mL en <1 kg, 4 mL entre 1-2 kg, 6 mL entre 2-13 kg, 20 mL entre 13-36 kg i com un adult (40-60 mL) a partir d'eixe pes (13).

El procediment es resumeix a continuació.

1. Utilitzar guants i mascareta
2. Netejar amb clorhexidina alcohòlica al 2% els taps dels vials
3. Seleccionar del lloc de l'extracció (no a través de catèter)
4. Desinfectar la pell amb clorhexidina alcohòlica al 2% i deixar actuar\*
5. Realitzar la punció sense tocar la pell del pacient amb la mà
6. No posar en contacte l'agulla amb el cotó
7. Extreure la sang: 10 ml a cada frasc en adults i entre 1-5 ml al frasc pediàtric
8. Inocular primer el frasc anaerobi (evitant l'entrada d'aire) i després l'aerobi.
9. Inocular la resta de tubs si hi ha (bioquímica, etc.)
10. Agitar suaument els dos frascos
11. Portar al laboratori de Microbiologia el més prompte possible
12. Mentrestant mantenir a temperatura ambient

Figura 15. Normes per extracció d'hemocultius. Adaptat de Rodriguez Díaz *et al.* SEIMC 2017

\*En menors de 2 mesos no es recomana la clorhexidina. Seria preferible la povidona iodada seguida d'alcohol (22)

Si tot aquest protocol es realitza correctament, el percentatge d'hemocultius contaminats no hauria de superar el 3% del total dels rebuts (22). Aquesta taxa de contaminació es defineix com el nombre de frascos contaminats (amb un microorganisme en el cultiu que no estaria present a la sang) per cada 100 mostres, independentment de les mostres processades o dels cultius positius totals (25).

No oblidem que els hemocultius contaminats comporten enormes despeses econòmiques directes per la prolongació de l'estada hospitalària o per les proves complementàries que generen o indirectes per sotmetre al pacient a un ATB innecessari.

Fins el 50% de pacients amb hemocultius contaminats són tractats sense necessitat (15). Per això cal insistir en la millora del procediment d'extracció, programant accions formatives periòdiques que permeten mantenir una taxa de contaminació acceptable.

### 5.3. Processament tradicional del hemocultiu.

#### 5.3.1. Mètodes automatitzats de cultiu de la sang

El processament manual dels hemocultius (que requeria de subcultius "cecs" a les 24-48 hores i al final de la incubació) es va substituir als anys 70 pels primers sistemes semi-automatitzats, com BACTEC 460 que era un sistema radiomètric, seguits per altres no-radiomètrics com BACTEC 660 (24). A finals dels anys 80, amb el desenvolupament de sistemes informàtics capaços de tractar gran quantitat de dades, apareixen nous sistemes automatitzats de monitorització contínua que mantenen la temperatura entre 35-37°C i fan una lectura cada 10 minuts. A més es poden connectar bidireccionalment al SIL. Els més habituals són:

-BacT/Alert Virtuo™: Aquest sistema està basat en la detecció colorimètrica mitjançant un sensor situat a la part inferior dels frascos, que passa de gris blavós a groguenc amb el canvi de pH que es produeix quan augmenta el CO<sub>2</sub> degut al creixement dels microorganismes. Permet la càrrega i descàrrega automàtica i té una capacitat de 432 cel·les.

-BD BACTEC™ FX: Es molt semblant a l'anterior però té un sensor de CO<sub>2</sub> fluorimètric. La seua capacitat és per a 400 frascos, i la càrrega i descàrrega són manuals.

Un 85-90% dels hemocultius es positivitzen en menys de 48 hores, excepte en el cas de bacteris de creixement lent o les fungèmies, que solen tardar almenys 72 hores. Es mantenen 5 dies de mitjana, que és el temps suficient per recuperar la majoria de microorganismes, però es pot allargar si se sospita algun microorganisme en especial (*Nocardia*, fongs, etc), encara que no ha estat ben demostrat que es recuperen més microorganismes “fastidiosos” com els del grup HACEK (*Haemophilus*, *Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* i *Kingella*) o bé *Brucella*, i en canvi si que n'augmenta la taxa de contaminació (24).

### 5.3.2. Tincions i subcultiu

Després de la positivització de l'hemocultiu, l'observació microscòpica de la sang sota tinció de GRAM és fonamental per orientar el diagnòstic en un primer moment, permetent l'emissió d'un informe preliminar.

Es faran subcultius en Agar Sang Columbia, Agar Chocolate Polyvitex, MacConkey o en Sabouraud o medis cromogènics per a llevats segons la morfologia observada en el GRAM. Les plaques s'incubaran a 37°C en atmosfera convencional o al 5-10% de CO<sub>2</sub> almenys 18-24 hores i, si es tracta del frasc anaerobi, en agar sang incubat en anaerobiosi almenys 48 hores.

### 5.3.3. Interpretació del resultat: Infecció vs contaminació

Encara que, com hem comentat, la taxa ideal de contaminacions hauria de ser inferior al 3%, la realitat és que es pot arribar fins un 30-50% (26) en alguns serveis amb elevat recanvi de personal com pot ser el d'Urgències. Per als microbiòlegs és essencial consultar la història clínica dels pacients per interpretar correctament un hemocultiu positiu, revisant aïllaments en altres tipus de mostra o el tractament antibiòtic pautat.

Microorganismes com *S.aureus*, *P.aeruginosa*, enterobacteris, *S.pyogenes*, *S.agalactiae*, *S.pneumoniae* i *Candida spp* indiquen amb molta seguretat una infecció hematògena vertadera. En canvi, *Cutibacterium acnes*, *Corynebacterium spp*, *Micrococcus spp* o *Bacillus spp* solen considerar-se contaminants procedents de la pell (3)(25). Altres bacteris com *Streptococcus* del grup *viridans* o *Staphylococcus* coagulasa-negatiu (SCN) s'han d'interpretar amb atenció valorant altres tipus de mostra (com la punta de catèter) o si s'aïllen en més d'un hemocultiu o en pacients immunodeprimits per a considerar-los significatius.



#### 5.3.4. Estudi de sensibilitat per mètodes fenotípics

L'estudi de sensibilitat és el mètode pel qual s'infereix la concentració d'un ATB necessària per a inhibir la multiplicació d'un microorganisme *in vitro* i que es podria assolir en els pacients. La disponibilitat de l'antibiograma, a més de facilitar la prescripció dels ATB adequats, és una eina per monitoritzar la selecció i l'emergència de patògens resistents. La informació sobre els patrons de resistència locals permet elaborar guies sobre tractament empíric (27).

Encara que el mètode de referència continua sent l'antibiograma a partir de colònia crescuda en medi sòlid a les 16-20 hores d'incubació, hi ha algunes tècniques que es poden aplicar per tal d'avançar informació que, encara que no estan totalment avalades pels comitès dedicats a l'estudi de sensibilitat (com CLSI o EUCAST), mostren una alta correlació amb el mètode de referència. La més estesa és la inoculació en targetes de Vitek2<sup>®</sup>, MicroScan WalkAway<sup>®</sup> (Beckman Coulter<sup>®</sup>), Phoenix BD<sup>®</sup> o d'altres sistemes automatitzats de microdilució, del *pellet* que s'obté en centrifugar un frasc positiu o d'un subcultiu de curta incubació en medi sòlid (4). D'aquesta manera aconseguim disposar de l'antibiograma a les 24 hores de la positivitat de l'hemocultiu o abans si es tracta d'un laboratori amb Atenció Continuada. L'antibiograma sobre *pellet* mostra millor concordança amb el *gold standard* per a BGN, i és menor per a CGP i llevats, mentre que el realitzat sobre subcultiu en medi sòlid permet una estandardització millor de l'inòcul i els resultats són més exactes (25)(28).

Recentment, EUCAST ha publicat unes recomanacions per fer l'antibiograma directe per disc-difusió a partir de l'hemocultiu (EUCAST RAST, *rapid antimicrobial susceptibility testing*), inoculant 100-150 uL de sang sense centrifugar en agar de Mueller-Hinton, que permet informar preliminarment a les 4, 6 i 8 hores. Està validat per 55 laboratoris europeus (29) i s'aplica a certs microorganismes: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pneumoniae*. Aquest mètode inclou una àrea d'incertesa tècnica (ATU) entre les categories *sensible* i *resistent*, per tal de reduir la falsa resistència/ sensibilitat associada al curt temps d'incubació. A les 4 hores s'observa un bon creixement en *E.coli* i *K.pneumoniae* mentre que *P.aeruginosa* necessita 6-8 hores per fer la lectura. La concordança amb el mètode tradicional arriba al 97%, i és fàcilment implantable en la major part de laboratoris de Microbiologia si l'horari ho permet.

L'únic inconvenient és que no es pot aplicar en bacterièmies mixtes o sobre microorganismes de creixement lent (25).

Amb bona correlació amb el mètode tradicional, ha aparegut una tècnica per nefelometria (Alfred AST<sup>®</sup>, Alifax) que proporciona resultats qualitius (S/I/R) en 5 hores (7).

#### 5.3.5. Informe acumulat de sensibilitat

Una informació molt valuosa per a triar el tractament empíric és el poder disposar de l'informe acumulat de sensibilitat, que s'elabora amb una periodicitat almenys anual per part dels/les especialistes en Microbiologia. Per a que tinga validesa estadística ha d'incloure les dades amb 30 o més aïllaments per espècie, considerant el primer aïllat per pacient (30). S'obté a partir de mostres clíniques i no de cultius de vigilància (31). És de gran utilitat la seua consulta si disposem de la identificació del microorganisme però no de l'antibiograma.

#### 5.4. Nous mètodes de diagnòstic.

Encara que l'hemocultiu convencional continua considerant-se el *gold standard*, perquè està implantat a tots els laboratoris i és l'únic que permet obtenir l'antibiograma (i el tipat si és necessari), es considera un mètode lent (pot tardar entre 6 hores i 5 dies) i poc sensible. Açò es deu principalment a la baixa càrrega bacteriana de la majoria de bacterièmies, que oscil·la entre 1 a  $10^4$  UFC/mL. També serien causes de falsos negatius la presència de bacteris no cultivables o el tractament ATB previ. Per això es considera que l'hemocultiu tradicional té una rendibilitat subòptima, amb un percentatge de positivitat entre el 30-40% en pacients sèptics (32).

El mètode de lisi-centrifugació Isolator, que conté saponina i requereix d'una centrifugació prèvia durant 30 minuts, en què s'obté un sediment que és sembrat als diferents medis de cultiu, ha mostrat més contaminacions i pitjor rendiment i està en desús (7)

Així, han sorgit nous mètodes basats en la detecció dels AN, que consideren el nombre de còpies *genòmiques* (incloent DNA de bacteris no viables o intrafagocítics, i que oscil·len entre  $10^3$  i  $10^4$  còpies de DNA/mL) i altres basades en l'espectre del proteoma microbià.

El mètode ideal per al diagnòstic de la sèpsia hauria de complir les següents condicions (15):

- Detecció ràpida (menys de 3 hores)
- Detecció d'un nombre elevat de bacteris, fongs i virus
- Poc invasiva, amb requeriments de volum <1mL en pediatria i de 5-10 mL en adults
- Elevada sensibilitat i especificitat
- Detecció polimicrobiana en un rang ampli de càrrega microbiana (1 a 100.000 UFC/mL sang)
- Detecció de mecanismes de resistència
- Facilitat d'us i mínims requeriments d'experiència en el processament i interpretació
- Possibilitat de detectar patògens emergents
- Capacitat de distingir que la resposta inflamatòria siga deguda a un patògen

### 5.4.1. Detecció de material genètic

Encara que econòmicament més costosos i, per tant, fora de l'abast de molts laboratoris, han sorgit sistemes que poden detectar el genoma de certs microorganismes i determinats gens de resistència a partir d'hemocultius positius.

La seua utilitat és òptima si es combina amb una comunicació directa amb els clínics o amb un expert del PROA (Programa d'Optimització de l'ús d'Antimicrobians), permetent l'optimització immediata del tractament ATB. Entre ells trobem:

#### 5.4.1.1. Amb amplificació dels AN (PCR)

La PCR en temps real es basa en la detecció i quantificació d'un senyal fluorescent emés durant l'amplificació, que és proporcional al producte de la PCR.

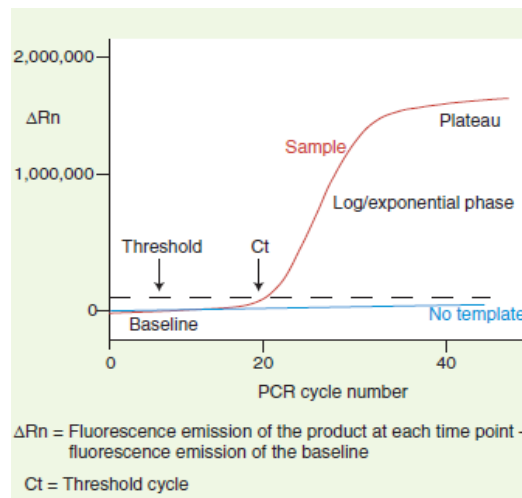


Figura 16. Corba d'amplificació. Pres de Arya *et al.* Expert Rev Mol Diag. 2005

Alguns sistemes són:

\*FilmArray-Blood Culture Identification Panel (FA-BCID, BioMérieux-BioFire®)

Es tracta d'una PCR niuada o *nested*, aplicada sobre un hemocultiu positiu, que és capaç de detectar simultàniament fins a 24 microorganismes (19 bacteris i 5 llevats) i 3 determinants de resistència: *mecA*, *vanA/vanB*, *blaKPC* en poc més d'una hora. La descriurem detalladament més endavant.

\*GeneXpert (Cepheid®) és una PCR en temps real que disposa d'un assaig per a detecció de SARM (*spa*, *mecA* i *SCCmec/orfX junction*) a partir d'hemocultiu, en una hora.

\*Verigene (Nanosphere®)

És un sistema basat en la hibridació, amb oligonucleòtids sintètics marcats amb nanopartícules d'or, del producte de la PCR. A partir de la tinció de GRAM de l'hemocultiu, aplicarem un panell per a grampositius (que inclou 4 gèneres i 9 espècies i els gens *mecA* i *vanA/vanB*) o per a gramnegatius (4 gèneres i 5 espècies) i els gens que codifiquen BLEE CTX-M i carbapenemases (KPC, NDM, VIM, IMP i OXA). La duració de la tècnica es d'unes 3 hores.

\*GenMark ePlex®

PCR multiplex que consta de 3 tipus de cartutx: per a BGN, CGP i fongs, segons el GRAM. Detecta en 1:30 hores, 41 espècies de bacteris i 15 de fongs, incorporant patògens freqüents en immunodeprimits (33).

#### 5.4.1.2. Sense amplificació AN (Hibridació fluorescent in situ o FISH)

\*PNA-FISH (QuickFISH) AdvanDx

Utilitza sondes fluorescents específiques per a cada microorganisme. Hi ha 4 panells diferents, per a *Enterococcus spp*, *Staphylococcus spp* amb detecció de *mecA*, BGN i *Candida spp*. Complexa i poc estesa.

\*Accelerate Pheno System™ (Accelerate Diagnostics, EUA)

És l'únic sistema fins al moment que combina la identificació amb l'estudi de sensibilitat. Capaç de detectar 16 microorganismes per hibridació in situ fluorescent (FISH) en 1:30 hores, permet l'estudi de sensibilitat per l'anàlisi morfocinètic per imatge del creixement bacterià sotmès a certa concentració antibiòtica (en 7 hores), amb una concordança entre 92-100% respecte als mètodes de microdilució. Consta també d'una sonda universal per a microorganismes no inclosos (33).

#### 5.4.2.Mètodes sobre sang directa

Els mètodes aplicats sense una incubació prèvia de la sang, poden donar un resultat a les 3-12 hores, però tenen l'inconvenient del seu elevat cost, la possible inhibició per substàncies presents a la sang (ferro, immunoglobulines, hemoglobina), per l'heparina o pel DNA humà. També podrien donar resultats falsament positius per la detecció de DNA bacterià d'infeccions controlades o contaminacions, o per DNA fúngic de l'ambient. A més, no permeten disposar del microorganisme per a l'estudi de sensibilitat. Per contra, són capaços de detectar els AN malgrat el tractament ATB previ. Alguns d'aquests mètodes són:

>*SepsiTest* (Molzym®): PCR amb *primers* universals per a dianes del RNA ribosomal bacterià (16S) i fúngic (18S). A partir d'1 mL de sang en EDTA. El resultat de la PCR s'obté en 4 hores i en cas de positivitat, l'amplicó es seqüència per obtenir la identificació, precisant-se fins a 8-12 hores més. Detecta fins a 345 microorganismes. No inclou gens de resistència. Sembla presentar taxes més altes de contaminació que l'hemocultiu tradicional, perquè s'amplifica DNA de microorganismes no significatius (15). Necessita d'un laboratori especialitzat.

>*Magicplex* (Seegene®): Doble PCR, amb sensibilitat i especificitat variables. Identifica més de 90 microorganismes a partir d'1 mL de sang. 6 hores.

>*Septifast* (Roche®): PCR *multiplex* seguida d'hibridació per sondes i anàlisi de corbes *melting* (15). Amplifica la regió ITS (*internal transcribed spacer*) del DNA ribosomal de 25 patògens, incloent 5 espècies de *Candida* i *Aspergillus spp.* Necessita un laboratori amb tecnologia i personal especialitzats. Inclou un *cutoff* que ajuda a diferenciar contaminants i limitar els falsos positius. 1,5 mL de sang en EDTA. 6 hores. Sensibilitat i especificitat variables amb una correlació amb l'hemocultiu entre el 43 i el 83% (7).

>*T2Candida* (T2Biosystems®): Nanotecnologia basada en la ressonància magnètica, amb *primers* específics que amplifiquen la regió ITS2 de *Candida* i que s'uneixen per hibridació a nanopartícules magnètiques cobertes d'una sonda. S'agrupen al voltant de la diana i modifiquen el senyal amb canvis microscòpics que es detecten per ressonància magnètica (34). Els resultats s'obtenen en 3-5 hores.

Presenta una sensibilitat del 99% i una especificitat del 91%, i un elevat valor predictiu negatiu que permetria retirar el tractament antifúngic si no es detecta cap espècie (7).

Recentment s'ha llançat el panell *T2Bacteria*, capaç de detectar sis microorganismes: *E.faecium*, *S.aureus*, *K.pneumoniae*, *A.baumannii*, *P.aeruginosa* i *E.coli*, amb una sensibilitat del 95,8% i una especificitat del 98,2% segons el fabricant.

>VYOO (SIRS-Lab®): És una PCR *multiplex* que detecta 34 bacteris (incloent anaerobis), 7 fongs, i 7 mecanismes de resistència (entre els quals BLEE). Els productes de l'amplificació se separen per electroforesi en gel d'agarosa. El resultat està disponible en unes 7 hores i precisa d'un laboratori de Biologia Molecular.

System (Manufacturer)	Principle	TAT (h)	Blood (mL)	Panel	Resistance genes	LoD (CFU/mL)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Cost	
									Instrument	Test
SepsiTest (Molzym)	Broad-range PCR + sequencing	8–12	2 × 1	>345 bacteria and fungi	—	20–460	21–87	85–96	€€	€€€
SeptiFast (Roche Molecular Diagnostics)	Multiplex real-time PCR	4–6	1.5	9 GP, 10 GN, 6 fungi	<i>mecA</i>	3–30	25–86	74–97	€€	€€€
MagicPlex Seegene)	Multiplex real-time PCR	3–5	1	73 GP, 12 GN, 6 fungi	<i>mecA, vanA, vanB</i>	30	37–65	66–92	€€	€€€
VYOO (Analytic Jena)	Multiplex PCR + gel electrophoresis	7–8	5	14 GP, 18 GN, 7 fungi	<i>mecA, vanA, vanB, bla<sub>SHV</sub></i>	3–10	60	70–75	€€	€€€
Iridica (Abbott Molecular)	Multiplex PCR + ESI-MS	6–8	5	>750 bacteria and fungi	<i>mecA, vanA, vanB, bla<sub>KPC</sub></i>	4–16	50–91	79	€€€€	€€€
T2Candida panel (T2 Biosystems)	PCR + magnetic resonance technology	3–4	4	5 <i>Candida</i>	—	1	91–100	98	€€€	€€€

GN, Gram-negative bacteria; GP, Gram-positive bacteria; LoD, limit of detection (in CFU/mL); TAT, turnaround time (in hours).

Figura 17. Alguns mètodes de detecció sobre sang directa. Pres de Rello *et al.* Clin Microbiol Infec 2018. Nota: Iridica (Abbott) es va retirar del mercat pel mateix fabricant.

>*U-dHRM* (Universal digital High-Resolution Melt). Mètode en desenvolupament sobre sang directa que combina una PCR universal bacteriana digital sense sondes sobre el gen 16S rRNA, amb una anàlisi de corbes de fusió sobre un xip microfluídic. Permet diferenciar i quantificar 37 microorganismes (però amb possibilitat d'expansió) en unes 4 hores (a les que s'ha de sumar l'extracció prèvia) amb menys d'1 mL de sang. L'anàlisi es fa mitjançant un algoritme automatitzat. El baix volum de sang el fa idoni per a nounats. La característica que el diferencia dels altres mètodes és que detecta només DNA viable (15).

>iDTECT Blood (PathoQuest®). Tècnica de metagenòmica, basada en la seqüenciació de genoma complet, que permet detectar uns 800 bacteris i 400 virus en sang sense la necessitat de disposar de sondes predefinides.

Compara els resultats amb una base de dades que proporciona el fabricant. Requereix un seqüenciador massiu. Almenys 48-72 hores. Actualment la seua disponibilitat és molt limitada (7).

La tecnologia de NGS (*Next-Generation Sequencing*), encara que ha aconseguit disminuir el cost i el temps respecte als seqüenciadors de primera generació basats en electroforesi capil·lar tipus Sanger, necessita almenys 48 hores, afegint el temps per a l'extracció i per a la interpretació bioinformàtica de les dades. El seu elevat cost i complexitat fan que estiga disponible en pocs hospitals (22). A més, la informació que proporciona sobre gens de resistència no sempre es correlaciona amb la expressió fenotípica (35). En alguns casos d'endocarditis amb hemocultiu negatiu la seqüenciació de DNA del teixit valvular podria ajudar a determinar l'agent etiològic (22).

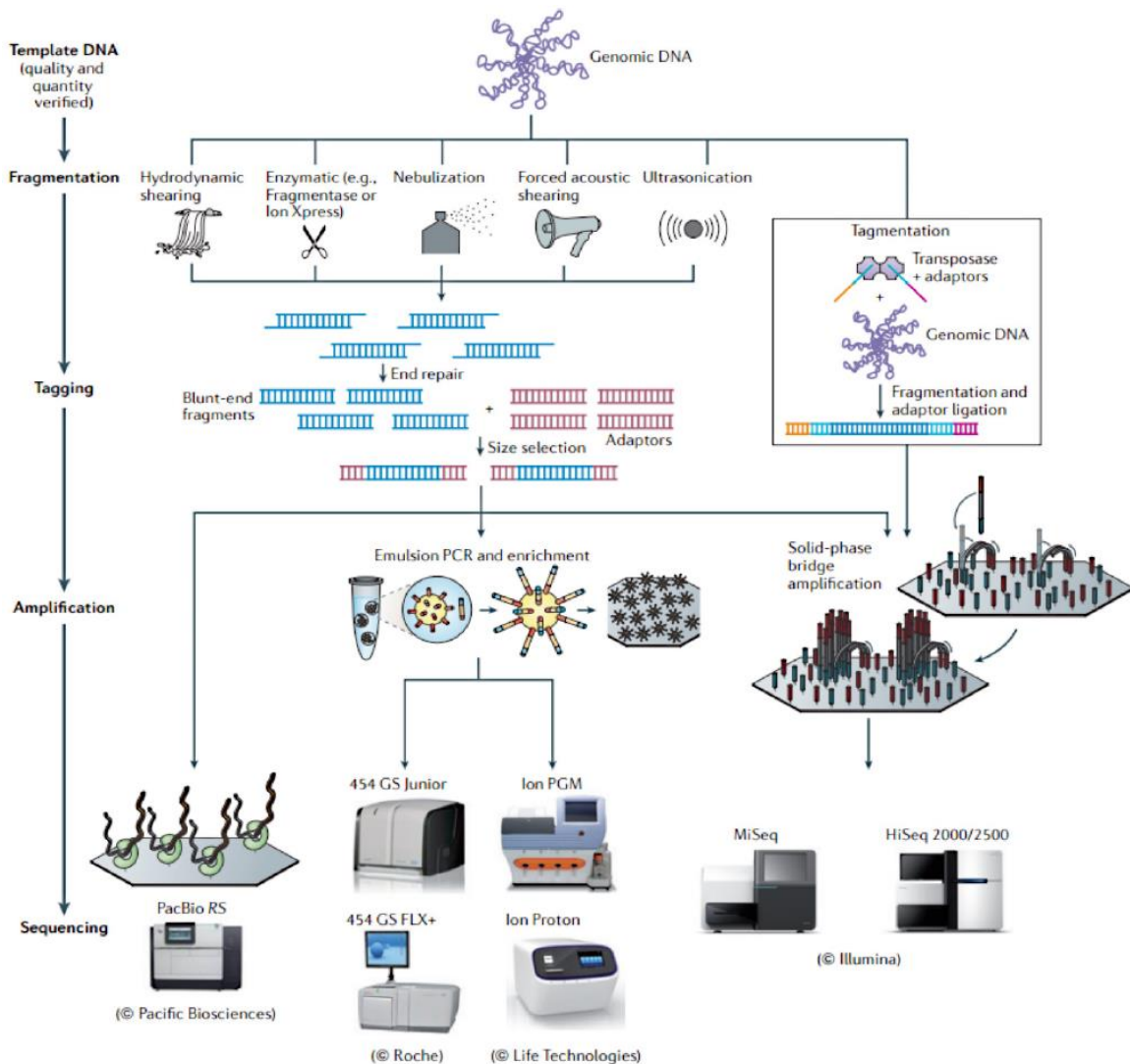


Figura 18. Plataformes de NGS. Pres de Applications of Clinical Microbial NGS. ASM 2016



### 5.4.3. Detecció proteica: Espectrometria de masses

L'espectrometria de masses MALDI-TOF és un sistema mitjançant el qual en fer incidir un raig làser sobre un microorganisme embegut dins una matriu d'àcid  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-trans-cinàmic, s'aconsegueix ionitzar una sèrie de proteïnes (fonamentalment ribosomals) que, sotmeses a un camp elèctric, migren per un tub fins a un detector. Segons la massa de cadascuna, mesurada pel temps de vol dins el tub, es genera un espectre que es compara amb d'altres, dins una base de dades, permetent la identificació de bacteris, fongs (incloent-ne alguns filamentosos) i micobacteris en 20-40 minuts (36).

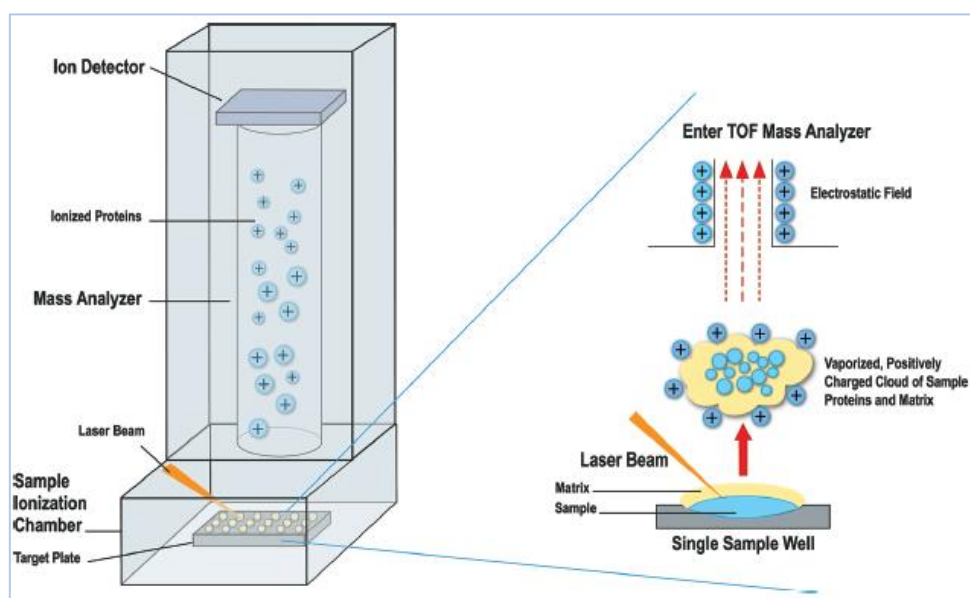


Figura 19. MALDI-TOF MS. Presa de Patel. Clinical Chemistry 2015

Aplicada als hemocultius, aquesta tecnologia ha suposat una revolució dins el camp de la Microbiologia, encara que s'ha d'aplicar només quan s'observa un sol tipus de microorganisme a la tinció de Gram. No està indicat per a bacterièmies mixtes, però aquestes suposen un mínim percentatge respecte al total.

>MALDI-TOF directe: L'aplicació directa sobre hemocultiu no es correlaciona totalment amb el processament sobre colònia (caldrà confirmar la identificació), i requereix el pretractament de la sang amb un procés de lisi amb saponina, centrifugació i, en certes ocasions, extracció proteica amb etanol i àcid fòrmic per obtenir el *pellet* bacterià (25). Segons un metaanàlisi que avaluava 32 estudis, el percentatge més gran de coincidència s'obté per a la família *Enterobacteriaceae* (entre el 96-100%), seguit de *P.aeruginosa* (98%), *A.baumannii* (88%) i *H.influenzae* (81%).

Entre els grampositius la concordança és del 74% per a *S.aureus* i del 72% per a SCN, i entre els estreptococs, *S.agalactiae* s'identifica correctament en un 92%, *S.pyogenes* en el 76% i la concordança és prou menor per a *S.pneumoniae*, amb un 31%. *Enterococcus spp* s'identifica correctament en un 86% dels casos (37).

>MALDI-TOF sobre subcultiu: També s'ha aconseguit una identificació prou aproximada a partir del subcultiu d'un inòcul elevat incubat entre 2-6 hores en medi sòlid. La concordança per a bacils gramnegatius pot arribar al 92% a les 4 hores d'incubació (38) i al 94,8% a nivell d'espècie a les 6 hores(39). Aquesta concordança s'aconsegueix quan s'identifica el microorganisme, perquè s'exclouen els resultats no concloents, que solen ser més habituals en grampositius perquè creixen més lentament i per tant, la quantitat de proteïna es insuficient per a l'anàlisi per espectrometria.

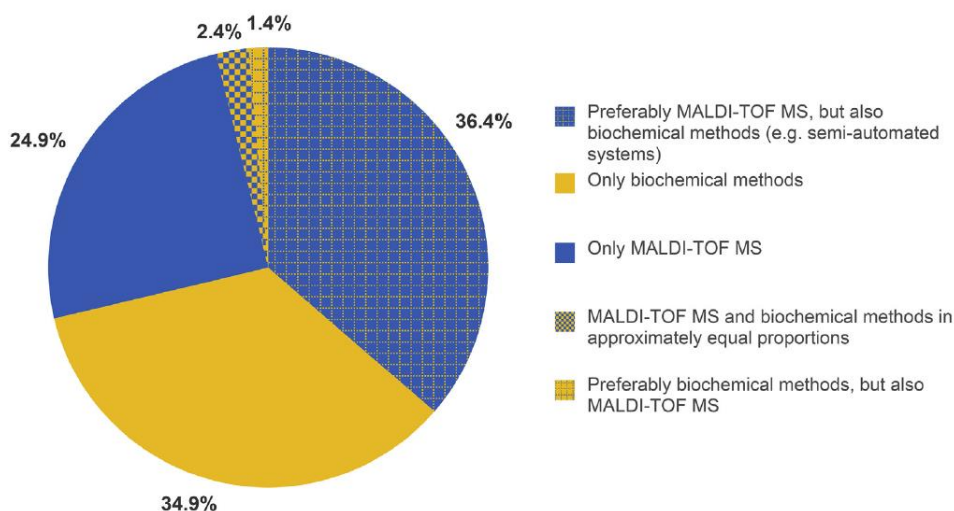


Figura 20. Mètodes d'identificació per laboratoris europeus a partir de subcultiu d'hemocultiu positiu. Pres de Idelevich *et al.* Clin Microbiol Infec 2019

>MALDI-TOF per a detecció de resistències: S'ha aplicat l'espectrometria de masses en la detecció, per exemple, de carbapenemases en Enterobacteriaceae, amb una excel·lent correlació però encara de forma experimental (33).

## 6. Biomarcadors

Un biomarcador és una característica objectivament mesurable i avaluada com un indicador dels processos biològics normals, patològics o de les respostes a una intervenció terapèutica. S'utilitza tant per al diagnòstic com per al pronòstic o l'avaluació de la resposta al tractament (40). La complexa patofisiologia de la sèpsia involucra la majoria de cèl·lules, teixits i òrgans i per tant, hi ha nombroses molècules que s'han proposat com a potencials biomarcadors, de les quals només un 20% han estat estudiades en profunditat (17). No existeix un *gold standard*, però definirem els que s'han utilitzat com a biomarcadors principals:

### -Proteïna C reactiva (pcr)

És un reactant de fase aguda produït principalment al fetge, però també a d'altres cèl·lules com els macròfags alveolars. Augmenta després del dany tissular (traumatisme, inflamació, infecció vírica, etc) i, encara que prou inespecífica, té una elevada sensibilitat. Les infeccions bacterianes, mitjançant l'IL-6, IL-1 i el TNF- $\alpha$ , provoquen un ràpid augment de la pcr. No és útil per a monitoritzar la resposta al tractament perquè es normalitza lentament.

### -Procalcitonina

Està considerada com el marcador més rellevant d'infecció bacteriana sistèmica. És la prohormona de calcitonina. Es sintetitza principalment a la glàndula tiroides i a les cèl·lules neuroendocrines del pulmó, encara que pot produir-se a d'altres teixits en resposta a la endotoxina o a mediadors alliberats en la infecció bacteriana com IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  o IL-6 (17). Té una vida mitjana més curta que la pcr (24 hores) i augmenta més precoçment en cas d'infecció (entre les 2 i les 6 hores), fet que la fa útil per optimitzar el tractament ATB. En condicions normals és quasi indetectable (<0.05 ng/mL) (41). Alguns estudis (26)(41)(42) la proposen com el millor marcador pronòstic de bacterièmia vertadera al Servei d'Urgències, més que la pcr i la xifra de leucòcits. És útil inclús en ancians, pacients oncològics i hematològics. Algunes limitacions serien que pot augmentar després de situacions de *stress* massiu com traumatismes severes, cirurgia, shock cardiogènic o cop de calor. La teràpia biològica i algunes malalties autoimmunes i síndromes paraneoplàsics també poden cursar amb un augment de PCT. En la candidèmia, els nivells de PCT poden ser normals (17).

-Lactat

És un excel·lent marcador d'hipoperfussió tissular. L'augment en els seus nivells és indicatiu de la necessitat de drogues vasoactives en la sèpsia. Un lactat major de 4 mmol/l indica que el pacient es troba en shock sèptic. És un paràmetre molt sensible i fàcil de mesurar però poc específic (17).

-MR proadrenomedulina (MR-proADM)

És un pèptid que pertany a la mateixa família que la procalcitonina. Té un aclariment molt ràpid renal i pulmonar, i és un excel·lent predictor de severitat i gravetat en la sèpsia (40).

## 7.Tractament empíric

En 1942, Anne Miller, una jove de 30 anys de Conneticut, va estar a punt de morir per una sèpsia. Se li va administrar un fàrmac experimental per tractar de salvar-la: la Penicil·lina, descoberta 14 anys abans per Alexander Fleming. Es va recuperar en poques hores, i va ser la primera persona al món salvada per un antibiòtic (43).

La correcta tria inicial de l'ATB ha demostrat salvar més vides que qualsevol altra intervenció mèdica, i hi ha estudis que suggereixen que hi ha una finestra diagnòstica d'1 a 3 hores des del reconeixement de la sèpsia fins l'inici del tractament ATB abans que augmente la taxa de mortalitat. Per contra, el tractament inapropiat en les 6 hores des del diagnòstic suposa una reducció de 5 vegades en la supervivència (15).

El tractament empíric es defineix com aquell règim seleccionat en absència d'una identificació definitiva del patogen i de l'estudi de sensibilitat. Està basat en el possible focus, en aquells microorganismes aïllats amb major probabilitat i en la severitat de la malaltia, així com en factors dependents del pacient com les comorbiditats, si porten dispositius permanents, l'estat immunològic, al·lèrgies, infeccions i/o colonitzacions recents o la exposició a ATB en els 3 darrers mesos. L'antibioteràpia empírica estarà guiada segons els antibiogrames locals, i es tindran en compte factors de risc d'infecció per microorganismes MDR. Si el possible focus es pot retirar o drenar, caldrà fer-ho per controlar la infecció. A més, s'ha d'assegurar la penetració de l'ATB als teixits afectats. En casos d'infecció greu, es pot optar per la teràpia combinada per ampliar l'espectre en un primer moment, prevenir l'aparició de mutants resistents i aconseguir una eliminació més ràpida del patogen (44).

Entre els patògens causants de sèpsia més freqüents, recollits a l'estudi SENTRY (2012-2017), s'observa el major percentatge de resistències en *S.aureus* (amb el 37% de SARM) i també en enterococs resistents a Vancomicina (24.6%), però amb una disminució estadísticament significativa en els darrers anys. Tot i així, es troben diferències entre regions, amb SARM i VRE predominants més a EUA que a Europa (39.7% i 33.2% vs 30.2% i 9.9% respectivament). En canvi, els BGN amb mecanismes de resistència són més freqüents a Europa que als EUA (*Klebsiella* BLEE 24% vs 12.5%; CRE 10.9% vs 2.3% i *P.aeruginosa* MDR 18.8% vs 13%) (3).

Organism (% resistant <sup>a</sup> )	Total	2012	2013	2014	2015	2016	2017	P value
<i>S. aureus</i> (% MRSA)	1567 (37.0)	200 (40.0)	206 (39.8)	216 (36.6)	297 (37.0)	307 (35.8)	341 (34.9)	0.0048*
<i>Enterococcus</i> spp. (% VRE <sup>b</sup> )	695 (24.6)	70 (35.7)	103 (28.2)	89 (23.6)	145 (25.5)	153 (19.6)	135 (21.5)	0.020*
<i>S. pneumoniae</i> (% PEN-NS <sup>c</sup> )	149 (3.4)	18 (5.6)	25 (4.0)	17 (17.6)	42 (0.0)	27 (0.0)	20 (0.0)	0.37
<i>Klebsiella</i> spp. (% ESBL)	636 (21.5)	70 (27.1)	72 (19.4)	86 (19.8)	131 (15.3)	146 (27.4)	131 (20.6)	0.78
<i>E. coli</i> and <i>Klebsiella</i> spp. (% CRE) <sup>d</sup>	2109 (1.5)	247 (3.2)	235 (2.6)	253 (1.2)	458 (0.7)	459 (2.0)	457 (0.7)	0.078
<i>P. aeruginosa</i> (% MDR)	293 (15.4)	44 (31.8)	43 (11.6)	29 (20.7)	70 (10.0)	46 (4.3)	61 (18.0)	0.25

<sup>a</sup> Resistance criteria are based upon CLSI M100 recommendations. (CLSI, 2019).  
<sup>b</sup> Vancomycin MIC, >16 mg/L.  
<sup>c</sup> Includes intermediate and resistant isolates per 2019 CLSI criteria for parenteral nonmeningitis. (CLSI, 2019).  
<sup>d</sup> No CRE *E. coli* detected.  
\* Statistically significant at  $P < 0.05$ .

Figura 21. Fenotips resistents més freqüents durant el període 2012-2017. Programa SENTRY de vigilància antimicrobiana. Pres de Pfaller. 2020

A l'estudi epidemiològic sobre bacterièmies d'Andalusia (21), es va observar una disminució en la bacterièmia per SARM, mentre que no hi va haver canvis en la detecció de BLEE.

Segons mostra Sara Cosgrove en una revisió (45), el desenvolupament de resistències en *S.aureus*, enterococs i BGN incrementa la morbiditat, mortalitat, estada hospitalària i costos, com a conseqüència del tractament inadequat o el retràs en instaurar-lo. Açò es relaciona amb tres factors principals, que afecten:

- L'hospedador. La severitat de la malaltia de base implica menor control de la infecció.
- El microorganisme. La major virulència només s'ha demostrat per a SARM comunitari per l'acció de les exotoxines, ja que en el cas dels BGN la multiresistència redueix el *fitness*.
- El tractament, que en patògens amb factors de resistència implica:
  - 1) Disminució en l'efectivitat, augment de la toxicitat i/o infradosificació
  - 2) Necessitat de cirurgia coadjuvant, que prolonga l'ingrés i els costos
  - 3) Retràs en la instauració o absència d'opcions terapèutiques

Són factors de risc d'infecció per SARM l'hospitalització o cirurgia recent, pertànyer a un centre socio-sanitari, hemodiàlisi i l'ATB prèvia. El tractament indicat serà Daptomicina (excepte si el focus és pulmonar perquè s'inactiva amb el surfactant), Vancomicina o Ceftarolina. Linezolid no seria el tractament més indicat pel seu efecte bacteriostàtic (44).

Pel que fa a les BLEE, són factors de risc la colonització o infecció prèvia, l'edat, la condició de trasplantat, d'immunodeprimit o els antecedents d'hospitalització en països amb una alta prevalença de BLEE. El tractament amb carbapenems seria el d'elecció (44).

En el cas dels enterobacteris resistents a carbapenem (CRE), la colonització prèvia, junt a l'estada en UCI, portar un catèter venós central, antibioteràpia prèvia o la diabetis, s'han considerat factors de risc. El tractament seria combinat amb colistina i ceftazidima-avibactam per CRE, o amb ceftolozano-tazobactam per *P.aeruginosa* o altres opcions com cefiderocol o meropenem-vaborbactam (44).

Tot i així, entre el 40-50% dels pacients amb bacterièmia i fins al 70% dels qui presenten fungèmia reben un tractament inadequat abans de la disponibilitat dels resultats microbiològics (15). En el cas del shock sèptic, el 20 % dels malalts reben un tractament inefectiu d'entrada, fet que motiva una reducció de cinc vegades en la supervivència (del 52% al 10,3%) (46).

## 8. Implicacions del diagnòstic sobre el tractament i impacte sobre el PROA

Posar fre a l'augment de les resistències bacterianes és una de les prioritats per a l'OMS. Des del Pla d'Acció Mundial sobre la Resistència als Antimicrobians, adoptat en 2014, es reconeix que l'ús inapropiat i excessiu d'antimicrobians contribueix a l'expansió de la resistència als ATB. Aquest pla té com a objectiu l'optimització dels ATB fomentant-ne un ús responsable i prudent (47). El problema de les resistències implica una actuació a nivell global, incloent la limitació de l'ús d'ATB en agricultura o ramaderia i la seua disseminació al medi ambient (48). Veure Annex 1.

Als EUA, cada any hi ha més de 2,8 milions d'infeccions per organismes MDR, que causaran la mort de 35.000 persones. A més, gairebé 224.000 pacients seran hospitalitzats a causa de la infecció per *C.difficile*, que va causar la mort de 12.800 persones en 2017 (43).

L'ECDC estima que entre el 30 i el 50% dels antibiòtics prescrits són innecessaris, i la sobreprescripció promou el desenvolupament i la disseminació de la resistència que, a la vegada, provoca a Europa unes 25.000 morts a l'any (27). Fins al 50% dels pacients amb infeccions respiratòries reben un ATB malgrat que la gran majoria estan causades per virus, amb el risc d'aparició d'efectes secundaris, d'infeccions relacionades amb l'antibioteràpia i de microorganismes resistents (49).

El retràs diagnòstic comporta estances hospitalàries més llargues i proves addicionals que perjudiquen els pacients i que, a més, n'augmenten els costos i l'evolució desfavorable.

En aquelles infeccions invasives on el tractament precoç és prioritari, és molt important detectar els mecanismes de resistència el més ràpidament possible. Segons l'ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), i mitjançant les dades recollides per l'EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) (50) sobre la resistència dels principals microorganismes causants d'infecció invasiva a 29 països, s'observa un augment tant de *K.pneumoniae* com d'*E.coli* amb resistència combinada a fluorquinolones, aminoglucòsids i C3G. També és preocupant el creixement de *K.pneumoniae*, *Acinetobacter spp* o *P.aeruginosa* resistents a carbapenem i de BGN resistents a colistina (la darrera opció en molts casos).



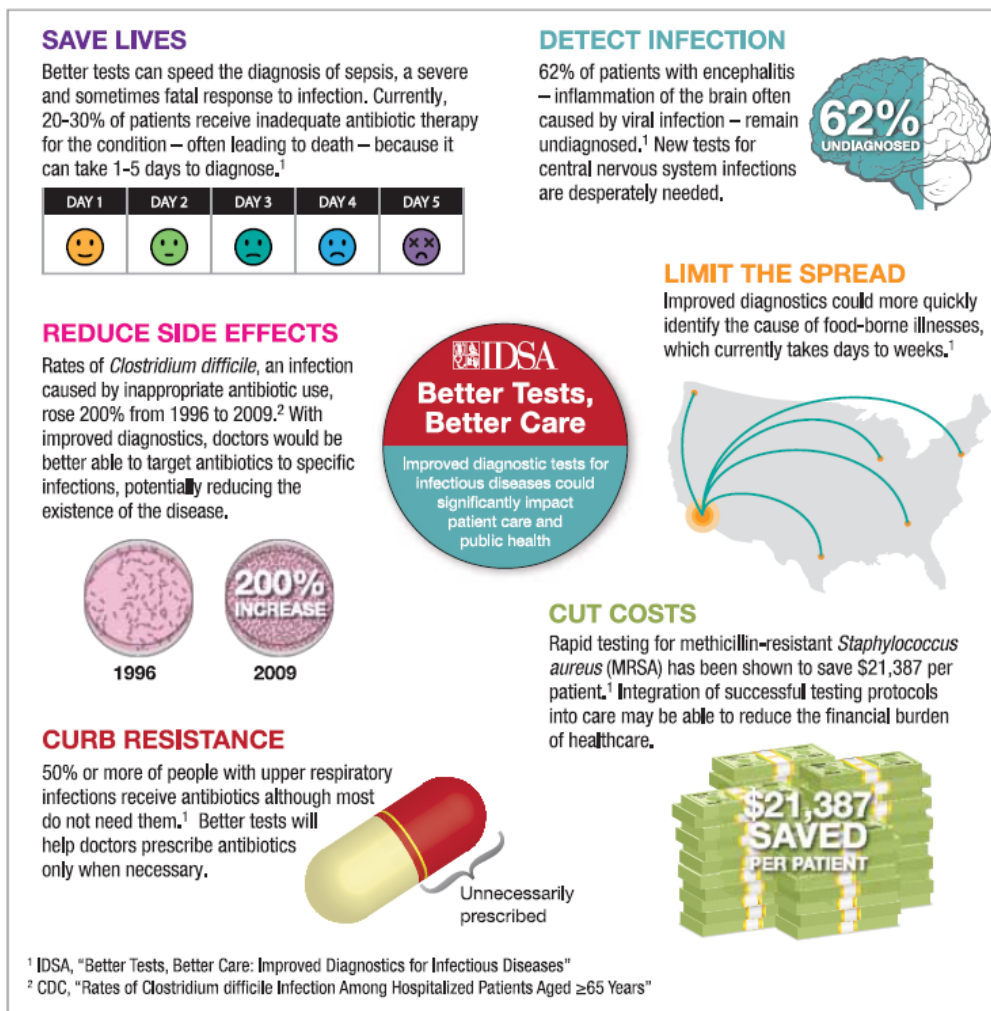


Figura 22. Necessitat d'un diagnòstic ràpid. Pres de Kuehn. JAMA 2013

Sobretot als països del sud-est d'Europa la taxa d'infeccions per patògens MDR està limitant les opcions de tractament d'una manera molt preocupant. *Klebsiella pneumoniae* mostra una creixent resistència a carbapenem amb prevalències >25% a Itàlia, Grècia, Sèrbia, Romania, Bielorússia i Turquia mentre que a l'Índia ja suposa >50% (20).

L'augment de *E.faecium* resistent a Vancomicina també és preocupant (10,5% en 2015 vs 18,3% en 2019) (50).

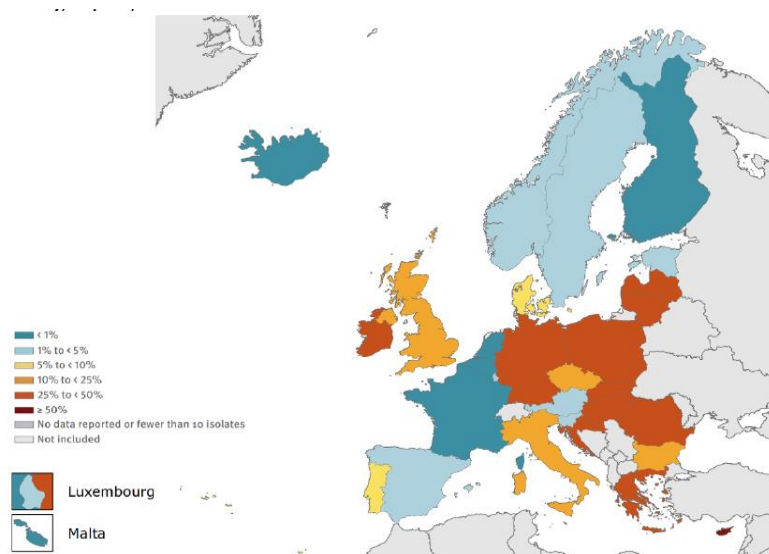


Figura 23. Aïllats invasius d'*E.faecium* resistent a Vancomicina. EARS-Net 2019.

Afortunadament el percentatge de SARM està disminuint, continuant la tendència dels darrers anys, com també ho fa *S.pneumoniae* “non-wild-type” a Penicil·lina (12,1%), és a dir, aquell fenotip informat com a *sensible a exposició incrementada* (I) o *resistent* (R) a Penicil·lina (CMI >0,06 mg/L) i resistent a Macròlids (14,5%) (50).

Entre els fongs, és preocupant l'emergència de *Candida auris*, una espècie MDR descrita en 2009 a Àsia, que pot causar brots nosocomials amb una elevada mortalitat. Als EUA ha augmentat en un 318% en 2018 respecte a la mitjana de casos entre 2015-2017 (43).

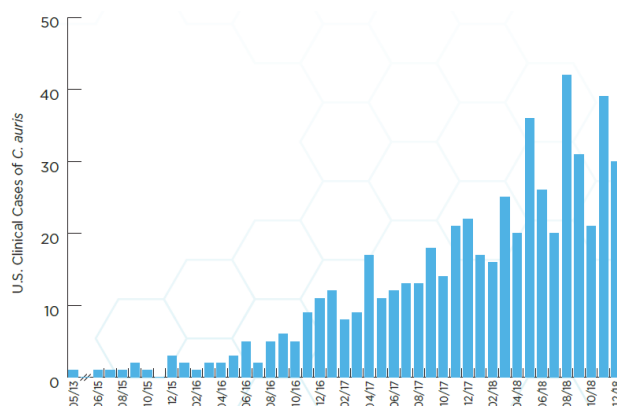


Figura 24. Casos de *C.auris*. Pres de CDC Antibiotic Resistance Threats in United States, 2019

L'ús prudent dels antimicrobians podria ser definit com *un bundle o paquet d'intervencions per a promoure i assegurar l'optimització del tractament antimicrobià que resulte en la millor evolució clínica en el tractament o prevenció de la infecció, amb la mínima toxicitat per al pacient i el mínim impacte per a la generació de resistències.*  
(31)

L'equip PROA s'ha convertit en una eina imprescindible per a promoure un ús adequat dels antibiòtics, aportant nombrosos beneficis com són:

- reducció de la incidència d'infecció per *C.difficile*
- reducció de les resistències bacterianes
- millora de la dosificació en pacients amb dany renal
- millora en l'ús de la profilaxi pre-quirúrgica
- millora en la taxa d'infeccions resoltes
- disminució en la taxa de mortalitat
- administració precoç del tractament adequat
- desescalada* en els casos indicats, definida com l'estratègia que disminueix la pressió antibiòtica sobre la microbiota intestinal i el risc associat d'adquirir microorganismes MDR, mantenint una eficàcia clínica similar.
- estalvi en els costos hospitalaris

En aquest equip, l'Especialista en Microbiologia juga un paper clau perquè hi contribueix, entre d'altres tasques:

- Elaborant informes acumulats de sensibilitat periòdicament
- Informant l'antibiograma selectivament, per afavorir la teràpia dirigida de menor impacte en les resistències
- Participant en l'elaboració de guies clíniques de les infeccions més comuns
- Notificant microorganismes o mecanismes de resistència d'especial vigilància
- Proposant directrius en la fase pre-analítica per millorar la qualitat de la mostra
- Afavorint la disponibilitat i validant mètodes de diagnòstic ràpid
- Notificant al clínic la necessitat de modificar un tractament inadequat (31)

En el cas de la bacterièmia, nombrosos estudis han demostrat que la intervenció precoç d'un equip PROA millora tant l'ús dels ATB com la supervivència (51)(52)(53). Si, a més, s'apliquen mètodes de diagnòstic microbiològic ràpid, aquest benefici augmenta considerablement.

La guia IDSA sobre Optimització de l'ús d'ATB de 2016 (54) ja recomanava incloure aquests mètodes sobre la sang en la rutina dels laboratoris de Microbiologia, per tal de controlar les resistències i millorar els resultats clínics, com també ho recomana el Document de Consens sobre "Código Sépsis" (16).

**XVII. Should ASPs Advocate for Rapid Diagnostic Testing on Blood Specimens to Optimize Antibiotic Therapy and Improve Clinical Outcomes?**

*Recommendation*

18. We suggest rapid diagnostic testing in addition to conventional culture and routine reporting on blood specimens if combined with active ASP support and interpretation (*weak recommendation, moderate-quality evidence*).

Comment: Availability of rapid diagnostic tests is expected to increase; thus, ASPs must develop processes and interventions to assist clinicians in interpreting and responding appropriately to results.

Figura 25. Presa de Guia IDSA sobre Optimització de l'ús d'ATB. Barlam et al. 2016

## 9. Bacterièmia durant la primera onada de la pandèmia de COVID-19

La pandèmia de COVID-19 ha suposat un canvi per a tots els laboratoris de Microbiologia del món. La major part de la seua càrrega de treball s'ha centrat en el processament d'una gran quantitat de mostres per a PCR de SARS-CoV-2. Alguns laboratoris no disposaven de tecnologia ni del personal suficient per fer front a aquesta pandèmia, però s'ha fet un enorme esforç per implantar-ho i ser capaços de diagnosticar a moltíssima gent (casos, contactes, estudis de cribratge...) en poc de temps. L'ampliació horària a les vesprades o inclús a les nits, ha permès gaudir d'un efecte col·lateral positiu: la millora en el processament dels hemocultius i, per tant, la reducció en el temps de diagnòstic de les bacterièmies.

Alguns estudis fets a l'inici de la pandèmia, com el de Mormeneo *et al*, a l'Hospital Miguel Servet de Saragossa (55) entre març i juny de 2020, mostren un descens en els hemocultius processats, més d'un 20% respecte als dos anys anteriors. Açò es podria explicar per la dràstica reducció de les intervencions quirúrgiques i la menor afluència de pacients a Urgències durant el confinament, que en ocasions es quedarien a casa amb processos febrils no-COVID originant un infradiagnòstic de bacterièmies. A més, van observar un augment dels aïllaments de *S.epidermidis* i SCN, probablement contaminants, per la dificultat de mobilitat lligada als EPIs i també un major percentatge de candidèmies. En canvi, un altre estudi fet a New York (56), mostra un increment tan gran dels hemocultius demanats com a conseqüència de l'atenció als processos febrils, que es va sobrepassar la capacitat de molts laboratoris. Alguns d'ells van haver de limitar la incubació a 4 dies. Es conclou també que predominaven els bacteris contaminants entre els pacients amb COVID-19 (quasi un 60% de SCN) i que les bacterièmies vertaderes van ser molt poc freqüents, un 3'8% front al 8% en pacients no-COVID. Les baixes xifres de procalcitonina a la major part de pacients amb COVID-19 tampoc suggerien coinfeccions bacterianes.

Un estudi realitzat a l'Hospital Clínic de Barcelona (57) sobre la incidència de coinfeccions comunitàries i superinfeccions hospitalàries en malalts COVID-9 hospitalitzats durant març i abril de 2020 mostra que, a diferència de les pandèmies per virus Influenza, les coinfeccions bacterianes són infreqüents. Entre els 989 pacients sols el 2,1% presentava una pneumònia bacteriana d'origen comunitari causada principalment per *S.pneumoniae* i *S.aureus*, bacterièmica només en un cas.

En els quadres d'adquisició hospitalària el 3,8% presentava una superinfecció bacteriana, principalment pneumònia associada a ventilació mecànica (25%) i bacterièmia (36,3%), amb *P.aeruginosa* i *E.coli* com a aïllats més freqüents. En el 0,7% dels pacients la superinfecció era fúngica (amb 2 candidèmies). Plantegen reconsiderar la necessitat de l'antibioteràpia empírica protocolitzada per fer un ús responsable dels ATB, i indicar-la només en casos amb sospita radiològica de pneumònia bacteriana, ingrés a l'UCI o immunosupressió severa.

## 10.Nova versió de FilmArray (BCID2): Ampliació de microorganismes i mecanismes de resistència

L'any 2020 es va comercialitzar una nova versió de FilmArray, anomenada FA-BCID-2. Es tracta d'una versió millorada, amb 33 patògens i 10 gens de resistència, incorporant la detecció de BLEE (CTX-M), les principals carbapenemases a més de KPC (IMP, OXA-48 like, NDM i VIM) i la resistència a colistina associada al gen *mcr-1*. També inclou la detecció de *mecA/C* (la primera versió només detectava *mecA*) i MREJ (*mec* right-extremity junction), específic de SARM. Aquesta versió diferencia *E.faecalis* i *E.faecium* (de vital importància per a triar com ATB d'elecció Ampicil·lina o Vancomicina) (58), detecta *Stenotrophomonas maltophilia*, amplia la detecció d'*Acinetobacter baumannii* al complex *A.calcoaceticus/baumannii*, té una diana pròpia per a *Salmonella spp* i *K.aerogenes*, inclou un anaerobi (*Bacteroides fragilis*), *Cryptococcus neoformans/gattii* i microorganismes emergents com *Candida auris*.

La detecció de l'ordre *Enterobacterales* però sense definir el gènere, pot incloure (a diferència de la primera versió) *Hafnia*, *Morganella*, *Pantoea*, *Providencia*, *Rhanella*, *Serratia*, *Tatumella* i *Yersinia*. Per contra, no té una diana genèrica per a *Enterococcus spp* que si estava present a FA-BCID, però si per a *Streptococcus spp* o *Staphylococcus spp*.

Quan detecta *Staphylococcus spp* però no a nivell d'espècie, no informa sobre la detecció de *mecA/C* (la versió anterior informava de la presència de *mecA*), però si que ho fa quan es tracta de *S.epidermidis* i *S.lugdunensis*.

Cortazzo et al (59), han comparat les dues versions, sobre un banc de 90 mostres congelades amb la identificació per MALDI-TOF i la detecció de gens de resistència per seqüenciació. Tots els microorganismes inclosos en el panell van ser detectats i no es van trobar discrepàncies entre les dues versions pel que fa a la identificació. En canvi, es va trobar alguna discrepància respecte a la detecció de *mecA* en bacterièmies mixtes.

Berinson et al (60), en un estudi prospectiu a Alemanya sobre 180 mostres, comparades amb la identificació per MALDI-TOF i amb l'estudi de sensibilitat per Vitek2<sup>®</sup>, van trobar una concordança del 88.3% (en cultius monomicrobians, del 94%). Els resultats discordants van ser més freqüents en bacterièmies mixtes. En 4 ocasions no es va avançar la resistència a C3G perquè no es devia a *bla*<sub>CTX-M</sub>.

Així, conclouen que la natura multifactorial de la resistència a cefalosporines i carbapenems en BGN fa necessària la combinació amb estudis de sensibilitat fenotípics. També remarquen la importància de la discriminació entre *E.faecalis* i *E.faecium* de cara a poder acurtar el tractament empíric amb Vancomicina.



# OBJECTIUS

---

## OBJECTIUS

### JUSTIFICACIÓ DE L'ESTUDI

La sèpsia representa, segons l'OMS, *la indicació més vital de l'ús responsable d'antimicrobians eficaços per a la salut (...) perquè en absència d'aquests, el quadre és quasi sempre letal. El tractament ineficaç o incomplet pot contribuir a l'augment de l'amenaça que representa la resistència als antimicrobians.* A l'informe sobre la 70<sup>a</sup> Assemblea Mundial de la Salut, en maig de 2017, es remarca la necessitat d'adoptar un enfocament integrat de la sèpsia, centrat en la prevenció, *el reconeixement precoç mitjançant serveis clínics i de laboratori, i l'accés a l'atenció sanitària* (61).

El Servei de Microbiologia de l'HGUC disposa d'avançats recursos tecnològics que han suposat una revolució en la capacitat de realitzar un diagnòstic ràpid i exacte. Amb l'espectrometria de masses MALDI-TOF, la identificació preliminar dels microorganismes pot avançar-se 24 hores respecte al cultiu tradicional.

Tant la bacterièmia com la sèpsia són importants causes de mortalitat en pacients hospitalitzats. I els ingressos per aquesta causa estan augmentant degut a l'envelliment de la població i a les comorbiditats associades, així com al creixent nombre de persones amb immunosupressió (38). En pacients sèptics la instauració del tractament antibiòtic adequat (i, per tant, la identificació precoç del microorganisme) s'ha demostrat crucial en la supervivència. El creixement fins a nivells detectables en un hemocultiu pot tardar de 6 hores a 5 dies, als que cal afegir (degut a l'horari de gran part dels laboratoris) 24 hores per a la identificació del microorganisme i 24-48 hores més per a l'estudi de sensibilitat. Hi ha pocs laboratoris amb personal suficient i format per a realitzar complexes tècniques de PCR (4). Per això, els sistemes compactes i de fàcil maneig són una alternativa que cal considerar. FilmArray-Blood Culture Identification Panel (FA-BCID, BioMérieux-BioFire<sup>®</sup>) (62) és una PCR capaç de detectar un ampli rang de microorganismes i alguns determinants de resistència en 65 minuts (més 5 minuts de manipulació). Aquesta informació, junt a l'informe de sensibilitat anual dels bacteris més freqüentment aïllats a l'hospital, permet inferir el tractament idoni. No obstant, l'augment i la ràpida expansió de mecanismes de resistència com les betalactamases d'espectre estès (BLEE) o les carbapenemases comporta, cada vegada més, el fracàs terapèutic (63), raó per la qual cal estar alerta i destinar els recursos necessaris per facilitar que tots els pacients puguin beneficiar-se d'un diagnòstic microbiològic precoç i de qualitat.

## HIPÒTESI

Partim de la hipòtesi de què la identificació dels microorganismes i/o la detecció de certs mecanismes de resistència per mètodes moleculars possibilitaria ajustar precoçment l'antibioteràpia en els casos de bacterièmia a l'Hospital General Universitari de Castelló.

## OBJECTIU PRINCIPAL

Avaluar la disminució en el temps d'emissió de resultats aplicant, sobre els hemocultius de pacients ingressats a l'HGUC, un mètode en paral·lel de diagnòstic molecular, en concret FilmArray-BCID, tant per a la identificació com per a la detecció de possibles mecanismes de resistència.

## OBJECTIUS SECUNDARIS

-Valorar si es modifica el tractament antibiòtic després d'informar el resultat de la PCR.

-Estudiar la concordança de la PCR respecte al cultiu convencional.

-Descriure l'experiència de la PCR sobre hemocultiu *en curs* (que definim com aquell que es troba dins l'aparell d'incubació i en el que encara no s'ha detectat creixement).

-Analitzar si poden establir-se uns criteris per realitzar la PCR segons paràmetres com els valors de procalcitonina (PCT), proteïna C reactiva (pcr) i leucòcits.

# MATERIAL I MÈTODE

---

## MATERIAL I MÈTODE

### 1. DISSENY I POBLACIÓ A ESTUDI

Estudi quantitatiu, analític, longitudinal, prospectiu i observacional de les bacterièmies de pacients ingressats a l'Hospital General Universitari de Castelló des de l'1 de gener de 2019 a l'1 de març de 2020. Sobre els hemocultius processats, analitzem el resultat de la PCR realitzada comparant-lo amb el cultiu convencional (*gold standard*).

L'HGUC disposa de 529 llits i dona assistència sanitària pública al Departament de Salut de Castelló, que inclou 283.000 habitants. A la vegada és l'hospital de referència dels Departaments de Vinaròs i La Plana.

### 2. CRITERIS DE SELECCIÓ

S'inclouen els pacients amb hemocultius consecutius als qui se'ls realitza FilmArray-BCID (Biomérieux®) com a mètode de diagnòstic molecular, paral·lelament al cultiu convencional.

S'exclouen els casos en què la PCR s'invalida i aquells ingressats a l'Hospital de La Magdalena, per no poder accedir a la història clínica ni fer un seguiment estret de l'evolució.

Amb la irrupció de la pandèmia per SARS-CoV-2, la càrrega de treball als laboratoris de Microbiologia ha augmentat considerablement, impossibilitant la continuïtat de la recollida de dades, que inicialment estava previst fer durant dos anys. Finalment s'ha realitzat durant 14 mesos, incloent a 133 pacients.

Es recullen les dades a partir del programa de gestió del laboratori (Gestlab®) i de la història clínica electrònica (Orion Clinic®). Aquestes s'inclouen dins una base de dades anònima on consta la data de la sol·licitud de l'hemocultiu, el número de mostra, la edat i sexe del pacient, el servei, el focus de la infecció (genitourinari, abdominal, pulmonar, ORL, pell i parts toves, cardiocirculatori, etc), els valors de procalcitonina (PCT), proteïna C reactiva (pcr), leucòcits, percentatge de neutròfils, el resultat de la tinció de GRAM, el microorganisme aïllat en cultiu, el detectat per PCR, si aquesta es va realitzar sobre hemocultiu positiu o encara *en curs*, la data de validació del cultiu, PCR i GRAM, l'ATB empíric i/o el dirigit després de l'informe preliminar i l'evolució de l'episodi.

Per a l'anàlisi estadística de les dades s'ha utilitzat el programa R, versió 4.0.2.

### 3. ASPECTES ÈTICS I PROTECCIÓ DE DADES

L'estudi ha estat aprovat pel Comitè Ètic d'Investigació Clínica (CEIC) de l'HGUC, i ha obtingut la dispensa de la signatura del consentiment informat per part dels pacients.

S'han respectat els principis ètics internacionals (Declaració de Helsinki, Brasil, 2013) i la legislació nacional aplicable (*Ley 14/2007 de investigación biomédica*).

El tractament de la informació sobre els pacients s'ha fet d'acord amb la normativa vigent en matèria de dades de caràcter personal. En particular, amb el Reglament (UE) 2016/679 del Parlament Europeu i del Consell, de 27 d' abril de 2016, relatiu a la protecció de les persones físiques pel que fa al tractament de dades personals i a la lliure circulació d'aquestes i la Llei orgànica 3/2018, de 5 de desembre, de protecció de dades personals i garantia dels drets digitals.

A partir de les dades consultades al Sistema d'Informació del Laboratori (SIL) s'ha creat un fitxer Excel anonimitzat incloent els pacients amb hemocultius sobre els que s'ha realitzat PCR. Aquest fitxer ha estat inclòs dins un document de seguretat que s'ha mantingut en les condicions que garanteixen la seua confidencialitat.

#### 4. DIAGNÒSTIC DE LA BACTERIÈMIA AMB ESPECTROMETRIA DE MASSES A L'HGUC

Al Servei de Microbiologia de l'HGUC es disposa del sistema d'incubació i monitorització contínua d'hemocultius BacT/Alert® Virtuo™ (BioMérieux®). S'utilitzen els frascos *BacT/Alert FA Plus aerobic*®, *BacT/Alert FN Plus anaerobic*® i *BacT/Alert FP Plus pediatric*® que contenen perles polimèriques per neutralitzar restes d'ATB, i SPS (polianetolsulfonat de sodi) com a anticoagulant. Aquests frascos s'introdueixen en Virtuo™ a primera hora del matí, on es mantindran 5 dies a 37°C fins a ser informats com a *negatius*. Si l'aparell detecta creixement, es realitza una tinció de GRAM.

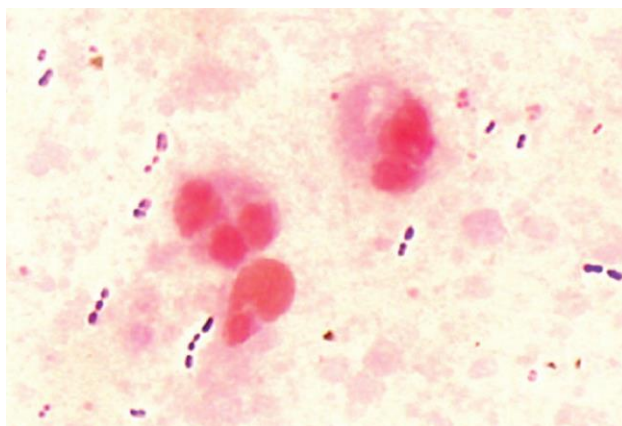


Figura 26. Tinció de GRAM d'un hemocultiu amb *S.pneumoniae*. Pres de Werno CID 2008

El primer hemocultiu positiu per pacient, si es considera *significatiu*, s'informa amb caràcter urgent al metge o metgessa responsable o a l'equip PROA, encarregat del seguiment de les bacterièmies de l'hospital, que inicia o ajusta el tractament ATB en cas necessari. A partir dels frascos positius, es realitza un subcultiu en agar *Chocolate PolyviteX* (BioMérieux®) que s'incuba a 35-37°C i, segons la morfologia observada a la tinció de GRAM, un altre en agar sang SCS incubat en anaerobiosi o bé en *BD CHROMagar Orientation* (BD®) que és un medi no selectiu i cromogènic que facilita la detecció de bacterièmies mixtes. En el cas d'observar-se formes compatibles amb llevats, es ressembla en *Chromagar Candida* (BioMérieux®). La lectura d'aquestes plaques es realitza a les 18-24 hores d'incubació.

Des de la incorporació de la Espectrometria de Masses (MALDI-TOF Vitek MS®) a l'HGUC en juny de 2016, la identificació del microorganisme es pot avançar analitzant un subcultiu de la sang en agar *Chocolate PolyviteX* (BioMérieux®) incubat al 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durant 4 hores (64).

S'analitzen dos replicats per mostra. La identificació per MALDI-TOF es considera vàlida si almenys un replicat obté un nivell de confiança del 75% o major, sense entrar en conflicte amb els altres replicats (28). A partir d'un inòcul estandaritzat al 0,5 McFarland del mateix subcultiu, i sempre que no es tracte d'una bacterièmia mixta, es realitza l'estudi de sensibilitat amb el sistema de microdilució amb monitorització contínua Vitek2® (BioMérieux®) que es validarà 18-24 hores més tard (encara que hi ha resultats que poden anar apareixent a les 4-6 hores), i que s'interpreta en base als criteris EUCAST. Si l'antibiograma requereix alguna comprovació, es poden emprar mètodes alternatius, com tires de gradient (E-test) o mètodes de disc-difusió. La confirmació fenotípica de mecanismes de resistència (BLEE, AmpC, Carbapenemases, SARM) es realitza mitjançant discos d'antibiòtics combinats amb inhibidor (ROSCO Diagnostica®), amb la detecció immunocromatogràfica NG-Test CTX-M de RAL®, el mètode colorimètric Carba-test (Bio-Rad®) o amb la detecció molecular de les principals carbapenemases (KPC, NDM, VIM, IMP-1, OXA-48) per Xpert® Carba-R (Cepheid®) entre d'altres.

En el cas d'aïllaments *no significatius*, definits com aquells en què s'aïlla SCN o algun altre microorganisme considerat contaminant en un sol frasc, es revisa al sistema d'informació del laboratori (SIL) si existeix algun altre tipus de mostra on s'aïlle el mateix microorganisme o si es sospita bacterièmia relacionada amb el catèter (BRC). En cas contrari, s'afegeix un comentari al resultat on consta que probablement es tracte d'una contaminació d'origen cutani.



## 5.ADAPTACIÓ A LA LIMITACIÓ HORÀRIA. PCR MULTIPLEX SOBRE HEMOCULTIU

Al Servei de Microbiologia de l'HGUC existia, al moment de començar la present tesi, una important limitació a aquesta rutina: la jornada de treball era només de 8:00 a 15:00 hores, de dilluns a dissabte. Açò suposava que els frascos d'hemocultiu no sempre s'introduïen immediatament dins Virtuo™, sinó que podien estar fins a 41 hores a temperatura ambient (sense incubar) si s'extreien un dissabte a les 15:00 hores. A banda, en el cas d'obtenir una prova no concloent per MALDI-TOF MS tampoc es podia emetre un resultat i s'havia d'esperar a treballar sobre les ressembres al següent dia laborable.

Davant quadres d'extrema gravetat com la sèpsia, que requereixen una resposta ràpida, i donat que s'havia demanat en diverses ocasions a les diferents gerències de l'hospital dotar al Servei de Microbiologia d'Atenció Continuada sense èxit, només ens restava modificar el protocol de treball dels hemocultius, que tractaríem d'accelerar aplicant tècniques moleculars sobre el cultiu tradicional.

Donada eixa gran limitació horària, i perquè pensàvem que era una tècnica cost-effective, es decideix implantar des de Novembre de 2016 la PCR FilmArray-BCID (BioMérieux-BioFire®), que detecta simultàniament àcids nucleics de 24 patògens (19 bacteris i 5 llevats) i 3 determinants de resistència (*mecA*, *vanA/vanB*, *blaKPC*), amb una manipulació mínima de la mostra (200ul) i obtenint el resultat en 65 minuts.

Entre les seues dianes es troben:

- ❖ *Enterococcus spp*
- ❖ *Listeria monocytogenes*
- ❖ *Staphylococcus spp* (amb una diana específica per a *S.aureus*)
- ❖ *Streptococcus spp* (*S.agalactiae*, *S.pneumoniae*, *S.pyogenes*)
- ❖ Família *Enterobacteriaceae* (*E.cloacae* complex, *E.coli*, *K.oxytoca*, *K.pneumoniae*, *Proteus spp*, *Serratia spp*)
- ❖ *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, *H.influenzae*, *N.meningitidis* (capsulades)
- ❖ *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*

Encara que sense una diana específica, i segons fitxa tècnica, com a *Streptococcus spp* és capaç de detectar *S. anginosus*, *S. bovis*, *S. constellatus*, *S. dysgalactiae*, *S. equinis*, *S. gallolyticus*, *S. gordonii*, *S. intermedius*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. pseudopneumoniae*, *S. salivarius* i *S. sanguinis*.

El llindar per a la detecció de microorganismes que es podrien considerar contaminants (com alguns SCN) és més elevat, fins a  $10^7$ - $10^8$ , per tal d'evitar falsos positius.

Detected (Detectado)	Detectado con sensibilidad reducida	Not Detected (No detectado)
<i>S. aureus</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. auricularis</i>
<i>S. caprae</i>	<i>S. pasteurii</i>	<i>S. carnosus</i>
<i>S. cohnii</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. lentus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. pettenkoferi</i>
<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
<i>S. hominis</i>		<i>S. schleiferi</i>
<i>S. lugdunensis</i>		<i>S. sciuri</i>
<i>S. xylosum</i>		

5x10<sup>6</sup> UFC/mL      10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> UFC/mL

Figura 27. Capacitat de detecció de *Staphylococcus spp* per FilmArray-BCID. Adaptació de l'insert.

FA-BCID és un sistema de diagnòstic molecular tancat que combina l'extracció d'àcids nucleics a partir de la sang, una PCR *multiplex* niuada i l'anàlisi de les corbes de fusió o *melting*.

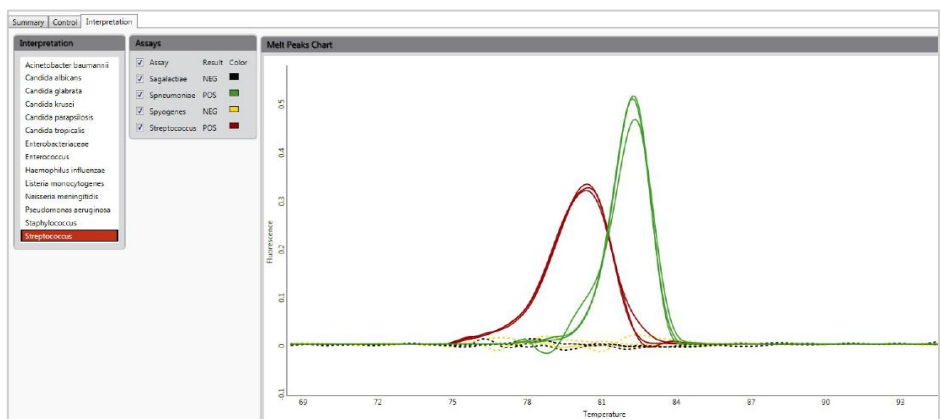


Figura 28. Corbes *melting*. Elaboració pròpia

La PCR consta de les següents fases:

-Purificació de l'àcid nucleic (AN): Després d'un procés de lisi per agitació, l'AN alliberat es captura, renta i elueix mitjançant partícules magnètiques.

-Primera etapa de la PCR: Enriquiment dels AN diana presents a la mostra. La solució d'AN es combina amb la *master mix* preescalfada per iniciar la PCR múltiple.

-Segona etapa de la PCR: Els productes de la primera PCR es dilueixen i mesclen amb reactius de PCR nous que contenen un colorant de fixació al DNA bicatenari. Aquesta solució es distribueix per la matriu. Els pouets individuals de la matriu contenen cebadors, per triplicat, dirigits a les seqüències d'AN específiques de cada patògen. Els cebadors estan internalitzats dins els productes de la primera etapa, per a augmentar la sensibilitat i la especificitat.

-Anàlisi de fusió de l'ADN: La fluorescència de cada pouet s'analitza i es genera una corba de fusió o *melting*. La temperatura de fusió ( $T_m$ ) és consistent i previsible per a cada producte de la PCR.

-Anàlisi de rèpliques: Un assaig és positiu si almenys dos de les tres corbes de fusió ho són.

Cada assaig inclou dos controls interns (CI): un que detecta el DNA d'un llevat liofilitzat (*Schizosaccharomyces pombe*) que passa per tot el procés, i un altre CI que és un DNA diana, que avalua la 2<sup>a</sup> PCR o fase de detecció de l'analit. Han de ser els dos positius per considerar l'assaig com a vàlid.

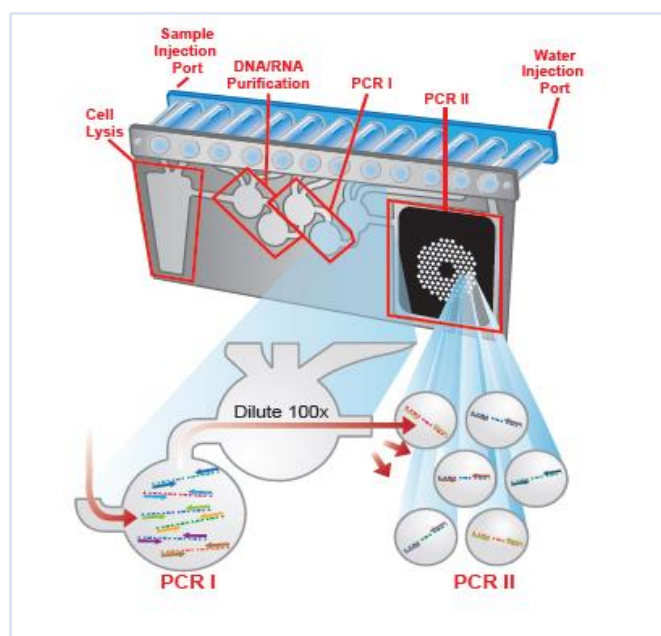


Figura 29. Esquema dels passos en la PCR FilmArray. Extret de fitxa tècnica

## 6.LIMITACIONS DE FILMARRAY-BCID

- En bacterièmies mixtes podria no identificar tots els microorganismes.
- L'anàlisi s'ha de fer menys de 24 hores després de la positivitat del frasc, la qual cosa perjudica els laboratoris sense atenció continuada.
- Només s'ha avaluat per a hemocultius positius amb microorganismes en el GRAM.
- De la família *Enterobacteriaceae* no detecta *Morganella spp*, *Providencia spp*, *Yersinia spp* ni algunes *spp* de *Serratia* (*S.liquefaciens* i *S.plymuthica*)
- Possible reactivitat creuada entre *Enterococcus* amb concentracions elevades de *Staphylococcus coagulasa-negatiu* i entre *E.coli* amb *Shigella spp*.
- No detecta anaerobis, fet que s'ha de tenir en compte per a no retirar el tractament anaerobicida en casos d'IIA.
- No diferencia *E.faecalis* i *E.faecium* i, per tant, no és possible desescalar a un ATB de menor espectre.

## 7.APLICACIÓ DE FILMARRAY-BCID FORA DE FITXA TÈCNICA

De manera experimental (i reflexant-ho com a tal a l'informe de resultats) en certs casos seleccionats, i a petició del facultatiu responsable, de pacients amb elevada sospita clínica de bacterièmia i un ràpid deteriorament, realitzem la PCR sobre hemocultiu *en curs* (aquell en què encara no s'ha detectat creixement) basant-nos en l'estudi d'Almuhayawi *et al* realitzat a l'Hospital Universitari Karolinska, a Suècia (65). En aquest estudi es fa una aproximació basada en el concepte del *semi-cultiu*, definit com la identificació en frascos *BacT/Alert Plus*<sup>®</sup> abans que es positivitzen. Realitzen a les 2,5h, 5h i 7,5h i després de la positivitat del frasc, la PCR per FA-BCID en tres escenaris diferents:

- 1) *In vitro*: assaig controlat amb la inoculació dins els frascos de 100 µL d'una suspensió d'*E.coli* i *S.aureus* contenint 1000 UFC. S'obté una identificació per FA-BCID del 100% (9/10 mostres a les 5h d'incubació i l'altra a les 7,5h). Estudien també l'efecte de deixar els frascos 2,5h a temperatura ambient abans d'incubar-los. En aquest cas es van identificar microorganismes a les 2,5h d'incubació (en lloc de les 5h) el 60% de les mostres. També apliquen FA-BCID sense incubar els frascos prèviament.

- 2) *Ex vivo* sobre mostres clíniques analitzades durant la incubació: Es van identificar 14/15 hemocultius (93%) per FA-BCID abans de la positivització.
- 3) *Ex vivo* sobre mostres clíniques analitzades abans de la incubació processant, si s'arribava a positivitzar l'hemocultiu, una alíquota congelada a  $-70^{\circ}$  directament o a partir del *pellet* si la primera PCR era negativa. De les 400 mostres processades, en 16 l'hemocultiu va ser positiu. D'aquestes, 8 (50%) van ser correctament identificades per FA-BCID (5 d'elles directament i 3 a partir del *pellet*).

Els avantatges d'aquest mètode de *semi-cultiu* respecte als de detecció en sang directa (com LightCycler SeptiFast<sup>®</sup> o Magicplex<sup>®</sup>) són el temps d'execució (la mediana en el cultiu convencional va ser d'11 hores, rang de 9,1 a 25h), la simplicitat de la tècnica i la posterior obtenció de l'antibiograma perquè el frasc continua la incubació fins que es positivitza.

En el nostre cas partim d'una preincubació del frasc en Virtuo<sup>™</sup> d'almenys 4 hores, afegides al temps (variable i no comptabilitzat) en què la mostra ha estat a temperatura ambient des de l'extracció fins que s'obri el laboratori (que pot arribar a ser de fins a 17 hores en dies laborables o fins a 41 hores en cap de setmana). Segons instruccions del fabricant, prenem 200 $\mu$ L de sang de l'hemocultiu per a realitzar la PCR i el tornem a introduir a Virtuo<sup>™</sup> immediatament perquè l'hemocultiu continue el seu protocol d'incubació (Annex 2).

Existeixen algunes tècniques específiques, que hem descrit abans, per a realitzar el diagnòstic per PCR directament sobre sang, entre les que no es troba FilmArray-BCID. Però la nostra hipòtesi és que donat que en un episodi de sèpsia el nombre de microorganismes circulants és molt baix (de 1 a  $10^4$  UFC/ml) la rendibilitat diagnòstica podria augmentar afegint aquest mètode, malgrat que el límit de detecció amb FilmArray-BCID no ha estat ben establert (segons la fitxa tècnica, la concentració bacteriana en el moment de positivització del frasc i de detecció per FA-BCID es trobaria entre  $6.12 \times 10^7$  i  $9.50 \times 10^8$  UFC/mL) (66).

Si la PCR detecta DNA d'algun microorganisme s'informa immediatament, bé personalment o via telefònica, al metge o metgessa responsable, a qui se li pregunta per l'ATB empíric administrat i, si procedeix, se li proposa una alternativa més adient.

## RESULTATS

---

## RESULTATS

### 1. ANÀLISI DESCRIPTIVA

En primer lloc, es realitza un estudi descriptiu de les variables observades.

Es descriu el perfil demogràfic dels pacients (edat i sexe) i el servei al que pertanyen, agrupant Pneumologia, Digestiu, Neurologia i Infeccioses com a Medicina Interna i Cirurgia, Traumatologia, Anestesia i Urologia com a Especialitats Quirúrgiques. Els pacients pediàtrics inclouen els ingressats a la planta, a neonatologia i a la UCI pediàtrica. Seguidament es descriuen el diagnòstic (o probable focus de la infecció), diferents paràmetres analítics (les xifres de procalcitonina, proteïna C reactiva, leucòcits i el percentatge de polimorfonuclears) i l'evolució (favorable o exitus). També es defineix el temps de demora de la PCR, la tinció de GRAM i l'hemocultiu respecte a l'inici de la incubació.

Les variables *categòriques* (sexe, servei, diagnòstic i evolució) es descriuen mitjançant freqüències i percentatges, i les variables *quantitatives* (edat, paràmetres analítics i temps de demora) es resumeixen amb la mitjana, mediana, primer i tercer quartil, i desviació típica (DT).

Es disposa de les dades de 133 pacients, 57.1% homes i 42.9% dones, amb una mitjana d'edat de 40.7 anys.

El diagnòstic més freqüent, amb gairebé el 40% dels casos, va ser la pneumònia, seguida de la infecció intraabdominal i de la FOD amb un 9.8% cadascuna. En tercer lloc destacava la sèpsia neonatal o la prematuritat, amb el 7.5%, seguida de la IPPT i de la infecció osteoarticular, amb el 6.8% dels casos.

Per serveis, la major part dels pacients eren de Pediatria (36.1%), als qui seguien els procedents de Medicina Interna (23.3%) i Urgències (22.6%). L'11.6% eren malalts ingressats a la UCI.

Pel que fa a les variables clíniques, en el 83.5% dels pacients en què es disposava del valor de PCT, la mediana va ser de 3 amb un rang interquartílic (IQR) d'11,1.

La pcr estava disponible en tots els pacients, amb una mediana de 137 (IQR 296).

Pel que fa a la xifra de leucòcits, la mediana va ser 12700 (IQR 10.900), i respecte al percentatge de polimorfonuclears, de 82 (IQR 22).

L'evolució va ser favorable en el 89.5% dels pacients, mentre que el 10.5% van morir.

Taula 1. Resum descriptiu del perfil demogràfic i clínic dels pacients.

Variable		n = 133
		Mitjana (DT) / n (%)
		Mediana (1r, 3r Q.)
<b>Sexe</b>		
	Masculí	76 (57.1%)
	Femení	57 (42.9%)
<b>Edat</b>		
		40.7 (33.3)
		47 (3, 71)
<b>Diagnòstic</b>		
	Pneumònia	53 (39.8%)
	IIA	13 (9.8%)
	FOD	13 (9.8%)
	Prematuritat/ sèpsia neonatal	10 (7.5%)
	IPPT	9 (6.8%)
	Infecció osteoarticular	9 (6.8%)
	Infecció urinària	8 (6%)
	Infecció ORL	6 (4.5%)
	Febre en immunodeprimit	5 (3.8%)
	Endocarditis	4 (3%)
	Altres	3 (2.3%)
<b>Servei</b>		
	Pediatría	48 (36.1%)
	Medicina interna	31 (23.3%)
	Urgències	30 (22.6%)
	UCI	15 (11.3%)
	Quirúrgiques	6 (4.5%)
	Hematologia	3 (2.3%)



Variable	n = 133
Procalcitonina	12.5 (31)
	3 (0.275, 11.4)
Valors buits	22 (16.5%)
Proteïna C reactiva	181 (159)
	137 (39, 335)
Leucòcits	13820 (8193)
	12700 (7600, 18500)
% polimorfonuclears	77.5 (16)
	82 (68, 90)
Evolució	
Favorable	119 (89.5%)
Exitus	14 (10.5%)

Com que el grup més nombrós va ser el de pacients pediàtrics, es desglossen per edat en la taula següent.

Taula 2. Grups d'edat dels pacients pediàtrics.

Variable	n = 48
	Mitjana (DT) / n (%)
Sexe	
Masculí	28 (58.3%)
Femení	20 (41.7%)
Edat	
0-28 dies	10 (20.8%)
29 dies a 2 anys	16 (33.3%)
2-5 anys	11 (22.9%)
6-14 anys	11 (22.9%)

Des del moment de la introducció de l'hemocultiu dins l'aparell de monitorització continua, es calcula el temps de demora de la PCR, que va ser 35 hores i 45 minuts de mitjana (DT 23:18 hores).

El GRAM es va fer en el 45.9% dels hemocultius (cal tindre en compte que part del treball inclou PCR sobre hemocultius no positivitzats. La demora va ser de quasi 33 hores (DT 16:04).

I la demora fins el resultat definitiu de l'hemocultiu va ser de 122 hores (DT 43:48)

Taula 3. Demora de la PCR, el GRAM i l'hemocultiu respecte a l'inici de la incubació.

	Mitjana (DT) / n (%)
	Mediana (1r, 3r Q.)
Temps d'emissió de resultats PCR (HH:MM)	35:45 (23:18) 35:39 (16:52, 37:52)
Temps d'emissió de resultats GRAM (HH:MM)	32:55 (16:04) 32:00 (20:00, 34:50)
Valors buits	72 (54.1%)
Temps d'emissió de resultats hemocultiu (HH:MM)	122:02 (43:48) 151:33 (81:29, 152:52)

Es van trobar 4 bacterièmies mixtes, que suposen el 6.1%.

A continuació es recullen els ATB utilitzats empíricament (Taula 4), i el percentatge de pacients tractats amb cadascun d'ells. Els més freqüentment emprats van ser Amoxicil·lina/clavulànic en el 12%, Piperacilina/tazobactam en el 10.5% i les cefalosporines de 3<sup>a</sup> generació en el 9.8%.

Taula 4. Antibiòtics utilitzats empíricament.

ATB empíric	Pacients tractats	
	n	%
Amoxicil·lina/clavulànic	16	12
Piperacilina/tazobactam	14	10.5
<sup>1</sup> C3G	13	9.8
-	10	7.5
Levofloxacino	9	6.8
C3G+ Levofloxacino	8	6
Carbapenem	6	4.5
C3G+ Claritromicina	4	3
Ampicil·lina	3	2.3
C3G + Cloxacilina	3	2.3
C3G + Ampicil·lina	2	1.5
Carbapenem + Linezolid	2	1.5
C3G + Vancomicina	2	1.5
Ciprofloxacino + Metronidazol	2	1.5
Levofloxacino + Piperacilina/tazobactam	2	1.5
Linezolid+ Piperacilina/tazobactam	2	1.5
Vancomicina	2	1.5
Altres	33	24.8

-: Cap ATB administrat

<sup>1</sup>Cefalosporines 3<sup>a</sup> generació (C3G): Cefotaxima, Ceftriaxona, Ceftazidima o Cefditoren

Seguidament s'analitza la modificació de l'antibioteràpia després de conèixer el resultat de la PCR (Taula 5). El tractament inicial es va ajustar en 29 dels 133 pacients (21.8%). Amb aquesta intervenció, només dos pacients van evolucionar desfavorablement. En el cas d'un pacient amb IIA que va presentar candidèmia per *C.albicans*, però sense microorganismes visibles al GRAM, la PCR va permetre afegir fluconazol al tractament inicial, avançant en 5 dies el diagnòstic respecte a l'hemocultiu tradicional i afavorint la resol.lució del quadre.

Taula 5. Casos en què el tractament antibiòtic ha estat ajustat.

ATB empíric	ATB ajustat	Resultat PCR
<sup>1</sup> C3G + vancomicina	C3G + oseltamivir	-
cloxacil·lina	cefuroxima	
ertapenem + daptomicina + tigeciclina	ertapenem + daptomicina + fluconazol + tigeciclina	<i>Candida albicans</i>
C3G + metronidazol	imipenem + caspofungina + metronidazol	Enterobacteriaceae <i>Enterococcus spp</i> <i>Staphylococcus spp</i>
piperacilina/tazobactam	ampicil·lina	<i>Enterococcus spp</i>
piperacilina/tazobactam	ciprofloxacino	
piperacilina/tazobactam	C3G	<i>Haemophilus influenzae</i>
ceftazidima + vancomicina	C3G	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
ampicil·lina + C3G + vancomicina	C3G	<i>Neisseria meningitidis</i>
levofloxacino	C3G	
meropenem	cloxacil·lina	<i>Staphylococcus aureus</i>
amoxicil·lina/clavulànic	levofloxacino	<i>Streptococcus agalactiae</i>
-	amoxicil·lina/clavulànic	
-	levofloxacino	
C3G + claritromicina	C3G + levofloxacino	
C3G + levofloxacino	C3G	
C3G + levofloxacino	amoxicil·lina/clavulànic	
C3G + levofloxacino	C3G	
ciprofloxacino + metronidazol	meropenem + linezolid	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
cotrimoxazol + ganciclovir + linezolid + piperacilina/tazobactam	cotrimoxazol + ganciclovir C3G + claritromicina +	
levofloxacino	C3G + claritromicina	
levofloxacino + piperacilina/tazobactam	C3G	
linezolid + piperacilina/tazobactam	meropenem + cotrimoxazol + linezolid	
vancomicina	levofloxacino	
C3G + cloxacil·lina	C3G + clindamicina	
cloxacil·lina + gentamicina	ampicil·lina + clindamicina	<i>Streptococcus pyogenes</i>
levofloxacino	amoxicil·lina/clavulànic	
piperacilina/tazobactam	C3G + clindamicina	
aciclovir	amoxicil·lina/clavulànic	<i>Streptococcus spp</i>

-: Cap ATB administrat

<sup>1</sup>Cefalosporines 3<sup>a</sup> generació (C3G): Cefotaxima, Ceftriaxona o Cefditoren

## 2. DEMORA EN L'EMISSIÓ DE RESULTATS

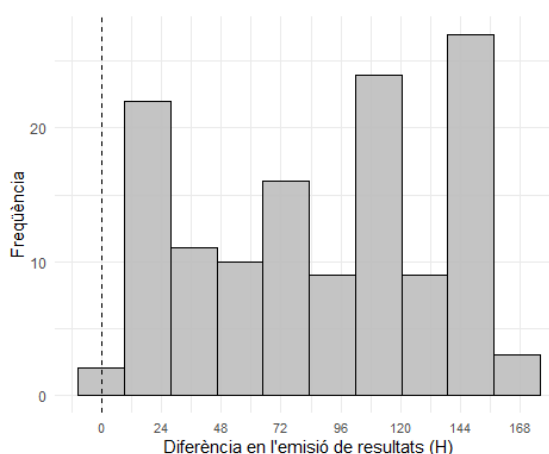
### 2.1. Globalment, entre PCR i hemocultiu convencional

A continuació es compara la demora en l'emissió de resultats entre la PCR i l'hemocultiu convencional. Per això es realitza un contrast d'hipòtesi, definint la *hipòtesi nul·la* com l'absència en la reducció de temps aplicant mètodes moleculars, i la *hipòtesi alternativa* com l'existència d'una reducció de temps si s'aplica la PCR. Es realitza el test de Wilcoxon per a mostres aparellades, el qual contrasta si la diferència mediana del temps d'emissió de resultats entre la PCR i l'hemocultiu és nul·la. El resultat del test indica que hi ha evidència estadística suficient per a rebutjar que no hi ha diferències en els temps d'emissió de resultats entre ambdues proves, amb una mediana estimada de 88:01 hores menys de demora, és a dir, 3 dies i mig menys, en l'emissió de resultats amb la PCR respecte a l'hemocultiu tradicional.

Taula 6. Resum del test de Wilcoxon per a mostres aparellades per a contrastar la igualtat entre els temps d'emissió de resultats amb la PCR i l'hemocultiu tradicional.

Estadístic (V)	Mediana	I.C. 95%	p-valor
8778	88:01	[79:31 - 92:58]	<0.001**

El següent gràfic mostra un histograma de la diferència entre el temps d'emissió de resultats amb l'hemocultiu tradicional i la PCR.



Gràfic 1. Histograma sobre l'emissió de resultats de l'hemocultiu tradicional i PCR.

Com que s'analitzen les dades en conjunt, la barra més alta es refereix als hemocultius negatius en què s'ha fet la PCR en curs a les poques hores d'incubació.

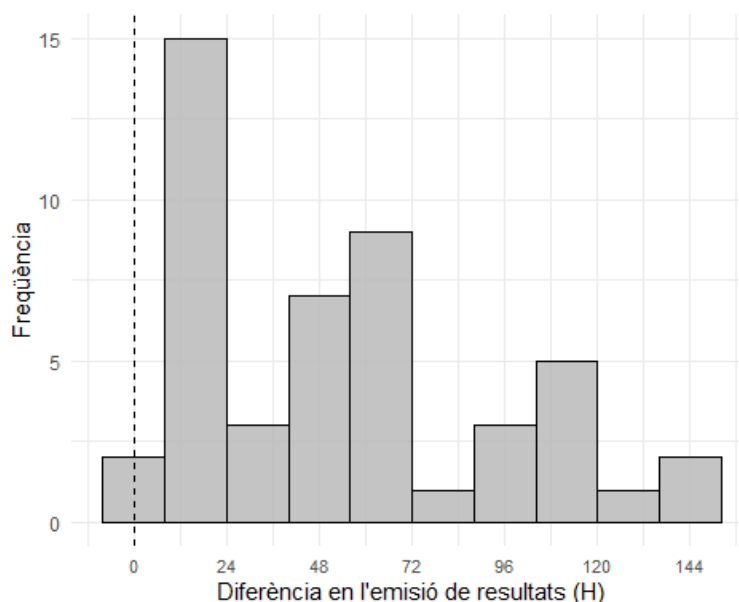
### 2.1.1. En casos concordants

En aquest subapartat s'analitza la demora en l'emissió del resultat de l'hemocultiu convencional respecte a la PCR sobre hemocultiu positiu, quan els resultats són concordants.

Taula 7. Resum del test de Wilcoxon per a mostres aparellades per a contrastar la igualtat entre els temps d'emissió de resultats amb la PCR sobre hemocultiu positiu i l'hemocultiu tradicional en els resultats concordants.

Estadístic (V)	Mediana	I.C. 95%	p-valor
1128	55:26	[43:14 - 68:19]	<0.001**

A continuació es representa un histograma de la diferència entre aquests temps, on observem que la majoria difereixen en 24 hores, que aplicant MALDI-TOF per a la identificació, seria el temps fins la validació de l'antibiograma.



Gràfic 2. Histograma de la diferència en hores d'emissió de resultats entre l'hemocultiu tradicional i la PCR entre els resultats concordants en PCR sobre hemocultiu positiu.

## 2.1.2. En pacients pediàtrics

### 2.1.2.1. PCR en hemocultiu positiu pediàtric

De 14 PCR realitzades sobre hemocultiu positiu, 6 casos es van considerar com a bacterièmies significatives (Taula 8), permetent avançar el resultat respecte a l'hemocultiu convencional en quasi 2 dies (la mediana en la diferència de temps entre PCR i hemocultiu va ser de 46 hores i 40 minuts).

Taula 8. Diferència, en pacients pediàtrics, en el temps d'emissió de resultats de la PCR sobre hemocultiu positiu respecte a l'hemocultiu, quan aquest es considera significatiu.

Patogen	Data PCR	Data hemocultiu	Demora (hh:mm)
<i>S.pyogenes</i>	2019-04-09 14:37	2019-04-10 08:11	17:33
<i>H.influenzae</i>	2019-05-18 12:24	2019-05-20 11:55	47:30
<i>S.pneumoniae</i>	2019-06-18 11:12	2019-06-20 10:12	47:00
<i>S.aureus</i>	2019-07-09 10:58	2019-07-10 09:02	22:03
<i>S.pyogenes</i>	2019-11-08 18:12	2019-11-11 08:24	62:12
<i>S.pneumoniae</i>	2019-12-07 10:39	2019-12-09 09:00	46:21

### 2.1.2.2. PCR en hemocultiu en curs pediàtric

De 34 PCR sobre hemocultiu en curs, 3 casos es consideren com a bacterièmies significatives (Taula 9). Açò va permetre avançar en més de 3 dies la identificació del microorganisme i, per tant, ajustar l'antibioteràpia (la mitjana del temps en la diferència entre PCR i hemocultiu va ser de 73 hores i 23 minuts).

Taula 9. Diferència, en pacients pediàtrics, en el temps d'emissió de resultats de la PCR sobre hemocultiu en curs respecte a l'hemocultiu, quan aquest es considera significatiu.

Patogen	Data PCR	Data hemocultiu	Demora (hh:mm)
<i>S.pyogenes</i>	2019-03-27 15:11	2019-04-02 07:33	136:22
<i>K.oxytoca</i>	2019-07-09 13:41	2019-07-11 09:27	43:45
<i>K.pneumoniae</i>	2019-08-19 13:35	2019-08-21 08:39	43:04

## 2.2 Entre GRAM i validació de PCR

A continuació es descriuen els temps d'emissió de resultats en la validació del GRAM i de la PCR (Taula 10). Es desglossa entre hemocultius positius (validació PCR-GRAM) i hemocultius *en curs* (validació GRAM-PCR). En aquest últim cas, la tinció de GRAM s'informa més de 31 hores més tard que la PCR, en sis pacients en què els hemocultius es van positivitzar després de la PCR.

Taula 10: Mediana, primer i tercer quartil de la distribució de les diferències entre PCR i GRAM (HH:MM).

Hemocultiu	n	Mediana	Q1	Q3
Positiu	56	3:30	1:59	5:44
<i>En curs</i>	6	31:11	20:06	42:19



### 3. MODIFICACIÓ DEL TRACTAMENT SEGONS EL RESULTAT DE LA PCR

Taula 11. Casos en què s'ha modificat el tractament segons el microorganisme detectat

Resultat de la PCR	ATB no modificat		ATB modificat	
	n	%	n	%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	14	53.8%	12	46.2%
<i>Streptococcus spp</i>	8	88.9%	1	11.1%
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	33.3%	4	66.7%
<i>Enterococcus spp</i>	1	33.3%	2	66.7%
<i>Neisseria meningitidis</i>	1	33.3%	2	66.7%
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	66.7%	1	33.3%
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	50%	1	50%
<i>Candida albicans</i>	0	0%	1	100%
<i>Enterobacteriaceae / Enterococcus spp / Staphylococcus spp</i>	0	0%	1	100%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0%	1	100%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	0%	1	100%
<i>Enterobacteriaceae</i>	1	100%	0	0%
<i>Haemophilus influenzae / Streptococcus pneumoniae</i>	1	100%	0	0%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	100%	0	0%
<i>Proteus spp / Streptococcus pneumoniae</i>	1	100%	0	0%
<i>Staphylococcus spp</i>	1	100%	0	0%
<i>Streptococcus pneumoniae / Staphylococcus spp</i>	1	100%	0	0%
<i>Streptococcus spp / Staphylococcus spp</i>	1	100%	0	0%
Negatiu	68	97.1%	2	2.9%

Cal destacar que es va detectar *S.pyogenes* en 6 ocasions, una d'elles sobre hemocultiu en curs. Es va ajustar el tractament en 4 casos, afegint clindamicina a C3G i retirant cloxacil·lina en un cas de fascitis necrotitzant i modificant cloxacil·lina+gentamicina a ampicil·lina+clindamicina en un altre d'artritis sèptica.

També es van trobar 3 bacterièmies per *N.meningitidis*, una d'elles realitzant la PCR sobre hemocultiu en curs. En dos casos es va ajustar el tractament: un modificant Piperacilina/tazobactam per C3G i en l'altre (també es detectava *N.meningitidis* al LCR) suspenent Vancomicina i Ampicil·lina per deixar C3G.

En aquells casos en què la PCR resulta negativa, majoritàriament no es modifica la conducta respecte al tractament. Només en el 2,9% en dos pacients pediàtrics (una artritis que s'havia iniciat amb cloxacil·lina i es modifica a cefuroxima i una infecció respiratòria en què es detecta Influenzavirus A i s'afegeix oseltamivir a C3G).

#### 4. CONCORDANÇA DE LA PCR I L'HEMOCULTIU TRADICIONAL

S'estudia la concordança del resultat de la PCR amb el de l'hemocultiu tradicional mitjançant freqüències i percentatges, comparant la PCR realitzada tant sobre hemocultiu positiu com sobre hemocultiu *en curs*. Si el microorganisme identificat per PCR i per cultiu és el mateix a nivell de gènere o espècie, es definirà el resultat com a *concordant*. Si el resultat és *no concordant* (Taula 12) podem trobar o bé que s'aïlla un microorganisme diferent, que no es recupera cap microorganisme a partir de cultiu (generalment aquest cas ocorre amb *S.pneumoniae*, per la seua tendència a la lisi (67)(68)) o perquè el microorganisme que creix al cultiu no es troba entre les dianes de la PCR.

##### 4.1. PCR sobre hemocultiu positiu

Dels resultats de les 65 PCRs sobre hemocultiu positiu 48 d'aquests, un 73,8% (IC(95%)=[61.5%, 84%]), coincideixen (parcial o totalment) amb els resultats de l'hemocultiu tradicional. Com que 5 microorganismes no estaven entre les dianes de la PCR i hi ha 3 aïllaments que no es van considerar significatius, la coincidència real es va donar en 45 casos (sobre 57 significatius en total), el que suposa una concordança del 79% (IC(95%)=[66.1%, 88.6%]).

Taula 12. Resultats no concordants entre PCR sobre hemocultiu positiu i hemocultiu tradicional.

Resultat PCR	Hemocultiu tradicional	Nº Proves	Proporció
<i>S.pneumoniae</i>	-	10	58.8%
-	<i>Corynebacterium mucifaciens</i> (No diana)	1	5.9%
-	<i>Eggertella lenta</i> (No diana)	1	5.9%
-	<i>Kocuria kristinae</i> (No diana)	1	5.9%
-	<i>Micrococcus luteus</i> (No diana)	1	5.9%
-	<i>Parvimonas micra</i> (No diana)	1	5.9%
-	<i>Staphylococcus spp</i>	1	5.9%
-	<i>Streptococcus spp</i>	1	5.9 %

-No es detecta cap microorganisme

En dos xiquets amb pneumònia es van aïllar *Kocuria kristinae* i *Micrococcus luteus* que es van considerar contaminants.

El pacient amb *Corynebacterium mucifaciens* presentava una ITUc per *Corynebacterium urealyticum*, i l'evolució va ser favorable amb Vancomicina. No es va poder analitzar la discrepància.

En el cas de *Staphylococcus spp*, es va considerar contaminant. El pacient va ser diagnosticat de grip.

La pacient amb *Streptococcus spp* tampoc es va considerar, perquè es va aïllar a un sol frasc de quatre.

Pel que fa a *S.pneumoniae*, de les 10 PCR positives sense creixement a l'hemocultiu, hem de dir que en 9 d'ells sí que es visualitzaven diplococs grampositius lanceolats en parelles al GRAM. El cas restant es podria considerar un fals positiu, perquè el pacient no presentava elevació de la procalcitonina ni de la pcr, i no va requerir antibioteràpia.

#### 4.2. PCR sobre hemocultiu *en curs*

Entre els resultats de les 68 PCR sobre hemocultiu *en curs* 55, un 80,9% (IC(95%)=[69.5%, 89.4%]), són concordants (parcial o totalment) amb els resultats del cultiu tradicional. Si eliminem els microorganismes no significatius i els que no es troben entre les dianes, finalment hi hauria un 88.3% de concordança (IC(95%)=[70.5%, 90.8%]), considerant també els resultats negatius.

Respecte a les PCR sobre hemocultiu *en curs* que són negatives (62) i finalment tenen el resultat de l'hemocultiu negatiu (51), la concordança és del 82.3% (IC(95%)=[70.5%, 90.8%]).

Taula 13. Resultats no concordants entre PCR sobre hemocultiu *en curs* i hemocultiu convencional

Resultat PCR	Hemocultiu convencional	Nº Proves
-	<i>Staphylococcus spp</i>	2
Enterobacteriaceae	-	1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	1
-	<i>Capnocytophaga canimorsus</i> (No diana)	1
-	<i>E.coli</i>	1
-	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1
-	<i>Listeria monocytogenes</i>	1
-	<i>Micrococcus luteus</i> (No diana)	1
-	<i>Staphylococcus aureus</i>	1
-	<i>Staphylococcus capitis</i>	1
-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1

-No es detecta cap microorganisme

Respecte als microorganismes detectats per PCR només:

- El pacient amb Enterobacteriaceae presentava una ITUc per *E.coli*.
- La pacient amb *S.pyogenes* era una xiqueta d'un any amb IPPT i shock sèptic, que tenia positiva la detecció de *S.pyogenes* en exsudat faringi.

Sobre els aïllats en cultiu només:

- Capnocytophaga canimorsus* no es troba entre les dianes de FA-BCID
- E.coli* podria haver-se detectat amb la PCR, probablement amb més temps d'incubació. Era un quadre d'origen abdominal.
- Enterobacter aerogenes*, en un pacient amb focus urinari, es podria haver detectat almenys com a Enterobacteriaceae, donat que entre les dianes d'aquest gènere només es troba *E.cloacae*. Probablement s'hauria detectat amb més temps d'incubació.
- Listeria monocytogenes*, va ser negativa en la PCR realitzada a les 4 hores però si que es va detectar en una nova PCR a les 11 hores, aquesta sobre hemocultiu ja positivitzat.
- El pacient amb *Micrococcus luteus* (que no es troba entre les dianes) presentava una infecció per VRS. No es va considerar significatiu aquest aïllament.
- L'aïllament de *S.aureus* es va fer en un pacient amb focus osteoarticular. Probablement s'hauria detectat augmentant el temps d'incubació.
- Als dos casos amb *Staphylococcus spp*, aquest es va considerar contaminant. Un d'ells va presentar una pneumònia per *S.pneumoniae*.
- S.capitis* tampoc es va considerar. El pacient, de 3 anys, presentava un empiema pleural.
- S.epidermidis* també es va considerar contaminant. S'aïllava en 1 frasc de 4.

### 4.3. Concordança parcial

En quatre pacients la concordança va ser *parcial*: es van detectar més organismes per PCR que els recuperats per cultiu, o bé la identificació no va ser a nivell d'espècie (Taula 14). La PCR es va fer sobre hemocultiu en curs en un cas i sobre hemocultiu positiu en tres casos.

Taula 14. Concordança parcial

Resultat PCR	Hemocultiu tradicional	GRAM	En curs
<i>H.influenzae</i>	<i>H.influenzae</i>	CGPC	No
<i>S.pneumoniae</i>			
<i>Streptococcus spp</i>	<i>S.pyogenes</i>	CGPC	No
<i>Enterobacteriaceae</i>			
<i>Enterococcus spp</i>	<i>K.aerogenes</i>	CGPC,BGN,	No
<i>Staphylococcus spp</i> ( <i>mecA+</i> )	<i>E.faecium</i>	LEV	
<i>Proteus spp</i>	<i>S.pneumoniae</i>	CGPC	Si
<i>S.pneumoniae</i>			

CGPC: Cocs grampositius en cadena BGN: Bacils Gramnegatius LEV: Llevats

-El primer cas, probablement era una bacterièmia mixta. *S.pneumoniae* no sembla un fals positiu. Es veien CGP en parelles al GRAM, va créixer en uns altres hemocultius i va evolucionar favorablement amb Cefotaxima.

-El segon, era una bacterièmia de focus osteoarticular. En detectar-se *Streptococcus spp*, es va afegir Clindamicina a Cefuroxima. L'evolució també va ser bona.

-El tercer presentava un quadre abdominal. La detecció de *Staphylococcus spp mecA+* va ser possiblement un fals positiu. Els llevats, que s'observaven al GRAM, no es van detectar per PCR ni van créixer. No obstant, es va mantenir el tractament antifúngic i va evolucionar favorablement.

-El darrer cas era un pacient amb pneumònia, al qual no se li va modificar el tractament empíric amb Meropenem i que finalment va morir. Probablement *S.pneumoniae* no era un fals positiu (al GRAM es veien CGP en parelles), però si ho era *Proteus spp* (hi havia una alerta de la casa comercial al respecte).

## 5. ESTIMACIÓ DE PARÀMETRES PER A LA REALITZACIÓ DE LA PCR

En darrer lloc, s'analitza si existeix algun paràmetre que pugui ser determinant per a predir la positivitat de la PCR (globalment i sobre pacients amb PCR sobre hemocultiu *en curs*). Amb eixa finalitat es realitza un model de regressió logística múltiple. Es considera com a variable *dependent* o *resposta* si el resultat de una PCR és positiva o no, i com a possibles variables *independents* o *explicatives*, el sexe, la edat, la procalcitonina, la proteïna C reactiva, el nombre de leucòcits i el percentatge de leucòcits polimorfonuclears. El model es construeix seguint un procediment de selecció de variables pas a pas cap enrere, en base a la significació dels paràmetres. La qualitat del model fou avaluada mitjançant el test de *Hosmer-Lemeshow*, i la seua capacitat predictiva amb la seua sensibilitat i especificitat.

El nivell de significació per als tests realitzats és de  $\alpha = 0,05$ .

### 5.1. PCR realitzada globalment

S'analitza quines característiques dels pacients (edat, sexe, procalcitonina, proteïna C reactiva, leucòcits i percentatge de polimorfonuclears) podrien condicionar la realització de la prova PCR. De tots aquests paràmetres, els únics rellevants per a predir si el resultat de la PCR va a ser positiva és el percentatge de polimorfonuclears i l'edat del pacient.

El model logístic construït assumeix la següent equació:

$$\text{logit}(p_i) = \log\left(\frac{p_i}{1-p_i}\right) = \beta_0 + \beta_1 \text{Edat}_i + \beta_2 \% \text{Polimorfonuclears}_i,$$

on,

- $p_i$ , és la probabilitat d'obtenir un resultat positiu a la PCR.
- $O = \frac{p_i}{1-p_i}$ , és la odds a favor d'obtenir un resultat positiu a la PCR per a algun microorganisme (quantes vegades és més probable obtenir un resultat positiu respecte a un negatiu).
- $\% \text{Polimorfonuclears}_i$  és una variable que indica el percentatge de leucòcits polimorfonuclears i  $\text{Edat}_i$  l'edat del pacient  $i$ -èsim.
- L'exponencial dels coeficients del model representen l'odds ratio de les variables.

La taula 15 mostra un resum del model: els coeficients estimats, l'error estàndard, el p-valor i l'odds ratio (l'exponencial del coeficient):

Taula 15. Resultat del model logístic amb els paràmetres dels pacients que podrien determinar el resultat de la PCR.

Variables	Coeficients (I.C. 95%)	Error estàndard	P-valor	Odds ratio
(Intercepte)	-3.6 (-6.09 , -1.45)	1.17	0.0022*	-
% polimorfonuclears	0.0367 (0.00756 , 0.0692)	0.0156	0.019*	1.04 (1.01 , 1.07)
Edat	0.0148 (0.00229, 0.0277)	0.00646	0.022*	1.01 (1 , 1.03)

Sensibilitat: 70%; Especificitat: 71.4%; AUC: 0.74

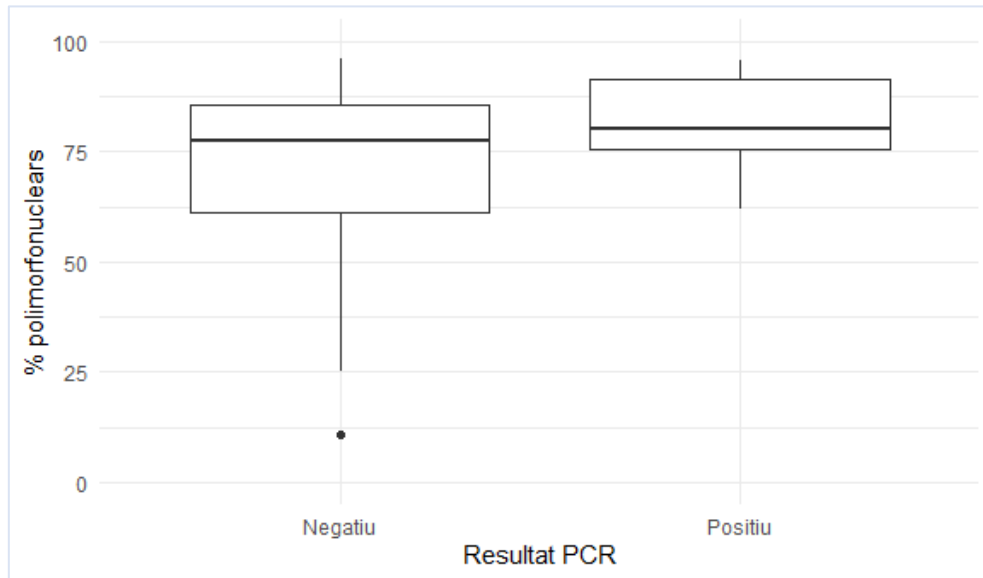
- L'odds a favor d'un resultat positiu en la PCR, augmenta aproximadament un 1.49% per cada any d'edat d'un pacient.
- L'odds a favor d'un resultat positiu en la PCR, augmenta aproximadament un 3.73% per cada increment d'una unitat en el percentatge de leucòcits **polimorfonuclears**.

Per tal d'establir un llindar de discriminació a partir del què es classifique el resultat esperat d'una PCR com a positiu, es maximitza la sensibilitat i especificitat del model. Aquest llindar s'estableix quan el model indica que hi ha una probabilitat d'obtenir un resultat positiu per a algun microorganisme del 50.7%. Amb aquest llindar s'obté una sensibilitat del 70% i una especificitat del 71.4%.



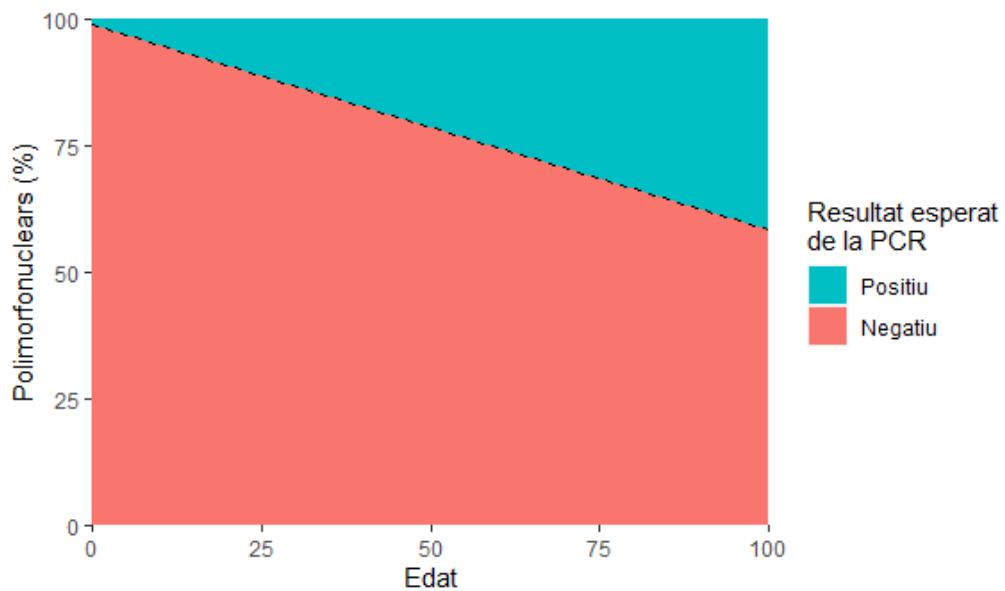
A continuació es mostren alguns gràfics descriptius del model.

Gràfic 3. Diagrama de caixes del percentatge de polimorfonuclears si la PCR ha detectat algun microorganisme.



El següent gràfic representa les regions de classificació del model (resultat esperat de la PCR), segons l'edat i el percentatge de polimorfonuclears dels pacients.

Gràfic 4. Regions de classificació del model de regressió logística.



## 5.2. PCR sobre hemocultiu *en curs*

En aquest apartat s'analitza quins paràmetres poden ser determinants per a estimar que la realització de la PCR sobre hemocultiu *en curs* podria donar un resultat positiu. Però no s'observen paràmetres estadísticament significatius. Es resumeix el mateix model realitzat anteriorment (Taula 16), però aplicat només sobre aquells pacients la PCR dels quals s'ha realitzat sobre un hemocultiu encara no positivitzat.

Taula 16. Resultat del model logístic amb els paràmetres dels pacients que podrien determinar el resultat de la PCR sobre hemocultiu *en curs*.

Variablen	Coefficients (I.C. 95%)	Error estàndard	P-valor	Odds ratio
(Intercepte)	-5.52 (-12.8 , -1.07)	2.91	0.057	-
% polimorfonuclears	0.0436 (-0.0169 , 0.132)	0.0371	0.24	1.04 (0.983 , 1.14)
Edat	-0.00633 (-0.0412 , 0.0247)	0.0162	0.70	0.994 (0.96 , 1.03)

Sensibilitat: 29%; Especificitat: 100%; AUC: 0.63

Observem que cap de les dos variables que semblaven significatives al model general ho són per a la realització de la PCR sobre hemocultiu *en curs*.

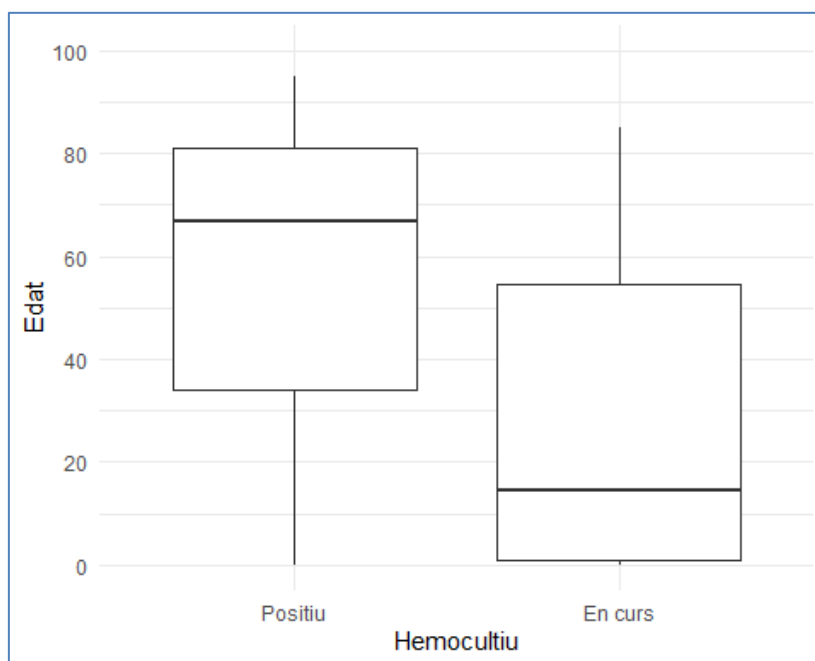
Açò és degut a que hi ha molt poques PCR sobre hemocultiu *en curs* amb resultat positiu.

Taula 17. Nombre de resultats positius amb la PCR sobre hemocultiu *en curs*.

PCR+ per a algun microorganisme	Nº
No	62
Si	6

Per una altra banda l'estimació del coeficient de l'edat ha deixat de ser significativa. Açò pot haver ocorregut perquè la distribució d'edats és diferent (prou més baixa). La freqüència amb què els pediatres sol·licitaven la PCR abans de la positivització de l'hemocultiu era major que en altres serveis.

Gràfic 5. Diagrames de les edats dels pacients segons si la PCR ha estat realitzada sobre hemocultiu en curs



## DISCUSSIÓ I LIMITACIONS DE L'ESTUDI

---

## DISCUSSIÓ I LIMITACIONS DE L'ESTUDI

Per tal de millorar l'eficiència de la PCR, a l'HGUC es reserva la seua realització per als casos en què el resultat puga generar un canvi en la conducta terapèutica, fet que sol ocórrer quan la tinció de GRAM es poc concloent o s'observen CGP. Probablement per això el principal focus de la bacterièmia entre els pacients inclosos al nostre estudi va ser la pneumònia, amb un 40% dels casos. També destaca la IIA i la FOD, amb quasi el 10%. Cal destacar que només el 6% tenien un focus urinari. Aquesta circumstància es podria deure a què la clínica de la ITUc sol ser més clara i, per tant, afavoreix l'administració d'un tractament empíric correcte amb cobertura per a BGN.

Sobre la utilitat dels biomarcadors i la seua aplicació en la millora del reconeixement de la infecció, el grup d'estudi del Servei d'Urgències de l'Hospital de Toledo, va fer una revisió l'any 2017 per la seua transcendència en quant a l'extracció o no d'hemocultius, l'antibioteràpia precoç i la decisió d'ingressar el pacient (41). Recentment han revisat aquelles dades segons els nous punts de tall de procalcitonina i les noves definicions de sèpsia (42), i remarquen que la PCT > 0,5 ng/mL obté el major rendiment pronòstic entre les variables analitzades, amb una odds ratio de 4,52 (IC 95% 4,20-4,84, p < 0,001). La figura següent mostra aquesta actualització, que destaca que amb una PCT elevada (alt risc de bacterièmia) sempre s'haurien de prendre hemocultius, entre 0,1-0,5 ng/mL (risc moderat) s'haurien de prendre si hi ha criteris de sèpsia però si no hi ha, s'hauria de valorar fer-ho si l'evolució és menor de 6 hores, s'ha administrat ATB en les 72 hores prèvies, existeix un focus localitzat o immunosupressió. Si la PCT és menor de 0,1 ng/mL (baix risc de bacterièmia) es prendrien hemocultius només si hi ha criteris de sèpsia.

Situación Clínica	Concentraciones de procalcitonina (ng/mL)		
	< 0,1 Bajo riesgo de bacteriemia	0,1-0,5 Moderado riesgo de bacteriemia	> 0,5 Alto riesgo de bacteriemia
No criterios clásicos sepsis <sup>a</sup> qSOFA ≤ 1 <sup>b</sup>	No	Valorar individualmente <sup>c</sup>	SÍ
Criterios de sepsis <sup>a</sup>	Valorar individualmente <sup>c</sup>	SÍ	SÍ
Sepsis grave-shock séptico <sup>a</sup> qSOFA ≥ 2 <sup>b</sup>	SÍ	SÍ	SÍ

<sup>a</sup> Criterios de sepsis: Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) más infección. SRIS con dos de los cuatro criterios: Temperatura > 38 °C o < 36 °C; leucocitosis > 12.000 o < 4.000/mm<sup>3</sup> o > 10% cayados; taquipnea > 20 respiraciones por minuto (rpm) o PaCO<sub>2</sub> < 32 mmHg; y taquicardia > 90 latidos por minuto. Sepsis grave: sepsis con disfunción orgánica, hipotensión o hipoperfusión (hiperlactacidemia). Shock séptico: hipotensión persistente a pesar de reposición de fluidos que precisa vasopresores.

<sup>b</sup> qSOFA: Quick - Sequential Organ Failure Assessment. Criterios: alteración nivel de consciencia con escala del coma de Glasgow ≤ 13, Presión arterial sistólica ≤ 100 mmHg y frecuencia respiratoria ≥ 22 rpm.

<sup>c</sup> Valorar posibles falsos positivos: Inicio agresión bacteriana < 6 horas, toma previa de antibióticos en las 72 horas previas, foco infección localizado, tipo de proceso infeccioso y situación basal y epidemiológica del paciente (neutropenia, inmunodepresión, etc.).

Figura 30. Recomanacions de la presa d'hemocultius al Servei d'Urgències en funció de la probabilitat de bacterièmia. Pres de Rubio et al. EIMC 2021

Al nostre estudi, 9 pacients (6,7%) presentaven valors de PCT <0,1 ng/mL ; 24 (18%) entre 0,1-0,5 ng/mL i 80 (60,1%) major de 0,5 ng/mL. En la resta de casos no constava aquesta variable.

La mediana va ser de 12,5. D'aquells pacients amb PCT <0,1 ng/mL, només en 2 (l'1,7%) es va constatar una bacterièmia significativa.

Pel que fa al tractament empíric, a banda del treball de Kumar (1) que conclou que cada hora de retràs en l'administració d'un ATB adient suposa una reducció en la supervivència del 7,6%, hi ha d'altres estudis que aprofundeixen sobre aquesta qüestió. Un treball realitzat sobre 400 pacients crítics de l'Hospital Virgen del Rocío (69) conclou que el tractament empíric inadequat s'associa amb un augment significatiu del risc de mort (RR 1,41; 95% CI 1,11-1,80), trobant una mortalitat durant l'ingrés vuit vegades major en aquells pacients que havien rebut un tractament incorrecte les primeres 24 hores. Amb una anàlisi multivariant s'estudien els factors de risc que condicionen aquest tractament incorrecte, com són la presència de fungèmia i el tractament ATB durant el mes anterior, pel seu efecte en la selecció de microorganismes MDR. Per tant, en pacients sèptics exposats a ATB prèviament s'hauria d'emprar una teràpia d'ampli espectre per cobrir la possibilitat de MDR que s'ajustarà quan es dispose dels resultats microbiològics. La mortalitat precoç (primers 3 dies) no s'afectava pel tractament, perquè es relaciona amb la comorbiditat i la situació clínica a l'ingrés, especialment amb l'existència d'insuficiència respiratòria o fracàs renal. Un estudi retrospectiu per a la *Surviving Sepsis Campaign*, (70) que va analitzar dades de quasi 18.000 pacients de 165 UCIs de tot el món, confirma que el retard en l'administració d'ATB s'associa a un augment de la mortalitat hospitalària, i que hi ha un increment lineal en el risc de mort per cada hora de retràs en l'administració de l'ATB. Aquests resultats demostren la importància de la ràpida identificació i tractament dels pacients sèptics (33).

La mortalitat al nostre estudi va ser del 10.5%. No s'han analitzat els factors relacionats amb aquesta variable per no ser un objectiu d'aquesta tesi.

En nounats el retard en la identificació del patògen implica allargar el temps d'exposició a ATB d'ampli espectre, que en els no infectats afavoriria innecessàriament l'aparició de resistències i en els que ho estaven, l'aparició d'infeccions fúngiques invasives, enterocolitis necrotitzant o fins i tot la mort (15).

Al nostre treball, el tractament empíric més freqüentment emprat van ser els betalactàmics (amoxicil.lina/clavulànic, piperacil.lina/tazobactam i C3G).

En quasi el 22% dels pacients es va modificar el tractament ATB en conèixer el resultat de la PCR, la majoria de vegades per la detecció de *S.pneumoniae*. Respecte a l'antibioteràpia, el tractament es va desescalar en 12 pacients (9%), ajustar en 10 (7.5%) i es va iniciar en dos pacients (1.5%).

Una utilitat afegida de FA-BCID és que permet descartar ràpidament la bacterièmia per *S.aureus* en el cas d'observar-se CGP compatibles amb *Staphylococcus* al GRAM i, per tant, suspendre el tractament i donar, inclús, l'alta hospitalària.

En el cas particular dels pacients pediàtrics, que suposaven un terç de la nostra sèrie, perquè es sol·licitava la PCR sobre hemocultiu en curs amb més freqüència que entre els adults, vam trobar que a 4 hemocultius on es veien CGP compatibles amb estafilococs al GRAM, es va poder descartar una bacterièmia significativa en poc més d'una hora.

Un treball de Ray et al (71) valorava si el resultat de FA-BCID modificava el maneig clínic, l'optimització del tractament i l'estança hospitalària sobre 100 xiquets. Van trobar que el 63% dels hemocultius eren significatius i un 18% de bacterièmies mixtes. En 11 casos, FA-BCID no va detectar els microorganismes recuperats per cultiu (9 no estaven entre les dianes) i van trobar 1 resultat falsament positiu. Al 54% dels casos es va intervenir sobre el tractament: en el 20% es va començar o modificar l'ATB i en el 25% es va desescalar o suspendre, sobretot per la identificació de possibles contaminants. Els canvis en el tractament es van donar sobretot davant la identificació de candidèmia, grampositius i gramnegatius per eixe ordre i, en la majoria de casos, en les primeres 24 hores des de l'extracció de l'hemocultiu.

Un altre treball als EUA, (72) també sobre població pediàtrica, constatava el benefici d'un diagnòstic ràpid (en aquest cas amb Verigene®), que va permetre canviar el tractament en el 70% dels casos, fonamentalment per la desescalada precoç davant *S.aureus* meticil·lin-sensible (79%) i evitant el tractament en SCN (35%). En canvi, davant la detecció de BGN, es pautaven ATB d'ampli espectre quan la població pediàtrica no sol presentar microorganismes MDR.

Respecte a la detecció d'*Enterococcus spp*, encara que FA-BCID presentava la limitació de no diferenciar entre *E.faecalis* i *E.faecium*, almenys tenia una diana de gènere amb què FA-BCID2 no compta.

Açò ens va permetre la detecció com a *Enterococcus spp* d'*Enterococcus gallinarum* en un pacient amb sèpsia d'origen abdominal. Un estudi realitzat a Japó sobre 235 episodis de bacterièmia (58) per *E.faecalis* i *E.faecium*, va concloure que la sensibilitat a Ampicil·lina era del 100% per a *E.faecalis* mentre que només del 8,8% per a *E.faecium*. Aquest percentatge de resistència és major que el descrit per altres estudis, circumstància que els porta a fer una anàlisi multivariant per trobar els factors relacionats amb la resistència a Ampicil·lina en *E.faecium*, conclouent que l'únic era l'adquisició nosocomial, i no l'hospitalització prèvia o l'ús de  $\beta$ -lactàmics o fluorquinolones, com s'havia descrit prèviament.

L'aplicació de MALD-TOF MS sobre hemocultiu positiu presenta un impacte molt favorable en la instauració del tractament ATB en pacients sèptics. Es pot realitzar després d'un processament mitjançant centrifugació repetida i/o lisis o bé sobre el creixement obtingut a partir de les 4 hores d'un subcultiu en Agar Chocolate Polyvitex, com és el cas de l'HGUC.

Mauri et al (28) proposen un mètode combinat que es basa en la centrifugació a 3500 rpm durant 10 minuts d'una alíquota de l'hemocultiu en un tub amb gel separador, descartant el sobrenedant i inoculant el *pellet* en dos plaques d'agar sang que s'incuben 3 hores a 37°C (en O<sub>2</sub> i en CO<sub>2</sub> al 5%) a partir de les quals es realitzaria la identificació i l'estudi de sensibilitat per MALDI-TOF. Els resultats es comparen amb el procediment habitual, obtenint una correcta identificació a nivell de gènere o espècie del 98,4%, i pel que fa a l'antibiograma, una concordança de pràcticament el 98%. El temps fins l'informe final es va reduir en quasi 22 hores.

Per a Verhoeven et al (73), que comparen MALDI-TOF sobre un subcultiu de 4 hores amb FA-BCID, prenent com a *gold standard* la identificació per MALDI-TOF després del cultiu convencional, la concordança de FA-BCID amb el mètode de referència va ser del 91,5%, significativament més elevada que el MALDI-TOF sobre subcultiu (79,7%). La sensibilitat de FA-BCID va ser del 90,9%, també major que MALDI-TOF (78,2%), sobretot en bacterièmies mixtes. Combinant els dos mètodes el 93,5% dels hemocultius es van identificar correctament el mateix dia de la seua positivització.



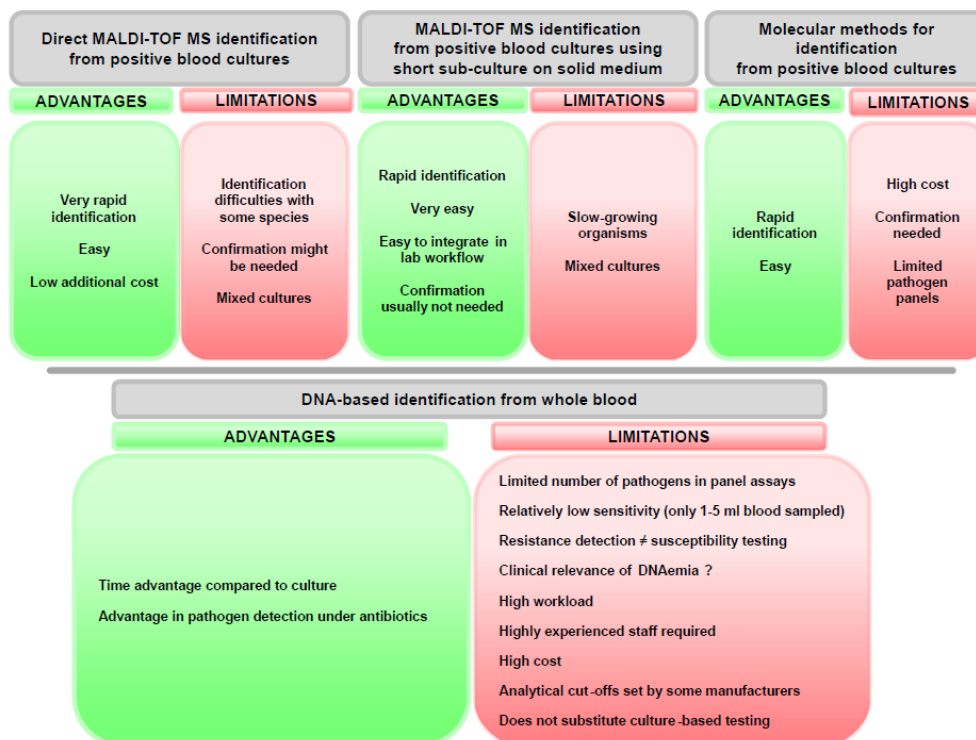


Figura 31. Avantatges i limitacions de MALDI-TOF directe, MALDI-TOF a partir de subcultiu i PCR en el diagnòstic de la bacterièmia. Pres de Lamy et al . Clin Microbiol Inf 2020

Els mètodes moleculars ajuden a agilitzar clarament el diagnòstic però es basen en un rang limitat de microorganismes i de gens de resistència. A més el seu cost és elevat i, en la majoria, la complexitat de les tècniques dificulta la seua implantació a qualsevol laboratori.

Una qüestió que ha sorgit amb aquests nous mètodes diagnòstics és que per la seua capacitat de detectar microorganismes no viables o no cultivables, que no creixerien a l'hemocultiu convencional, valorar la sensibilitat i especificitat és complicat perquè es comparen amb un *gold standard* imperfecte, degut a la baixa quantitat de microorganismes circulants en un episodi de bacterièmia, a l'escàs volum de què es parteix en certs casos (nourats i grans prematurs) i que poden originar falsos negatius, o a l'efecte del tractament ATB previ (15). Per això els estudis de validació requereixen d'altres proves, moleculars o no, que confirmen els resultats discordants perquè aquests podrien donar-se per deteccions de DNA residual d'infeccions ja resoltes o de patògens contaminants, per exemple. Sense un VPN>98%, no es poden prendre decisions sobre l'inici de l'antibioteràpia empírica. Aquesta sensibilitat està condicionada per l'extracció correcta del DNA, la interferència amb el DNA humà, la competència en les amplificacions, etc. Per tot això, cap de les plataformes que existeixen permeten reemplaçar, en el moment actual, l'hemocultiu tradicional.

En eixe aspecte, la tecnologia U-dHRM és prometedora perquè sols detectaria DNA d'infeccions actives, diferenciant-se dels altres mètodes moleculars i inclús de la seqüenciació, que sovint detecta microorganismes de fons.

Una important limitació del nostre treball és que la consideració o no com a *falsos positius* dels patògens detectats per PCR que no van créixer en cultiu es va fer segons criteris clínics i no objectius, en no poder disposar de mètodes de confirmació com la seqüenciació del gen 16S rRNA.

En alguns estudis s'han tractat de definir algorismes sobre quan estaria indicat realitzar una PCR, dins un context de *machine learning* basat en la intel·ligència artificial. S'han suggerit alguns índex com la ratio neutròfils/limfòcits o els nivells de PCT (15).

Nosaltres hem tractat de trobar alguna variable que poguera anticipar un resultat positiu de la PCR, i hem trobat que l'edat i el percentatge de leucòcits polimorfonuclears presenten una Odds ratio favorable (1.01 i 1.04 respectivament). Per a la PCR realitzada sobre hemocultiu *en curs*, en canvi, no es va trobar cap paràmetre relacionat amb un resultat positiu, probablement pel baix nombre de mostres analitzades.

Sobre l'aplicació de FA-BCID sobre hemocultius positius, es va avançar el diagnòstic respecte a l'hemocultiu tradicional en 55:26 hores de mediana (IC 95% 43:14-68:19) i  $p < 0.001$ . En el cas particular de Pediatria, es va avançar en 46:40 hores de mediana. Cal dir que quan es valida l'hemocultiu ja s'inclou l'estudi de sensibilitat. Així, una limitació important és que la validació preliminar de la identificació del microorganisme (que seria el millor comparador respecte a la PCR) no es pot recuperar del SIL una vegada existeix una validació definitiva.

Un estudi de 21 pacients (74) va trobar una concordança del 100% amb la identificació tradicional per a les bacterièmies clínicament significatives i la modificació del tractament empíric després de l'informe de la PCR va ser del 33%. MacVane *et al* (51) van trobar un percentatge de resultats positius en el 76,9% d'hemocultius processats, i una concordança del 93,1% amb l'hemocultiu convencional (una vegada eliminats els microorganismes que no es trobaven entre les dianes i els considerats contaminants). Al nostre estudi la concordança és més baixa (del 79%) possiblement perquè en 10 ocasions es detecta DNA de *S.pneumoniae* que no es recupera al cultiu en medi sòlid.

Payne et al (75) en un estudi realitzat a Canadà, en laboratoris amb horari 8-18 hores de dilluns a divendres, comparen FilmArray-BCID amb MALDI-TOF directe i amb l'hemocultiu convencional. FA-BCID va donar una identificació exacta en 102/112 (91%) dels casos (99% si només es tenien en compte els patògens inclosos al panell). MALDI-TOF va donar la identificació exacta en 91/112 (81%), en 13/91 casos (14%) al segon intent. La concordança en aquest cas va ser menor en BGN. El temps transcorregut fins la identificació va ser de 2.4h per a FA-BCID, 2.9h per a MALDI i 26.5h per al cultiu convencional. En 44 casos (39%) el resultat va suposar un canvi d'ATB.

Un estudi multicèntric sobre 2200 hemocultius de 8 hospitals dels EUA (76), comparant mostres clíniques i inoculades a van observar que FA-BCID detectava almenys un microorganisme dels recuperats per cultiu en el 88% els casos. La resta no es trobaven entre les dianes. Es van detectar bacterièmies mixtes en el 5,8% de les mostres. La sensibilitat i especificitat per a *vanA/B* i *blaKPC* va ser del 100%, i per a *mecA*, del 98,4%. En el nostre cas les bacterièmies mixtes van suposar el 6.1%.

Cal destacar que segons la fitxa tècnica, per a FA-BCID existia un requisit previ que era que el frasc no portara més de 8 hores de positivitat per qüestions d'estabilitat. Aquesta limitació en l'interval de temps des de la positivització del frasc, seria un inconvenient per als laboratoris amb horari de 8-15 hores, perquè no poden avançar amb seguretat un resultat ràpid. Respecte a aquesta recomanació, la fitxa tècnica de la nova versió FA-BCID2 amplia aquest interval fins a les 24 hores des de la positivització del frasc conservat dins el sistema d'hemocultius o bé a temperatura ambient.

L'algoritme proposat per alguns autors com Fiori et al (62), seria realitzar FA-BCID en el cas de MALDI-TOF no conclouent o en el cas de bacterièmies mixtes. Fent això, augmenten un 15% la detecció respecte a MALDI-TOF i en les bacterièmies mixtes la identificació és correcta en gairebé el 90%.

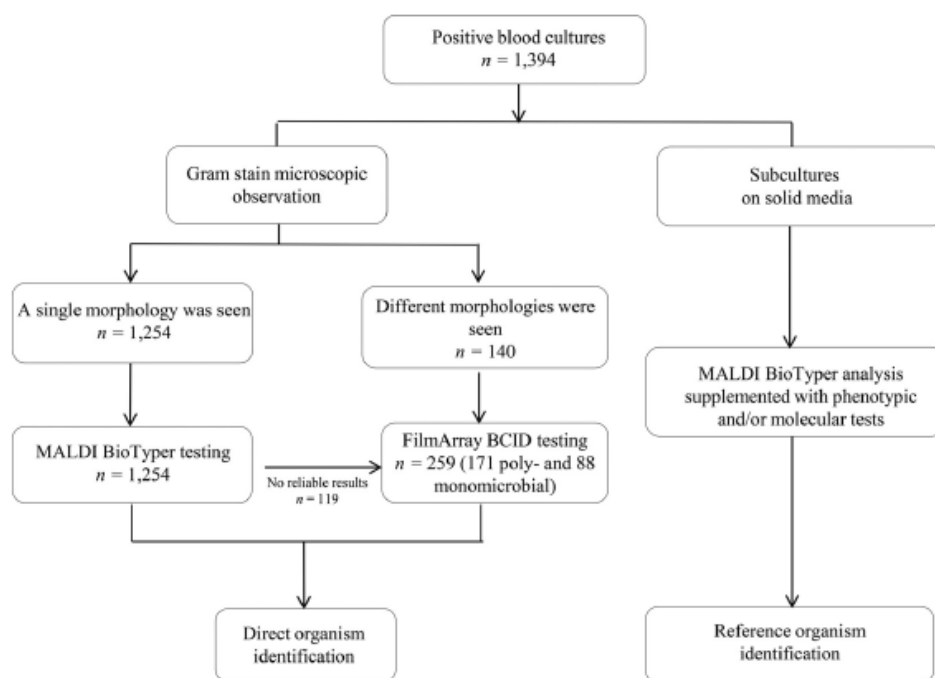


Figura 32. Algorisme en el processament dels hemocultius. Pres de Fiori et al. JCM.2016.

Els pacients crítics també es beneficien d'aquestes tecnologies. En un estudi fet a Bèlgica, Verroken et al (77), van comparar un grup de pacients ingressats a la UCI pre-intervenció amb un altre aplicant PCR 24/7 i es va avaluar el temps fins a l'antibioteràpia òptima (que va ser 14:41 vs 4:39 hores). A més, FilmArray va permetre ajustar el tractament en el 31,8% dels casos. Sobre la concordança amb l'hemocultiu, es van identificar el 85% dels microorganismes.

La probabilitat d'obtenir falsos positius amb FilmArray és excepcional. Almuhayawi et al (65) van trobar una elevada especificitat de FA-BCID front a l'hemocultiu negatiu, encara que es va donar aquest cas només en 12 mostres.

Per a nosaltres, en el cas de PCR sobre hemocultiu en curs, la concordança amb el resultat negatiu del cultiu va ser del 82,3%. En un cas d'un pacient amb pneumònia amb concordança parcial, FA-BCID detectava *Proteus spp* i *S.pneumoniae*, i només va créixer *S.pneumoniae* en cultiu (es veien CGP en parelles al GRAM). Biomérieux va emetre una alerta en Febrer de 2020 explicant que s'havien detectat falsos positius a *Proteus spp* en PCR realitzades a partir de certs lots dels frascos *BacT/Alert FA Plus aerobic*® (59).

Per a Altun et al (66), que van realitzar una avaluació clínica a Suècia sobre uns 200 hemocultius positius, en el 91,6% dels casos el resultat coincidia amb el cultiu, i en 6 dels que no, els microorganismes recuperats (*Bacillus spp*, *Corynebacterium spp*, *Micrococcus spp*) es van considerar contaminants. També en el 3,6% es va detectar un microorganisme addicional que no es trobava a l'hemocultiu, amb la limitació que no es va poder resoldre la discrepància mitjançant seqüenciació.

Per a nosaltres, que tampoc vam poder fer la comprovació, aquesta troballa es va donar en el 2,2% dels casos. A l'estudi realitzat a Suècia, en els casos on l'hemocultiu havia estat detectat com a positiu però no hi havia creixement, FA-BCID també va ser negatiu. En canvi, per a nosaltres, sobre els 10 hemocultius detectats com a positius sense creixement posterior, FA-BCID va detectar *S.pneumoniae*. En tots ells es veien CGP en parelles al GRAM, excepte en un, que es va considerar un fals positiu. Aquesta circumstància podria deure's a la capacitat d'autòlisi que presenta *S.pneumoniae*, i que, si s'endarrereix el procés de subcultiu a partir de frasc positiu (per motius relacionats amb la disponibilitat horària) podria dificultar la recuperació posterior de les colònies.

Alguns autors han trobat un percentatge de resultats invàlids de l'1.5% (66) perquè no es va detectar el control d'extracció o el d'amplificació. En el nostre cas açò va ser un criteri d'exclusió, però hem de remarcar que el percentatge d'invàlids va disminuir utilitzant una agulla de calibre reduït, com puga ser la d'injecció d'Insulina, possiblement perquè n'impedeix el pas de partícules polimèriques que podrien causar aquesta inhibició.

Coincidint amb l'estudi de Verhoeven (73) realitzat a França, no vam detectar en cap cas KPC ni *vanA/B*, ni tampoc es va detectar cap mecanisme de resistència en bacterièmies significatives.

Al nostre estudi vam trobar 2 casos (3%) de bacterièmia per anaerobis (*Eggerthella lenta* i *Parvimonas micra*), de focus urinari i abdominal respectivament, que van ser tractades amb piperacilina/tazobactam amb bona evolució.

Ny et al (78) van estudiar els casos on FA-BCID no identificava cap microorganisme (el 6% de 1044 hemocultius processats) i ho van comparar amb un grup on si que s'obtenia un resultat per PCR. En el 57% es tractava d'anaerobis: *Bacteroides spp* en el 30%, *Clostridium spp* en l'11% i *Fusobacterium spp* en el 8%.

El resultat es va retrassar 2 dies respecte als casos en què FA-BCID detectava algun microorganisme i, per tant, també la prescripció d'un ATB correcte (9,7 vs 3,1 hores,  $p=0.647$ ) i la mortalitat (33% vs 19%,  $p=0.447$ ). Aquests autors remarquen la necessitat d'ampliar la cobertura per a anaerobis (amb carbapenems, metronidazol o piperacilina/tazobactam, per exemple) davant d'un resultat negatiu de FA-BCID especialment si es tracta d'una FOD o d'un focus abdominal o pèlvic. Proposen incloure la detecció d'anaerobis entre les dianes, que ja ha incorporat la versió FA-BCID2, possibilitant la detecció de *Bacteroides fragilis*.

La no concordança, al nostre treball, de la PCR realitzada sobre hemocultiu *en curs* respecte a certs microorganismes que es troben entre les dianes és esperable, perquè els frascos porten un mínim de 4 hores d'incubació i probablement encara no presenten el nombre detectable de còpies genòmiques. En el cas d'una pacient amb sèpsia neonatal per *L.monocytogenes*, es va detectar per PCR quan l'hemocultiu va ser positiu (a les 11 hores d'incubació) i no sobre la PCR feta sobre hemocultiu *en curs*. Malauradament va morir malgrat portar el tractament empíric correcte (Cefotaxima+ Amikacina+ Ampicil·lina).

La bacterièmia per *S.pneumoniae* és una important causa de morbimortalitat a nivell mundial que fa necessària la identificació precisa per tal de iniciar el tractament el més precoçment possible. Al present estudi crida l'atenció la detecció per FA-BCID de *S.pneumoniae* que finalment no pot recuperar-se del cultiu, plantejant el dubte de si poguera tractar-se de resultats falsament positius de la PCR. En la majoria de casos si que arriben a observar-se diplococs grampositius lanceolats o en cadena al GRAM, però en altres el GRAM no mostra cap microorganisme o inclús pot observar-se com a gramnegatiu per un excés de decoloració afavorit per l'efecte del tractament sobre l'estructura bacteriana. És aquest efecte ATB, junt a altres factors com la invasió intermitent del torrent sanguini o l'alliberament d'una autolisina produïda pel pneumococ durant la fase de creixement estacionari acompanyada de l'activació d'una hemolisina, el que dificulta la recuperació del microorganisme als medis de cultiu bacteriològic (68). Davant d'aquesta dificultat, algunes autores com Petti et al (67) han estudiat l'aplicació de la immunocromatografia que detecta l'antigen polisacàrid C de la pared bacteriana (BinaxNOW *S.pneumoniae*®) sobre hemocultius positius. Aquesta eina pot resultar d'utilitat però tenint en compte les possibles reaccions creuades amb *S.mitis group*, i que també podria donar resultats positius temps després de la infecció o a causa de la vacunació antipneumocòccica.

Alguns estudis (79) mostren que en bacterièmies nosocomials per *S.aureus*, el retràs en el tractament és un factor predictor de mortalitat independent (33% vs 19%) i que comporta un ingrés més llarg (20 vs 14 dies). I que la infecció per SARM era el factor predictor de retràs del tractament més significatiu (OR 8,3 p<0.001). Altres autors troben associacions similars però amb BGN resistents. El temps fins a un tractament correcte pot incrementar-se fins a 6 vegades en BGN productors de BLEE respecte a no-BLEE (80). A banda d'un pitjor pronòstic, les infeccions per patògens resistents suposen fins a 30.000 dòlars més per pacient que les infeccions per microorganismes sense factors de resistència, i encara trobem més diferència si ho comparem amb els pacients sense infecció. Per tant, són necessàries estratègies de prevenció de l'aparició nosocomial i d'expansió dels microorganismes resistents (45).

MacVane *et al* (51) van comparar un grup control (cohort de pacients de 2010, any en què encara no s'havia instaurat el PROA) amb un grup d'intervenció PROA però amb diagnòstic convencional de la bacterièmia i un altre amb PROA i FilmArray BCID. Mostraven que la instauració de FA-BCID a l'hospital permetia, si els resultats eren valorats per l'equip PROA, desescalar en les primeres 96 hores més ràpidament: fins a 15 hores abans que en el grup control i 12 hores abans que en el grup sense diagnòstic molecular. A més, el tractament dirigit es va pautar més precoçment (10 hores abans que al grup control i 8 hores abans que sense PCR). Açò, a més del gran benefici per al malalt, va suposar un estalvi (encara que no estadísticament significatiu) de més de 10.000 dòlars per pacient.

Un assaig randomitzat elaborat per Banerjee *et al* (52) va mostrar que l'aplicació de FilmArray BCID sobre els hemocultius positius comportava un ús més adient dels ATB. Es van identificar correctament més del 80% dels microorganismes, acurtant quasi 24 hores l'emissió de resultats. Es van comparar amb el grup control (sense cap intervenció) dos branques que incloïen PCR. Una amb comentaris guiant la interpretació i la prescripció antimicrobiana i l'altra amb el suport de l'equip PROA. A les dues branques amb PCR es va reduir el temps des del GRAM fins la identificació definitiva (1,3 vs 22,3 hores al grup control) i, per tant, l'ús innecessari d'ATB. A més, a la que incloïa al PROA, es va efectuar una desescalada més ràpida.

En el nostre cas, un component de l'equip PROA era informat presencialment cada dia de les bacterièmies dels adults i, en el cas de Pediatria, la informació es donava immediatament via telefònica.

És molt necessari que l'informe telemàtic del resultat s'acompanye d'un informe verbal clar per part del microbiòleg i/o per algoritmes de decisió clínica si no està accessible l'equip PROA. En un estudi realitzat a Nebraska, Donner et al (81) van mostrar que la interpretació dels resultats per part dels clínics era subòptima fins en el 50% dels casos, i podria resultar en un tractament inefectiu o en una oportunitat perduda per a iniciar un tractament d'espectre més estret.

Segons Juttukonda et al (72), encara que el diagnòstic microbiològic ràpid estava disponible 24x7, els canvis de tractament es feien més ràpidament durant el dia que durant la nit (4,6 vs 11,7 hores,  $p < 0.05$ ), probablement per la disponibilitat de l'equip PROA.

Pardo et al (53), als EUA, van estudiar l'impacte clínic i econòmic de les intervencions de l'equip PROA després d'aplicar FA-BCID, en pacients amb infecció hematògena per CGP i *Candida spp.* Comparat amb un grup control d'abans de la introducció de la PCR es va reduir significativament l'ús de Vancomicina per la ràpida identificació de SCN o de *S.aureus* meticil·lin-sensible, l'estada hospitalària i el cost.

Les darreres millores tecnològiques aplicades al camp del diagnòstic microbiològic, han suposat una vertadera revolució que podria repercutir molt favorablement en la supervivència dels pacients. Però sense l'ampliació horària als laboratoris, aquestes noves tecnologies no són aprofitades completament. Segons la fitxa tècnica, FA-BCID es realitza sobre un hemocultiu positiu la tinció de GRAM del qual mostre microorganismes (53). Malgrat aquesta condició, es podria utilitzar després de la positivitat del frasc perquè el GRAM no condiciona el tipus de panell (a diferència d'altres sistemes com Verigene® o PNA-FISH). D'aquesta manera, seria possible realitzar-lo en centres on el microbiòleg no està disponible les 24 hores però si que hi ha personal tècnic.

Sovint, el principal entrebanc que sofreixen encara massa laboratoris de Microbiologia és el de dependre administrativament d'una altra especialitat amb la què únicament comparteixen que part de la seua tasca es desenvolupa dins un laboratori. Aquesta dependència ha suposat que les plantilles a Microbiologia siguin mínimes (i, per tant, impossibiliten ampliar l'horari de treball) o que en molts llocs no es dispose del suficient espai ni de personal administratiu propi.



Altres dificultats són que la supervisió dels TEL es troba en un altre lloc físic i això dificulta prendre decisions equitatives, que els reactius sovint no arriben quan es necessiten, que els microbiòlegs no puguin participar en òrgans de decisió que els afecten plenament (com ara els comitès COVID), i un llarg etcètera. Lluny d'afavorir un enfrontament personal dins de cada hospital on això passa, seria desitjable que la *Comisión Nacional de Especialidades* mostrara sensibilitat amb aquest problema que té l'origen, bàsicament, en què els Analistes en formació reben unes mínimes pinzellades sobre un camp tan ampli com la Microbiologia, que els habilita per a exercir en lloc de Microbiòlegs que s'han format durant 4 anys en una especialitat que no deixa d'expandir-se en coneixements.

A l'HGUC, feia més de 20 anys que l'horari era de 8 a 15 hores de dilluns a dissabte. Des de març de 2019 es va ampliar, obrint de 8 a 21 hores de dilluns a divendres, i dissabtes i diumenges de 8 a 15 hores.

Malgrat que el diagnòstic de la bacterièmia es considera urgent, una enquesta a 209 hospitals de 25 països europeus elaborada pel Grup d'Estudi de Bacterièmies, Endocarditis i Sèpsia de l'ESCMID (82), mostrava que un nombre insuficient de laboratoris oferien disponibilitat 24/7 i, d'aquests, el 41,5% ho feien només per a incubar els hemocultius, el 13% per a processar els positius i el només el 4,2% per a validar els resultats i informar precoçment.

Els laboratoris dels Estats Units també pateixen aquest problema. Està demostrat que el retard en la incubació disminueix la taxa de recuperació de microorganismes, i quan són positius, s'haurien de processar immediatament per accelerar el diagnòstic.

El temps màxim recomanat per a la incubació dels frascos des de la presa de mostra és de 4 hores, idealment menys de 2h (25) però per això és necessària una atenció al laboratori de Microbiologia de 24/7, que seria la sol.lució ideal perquè permetria, a més, processar ràpidament els hemocultius positius i informar al clínic. Una alternativa podria ser situar el sistema d'incubació dels hemocultius fora del laboratori, perquè els frascos pogueren ser carregats per una persona aliena a ell. Aquesta opció acurtaria el temps fins a la positivització i evitaria els falsos negatius deguts a la prolongació del temps que els frascos passen sense incubar (25).

Una limitació del nostre treball és que el punt de partida per tal de calcular la demora en els resultats de PCR, GRAM i hemocultiu, parteix del moment de l'inici en la incubació dels frascos. El temps previ des de la presa de mostra fins a la incubació és molt variable i no ha segut possible quantificar-lo.

Estudis com el d'Almuhayawi (65), mostraven que el temps que els frascos estan a temperatura ambient abans de la incubació, pot influir en el resultat obtingut posteriorment.

Savinelli *et al* (83) recalquen la diferència en el temps en que s'informa un resultat quan l'hemocultiu es positivitza quan hi ha personal al laboratori i quan no, arribant a ser de més de 5 hores. Açò implica una demora de quasi el doble de temps en canviar un tractament.

Tabak *et al*, (84) han mesurat el temps des de la presa de mostra fins l'informe del GRAM, identificació i antibiograma dels hemocultius processats a 13 hospitals dels Estats Units que no disposaven de PCR ni d'espectrometria de masses, i només un d'ells amb atenció 24x7. Aquesta demora era, de mitjana, d'1, 2 i 3 dies respectivament (allargant-se en el cas de les candidèmies).

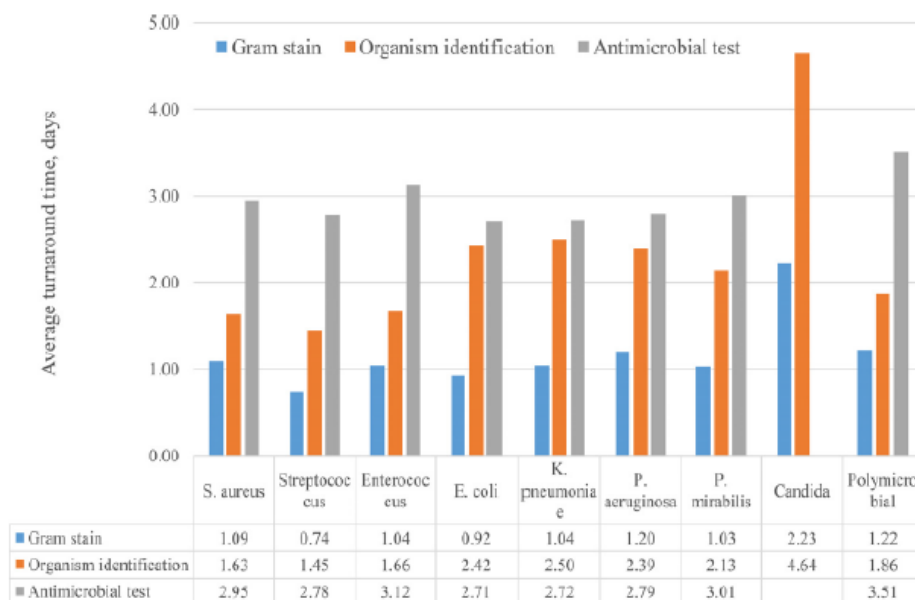


Figura 33. Temps d'emissió de resultats (TAT) per patògen. Pres de Tabak et al. JCM 2018

Com que aquest retard afecta a l'aparició de resistències perquè el temps que passa fins emprar un ATB eficaç és major, els *Centers for Medicaid* i *Medicare* arribaven a penalitzar aquells hospitals amb major taxa d'infecció nosocomial relacionada amb l'ús inadequat d'ATB, com l'associada a *C.difficile* (84).

# CONCLUSIONS

---

## CONCLUSIONS

S'ha prioritzat la realització de la PCR en aquells casos en què el resultat podria generar un canvi en la conducta terapèutica.

Dels pacients amb valors normals de procalcitonina, només dos presentaven bacterièmia significativa.

En quasi el 22% dels pacients es va modificar el tractament antibiòtic en conèixer el resultat de la PCR.

L'aplicació de FA-BCID sobre hemocultiu positiu va permetre avançar el diagnòstic respecte a l'hemocultiu tradicional en dos dies. La concordança en la identificació va ser del 79%.

En el cas de la PCR sobre hemocultiu *en curs*, es van detectar microorganismes en pocs casos, però es va avançar el diagnòstic considerablement. La PCR negativa va mostrar una concordança amb el cultiu del 82,3%.

El percentatge de polimorfonuclears i l'edat són els únics paràmetres rellevants que podrien condicionar un resultat positiu de la PCR.

Especialment en les bacterièmies per *S.pneumoniae* FA-BCID ha suposat una bona eina diagnòstica, que també ha permès descartar precoçment la bacterièmia per *S.aureus*.

Tant l'espectrometria de masses com la PCR *multiplex* acceleren la identificació després de la positivització de l'hemocultiu però, ara per ara, no poden substituir el cultiu tradicional.



## BIBLIOGRAFIA

---

## BIBLIOGRAFIA

1. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med*. 2006 Jun;34(6):1589–96.
2. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 2020;395(10219):200–11.
3. Pfaller MA, Carvalhaes CG, Smith CJ, Diekema DJ, Castanheira M. Bacterial and fungal pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2012–2017). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020;97(2):115016.
4. Opota O, Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: State of the art. *Clinical Microbiology and Infection*. 2015. Apr;21(4):313–22.
5. Vila J, Gómez MD, Salavert M, Bosch J. Métodos de diagnóstico rápido en microbiología clínica: necesidades clínicas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017 Jan 1;35(1):41–6.
6. Isenberg HD. Clinical microbiology: Past, present, and future. *J Clin Microbiol*. 2003;41(3):917–8.
7. Rodríguez Díaz JC, Guna Serrano R, Larrosa Escartín N, Marín Arriaza M. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. 2017. 62. Rodríguez Díaz JC (coordinador). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017.
8. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *J Am Med Assoc*. 2016;315(8):801–10.
9. Asamblea Mundial de la Salud, 70. (2017). Mejora de la prevención, el diagnóstico y la atención clínica de la septicemia. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/275647>
10. Prescott HC, Angus DC. Enhancing recovery from sepsis: A review. *J Am Med Assoc*. 2018;319(1):62–75.
11. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. In: *Chest*. 1992. Jun;101(6): p. 1644–55.
12. Hsu HE, Abanyie F, Agus MSD, Balamuth F, Brady PW, Brill R, et al. A national approach to pediatric sepsis surveillance. *Pediatrics*. 2019;144(6).
13. Huber S, Hetzer B, Crazzolara R, Orth-Höller D. The correct blood volume for paediatric blood cultures: a conundrum? *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(2):168–73.

14. Shane AL, Sánchez PJ, Stoll BJ. Neonatal sepsis. *Lancet*. 2017; 390 (10104):1770–80.
15. Sinha M, Jupe J, Mack H, Coleman TP, Lawrence SM, Fraley SI. Emerging technologies for molecular diagnosis of sepsis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2018. Feb 28;31(2):e00089-17
16. Borges M, Candel F, Ferrer R, Vidal P, Zaragoza R. Código Sepsis. Documento de Consenso.2014.5–60p. Available from: <https://seguridaddelpaciente.es/resources/documentos/2016/SEPSIS-DOCUMENTO-DE-CONSENSO.pdf>
17. Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, Hartog CS. New approaches to sepsis: Molecular diagnostics and biomarkers. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(4):609–34.
18. Angus DC, van der Poll T. Severe Sepsis and Septic Shock. *N Engl J Med* 2013;369:840-51. doi 10.1056/NEJMra1208623
19. Sociedad Española de Medicina Preventiva Salud Pública e Higiene. ESTUDIO EPINE-EPPS no 30: 2019 Informe España. *Estud EPINE*. 2019;33–6. Available from: <https://epine.es/api/documento-publico/2019>
20. Kern W V., Rieg S. Burden of bacterial bloodstream infection—a brief update on epidemiology and significance of multidrug-resistant pathogens. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(2):151–7.
21. Martínez Pérez-Crespo PM, López-Cortés LE, Retamar-Gentil P, García JFL, Vinuesa García D, León E, et al. Epidemiologic changes in bloodstream infections in Andalucía (Spain) during the last decade. *Clin Microbiol Infect*. 2021;27(2):283.e9-283.e16.
22. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis*. 2018;67(6):e1–94.
23. Kellogg JA, Manzella JP, Bankert DA. Frequency of low-level bacteremia in children from birth to fifteen years of age. *J Clin Microbiol*. 2000;38(6):2181–5.
24. Wilson ML. Development of new methods for detecting bloodstream pathogens. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(3):319–24.
25. Lamy B, Sundqvist M, Idelevich EA. Bloodstream infections – Standard and progress in pathogen diagnostics. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(2):142–50.
26. Zafar Iqbal-Mirza S, Serrano Romero de Ávila V, Estévez-González R, Rodríguez-González D, Heredero-Gálvez E, Julián-Jiménez A. Capacidad de la procalcitonina para diferenciar bacteriemia verdadera de los hemocultivos contaminados en el servicio de urgencias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2019;37(9):560–8.
27. van Belkum A, Bachmann TT, Lüdke G, Lisby JG, Kahlmeter G, Mohess A, et al. Developmental roadmap for antimicrobial susceptibility testing systems. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(1):51–62.



28. Mauri C, Principe L, Bracco S, Meroni E, Corbo N, Pini B, et al. Identification by mass spectrometry and automated susceptibility testing from positive bottles: A simple, rapid, and standardized approach to reduce the turnaround time in the management of blood cultures. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):1–8.
29. Åkerlund A, Jonasson E, Matuschek E, Serrander L, Sundqvist M, Kahlmeter G, et al. EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) in blood cultures: Validation in 55 european laboratories. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(11):3230–8.
30. Canut-Blasco A, Calvo J, Rodríguez-Díaz JC, Martínez-Martínez L. Informes acumulados de sensibilidad a los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34(8):524–30.
31. Morency-Potvin P, Schwartz DN, Weinstein RA. Antimicrobial stewardship: How the microbiology laboratory can right the ship. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(1):381–407.
32. Rello J, van Engelen TSR, Alp E, Calandra T, Cattoir V, Kern W V., et al. Towards precision medicine in sepsis: a position paper from the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(12):1264–72.
33. Briggs N, Campbell S, Gupta S. Advances in rapid diagnostics for bloodstream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2021;99(1).
34. Marco F. Métodos moleculares para el diagnóstico de septicemia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017;35(9): 586-592
35. Weinstock GM, Goldberg B, Ledebner N, Rubin E, Sichtig H, Geyer C. Applications of Clinical Microbial Next-Generation Sequencing. *Am Soc Microbiol.* 2016; Available from: <http://asmscience.org/content/colloquia.53>
36. Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem.* 2015;61(1):100–11.
37. Ruiz-Aragón J, Ballester-Téllez M, Gutiérrez-Gutiérrez B, de Cueto M, Rodríguez-Baño J, Pascual Á. Direct bacterial identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry: A systematic review and meta-analysis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2018;36(8):484–92.
38. Ramanan P, Bryson AL, Binnicker MJ, Pritt BS, Patel R. Syndromic Panel-Based Testing in Clinical Microbiology. 2017; *Clin Microbiol Rev.* 2017 Nov 15;31(1):e00024-17.
39. Jihye Ha, M.D.1, Sung Kuk Hong, M.D.2\*, Geum Hee Han, M.T.1, Myungsook Kim, M.T.1, Dongeun Yong, M.D.1\*, and Kyungwon Lee MD. Same-Day Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria in Positive Blood Culture Broths Using Short-Term Incubation on Solid Medium with the MicroFlex LT, Vitek-MS, and Vitek2 Systems. *Ann Lab Med.* 2018 May;38(3):235-241.
40. Rello J, Valenzuela-Sánchez F, Ruiz-Rodríguez M, Moyano S. Sepsis: A Review of Advances in Management. *Adv Ther.* 2017;34(11):2393–411.
41. Julián-Jiménez A, Candel FJ, González-Del Castillo J. Usefulness of biomarkers to predict bacteremia in patients with infection in the emergency department. *Rev Esp Quimioter.* 2017;30(4):245–56.

42. Rubio Díaz R, Nieto Rojas I, Julián-Jiménez A. Importancia de la predicción de bacteriemia en los servicios de urgencias: seis años después. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2021 Feb 1;39(2):109–10.
43. US Department of Health and Human Services, CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States. *Centers Dis Control Prev* [Internet]. 2019;1–113. Available from: [https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest\\_threats.html](https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html)
44. Strich JR, Heil EL, Masur H. Considerations for empiric antimicrobial therapy in sepsis and septic shock in an era of antimicrobial resistance. *J Infect Dis*. 2021;222(Suppl 2):S119–31.
45. Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin Infect Dis*. 2006 Jan 15;42 Suppl 2:S82-9. doi: 10.1086/499406.
46. Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, et al. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest*. 2009;136(5):1237–48.
47. Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2016. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255204/1/9789243509761-spa.pdf>.
48. O'Neill J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. In: Ro A, ed. *Resistance*. London, United Kingdom: 2016; 1, 84. Disponible en [https://amr-review.org/sites/default/files/160525\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf)
49. Kuehn BM. IDSA: Better, faster diagnostics for infectious diseases needed to curb overtreatment, antibiotic resistance. *J Am Med Assoc*. 2013;310(22):2385–6.
50. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net). 2019. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2019.pdf>
51. MacVane SH, Nolte FS. Benefits of adding a rapid PCR-based blood culture identification panel to an established antimicrobial stewardship program. *J Clin Microbiol*. 2016;54(10):2455–63.
52. Banerjee R, Teng CB, Cunningham SA, Ihde SM, Steckelberg JM, Moriarty JP, et al. Randomized Trial of Rapid Multiplex Polymerase Chain Reaction-Based Blood Culture Identification and Susceptibility Testing. *Clin Infect Dis*. 2015;61(7):1071–80.
53. Pardo J, Klinker KP, Borgert SJ, Butler BM, Giglio PG, Rand KH. Clinical and economic impact of antimicrobial stewardship interventions with the FilmArray blood culture identification panel. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;84(2):159–64.
54. Barlam TF, Cosgrove SE, Abbo LM, Macdougall C, Schuetz AN, Septimus EJ, et al. Implementing an antibiotic stewardship program: Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Clin Infect Dis*. 2016;62(10):e51–77.

55. Mormeneo Bayo S, Palacián Ruíz MP, Moreno Hijazo M, Villuendas Usón MC. Bacteremia during COVID-19 pandemic in a tertiary hospital in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2021 Feb 11:S0213-005X(21)00037-9. doi: 10.1016/j.eimc.2021.01.015.
56. Sepulveda J, Westblade LF, Whittier S, Satlin MJ, Greendyke WG, Aaron JG, et al. Bacteremia and blood culture utilization during covid-19 surge in New York City. *J Clin Microbiol*. 2020;58(8):1–7.
57. Garcia-Vidal C, Sanjuan G, Moreno-García E, Puerta-Alcalde P, Garcia-Pouton N, Chumbita M, Fernandez-Pittol M, Pitart C, Inciarte A, Bodro M, Morata L, Ambrosioni J, Grafia I, Meira F, Macaya I, Cardozo C, Casals C, Tellez A, Castro P, Marco F, García F, Mensa J, Martínez JA, Soriano A; COVID-19 Researchers Group. Incidence of co-infections and superinfections in hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study. *Clin Microbiol Infect*. 2021 Jan 1
58. Matsumura T, Nagao M, Nakano S, Yamamoto M, Matsumura Y, Ichiyama S. Enterococcal bacteraemia: Predictive and prognostic risk factors for ampicillin resistance. *Epidemiol Infect*. 2018;146(16):2028–35.
59. Cortazzo V, D’Inzeo T, Giordano L, Menchinelli G, Liotti FM, Fiori B, et al. Comparing BioFire FilmArray BCID2 and BCID panels for direct detection of bacterial pathogens and antimicrobial resistance genes from positive blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2021;59(4):2–5.
60. Berinson B, Both A, Berneking L, Christner M, Lütgehetmann M, Aepfelbacher M, Rohde H. Usefulness of BioFire FilmArray BCID2 for Blood Culture Processing in Clinical Practice. *J Clin Microbiol*. 2021 Jul 19; 59(8).
61. Improving the prevention, diagnosis and clinical management of sepsis. 2017. World Health Assembly, 70. (2017). <https://apps.who.int/iris/handle/10665/275646>
62. Fiori B, D’Inzeo T, Giaquinto A, Menchinelli G, Liotti FM, De Maio F, et al. Optimized Use of the MALDI BioTyper System and the FilmArray BCID Panel for Direct Identification of Microbial Pathogens from Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol*. 2016; Mar;54(3):576-84.
63. Rodríguez-Baño J, Gutiérrez-Gutiérrez B, Machuca I, Pascual A. Treatment of Infections Caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev*. 2018 Feb 14;31(2):e00079-17.
64. Kohlmann R, Hoffmann A, Geis G, Gatermann S. MALDI-TOF mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid pathogen identification from positive blood cultures. *Int J Med Microbiol*. 2015 Jun 1;305(4–5):469–79.
65. Almuhayawi M, Altun O, Strålin K, Özenci V. Identification of microorganisms by filmarray and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry prior to positivity in the blood culture system. *J Clin Microbiol*. 2014; Sep;52(9):3230-6. doi: 10.1128/JCM.01084-14.

66. Altun O, Almuhayawi M, Ullberg M, Ozenci V. Clinical evaluation of the Filmarray blood culture identification panel in identification of bacteria and yeasts from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* 2013 Dec;51(12):4130-6. doi: 10.1128/JCM.01835-13.
67. Petti CA, Woods CW, Reller LB. Streptococcus pneumoniae antigen test using positive blood culture bottles as an alternative method to diagnose pneumococcal bacteremia. *J Clin Microbiol.* 2005;43(5):2510–2.
68. Werno AM, Murdoch DR. Laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease. *Clin Infect Dis.* 2008;46(6):926–32.
69. Garnacho-Montero J, Garcia-Garmendia JL, Barrero-Almodovar A, Jimenez-Jimenez FJ, Perez-Paredes C, Ortiz-Leyba C. Impact of adequate empirical antibiotic therapy on the outcome of patients admitted to the intensive care unit with sepsis. *Crit Care Med.* 2003;31(12):2742–51.
70. Ferrer R, Martin-Loeches I, Phillips G, Osborn TM, Townsend S, Dellinger RP, Artigas A, Schorr C, Levy MM. Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program. *Crit Care Med.* 2014;42(8):1749–55.
71. Ray STJ, Drew RJ, Hardiman F, Pizer B, Riordan A. Rapid Identification of Microorganisms by FilmArray Blood Culture Identification Panel Improves Clinical Management in Children. *Pediatr Infect Dis J.* 2016 May;35(5):e134-8.
72. Juttukonda LJ, Katz S, Gillon J, Schmitz J, Banerjee R. Impact of a rapid blood culture diagnostic test in a children’s hospital depends on gram-positive versus gram-negative organism and day versus night shift. *J Clin Microbiol.* 2020;58(4):1–10.
73. Verhoeven PO, Haddar CH, Rigail J, Fonsale N, Carricajo A, Grattard F, et al. Comparison of the Fully Automated FilmArray BCID Assay to a 4-Hour Culture Test Coupled to Mass Spectrometry for Day 0 Identification of Microorganisms in Positive Blood Cultures. *Biomed Res Int.* 2018 Nov. doi:10.1155/2018/7013470
74. López-Fabal MF, Gómez-Garcés JL, Lomba ML, Bastián MR. Valoración de una técnica de PCR-múltiple en el diagnóstico rápido de la bacteriemia. *Rev Española Quimioter.* 2018 Jun 1;31(3):263.
75. Payne M, Champagne S, Lowe C, Leung V, Hinch M, Romney MG. Evaluation of the filmarray blood culture identification panel compared to direct MALDI-TOF MS identification for rapid identification of pathogens. *J Med Microbiol.* 2018;67(9).
76. Salimnia H, Fairfax MR, Lephart PR, Schreckenberger P, DesJarlais SM, Johnson JK, et al. Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification Panel: Results of a Multicenter Controlled Trial. *J Clin Microbiol.* 2016; Mar;54(3):687-98.
77. Verroken A, Despas N, Rodriguez-Villalobos H, Laterre PF. The impact of a rapid molecular identification test on positive blood cultures from critically ill with bacteremia: A pre-post intervention study. *PLoS One.* 2019;14(9).

78. Ny P, Ozaki A, Pallares J, Nieberg P, Wong-Beringer A. Antimicrobial stewardship opportunities in patients with bacteremia not identified by biofire filmarray. *J Clin Microbiol.* 2019;57(5):1–12.
79. Lodise TP, McKinnon PS, Swiderski L, Rybak MJ. Outcomes analysis of delayed antibiotic treatment for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2003 Jun 1;36(11):1418–23.
80. Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis.* 2001 Apr 15;32(8):1162–71.
81. Donner LM, Campbell WS, Lyden E. crossm Identification Result Interpretation and Antibiotic Prescribing Practices. 2017;55(5):1496–507.
82. Idelevich EA, Seifert H, Sundqvist M, Scudeller L, Amit S, Balode A et al on behalf of the ESCMID Study Group for Bloodstream Infections, Endocarditis and Sepsis (ESGBIES). Microbiological diagnostics of bloodstream infections in Europe-an ESGBIES survey. *Clin Microbiol Infect.* 2019 Nov;25(11):1399-1407. doi: 10.1016/j.cmi.2019.03.024.
83. Savinelli T, Parenteau S, Mermel LA. What happens when automated blood culture instrument detect growth but there are no technologists in the microbiology laboratory? *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004; Mar;48(3):173-4.
84. Tabak YP, Vankeepuram L, Ye G, Jeffers K, Gupta V, Murray PR. Blood Culture Turnaround Time in US Acute Care Hospitals and Implications for Laboratory Process Optimization. *J Clin Microbiol.* 2018; Nov 27;56(12):e00500-18.



## ANNEXOS

---

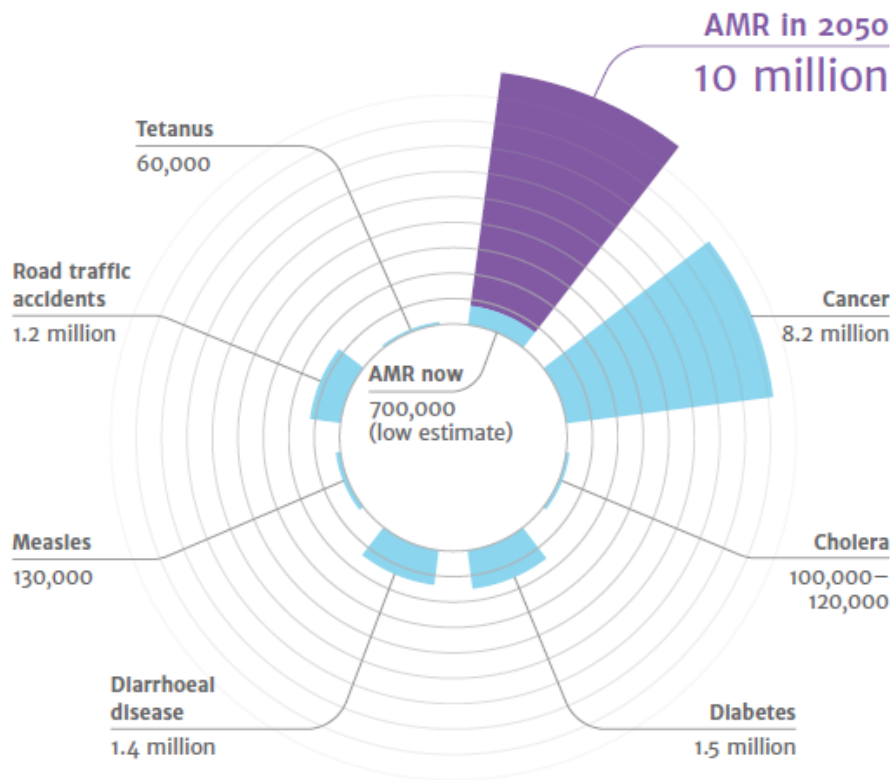
## ANNEXOS

Annex 1. Infografies sobre la Resistència als antimicrobians. Pres de O'Neil





# DEATHS ATTRIBUTABLE TO AMR EVERY YEAR



## Sources:

Diabetes: [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs121/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs121/en/) Cancer: [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs129/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs129/en/)  
 Cholera: [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/) Diarrhoeal disease: [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673612617280](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673612617280)  
 Measles: [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673612617280](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673612617280) Road traffic accidents: [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs120/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs120/en/)  
 Tetanus: [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673612617280](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673612617280)



## Annex 2. Comunicació presentada al Congrés Nacional de la SEIMC. Bilbao 2018.

### 472. EXPERIENCIA CON FilmArray-BCID<sup>®</sup> EN UN LABORATORIO SIN ATENCIÓN CONTINUADA

M Gil Fortuño, MD Tirado Balaguer, A Blasco Molla, S Sabater Vidal, B Gomila Sard, E Álvarez Salinas, R Moreno Muñoz.

Servei de Microbiologia. Hospital General Universitari de Castelló



#### Introducción

Las técnicas de diagnóstico microbiológico rápido están cobrando mucha importancia ya que permiten instaurar un tratamiento antimicrobiano precoz y adecuado, que además de influir en la buena evolución de los pacientes, supone una disminución en el desarrollo resistencias. Los métodos moleculares que incluyen extracción, amplificación y detección en un mismo ensayo, además de poderse implantar en centros con escaso personal técnico, minimizan el riesgo de contaminación por amplicones. Aquellos basados en tecnología multiplex permiten, además, un diagnóstico sintromico con la consiguiente optimización tanto de la muestra como de los recursos. Lamentablemente son muchos los laboratorios de microbiología como el nuestro (aún perteneciendo a un hospital de referencia) que no disponen de Atención Continuada, por lo que los avances tecnológicos no se acompañan de una adecuación de los recursos humanos. Esta importante limitación nos lleva a intentar procesar las muestras e informar los resultados en el menor tiempo posible. Presentamos nuestra experiencia en el diagnóstico de bacteriemias tras incorporar la tecnología FilmArray<sup>®</sup> de BioFire Diagnostics<sup>®</sup>.

#### Material y método

Desde Noviembre de 2016 incorporamos a nuestro Servicio el panel FilmArray-Blood Culture Identification (FA-BCID<sup>®</sup>) sobre frasco de hemocultivo. FilmArray BCID<sup>®</sup> puede detectar e identificar simultáneamente los ácidos nucleicos de bacterias grampositivas (*Enterococcus spp*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus spp*, *S.aureus*, *Streptococcus spp*, *S.agalactiae*, *S.pyogenes*, *S.pneumoniae*), gramnegativas (*A.baumannii*, *H.influenzae*, *N.meningitidis*, *Paeruginosa*, *E.cloacae complex*, *E.coli*, *K.oxytoca*, *K.pneumoniae*, *Proteus spp*, *S.marcescens*), y levaduras (*C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* y *C.tropicalis*), y seleccionar algunos determinantes de resistencia (*mecA*, *vanA/B*, *KPC*).

Aunque según ficha técnica la prueba se realiza sobre un hemocultivo identificado como positivo por un sistema de incubación y vigilancia continuada (en nuestro caso Virtuo<sup>®</sup>) cuya tinción de Gram muestre microorganismos, ante una elevada sospecha de sepsis o en pacientes con neutropenia febril la realizamos sobre hemocultivos en curso (en los que aún no se ha detectado crecimiento), basándonos en el estudio de Almuhayawi *et al* (J Clin Microbiol 52, 2014). En este caso partimos de una incubación del frasco en Virtuo<sup>®</sup> de al menos 4 horas. Siguiendo las instrucciones del fabricante, tomamos 0,2 mL de sangre y lo volvemos a incubar inmediatamente (ya que Virtuo<sup>®</sup> lo permite siempre que no hayan transcurrido más de 2 horas desde su descarga).

Analizamos las PCR realizadas comparando los resultados con los obtenidos mediante cultivo convencional. Para la identificación empleamos Maldi-TOF Vitek MS<sup>®</sup>.

#### Resultados

En un año (Noviembre 2016 a Noviembre 2017) procesamos 47 muestras correspondientes a 46 pacientes, 19 mujeres y 27 hombres, procedentes de Pediatría (21), Med.Intensiva (6), Med.Interna (8) y Hematología (11). Un paciente hematológico tuvo dos episodios sugestivos de sepsis. Realizamos la PCR tras la positividad del frasco en 6 ocasiones.

Cuando la PCR fue negativa el hemocultivo también lo fue, excepto para 3 microorganismos no incluidos entre sus dianas. Cuando fue positiva, crecieron los mismos microorganismos en el cultivo excepto en dos casos en que se detectó DNA de *S.pneumoniae*, pero no hubo crecimiento en los medios habituales. En conjunto, la PCR nos permitió adelantar el resultado un promedio de 22 horas (rango 4h-96h) respecto a la identificación convencional, con elevada sensibilidad (91,6%) y especificidad (100%).

Los resultados positivos y los discordantes se reflejan en la tabla.

SERVICIO	PCR sobre hemo en curso	PCR (FA-BCID)	HEMOCULTIVO CONVENCIONAL	GRAM	Anticipación del resultado respecto a Id (h)	PROCALCITONINA (ng/mL)/ PCR (mg/L)/ LEUCOCITOS
UCI	sí	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	BGN	4	>100/ 212/ 26.000
HEMATOLOGÍA	sí	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	BGN	19	16/ 142/ 30
HEMATOLOGÍA	sí	<i>S.pneumoniae</i>	<i>S.pneumoniae</i>	CGPc	96	0.54/ 312/ 21.000
MED.INTERNA	sí	<i>S.pneumoniae</i>	NEGATIVO	CGPc	No id	1,09/ 438/ 25.000
MED.INTERNA	sí	<i>S.pneumoniae</i>	<i>S.pneumoniae</i>	-	21	6.14/ 523/ 14.000
PEDIATRÍA	sí	NEGATIVO	<i>C.jejuni</i>	-	-	2,79/ 102/ 12.000
MED.INTERNA	sí	NEGATIVO	<i>M.nonliquefaciens</i>	BGN	-	0,93/ 125/ 19.000
UCI	sí	NEGATIVO	<i>E.coli</i>	BGN	-	3,13/ 267/ 8.900
HEMATOLOGÍA	no	<i>H.influenzae</i>	<i>H.influenzae</i>	CBGN?	24	
PEDIATRÍA	no	<i>S.agalactiae</i>	<i>S.agalactiae</i>	CGPc	4	
HEMATOLOGÍA	no	<i>S.pneumoniae</i>	NEGATIVO	CGPc	No id	
PEDIATRÍA	no	<i>Staphylococcus spp</i>	<i>S.epidermidis</i>	CGPr	24	
UCI	no	<i>E.cloacae</i>	<i>E.cloacae</i>	BGN	4	
PEDIATRÍA	no	<i>S.marcescens</i>	<i>S.marcescens</i>	BGN	4	

#### Conclusiones

La incorporación de FA-BCID<sup>®</sup> a nuestro laboratorio ha mejorado el diagnostico en cuadros graves como la sepsis. Aunque presentamos una serie pequeña por la limitación horaria hemos podido adelantar el resultado prácticamente en 24 horas (aún realizándolo antes de lo recomendado en ficha técnica) con una elevada sensibilidad y especificidad. En la sepsis por neumococo la PCR fue el único método positivo en dos ocasiones. Dado que cada vez más laboratorios disponen de técnicas moleculares rápidas es necesario el compromiso de la Administración para dotarlos de Atención Continuada y optimizar los recursos en beneficio del paciente.

