



Departamento de Microbiología

Evaluación de la Técnica Molecular

LightCycler® SeptiFast

utilizando una

Extracción Automatizada de ADN

para la

Detección de Bacteriemia y Fungemia

en Pacientes Críticos

TESIS DOCTORAL

Antonia Isabel Martos Gilabert

Sevilla, 2017

“El trabajo es amor hecho visible” (Kahlil Gibran)

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. ANTECEDENTES	9
2. OBJETIVOS	13
2.1. HIPÓTESIS	13
2.2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL Y MÉTODOS	15
3.1. Pacientes. Criterios de inclusión y exclusión	15
3.2. Conceptos.....	21
3.3. Hemocultivo.....	23
3.4. Muestra de sangre para LightCycler® SeptiFast.....	24
3.5. Cultivos de otras muestras biológicas	25
3.6. PCR múltiple a tiempo real SeptiFast.....	25
3.6.1. Lisis mecánica, extracción y purificación del ADN	26
3.6.1.1. Extracción del ADN	26
3.6.1.1.1. Extracción manual del ADN.....	27
3.6.1.1.2. Extracción automatizada del ADN	28
3.6.2. Amplificación del ADN y detección de los productos de PCR.....	29
3.6.2.1. Amplificación del ADN.....	29
3.6.2.2. Detección de los productos de PCR.....	33
3.6.3. Identificación de los microorganismos y controles	35
3.7. Comprobación de la sensibilidad mínima analítica.....	38
3.8. Desarrollo del estudio	39
3.9. Interpretación de los resultados.....	40
3.10. Análisis estadístico de los datos	41
4. RESULTADOS	44
4.1. Sensibilidad mínima analítica de la técnica LightCycler® SeptiFast.....	44
4.2. Evaluación de la técnica SeptiFast con Extracción manual.....	44
4.3. Evaluación de la técnica SeptiFast con Extracción manual y Dilución del extraído	45
4.5. Evaluación preliminar de SeptiFast con Extracción automática frente a la Extracción manual y el hemocultivo.....	46
4.6. Evaluación de la técnica SeptiFast con Extracción automática frente al hemocultivo	47
4.6.1. Resultados clínico-epidemiológicos	47
4.6.2. Resultados microbiológicos	50
4.7. Análisis estadístico de los datos.....	57
5. DISCUSIÓN	69
5.1. Incidencia y mortalidad.....	69
5.2. Etiología de la sepsis.....	69
5.3. Contribución de los marcadores biológicos al diagnóstico de sepsis	70
5.4. Calidad de nuestro estudio	72
5.5. Sensibilidad mínima analítica de la técnica molecular SeptiFast	73
5.6. Extracción automatizada	74

5.7. Superioridad en la detección de microorganismos mediante <i>SeptiFast</i> respecto al hemocultivo	75
5.8. Exactitud diagnóstica	76
5.9. Influencia del tratamiento antimicrobiano previo en los resultados.....	78
5.10. Tiempo de respuesta en total (TAT)	79
5.11. Comparación con otras técnicas moleculares con marcado CE	80
6. CONCLUSIONES	83
6.1. Eficacia de la extracción automatizada frente a la extracción manual	83
6.2. <i>SeptiFast</i> con extracción automatizada frente a hemocultivo	83
6.3. Ventajas de <i>SeptiFast</i> con extracción automatizada en el manejo del paciente crítico.....	84
7. ABREVIATURAS	87
7.1. ABREVIATURAS GENERALES.....	87
7.2. ABREVIATURAS DE ANTIMICROBIANOS	88
8. ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y ANEXOS	91
9. AGRADECIMIENTOS.....	95
10. BIBLIOGRAFÍA	97

1. INTRODUCCIÓN

La bacteriemia y fungemia son importantes causas de morbi-mortalidad en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) (Crowe y cols, 1998). Los pacientes con sepsis severa o shock séptico tienen una alta tasa de mortalidad, permanecen largos períodos de tiempo ingresados en UCI y tienen un coste en cuanto a tratamiento significativamente mayor que los pacientes no diagnosticados de sepsis en UCI (Edbrooke y cols, 1999). En estos pacientes, un tratamiento antimicrobiano inadecuado se asocia a una mayor mortalidad respecto a los tratados adecuadamente y representa el factor más importante en cuanto a pronóstico (Kollef y cols, 1999; Ibrahim y cols, 2000; Garnacho-Montero y cols, 2008). Distintas publicaciones sobre la utilidad de los métodos moleculares, dan importancia a las potenciales ventajas en términos de adecuar el tratamiento antimicrobiano, al contar con un sistema capaz de diagnosticar y confirmar rápidamente una infección asociada a SRIS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica) (Louie y cols, 2008; Lehmann y cols, 2009; Mancini y cols, 2010).

El método de referencia actual para la detección de bacterias y hongos patógenos en sangre, es el hemocultivo (HC). Este método convencional presenta algunas limitaciones como: lento crecimiento y baja sensibilidad (Rangel-Frausto y cols, 1995; Sands y cols, 1997), especialmente con microorganismos fastidiosos y cuando se ha administrado tratamiento antimicrobiano previamente (Peters y cols, 2004). Para disponer de los resultados utilizando los hemocultivos (HC) convencionales, que dependen de la viabilidad de los microorganismos, el clínico debe esperar más de 24 horas en el caso de HC positivos (Kollef y cols, 2006); y hasta un mínimo de 5 días si un HC finalmente es negativo. El diagnóstico molecular es un método rápido en la obtención de resultados. En Enero de 2006, Roche Diagnostics introduce el primer test basado en una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real: *SeptiFast*, para la detección de los 25 patógenos más comunes productores de sepsis, incluyendo

hongos causantes de sepsis (tabla 1); y en aproximadamente 6 horas este método es capaz de ofrecer resultados microbiológicos al clínico.

Tabla 1.- Lista maestra (SML) de los microorganismos detectados mediante LightCycler® SeptiFast

Gram Negativos	Gram Positivos	Hongos
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Klebsiella (pneumoniae/oxytoca)</i>	SCN ¹	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Enterobacter (cloacae/aerogenes)</i>	<i>Streptococcus spp.</i> ²	<i>Candida glabrata</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		

¹*Staphylococcus haemolyticus, S. epidermidis* ²*Streptococcus agalactiae, S. pyogenes, S. viridans*

La forma de trabajo, al igual que en la mayoría de técnicas moleculares, consta de tres fases: extracción de los ácidos nucleicos, amplificación/detección de las dianas y análisis de los datos. El aislamiento de ácidos nucleicos en el protocolo de SeptiFast, siguiendo las instrucciones del fabricante, es un proceso mayoritariamente manual; que incluye pasos sucesivos de lisis mecánica/enzimática y filtración mediante fibra de vidrio, para lo que se requieren aproximadamente 4 horas sólo para esta fase de aislamiento de los ácidos nucleicos. En los últimos años, están disponibles métodos automáticos de extracción de ácidos nucleicos para ser utilizados conjuntamente con técnicas de PCR. Estas técnicas están diseñadas para desarrollar un trabajo más rápido y eficaz; reduciendo el error humano, mejorando la precisión para obtener resultados reproducibles y permitir el análisis de un gran número de muestras (Störmer y cols, 2007).

Se han publicado diversos trabajos estudiando el potencial beneficio que SeptiFast aportaría en el diagnóstico de la sepsis en pacientes críticos (Lehmann y cols, 2010; Yanagihara y cols, 2010; Lodes y cols, 2012); pero todos ellos utilizan el método de extracción manual

recomendado por el fabricante, siendo el tiempo de respuesta global al médico solicitante de unas 6 horas.

Nosotros pretendemos evaluar este test utilizando una adaptación específica de la extracción automática de los ácidos nucleicos, mediante **MagNA Pure Compact® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)**; que podría acortar el tiempo de respuesta al clínico y también reducir los posibles errores derivados de la manipulación de las muestras en la etapa de extracción; para contribuir a un diagnóstico más rápido y seguro de la sepsis en pacientes críticos.

1.1. ANTECEDENTES

Existe una necesidad urgente de desarrollar técnicas que provean de información al diagnóstico de la sepsis, dentro del tiempo en que aparecen los signos clínicos, y que permita unas decisiones más informadas en el uso precoz de terapia antibiótica (Dellinger y cols, 2013).

El diagnóstico molecular utiliza métodos rápidos en la obtención de resultados; y se han ensayado con éxito en la detección de bacterias, virus, hongos y parásitos patógenos en distintos tipos de muestras (Nolte y Caliendo, 2007). Existe gran interés en la tecnología de PCR, a la hora de resolver esta necesidad de un diagnóstico rápido de la sepsis, basado en su habilidad para detectar pequeñas cantidades de ADN microbiano en muestras sanguíneas ofreciendo resultados en un tiempo mínimo de 4 a 6 horas (Peters y cols, 2004). Los ensayos han ido dirigidos en dos direcciones utilizando la PCR para amplificación genómica utilizando:

a) cebadores universales con amplio rango de detección de ADN bacteriano y fúngico, seguido de identificación de las especies mediante una técnica post-PCR como secuenciación o espectrometría de masas

b) una hibridación con sondas específicas por grupos de patógenos (como Cocos Gram Positivos, Bacilos Gram Negativos y hongos), que ofrezcan confirmación directa de las especies presentes (Dark y cols, 2009).

La segunda opción parece tener la mayor utilidad clínica, asumiendo que puede ser establecido un panel apropiado de los patógenos que más frecuentemente estén implicados en la producción de sepsis en las UCIs.

Se ha reconocido la sensibilidad y especificidad de estas técnicas para la detección de ADN de patógenos en sangre, pero se requerían ensayos clínicos que investigasen la seguridad diagnóstica de estos tests en pacientes que desarrollan un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) debido a una sospecha de infección (Dark y cols, 2011). Esto ha sido debido en parte, a la falta de utilización de una tecnología estandarizada aceptada para diagnóstico clínico.

LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE} (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) es el primer sistema basado en PCR a tiempo real con marca CE para detección e identificación de patógenos ante una sospecha de sepsis (Dark y cols, 2009) y hasta ahora, el más intensamente investigado en estudios clínicos de cohortes y estudios multicéntricos (Dark y cols, 2011). Esta tecnología de PCR a tiempo real ha sido ampliamente ensayada en muestras clínicas y parece tener una excelente sensibilidad analítica, confirmándose su utilidad clínica en el manejo de los pacientes con SRIS (Yanagihara y cols, 2010 Lodes y cols, 2012). La sensibilidad mínima analítica descrita por la casa comercial se establece en 30 UFC/ml para todas las especies incluidas en su lista maestra (SML), excepto para los grupos de los Estafilococos coagulasa negativa (SCN), *Streptococcus* spp. y *S. pneumoniae* que se establece en 100 UFC/ml.

Un pequeño número de nuevas técnicas de PCR con marca CE están actualmente disponibles y pueden detectar ADN de patógenos rápidamente en muestras sanguíneas sin la necesidad de cultivo previo, utilizando una aproximación a todos los patógenos sin identificación de especie (ej. Sepsitest®, Molzym) o utilizando una aproximación múltiple basada en un amplio panel

de patógenos (ej. VYOO®, SIRS-Lab o IRIDICA®, Abbott). SepsiT_{est}® (Molz_{ym}, Bremen, Alemania) es un ensayo de PCR a tiempo real en el que se amplifican los genes ribosomales 16S de bacterias y 18S de hongos, seguido de la secuenciación de los amplicones obtenidos (Well_{inghausen} y cols, 2009). VYOO® (SIRS-Lab, Jena, Alemania) es un test de PCR múltiple que detecta 34 especies de bacterias y 6 especies de hongos, así como 5 marcadores de resistencia. Seguida a la amplificación, los productos obtenidos se detectan mediante electroforesis en gel (Fitting y cols, 2012). IRIDICA BAC BSI Assay® (Abbott Park, IL, EUA) es una técnica que utiliza una PCR combinada con espectrometría de masas de ionización por electrodispersión (PCR/ESI-MS) y puede identificar unos 750 microorganismos entre bacterias y hongos (Strålin y cols, 2016). Comparado con SF, el número de estudios clínicos diagnósticos actuales que utilizan estas tecnologías es muy limitado. Dark (Dark y cols, 2015) realiza una revisión sistemática de esos estudios clínicos, enfocada a la seguridad en el diagnóstico de SF para la detección e identificación de patógenos en la sangre de pacientes con sospecha de sepsis; concluyendo que se necesitan ensayos de calidad para realizar recomendaciones serias sobre su utilidad clínica.

Así pues, pretendemos realizar un estudio que solvete las deficiencias encontradas en otros estudios similares, y evaluar este test utilizando una extracción automática (mediante MagNA Pure Compact); que reduciría los posibles errores derivados de la manipulación de las muestras en la etapa de extracción, además de acortar el tiempo de respuesta global de aproximadamente 6 horas a 4 horas; para contribuir a disponer de una herramienta aún más rápida y segura en el abordaje de la sepsis en pacientes críticos.

2. OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

El sistema MagNA Pure Compact, utiliza un kit para la extracción automatizada de ácidos nucleicos -desarrollado por Roche Diagnostics- que aplicado a las muestras con el protocolo de extracción para ADN bacteriano, nos ofrece el eluído en 30 minutos.

La extracción automática mediante MagNA Pure, seguida de la detección mediante **LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE}** (SeptiFast) podría ser una herramienta rápida y segura en el abordaje de la sepsis en pacientes críticos, acortando el tiempo de respuesta y evitando contaminaciones.

2.2. OBJETIVOS

1.- Evaluar la eficacia de la extracción automatizada de ADN bacteriano y fúngico frente a la extracción manual.

2.- Aplicar esta extracción automatizada en muestras de pacientes con alta sospecha de sepsis, para la detección de infecciones por bacterias y/u hongos.

3.- Determinar las ventajas que el uso de esta extracción, junto con la detección mediante SeptiFast aportan al manejo del paciente crítico con sepsis.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Realizamos un estudio prospectivo observacional en muestras sanguíneas de pacientes con criterios de SRIS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), ingresados en la unidad de cuidados intensivos (UCI) del Hospital Universitario Virgen de Valme de Sevilla.

3.1. Pacientes. Criterios de inclusión y exclusión

Se incluyen en el estudio pacientes mayores de 18 años ingresados en la UCI del Hospital Universitario de Valme, tratados y no tratados previamente con antimicrobianos. Todos ellos con sospecha de sepsis y presentando dos más de los siguientes criterios de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS): temperatura $>38,3^{\circ}\text{C}$ ó $<36^{\circ}\text{C}$, taquicardia (>90 latidos/minuto), taquipnea (>30 respiraciones/minuto) o hiperventilación ($\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg), leucocitosis ($12.000/\text{mm}^3$), leucopenia ($<4.000/\text{mm}^3$) o $>10\%$ de células inmaduras. Se consideraron episodios de SRIS distintos de un mismo paciente, cuando transcurrieron entre ellos al menos 7 días de diferencia; y se excluyeron los resultados de episodios que no reunían este criterio. Se excluyen así mismo del estudio, pacientes menores de 18 años, y pacientes de urgencias o ingresados en otros servicios hospitalarios distintos de UCI.

Se elabora un protocolo (anexo I) para la recogida de datos de los pacientes, incluyendo entre otros: datos demográficos (edad, sexo, fecha de ingreso en UCI, fecha de recogida de la muestra), datos clínicos-analíticos (diagnóstico de ingreso, temperatura corporal, tensión arterial, recuento de leucocitos, índices de gravedad APACHE II/SOFA), datos microbiológicos (tratamiento antimicrobiano previo, resultado de *SeptiFast* y resultado del hemocultivo). Se consideró que habían recibido tratamiento antimicrobiano previo, cuando éste se administró dentro de las 12 horas previas a la extracción de las muestras sanguíneas. Se obtiene también el consentimiento informado de los pacientes que van a ser incluidos en el estudio (anexo II).

Excluyéndose del trabajo, aquellos pacientes de los que no obtenemos dicho consentimiento informado.

El índice APACHE (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation), aunque no es específico para sepsis, es una de las escalas que predicen mortalidad más conocidas y ampliamente difundidas. Es relativamente sencillo de calcular a partir de datos disponibles en la clínica y proporciona una evaluación de la gravedad de la enfermedad en el momento en que se atiende al paciente por primera vez. Está compuesta de dos partes: *a*) una puntuación fisiológica que representa el grado de la enfermedad aguda y *b*) una evaluación de la salud previa del paciente. Existen numerosas revisiones y validaciones del sistema APACHE en la práctica clínica, pero la clasificación APACHE II (modificada por Knaus y cols, 1985) es la más utilizada. El índice SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment), es una escala que valora el grado de disfunción orgánica; permite el cálculo de una puntuación conjunta para la presencia y grado de disfunción de los 6 órganos-sistemas (cardiovascular, respiratorio, hígado, hematopoyético, renal y SNC). Se realiza diariamente y puede ser usado como un índice dinámico de la gravedad del paciente (anexo III).

ANEXO I.- Protocolo para la recogida de datos de los pacientes

Hoja de recogida de datos Caso nº □□□

Espacio reservado para la etiqueta identificativa del paciente

Resultado: **HC** Positivo Negativo

Procedencia: _____

Observación Planta Quirof Despertar OC Otros
Fecha ingreso hospital (día/mes/año) □□/□□/□□ Hora □□/□□
Fecha ingreso Observ.Urg (día/mes/año) □□/□□/□□ Hora □□/□□
Fecha ingreso UCI (día/mes/año) □□/□□/□□ Hora □□/□□
Fecha alta/exitus UCI (día/mes/año) □□/□□/□□ Hora □□/□□
Fecha alta hospital/exitus (día/mes/año) □□/□□/□□ Hora □□/□□
Outcome Superv Exitus UCI Hospital

Diagnostico de ingreso: _____

Foco de Infección en el momento en que se practica HC

Pulmonar Abdominal ORL/Ótico
Urinario Piel/tej. blandos S. Nervioso
Endocardio Desconocido Catéter
Otros

Foco de Infección con comprobación clínica o microbiológica

Tipo de infección

Comunit. Centro sociosanit. Nosoc. planta Nosocomial intra UCI

Destino:

Planta Despertar Exitus Domicilio OC

Hemocultivo. Extracción

Extracción ambos(día, mes, año, hora, min) Hora, min□□/□□

Motivo:

Fiebre Hipotensión Leucocitosis
Acidosis inexplicable Deterioro clínico agudo inexplicable
Tras manipulación foco séptico "No me gusta"...
Antibioterapia en el momento * Si No

(* trato. antimicrobiano en las 12 h. previas)

Código 1º □□□
2º □□□
3º □□□

Situación clínica en el momento de la extracción

Criterios SEPSIS:

Sepsis Grave:

Shock Séptico:

Lactato □□ ,□□ mmol/L

Scores de gravedad y disfunción orgánica

APACHE II □□
SOFA □□

Datos evolutivos

SEPSIS= cualquier infección documentada o sospechada con uno o mas de los siguientes criterios enumerados

Hipotensión debida a sepsis que persiste a pesar de fluidos con alteración de la perfusión o disfunción de órganos. O necesidad de fármacos vasoactivos

Resultado HC (día, mes, año, hora, min)

□□/□□/□□ Hora □□/□□

Recepción Oral Recepción escrito

Positivo

Microorganismo (s) Código

1º

□□□

2º

□□□

3º

□□□

Negativo

Observaciones

ANEXO II.- Consentimiento informado



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD
Hospital Universitario de Valme

Secretaría: Tel. y Fax:
+ 34.955.01.55.93/ 94

Servicio de Cuidados Críticos y Urgencias

PROYECTO SEPTIFAST

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE/FAMILIAR Y CONSIEMIENTO INFORMADO.

Este hospital en su Unidad de Cuidados Intensivos, está participando en un estudio para conocer la utilidad de una prueba de laboratorio que está en fase de investigación. Se trata de intentar mejorar la utilidad de un procedimiento analítico habitual e importante, como es el sacar sangre y cultivarla, ara identificar los gérmenes que pudieran estar presentes en ella, y que se viene haciendo hace más 20 años, al incorporar una tecnología nueva y sin riesgo para el paciente.

Habitualmente, cuando un paciente presenta fiebre, se le hace de forma rutinaria lo que llamamos un cultivo de la sangre, con objeto de identificar esos gérmenes. Esto se viene haciendo desde hace muchos años, y forma parte de la práctica habitual asistencial en nuestro medio. Los resultados de esta técnica tarda varios días (2-3), cuando da positivo, por lo que se tarda algo de tiempo en conocerlos y se utilizan mientras antibióticos de amplio espectro y seguros aunque no se tonga toda la información disponible. Actualmente, en este estudio además de los cultivos de sangre rutinarios lo que hacemos es cultivar la sangre, por un procedimiento nuevo que no tiene ningún riesgo para el paciente, y que si es positivo podemos tener la información en horas, lo que tiene mucha importancia para administrar el tratamiento más eficaz y adecuado.

El procedimiento es muy sencillo dado que cuando se saca sangre para el cultivo rutinario, se extraen 3 cm más que se utilizan para la práctica de esta nueva técnica que tanto bien puede producir a los pacientes, dado que es más sensible y más rápida que la técnica habitual.

Los datos del paciente son tratados de forma anónima, durante o después el estudio y toda la información está disponible para que pueda ser inspeccionada por los organismos de la administración. Se toman las medidas necesarias para respetar la confidencialidad de estos documentos, y en los formularios estará identificado por fecha de nacimiento y por un número. Si se publican los resultados de este estudio no se identificará ni por el nombre ni por los apellidos.

Si en un determinado momento Vd., decide no seguir participando en el estudio solo tiene que comunicarlo a su médico, contando siempre que su decisión no influirá en absoluto en la relación médico-paciente.

Si tiene alguna pregunta o duda respecto a este tipo o tratamiento póngase en contacto con el médico de UCI.

NOMBRE DEL PACIENTE (FAMILIAR).....

PARENTESCO..... FECHA.....

ANEXO III.- Herramientas de cálculo de los Índices de gravedad APACHE-II y SOFA

Escala APACHE-II

Variable	4	3	2	1	0	1	2	3	4
T°C	>41	39-40.9		38.5-39.9	36-38.4	34-35.9	32-33.9	30-31.9	<29.9
PAM	>160	130-159	110-129		70-109		50-69		<49
FC	>180	140-179	110-139		70-109		55-69	40-54	<39
FR	>50	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		<5
PaO ₂					>70	61-70		55-60	<55
Grad A-a .	>500	350-499	200-349		200				
PH	>7.7	7.6-7.69		7.5-7.59	7.33-7.49		7.25-7.32	7.15-7.24	<7.15
Na	>180	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	<111
K	>7	6-6.9		5.5-5.9	3.5-5.4	3-3.4	2.5-2.9		<2.5
Creat	>3.5	2-3.4	1.5-1.9		0.6-1.4		<0.6		
Hcto	>60		50-59.9	46-49.9	30-45.9		20-29.9		<20
Leu	>40		20-39.9	15-19.9	3-14.9		1-2.9		<1

*Gradiente alveolo arterial, solo utilizar como sustituto de PaO₂ si FiO₂>0.5.

- APS= Suma de puntos de la tabla
- Puntuación por enfermedad crónica: Si hay enfermedad crónica previa se penaliza con 2 puntos para procesos o intervenciones programadas y con 5 puntos para procesos o intervenciones agudas.
- Puntuación por edad:

Edad	<44	45-54	55-64	65-74	>75
Puntos	0	2	3	5	6

APACHE-II= APS + (15-Glasgow) + Puntos Enfer. Crónica + Puntos edad=

Escala SOFA

	0	1	2	3	4
Respiratorio: pO ₂ /FiO ₂	> 400	≤400	≤300	≤200*	≤100
Renal: creatinina/diuresis	< 1,2	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9 ó < 500 ml / d	≥5 ó < 200 ml / d
Hepático: bilirrubina	< 1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	≥12
Cardiovascular	No hipotensión	PAM < 70	DA ≤5 ó DBT	DA > 5 ó N/A ≤0,1	DA > 15 ó N/A > 0,1
Hematológico: plaquetas	> 150	≤150	≤100	≤50	≤20
Neurológico: Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	< 6

pO₂/FiO₂ en mmHg; * las puntuaciones 3 y 4 se aplican solo si el enfermo recibe soporte ventilatorio; creatinina en mg/dl; bilirrubina en mg/dl; PAM = presión arterial media; fármacos vasoactivos administrados durante más de una hora, dosis en mcg/min; N/A = noradrenalina ó adrenalina; DBT = dobutamina (cualquier dosis); Glasgow = puntuación en la escala de Glasgow para el coma

3.2. Conceptos

Se considera bacteriemia a la presencia de bacterias en el torrente sanguíneo y fungemia a la presencia de hongos en sangre. La bacteriemia puede ser: transitoria, mantenida o intermitente en su duración.

Consideramos que existe un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) cuando se cumplen dos o más de los siguientes criterios:

- temperatura corporal $>38,3^{\circ}\text{C}$ ó $<36^{\circ}\text{C}$
- leucocitosis ($12.000/\text{mm}^3$) o leucopenia ($<4.000/\text{mm}^3$) o $>10\%$ de células inmaduras
- taquicardia (>90 latidos/minuto)
- taquipnea (>30 respiraciones/minuto) o hiperventilación ($\text{PaCO}_2 <32$ mmHg)

Sepsis es cualquier infección documentada o sospechada que cumple además dos o más de los siguientes criterios:

- temperatura $>38,3^{\circ}\text{C}$ ó $<36^{\circ}\text{C}$
- leucocitosis ($12.000/\text{mm}^3$) o leucopenia ($<4.000/\text{mm}^3$) o $>10\%$ de células inmaduras
- taquicardia (>90 latidos/minuto)
- taquipnea (>30 respiraciones/minuto) o hiperventilación ($\text{PaCO}_2 <32$ mmHg)
- alteración aguda del estado mental (Glasgow <14)
- glucemia plasmática >110 mg/dl (en ausencia de diabetes)
- niveles plasmáticos altos de proteína C reactiva o procalcitonina

La sepsis siempre va a estar asociada a bacteriemia o fungemia, pero la bacteriemia o fungemia no siempre se va a deber a la presencia de sepsis.

Consideramos sepsis grave a un episodio de sepsis con hipoperfusión tisular y/o hipotensión y/o disfunción orgánica aguda.

Consideramos shock séptico a un episodio de sepsis con hipotensión refractaria a reposición de fluidos.

Los conceptos de sepsis, sepsis grave y shock séptico, para este trabajo, han sido tomados de las Conferencias Internacionales de Definiciones de la Sepsis de 1991 y 2001 (ACCP/SCCM, 1992; Levy y cols, 2003).

Otros conceptos:

- Hipoperfusión tisular, hiperlactacidemia (>3 mmol/l o 24 mg/dl), oliguria (diuresis $<0,5$ ml/kg/h durante al menos 2 h)
- Hipotensión, corresponde a una tensión arterial sistólica <90 mmHg, tensión arterial media <65 mmHg o descenso sobre la tensión arterial sistólica habitual >40 mmHg

Revisamos las historias clínicas de los episodios-pacientes y registramos el diagnóstico final emitido por el médico intensivista; estableciendo las siguientes categorías diagnósticas:

- Sepsis clínica, cuando se cumplieron los criterios de sepsis descritos anteriormente, pero no se consiguió aislar el microorganismo en sangre.
- Sepsis probada, cuando se cumplieron dichos criterios de sepsis, y además se confirmó con el aislamiento de uno o varios microorganismos en la sangre del paciente.

Para la evaluación de los resultados, en este trabajo, el término “diagnóstico final de sepsis” comprenderá los conceptos de sepsis clínica y sepsis probada.

- Se consideró sepsis descartada cuando finalmente se determinó clínica y/o microbiológicamente, que los criterios de SRIS no fueron debidos a una infección.

En cuanto a los resultados microbiológicos, consideramos:

- Resultado concordante, cuando coincide el resultado de ambos test *SeptiFast* (SF) y hemocultivo (HC). Puede ser concordante negativo (cuando los resultados de ambas

técnicas son negativos) o concordante positivo (cuando resultan ambas técnicas positivas e identifican el mismo microorganismo)

- Resultado discordante, cuando ambas técnicas *SF* y *HC* han sido positivas, pero identifican distintos microorganismos.

3.3. Hemocultivo

Para cada paciente, se obtienen 2 sets (tomas) de hemocultivos. Se extraen de 10 a 20 ml de sangre para cada set, inoculándolos en botes Plus Aerobio/F y Plus Anaerobio/F para su procesamiento en Bactec-9240® (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, MD, EUA). Bactec-9240® es un sistema automático (figura 1), de agitación continua, que detecta el CO₂ producido por el metabolismo bacteriano al reaccionar con un material fluorescente situado en el fondo del frasco del hemocultivo.



Figura 1.- Sistema Bactec-9240® (Becton Dickinson)

Los fotosensores miden el nivel de fluorescencia, realizando una lectura cada 10 minutos. Cuando el sistema automático señala un bote como positivo, se aspira asépticamente caldo del frasco y se deposita una gota en un portaobjetos para realizar una tinción de Gram. Por otro lado, si el material aspirado corresponde al bote aerobio, se subcultiva en agar sangre

(bioMérieux, Durham, NC, EUA) y agar chocolate (bioMérieux, Durham, NC, EUA) que se incuban a 35-37° C en atmósfera con 5% de CO₂; si corresponde al bote anaerobio, se subcultiva en agar sangre, agar chocolate y agar Schaedler (bioMérieux, Durham, NC, EUA) que se incubarán a 35-37° C en atmósfera aerobia con 5% de CO₂ y atmósfera anaerobia respectivamente. Teniendo en cuenta la morfología de los microorganismos observada en la tinción de Gram, se realizan además subcultivos en medios específicos; por ejemplo, MacConkey (bioMérieux, Durham, NC) si se observan Bacilos Gram Negativos o agar Sabouraud con glucosa (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania) y/o CHROMagar Candida (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania) si se observan levaduras.

La identificación de los microorganismos y la determinación de la sensibilidad a los distintos antimicrobianos, se realizó mediante el sistema VITEK® 2 (bioMérieux, Durham, NC, EUA). El hemocultivo se consideró negativo, si a los 5 días de incubación, el sistema Bactec-9240® no detectó crecimiento en los botes de hemocultivo.

3.4. Muestra de sangre para LightCycler® SeptiFast

Para la técnica molecular LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE} (SeptiFast), se recogieron 3 ml de sangre adicionales inmediatamente después del primer set de hemocultivo (HC) de cada paciente, se extrae la sangre por sistema de vacío en tubos que contenían K₂ EDTA (BD Vacutainer® Diagnostic Systems, Franklin Lakes, NJ, EUA); y se enviaron al laboratorio, junto a los botes de HC correctamente identificados y rellena la hoja de petición. Si se iba a aplazar su procesamiento, los tubos de sangre con EDTA para SF se mantuvieron refrigerados entre 4-6° C por un máximo de 3 días. Si necesitábamos conservar esta muestra para su reanálisis, la congelamos a -40° C. Se rechazaron las muestras mal identificadas y/o que teníamos datos de no haberse tomado simultáneamente al hemocultivo.

3.5. Cultivos de otras muestras biológicas

Revisamos en las historias clínicas de los pacientes, y registramos en nuestra base de datos, la existencia y los posibles resultados de cultivos microbiológicos de otras muestras diferentes al hemocultivo objeto de estudio, y/o pruebas microbiológicas como antígeno de neumococo o antígeno de galactomanano. Tenemos en cuenta aquellos cultivos y/o pruebas microbiológicas que se hubiesen realizado en los tres días anteriores o posteriores a la fecha de extracción de las muestras sanguíneas. Estas muestras, habrían sido extraídas según la sospecha del posible foco origen de la sepsis, pudiendo ser: orina, esputo, aspirado traqueo-bronquial, puntas de catéteres, exudados de heridas, líquido peritoneal, líquido cefalorraquídeo, etc; así como recogida de orina para detección de antígeno de neumococo (BinaxNOW® *S. pneumoniae* urinary antigen test; Binax, Portland, ME, EUA), en el caso de sospechar neumonía o suero para detección del antígeno de galactomanano (Platelia® *Aspergillus* EIA; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), en el caso de sospechar una aspergilosis invasiva.

3.6. PCR múltiple a tiempo real SeptiFast

El test SeptiFast, es una técnica molecular basada en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR); y consta de tres pasos:

3.6. 1.- Lisis mecánica, extracción y purificación del ADN.

3.6. 2.- Amplificación del ADN y detección de los productos de PCR

3.6. 3.- Identificación de los microorganismos y controles.

Todo el procesamiento de las muestras y preparación de la reacción en cadena de la polimerasa, se realizó en campana de flujo laminar para minimizar el riesgo de contaminación en la manipulación. Además, se utilizaron guantes estériles libres de talco. Todos los instrumentos utilizados estaban conservados en condiciones de esterilidad o fueron descontaminados previamente de ADN mediante radiación ultravioleta.

3.6.1. Lisis mecánica, extracción y purificación del ADN

En primer lugar se realiza una lisis mecánica para romper las membranas celulares, como paso común y previo a la extracción de los ácidos nucleicos. Para ello, se utilizaron 1,5 ml de sangre total de los pacientes seleccionados, obtenida de sus correspondientes tubos con EDTA. Se procesa mediante *SeptiFast Lys Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) en el sistema rotor *MagNA Lyser* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Homogeneizamos 1,5 ml de sangre durante 30 minutos en un agitador; y posteriormente, pasamos este volumen de sangre a un tubo de *SeptiFast Lys Kit* (que contiene partículas de cristal/cerámica para provocar la ruptura de las membranas, para continuar con la lisis en el rotor *MagNA Lyser* (70 segundos 7000 rpm).

Procesamos de la misma forma un volumen igual (1,5 ml) del control negativo que provee el *LightCycler® SeptiFast kit*, para asegurar la ausencia de contaminación en la manipulación de las muestras.

3.6.1.1. Extracción del ADN

La extracción de ácidos nucleicos recomendada por el fabricante es una extracción manual mediante *SeptiFast Prep Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), que describimos más adelante; pero nosotros pretendemos evaluar este test *SF* utilizando una extracción automatizada mediante el sistema *MagNA Pure Compact* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Tanto en la extracción manual como en la automatizada, se utilizaron un control negativo (CN) por ensayo, para asegurar la ausencia de contaminación, y un control interno (CI) por cada muestra procesada, para eliminar los posibles falsos negativos. El CN y CI utilizados, fueron los que provee el *LightCycler® SeptiFast Test M^{GRADE}*.

3.6.1.1.1. Extracción manual del ADN

Después de la lisis, el ADN bacteriano está preparado para su extracción utilizando el *SeptiFast* Prep Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Esta es la técnica recomendada por el fabricante y se realiza con 1 ml de lisado obtenido en el paso anterior.

Las muestras lisadas se incubaron a 56° C durante 15 minutos en agitación suave, con una proteasa K y un tampón de lisis (que contiene tiocianato de guanidina, Triton X-100 y Tris-HCl) para liberar los ácidos nucleicos y a su vez proteger el ADN liberado de las ADNasas de la sangre completa. Se introdujo un control interno (CI), 10 µl en cada muestra junto con el tampón de lisis. El CI consiste en una mezcla de moléculas de ADN sintético de doble cadena; con las secuencias complementarias donde se unirán los cebadores de la misma forma que en las secuencias diana pero en distintos lugares de unión, lo que permitirá la diferenciación del CI amplificado y el amplicón específico de la diana. Pasado el tiempo de incubación, se añade el tampón de unión y transferimos la mezcla a una columna de centrifugación que contenía una fibra de vidrio a modo de filtro, para centrifugarla a 5000 rpm durante 2 minutos. El ADN genético humano y las sondas de ADN bacteriano y fúngico de la muestra se adsorben a la superficie de la fibra de vidrio (unión a la matriz) (figura 2). Se procede entonces a la retirada de los posibles inhibidores (sales, proteínas, fragmentos celulares) mediante lavado (5000 rpm durante 2 minutos) con 1800 µl de tampón de retirada de inhibidores (que contiene HCl de guanidina, etanol y Tris-HCl) y otro lavado adicional a 5000 rpm durante 10 minutos con 1600 µl de tampón de lavado (que contiene cloruro sódico, etanol y Tris-HCl). Una vez adsorbidos los ácidos nucleicos en la columna, incubamos la misma durante 5 minutos con 100 µl de tampón de elución precalentado a 70° C y centrifugamos a 5000 rpm durante 2 minutos, para eluir los ácidos nucleicos. Es un proceso con muchos pasos (figura 2), susceptible de sufrir contaminación en su manipulación. Obtuvimos un volumen final de elución de 300 µl.



Figura 2.- Pasos de la extracción manual, desde la lisis mecánica de la muestra hasta la purificación del ADN

3.6.1.1.2. Extracción automatizada del ADN

Es la que realizamos en la segunda etapa de nuestro estudio, mediante MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) en el sistema MagNA Pure Compact (figura 3). Este procedimiento requiere sólo 400 µl de volumen inicial; compuesto de 215 µl de lisado, 180 µl de MagNA Pure Bacteria Lysis Buffer y 5 µl de control interno que se pipetea en sus cartuchos de reacción correspondientes (figura 3.dcha), que suministra el kit MagNA Pure.



Figura 3.- Aparato de extracción automática MagNA Pure Compact ® (izquierda) y cartucho de reactivos (derecha)

El sistema MagNA Pure Compact presenta 6 protocolos optimizados distintos de purificación-extracción de ácidos nucleicos, a seleccionar dependiendo del tipo de material genético que deseamos obtener. Nosotros utilizamos para este experimento, el protocolo

DNA_Bacteria_V3_1 y seguimos las instrucciones del fabricante. Obtuvimos un volumen final de elución de 200 μ l.

3.6.2. Amplificación del ADN y detección de los productos de PCR

3.6.2.1. Amplificación del ADN

Se realiza una amplificación por PCR a tiempo real de las dianas de ADN en tres reacciones paralelas (Gram Positivos, Gram Negativos y hongos) y posterior detección de los productos de PCR por hibridación con sondas específicas.

Previo a este paso de amplificación del ADN, realizamos a partir de la segunda etapa de nuestro estudio, una dilución al 1:3 del extraído en tampón de elución.

La amplificación del ADN extraído tanto manualmente como de forma automática, se realizó mediante LightCycler® SeptiFast kit en el sistema LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El sistema LightCycler® 2.0 (figura 4) permite el procesamiento simultáneo de 10 muestras, incluyendo un control positivo y un control negativo en cada ensayo; para detección de bacterias Gram Positivas (GP), bacterias Gram Negativas (GN) y hongos (F). En resumen, se añaden tres alícuotas de 50 μ l del eluido de ADN de nuestras muestras, a 50 μ l de la mezcla maestra (MM) y se procesan en los capilares del LightCycler® 2.0.



Figura 4.- Aparato LightCycler® 2.0 para amplificación molecular con carruseles para los capilares

Todo este proceso se realiza en bloque refrigerado (figura 5). La distribución de los reactivos y muestras en el bloque refrigerado es la siguiente de izquierda a derecha:

- Vial 1b: solución de dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato) y tampón de reacción
- Vial 1a: Taq polimerasa
- Mezcla de detección (DM): mezcla de cebadores y sondas de cada grupo de microorganismos G+ (bacterias Gram Positivas), G- (bacterias Gram Negativas) y F (hongos)

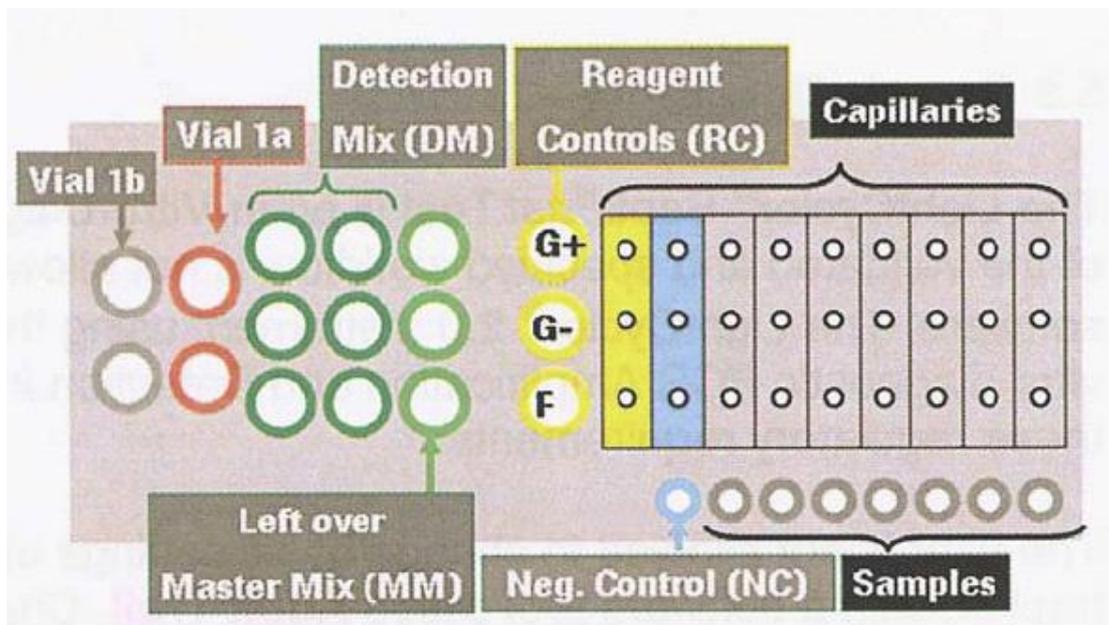


Figura 5.- Distribución de los reactivos (mezcla de detección, mezcla maestra, controles) y muestras en el bloque refrigerado de SeptiFast

- Mezcla maestra (MM) para cada grupo de microorganismos G+, G- y hongos
- Control de reacción (RC): control positivo
- Control negativo (NC)
- Capilares para mezcla de 50 µl de eluido de las muestra con 50 µl de reactivo

La diana de ADN se amplifica en tres reacciones paralelas (bacterias Gram Positivas, bacterias Gram Negativas y hongos) en sus capilares correspondientes, utilizando una Taq-Polimerasa Hot start. Esta polimerasa, es una ADN polimerasa modificada químicamente

inactiva a temperatura ambiente, y que comienza a activarse a altas temperaturas (por ejemplo, tras una etapa de pre-incubación a 95° C durante 5-10 minutos).

Los 25 microorganismos capaces de ser detectados mediante LightCycler® *SeptiFast* en las tres reacciones correspondientes, se detallan en la tabla 1. Este test, utiliza la región ITS (espaciador del transcrito interno) como diana específica para la detección y diferenciación de patógenos bacterianos y fúngicos. La información que ofrece la región ITS como diana, fue descrita en las patentes WO 2004/052606, WO 2004/053156, WO 2005/075673 y WO 2006/035062. La región ITS es un fragmento de ARN no funcional, situado entre ARN ribosómico (rARN) estructural en un transcrito precursor común. Leído de 5' a 3', este transcrito precursor de rARN en células eucariotas (hongos) contiene: la secuencia 5 transcrita externa (5 ETS), también 18S rARN, ITS1, 5.8S rARN, ITS2, 28S rARN y la 3 ETS. Durante la maduración del rARN, los fragmentos ITS y ETS se escinden y degradan rápidamente como productos de maduración no funcionales. Las secuencias diana están localizadas entre las regiones de ADN ribosómico 16S y 23S de bacterias Gram Positivas (GP) y bacterias Gram Negativas (GN), y entre las regiones 18S y 5.8S del ADN ribosómico de los hongos (F).

La comparación de secuencias de la región ITS, se utiliza en taxonomía y filogenia molecular debido por un lado, al alto número de copias existentes de genes de rARN; y por otro, al alto grado de variación entre especies relacionadas cercanas. La figura 6 muestra las distintas partes de los genes que codifican para el ARN ribosómico.

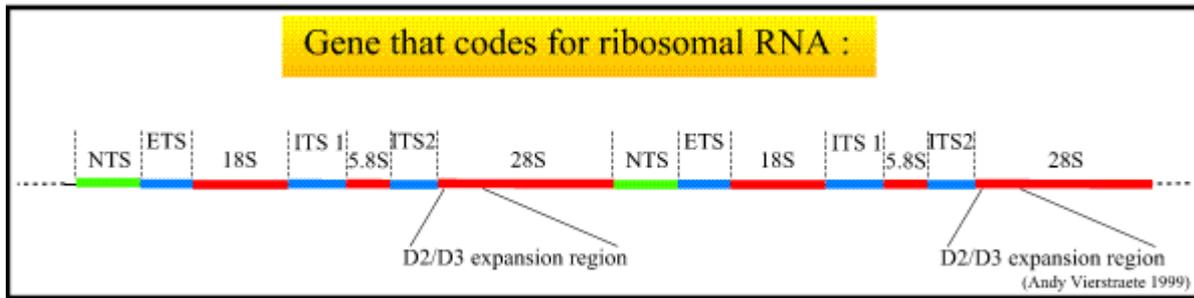


Figura 6.- Regiones ITS. Genes que codifican para el ARN ribosómico

En células eucariotas, hay entre 50 y 500 copias idénticas de genes en los 10 millones de ribosomas. Estos genes son tandem colocados pertinentemente en grandes bloques en los cromosomas y están separados unos de otros mediante el espaciador no transcrito (NTS). Estos genes se transcriben en un precursor de ARN a partir del cuál se obtienen las moléculas de rARN maduro. En este proceso se elimina el espaciador del transcrito externo (ETS), el ITS 1 y el ITS 2 del precursor de ARN, resultando 3 moléculas de rARN: 18S, 5.8S y 28S.

Las secuencias diana de las distintas especies cubiertas por este ensayo se amplificaron mediante sus respectivos cebadores genéricos. El fundamento del test incluyendo los cebadores y las sondas de hibridación específicas para las regiones ITS de cada especie, está descrito en las patentes referidas anteriormente: WO 2004/053148 y WO 2004/053156. Se detallan las condiciones de temperatura, número de ciclos y tiempos de las distintas etapas de la amplificación de la PCR en la tabla 2.

Tabla 2.- Condiciones de temperatura, número de ciclos y tiempos de las distintas etapas de la amplificación de la PCR mediante LightCycler® SeptiFast

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Cambio de temperatura (°C/s)
Perfil de amplificación:			
Pre-Incubación			
Descontaminación	40	5 min	20,0
Activación enzimática	95	10 min	20,0
Pre-amplificación (15 ciclos)			
Desnaturalización	95	10 s	3,0
Anillamiento	58	50 s	20,0
Elongación	72	40 s	3,0
Amplificación (30 ciclos)			
Desnaturalización	95	10 s	3,0
Anillamiento	50	50 s	20,0
Elongación	72	40 s	3,0
Perfil de la curva de fusión:			
Desnaturalización	95	60 s	20,0
Anillamiento	40	60 s	20,0
Fusión	80	0 s	0,1
Enfriamiento:	40	30 s	

3.6.2.2. Detección de los productos de PCR

Durante la reacción de la PCR, se detecta el aumento de productos específicos: utilizando sondas de hibridación marcadas con fluoresceína (HybProbe) y midiendo continuamente de forma automatizada la fluorescencia emitida. Todas las sondas se han diseñado para distinguir las especies de microorganismos detectadas en el mismo canal del instrumento, ayudándonos de las temperaturas de fusión (TM) específicas de los correspondientes amplicones. Las temperaturas de fusión dependen de la longitud del fragmento, de la composición de su secuencia y del grado de homología entre la sonda de hibridación y la diana de ADN. Las

sondas marcadas mediante fluoresceína, forman híbridos con las secuencias internas de los fragmentos amplificados durante la fase de anillamiento. La fluorescencia emitida, que tiene como fundamento la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), se mide en uno de los cuatro canales de detección del sistema LightCycler® 2.0. FRET, es un mecanismo de transferencia de energía entre cromóforos. En el procesamiento de la PCR, se añaden a la mezcla de reacción junto con los cebadores de la PCR, dos secuencias oligonucleotídicas específicas de sondas marcadas con distintos cromóforos (donante y receptor) (figura 7.A). Estas sondas HybProbe, se hibridan con las secuencias diana en el fragmento del ADN amplificado, en un acoplamiento dipolo-dipolo, y así conseguir la máxima proximidad de los dos cromóforos. El cromóforo donante (fluoresceína) es excitado por una fuente LED de luz azul, y la energía emitida por el donante, excita al cromóforo receptor ligado a la segunda sonda HybProbe; que entonces emite luz fluorescente a una longitud de onda distinta (figura 7.B). La cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN diana, generado durante el proceso de la PCR.

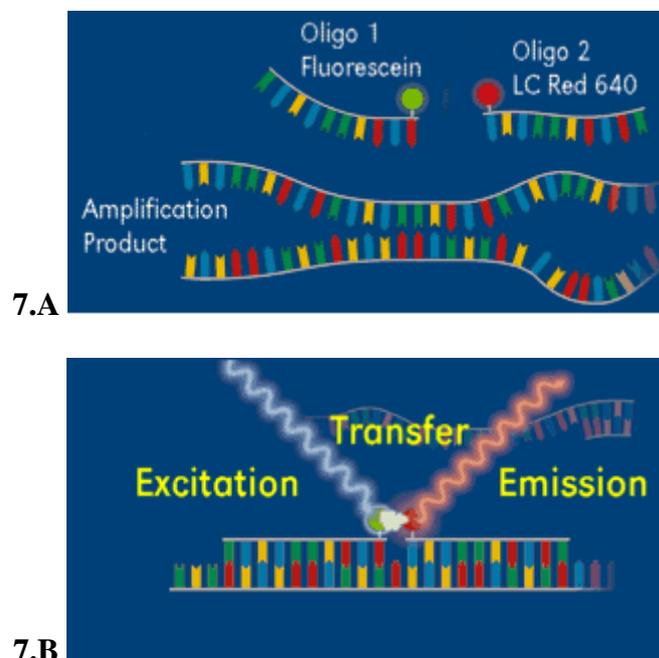


Figura 7.- Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (FRET). Figura 7.A.- Adición de dos secuencias oligonucleotídicas marcadas con cromóforos. Figura 7.B.- Excitación, transferencia y emisión de energía entre los cromóforos

Una vez completada la amplificación, se analizan las curvas de temperaturas de fusión para asegurar la especificidad de los productos obtenidos (figura 8).

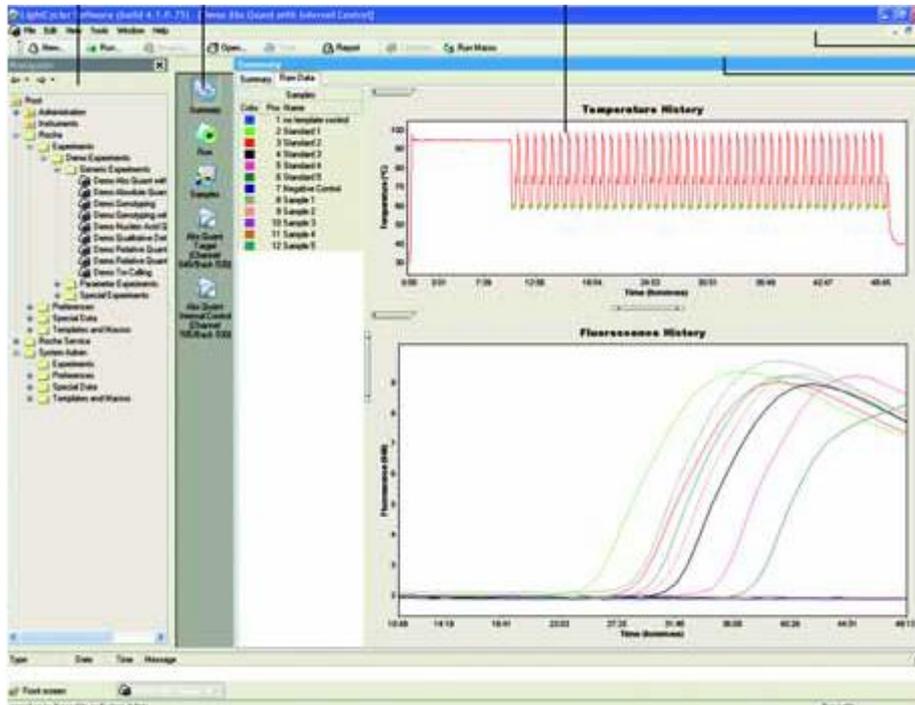
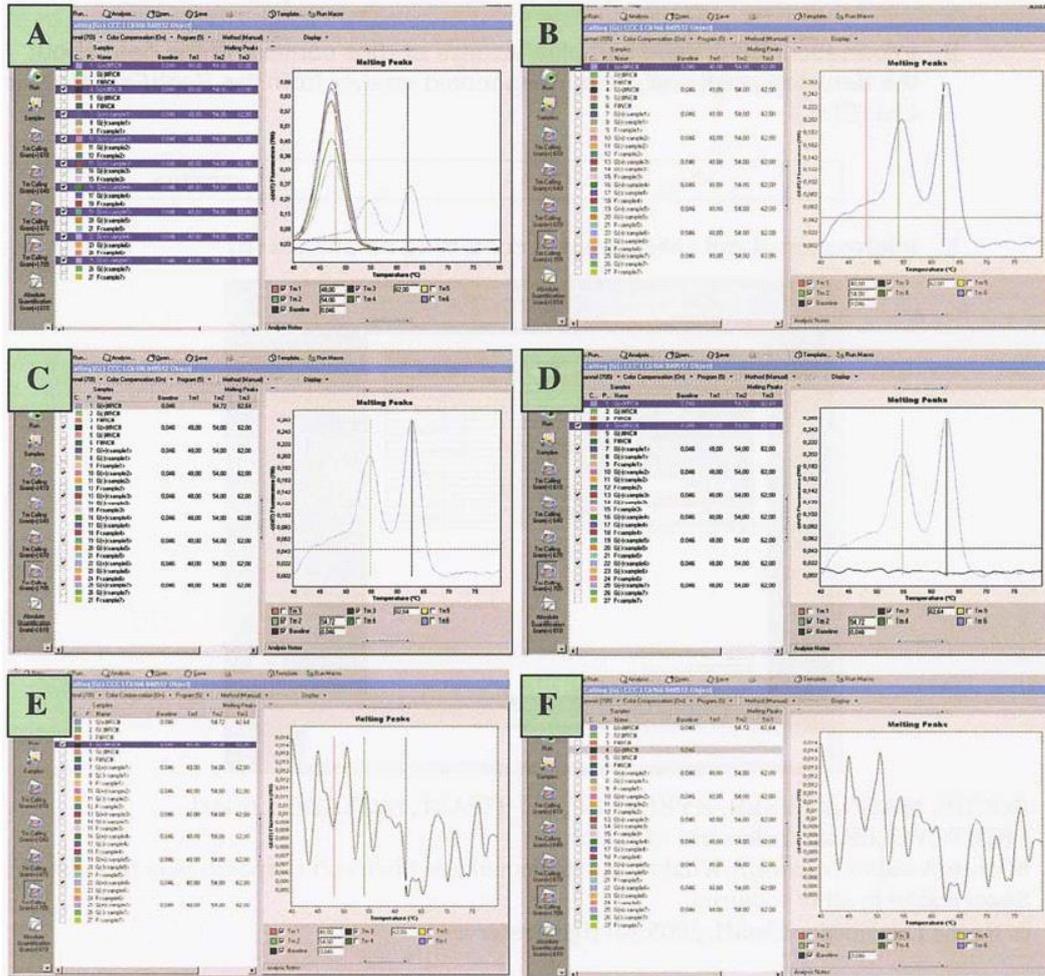


Figura 8.- Curvas de temperaturas de fusión en la amplificación de la PCR de *SeptiFast*

3.6.3. Identificación de los microorganismos y controles

Los amplicones resultantes de las reacciones de PCR en las muestras y controles, se analizaron mediante el software de identificación de patógenos (SIS) *SeptiFast* Identification Software (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany); específicamente diseñado para la interpretación de las temperaturas de fusión de estos productos de PCR (figuras 9.A-F).



Figuras 9.A-F.- Interfaz del software de identificación de patógenos (SIS; SeptiFast Identification Software, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)

Completado cada ensayo en el equipo LightCycler® 2.0, todas las curvas de fusión se marcan manualmente con líneas verticales deslizantes. Una vez que se fija una línea, el software calcula automáticamente el valor de la temperatura de fusión y la correspondiente altura del pico. Este proceso se repite para cada uno de los cuatro canales de detección (canal 610, canal 640, canal 670, canal 705) y para cada uno de los tres tipos de microorganismos: G (+) = Gram Positivos, G (-) = Gram Negativos y Fungi = hongos (figura 10). El tiempo de respuesta en total al clínico, mediante este método, es de aproximadamente 6 horas con extracción manual y de 4 horas con extracción automatizada del ADN mediante MagNA Pure Compact.

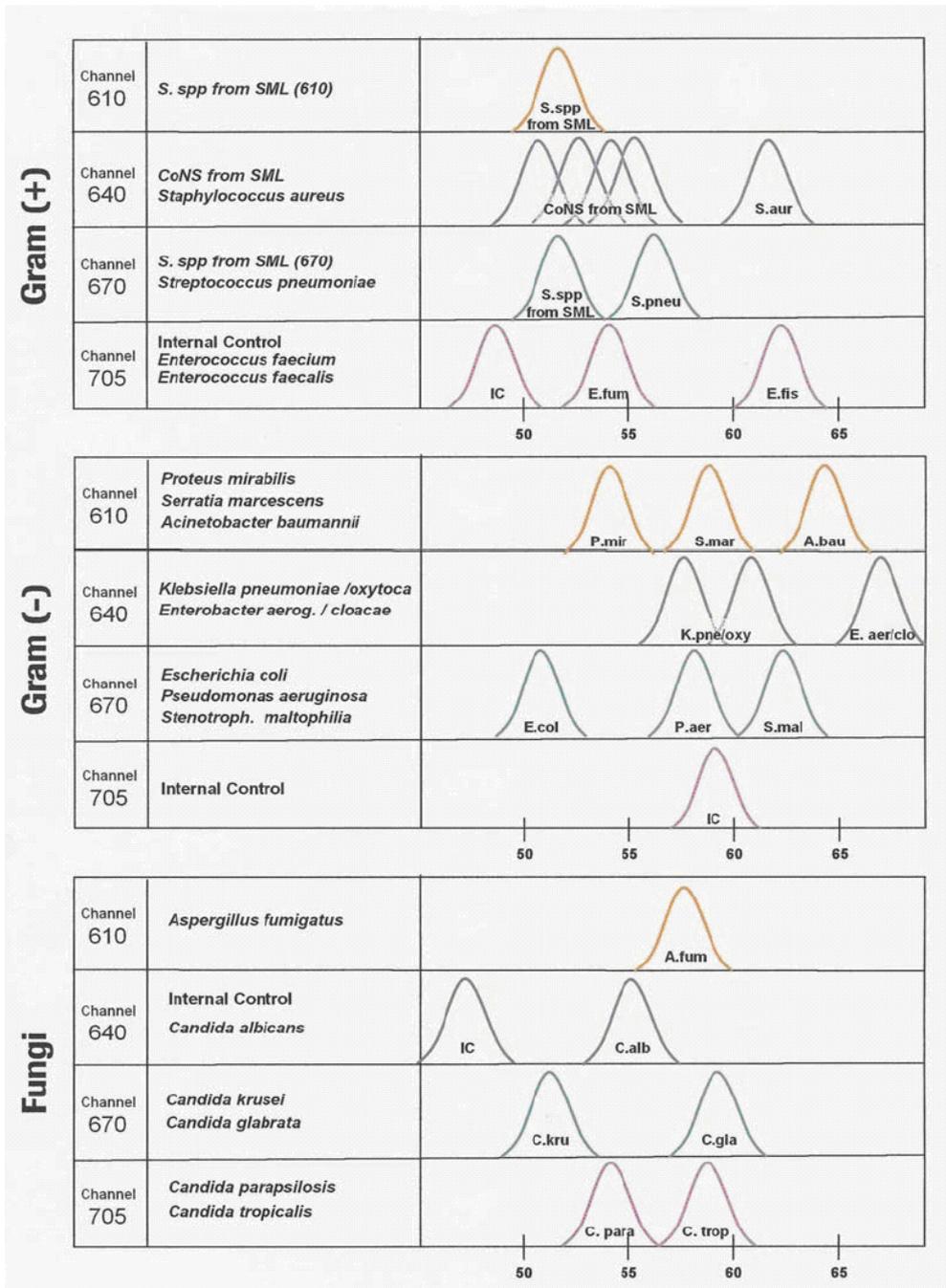


Figura 10.- Distribución de las curvas de fusión y sus respectivos canales de detección (canal 610, canal 640, canal 670, canal 705) para los distintos microorganismos G (+) = Gram Positivos, G (-) = Gram Negativos, Fungi = hongos y los controles internos (IC)

3.7. Comprobación de la sensibilidad mínima analítica

Para realizar una comprobación de la sensibilidad mínima analítica del test, obtuvimos muestras sanguíneas procedentes de 2 voluntarios sanos (sin evidencias clínicas ni analíticas de sepsis) en tubos con EDTA; y se inocularon con cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *C. krusei*, a concentraciones finales de 100, 30 y 3 UFC/ml. Las cepas se obtuvieron de cultivos puros microbiológicos convencionales previos, preparándose alícuotas para ser almacenadas congeladas a -80° C hasta su uso. El día de la comprobación de la sensibilidad mínima analítica del test, se descongeló una alícuota de cada especie y se determinó y ajustó la concentración de bacterias y hongos respectivamente, a partir de una dilución en suero salino fisiológico al 0,5 en la escala de Mac Farland. Realizamos diluciones a partir de la inicial al 0,5 Mac Farland, esta vez en sangre completa con EDTA de los voluntarios sanos, hasta obtener el contaje deseado de 100, 30 y 3 UFC por ml. Para obtener dichas concentraciones finales deseadas y asegurar así mismo que partimos de cultivos puros de las cepas congeladas, las sembramos previamente e incubamos en agar sangre y Mac Conkey para el caso de *S. aureus* y *E. coli*, y en agar sangre y agar Sabouraud para *C. krusei*.

Estas diluciones de 100, 30 y 3 UFC/ml fueron posteriormente procesadas de la misma manera que las muestra sanguíneas de los pacientes incluidos en el estudio; siguiendo las instrucciones del fabricante del test, comenzando con una lisis y extracción manual de los ácidos nucleicos hasta llegar a la identificación automatizada de las especies microbianas que habíamos inoculado. Añadimos también en esta comprobación de la sensibilidad mínima analítica del test, una muestra de sangre sin inóculo como control negativo del ensayo.

3.8. Desarrollo del estudio

Comenzamos el estudio de evaluación de nuestra técnica de PCR *SeptiFast* para la detección de bacteriemia y fungemia en pacientes críticos: comprobando, como hemos descrito en su apartado correspondiente, la sensibilidad mínima analítica de la técnica.

Una vez comprobada la sensibilidad mínima analítica, analizamos un total de 44 muestras procedentes de 33 pacientes utilizando la extracción manual propuesta por el fabricante, mediante *SeptiFast* Prep Kit. Conservamos los extraídos a -40° C.

Posteriormente ensayamos para la amplificación, una dilución al 1:3 del extraído en tampón de elución; para evitar las posibles inhibiciones del control interno. Reanalizamos previamente 3 de las muestras del primer periodo que obtuvieron como resultado: *SF* negativo y *HC* positivo, y comparamos el resultado con el obtenido amplificando el extraído sin diluir. Analizamos después, mediante esta variante del método recomendado por el fabricante: 62 muestras de 55 pacientes.

Comenzamos con la variante de extracción automatizada mediante el sistema *MagNA Pure Compact*. La evaluamos preliminarmente, analizando en primer lugar la sensibilidad mínima analítica de la misma manera en que lo hicimos al inicio de nuestro estudio para la extracción manual: realizamos diluciones de *S. aureus*, *E. coli* y *C. krusei* a concentraciones de 100 UFC/ml, 30 UFC/ml y 3 UFC/ml. Posteriormente, reanalizamos 15 muestras de pacientes que habíamos ensayado mediante extracción manual y diluyendo al 1:3; comparando los resultados obtenidos mediante ambos tipos de extracción de ácidos nucleicos entre sí y con los de sus respectivos *HC*.

Por último, evaluamos la técnica molecular *SeptiFast* con la variante de extracción automatizada; comparando los resultados de 264 muestras de 237 pacientes, con lo obtenido en

los hemocultivos, utilizando también para su evaluación el diagnóstico final de sepsis clínica o probada/sepsis descartada como criterio de referencia.

3.9. Interpretación de los resultados

Es relativamente frecuente, que la flora normal cutánea del enfermo y/o del personal que realice la toma del hemocultivo (HC) pueda contaminar la sangre en el momento de la extracción; o que esta contaminación suceda en el laboratorio, durante la manipulación de los hemocultivos. De igual forma podemos hallar resultados anómalos o difíciles de interpretar, por la posibilidad de una contaminación, durante la extracción de la sangre para la PCR o en la fase de extracción-purificación del ADN. Como decimos, a veces es difícil distinguir entre un verdadero positivo con valor clínico y un microorganismo contaminante, y sobre todo, en aquellos casos donde el foco de infección podría ser el catéter cardio-vascular o el paciente tiene sospecha de endocarditis infecciosa. Esto ocurre con frecuencia cuando se detectan *Estafilococos coagulasa negativa (SCN)*, que suelen ser los más frecuentemente contaminantes en hemocultivos.

Se consideran microorganismos potencialmente contaminantes: *Estafilococos coagulasa negativa (SCN)*, *Micrococcus spp.*, *Streptococos del grupo viridans*, *Corynebacterium spp.*, *Bacillus spp.* o *Propionibacterium acnes*. Otros microorganismos como *Aspergillus spp.*, *Pseudomonas spp.* o *Acinetobacter spp.* pueden ser también contaminantes ambientales de las técnicas moleculares. En algunas situaciones estos microorganismos pueden ser responsables de auténticas bacteriemias y no ser meras contaminaciones; por tanto hay que tener en cuenta varios parámetros. Para diferenciar los verdaderos positivos de los contaminantes:

- evaluamos la existencia en el paciente de posibles factores predisponentes como inmunodepresión o dispositivos protésicos, y características clínicas del episodio como

ausencia de otro foco que justifique la clínica, aspecto del punto de punción de la vía central o presencia de flebitis

- investigamos el crecimiento del microorganismo en más de un hemocultivo y/o muestras procedentes del foco sospecha de causar la infección primaria (esputo, orina, exudados y/o fluidos biológicos) tomados en el rango de dos días anteriores o posteriores a la fecha de extracción de nuestra muestra sanguínea
- y tenemos en cuenta el tiempo de detección del microorganismo en el caso del HC, ya que los falsos positivos suelen requerir períodos de incubación más prolongados (Marco y Sancho, 2007).

La distinción entre patógeno y contaminante fue también determinada en *SeptiFast*, analizando las curvas de amplificación mediante los puntos de corte obtenidos utilizando el software de identificación de *SeptiFast* (SIS) del LightCycler®. El punto de corte representa el punto en el ciclo de amplificación, donde la curva de amplificación intersecciona con la línea base de detección (umbral de detección). Las líneas base de detección, están definidas previamente para cada módulo en la macro de *SeptiFast*; habiendo sido establecidas mediante el desarrollo de la técnica por el fabricante.

3.10. Análisis estadístico de los datos

Para el análisis estadístico de los resultados, elaboramos una tabla usando el programa Microsoft® Office Excel 2007 en la que incluimos datos relativos a: edad, sexo, días de permanencia en UCI, presencia o no de temperatura corporal $>38,3$ °C o <36 °C, presencia o no de leucocitosis/leucopenia, índices de gravedad APACHE II/SOFA, niveles sanguíneos de proteína C reactiva y procalcitonina, tratamiento antimicrobiano previo, resultado de *SeptiFast*, resultado del hemocultivo y diagnóstico final de sepsis clínica/probada o sepsis descartada. Utilizamos el programa para Windows® IBM SPSS v.23.0 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, EUA)

para los cálculos de los distintos parámetros estadísticos. Hallamos la concordancia-índice kappa de Cohen de la técnica *SF* respecto al HC como criterio de referencia; considerando los resultados contaminantes de ambos métodos como negativos. Calculamos también concordancia-índice kappa entre ambas técnicas con respecto al diagnóstico final (DF) como criterio de referencia, de igual forma consideramos los resultados contaminantes de ambos métodos como negativos. La escala de valoración utilizada para el índice kappa, fue la propuesta por Landis y Koch (Landis y Koch, 1977): <0,2 Muy baja; 0,21-0,4 Baja; 0,41-0,6 Moderada; 0,61-0,8 Buena; 0,81-1 Excelente.

Determinamos el grado de relación entre todas las variables recogidas en la tabla respecto al diagnóstico final de sepsis clínica/probada o sepsis descartada (DF). Para ello, se realizó un análisis bivariante y se compararon las variables mediante la prueba exacta de Fisher o chi-cuadrado (χ^2). Para ser considerado estadísticamente significativo, utilizamos un valor de $p < 0,05$.

Hallamos también la exactitud diagnóstica de *SF* y HC respecto a DF: Sensibilidad, Especificidad, Valor predictivo positivo (VPP), Valor predictivo negativo (VPN) e Intervalo de confianza del 95% (IC₉₅) para cada uno de los índices.

4. RESULTADOS

4.1. Sensibilidad mínima analítica de la técnica LightCycler® SeptiFast

Evaluamos en primer lugar la sensibilidad de nuestra técnica molecular *SF*, utilizando la extracción manual siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta evaluación arrojó resultados positivos para todas las concentraciones de *S. aureus* y *E. coli*, habiéndose inoculado en sangre de donantes sanos concentraciones de los respectivos microorganismos de 100, 30 y 3 UFC/ml. Para *C. krusei*, inoculada igualmente en sangre de donantes sanos a concentraciones de 100, 30 y 3 UFC/ml, obtuvimos positivas las dos primeras concentraciones ensayadas y negativa la concentración de 3 UFC/ml. La muestra de sangre sin inóculo, como control negativo, resultó negativa.

Evaluamos también la sensibilidad de nuestra técnica *SF*, utilizando el método automático para la extracción de los ácidos nucleicos: MagNA Pure Compact. Obtuvimos igualmente resultados positivos para todas las diluciones de *S. aureus*, *E. coli* y *C. krusei*, excepto para la concentración de 3 UFC/ml de *C. krusei*, que resultó negativa. La muestra de sangre sin inóculo, como control negativo, resultó negativa.

4.2. Evaluación de la técnica SeptiFast con Extracción manual

Utilizando la extracción manual recomendada por el fabricante, analizamos 44 muestras; de las que 38 (86.36%) fueron negativas tanto por *SF* como en sus respectivos hemocultivos (HC). Dos muestras resultaron positivas tanto en la técnica *SF* como en sus HC e identificaron los mismos microorganismos (*E. coli* y *Staphylococcus* coagulasa-negativo). Una de las muestras fue *SF* positiva y negativa mediante HC; detectándose *S. pneumoniae* que fue confirmado por la detección del antígeno frente a neumococo en una muestra de orina del paciente. Tres de las

muestras ofrecieron resultados negativos para *SF*, siendo sus respectivos hemocultivos positivos (2 *E. coli*, 1 *S. agalactiae*). Resumimos estos resultados en la tabla 3.

Tabla 3.- Resumen de resultados de las evaluaciones de las distintas variantes ensayadas preliminarmente, de la técnica SeptiFast (*SF*) respecto al hemocultivo (*HC*)

Variante SeptiFast	Episodios (Pacientes)	RESULTADOS (n)					
		SF-/HC-	SF+/HC+	SF-/HC+	SF+/HC-	SF/HC discordantes	No en SML
Extracción manual	44 (33)	38	2	1	3	0	0
Dilución del extraído	66 (59)	43	10	8	1	3	1
Extracción automática	15 (15)	11	3	1	0	0	0

Resultados *SF* negativo y *HC* negativo (*SF*-/*HC*-), resultados *SF* positivo y *HC* positivo (*SF*+/*HC*+), resultados *SF*/*HC* discordantes (positivos por ambas técnicas, con identificación de distintos microorganismos), No en SML (no incluidos en la lista maestra de *SF*)

4.3. Evaluación de la técnica SeptiFast con Extracción manual y Dilución del extraído

Ensayamos ahora la técnica *SF*, según las instrucciones del fabricante utilizando una extracción manual, pero diluyendo esta vez el extraído (descrito en el apartado de material y métodos de nuestra tesis) al objeto de reducir posibles inhibiciones en la técnica de PCR. Reanalizamos en primer lugar 4 muestras que habíamos ensayado mediante la extracción manual sin diluir: una que fue negativa por *SF* y también negativa por el hemocultivo (*SF*-/*HC*-) y 3 muestras que habían resultado negativas por *SF* y positivas en sus respectivos hemocultivos (*SF*-/*HC*+). En este ensayo, la muestra *SF*-/*HC*- fue efectivamente concordante negativa de nuevo, y de las muestras *SF*-/*HC*+ obtuvimos 2 resultados concordantes positivos más, con la detección ahora también mediante *SF* de 2 *E. coli*, que habían sido detectados en sus respectivos *HC*. Una de las muestras reanalizadas, ofreció un resultado discordante *SF*+/*HC*+, en el que se identificaron distintos microorganismos mediante *SF* frente a su respectivo *HC*: *C. parapsilosis* mediante *SF* y *S. agalactiae* en el *HC*. Los términos “concordante y discordante”, están definidos en el apartado de conceptos (material y métodos) de esta tesis. La *C. parapsilosis* detectada mediante SeptiFast con extracción manual y diluyendo el extraído, pertenecía a un

varón de 40 años que ingresa en parada cardio-respiratoria por shock hemorrágico tras sangrado de varices esofágicas. Como datos clínico-epidemiológicos presentaba: criterios de SRIS, SOFA/APACHE II de 7/9 respectivamente, antecedentes de hipertensión arterial, consumo de alcohol; y no se disponía de información como diabetes o algún tipo de inmunodepresión. Presentó hepatopatía alcohólica y fue exitus tras 3 días en UCI. Se le tomaron dos hemocultivos el mismo día; en los que se confirma *S. agalactiae*, y se detecta *C. parapsilosis* sólo en uno de ellos mediante *SF*. No se tomaron más muestras para cultivo microbiológico; así pues no podemos confirmar el significado clínico de la *Candida parapsilosis* detectada mediante *SeptiFast*.

Continuamos analizando 62 muestras más, mediante extracción manual y dilución del extraído. Analizamos en total 66 muestras sanguíneas (tabla 3); obteniendo 43 resultados concordantes negativos y 10 concordantes positivos *SF/HC*; siendo el total de resultados *SF* concordantes positivos y negativos con sus respectivos HC 53/66 (80,3%). En 8 de las muestras analizadas, detectamos por *SF* patógenos que no fueron detectados en los HC (2 *A. baumannii*, 2 *S. pneumoniae*, 1 *E. coli*, 1 *A. fumigatus*, 1 *E. faecium*, 1 *E. cloacae*), en 1 muestra se detectó *E. coli* por HC que no fue detectado mediante *SF*, igualmente en un hemocultivo se detectó *Salmonella* spp. que no está incluido en la lista maestra (SML) de microorganismos que detecta *SF*. Finalmente, 3 de las muestras ofrecieron resultados discordantes *SF/ HC* (tabla 3): *S. aureus/E. coli*, *S. aureus+SCN/S. epidermidis*, *C. parapsilosis/S. agalactiae*). En la primera de ellas, habíamos encontrado una incidencia preanalítica: las muestras de HC llegaron al laboratorio separadamente de la muestra sanguínea para *SF*.

4.5. Evaluación preliminar de SeptiFast con Extracción automática frente a la Extracción manual y el hemocultivo

Queríamos probar ahora la variante objeto de nuestro estudio: la técnica *SF* con extracción de ácidos nucleicos mediante el sistema automático MagNA Pure Compact. Evaluamos

preliminarmente este método de extracción automática en 15 muestras sanguíneas que habían sido analizadas diluyendo el extraído. Obtuvimos: 11 resultados concordantes negativos SF/HC (tabla 3) y 3 concordantes positivos (1 *E. coli*, 1 *S. pneumoniae*, 1 *P. aeruginosa*). En una de las muestras analizadas, se detectó *A. fumigatus*, no habiendo sido detectado previamente ni por el método manual ni en su HC. El resultado se confirmó, al identificarse también *A. fumigatus* en una muestra de aspirado traqueo/bronquial del paciente. En esta evaluación preliminar de SF con extracción automática, no obtuvimos resultados discordantes ni resultados SF negativos con HC positivo (tabla 3).

4.6. Evaluación de la técnica SeptiFast con Extracción automática frente al hemocultivo

4.6.1. Resultados clínico-epidemiológicos

Incluimos en el estudio un total de 264 episodios procedentes de 237 pacientes adultos, ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital Virgen de Valme de Sevilla. En 22 pacientes estudiamos varios episodios de SRIS distintos: en 17 estudiamos 2 episodios de SRIS diferentes, en 4 pacientes estudiamos 3 y en uno de ellos estudiamos 4 episodios de SRIS distintos. Rechazamos 2 muestras que no llegaron correctamente identificadas. Anulamos los resultados de 3 episodios (de tres pacientes distintos) que no cumplían el criterio de haberse extraído con una diferencia entre ellos de 7 días. Sacamos también del estudio 1 muestra que resultó inválida en la PCR por inhibición del control interno, y los resultados de 2 muestras de pacientes que procedían de urgencias. Detallamos en el anexo IV los datos recogidos en el estudio por episodio-paciente, tanto clínico-epidemiológicos como microbiológicos y de tratamiento antimicrobiano previo a la extracción de las muestras sanguíneas. Las patologías causa de ingreso en UCI para los pacientes incluidos en nuestro estudio se expresan en la tabla 4, situándose en primer lugar los ingresos por patologías digestivas, seguido por patologías de

origen respiratorio, cardiovascular, urinario, cerebral, piel-partes blandas, multiorgánicas, traumatológicas y otras. Desconocemos la causa de ingreso en 1 de los episodios.

Tabla 4.- Patologías causa de ingreso en UCI, de los pacientes y/o episodios estudiados

PATOLOGÍAS	n	%
DIGESTIVAS		33,3
Peritonitis, pancreatitis e infecciones intra-abdominales	31	
Colectomías	26	
Otras cirugías digestivas	10	
Otras patologías intra-abdominales	9	
Otras intervenciones quirúrgicas	8	
Complicaciones de Diabetes	4	
RESPIRATORIAS		21,6
Neumonía y otras infecciones respiratorias	26	
Insuficiencia respiratoria	24	
Otras patologías respiratorias	7	
CARDIO-VASCULARES		16,7
Shock cardiogénico	15	
Shock hipovolémico	13	
Hemorragia intracraneal	7	
Otras patologías cardio-vasculares	9	
URINARIAS		8,0
Sepsis origen urinario	14	
Insuficiencia renal	7	
CEREBRALES		7,2
Bajo nivel de conciencia	10	
Meningitis-meningoencefalitis	9	
PIEL-PARTES BLANDAS		5,7
Sepsis piel-partes blandas	9	
Sepsis otros focos	6	
FMO		4,2
Fallo multiorgánico	11	
TRAUMATOLÓGICAS		1,9
Politraumatismos	5	
OTRAS		1,4
Otros (1 desconocido)	4	
TOTAL	264	100

Expresamos en la tabla 5 los resultados clínico-epidemiológicos obtenidos, diferenciándolos para su análisis descriptivo, en variables cualitativas y cuantitativas.

Tabla 5.- Análisis descriptivo de los datos clínico-epidemiológicos

Variabes cualitativas¹	n	%
Sexo (n=237)		
Hombre	157	66,2
Mujer	80	33,8
Evolución (n=239)		
Exitus	111	46,4
Superviviente	128	53,6
Temperatura (>38,3°C, <36°C)	200	75,7
Leucocitosis/Leucopenia	163	61,7
Diagnóstico inicial		
Sepsis	210	79,5
Sepsis grave	14	5,3
Shock séptico	40	15,2
Foco de infección ²		
Respiratorio	68	25,8
Digestivo	60	22,7
Cardiovascular	42	15,9
Herida	39	14,7
Urinario	21	8,0
Cerebral	19	7,2
Desconocido	15	5,7
Otros cultivos (n=259)	207	79,9
Tratamiento previo (n=252)	169	67,1
Diagnóstico final		
Sepsis clínica o probada	110	41,7
Sepsis descartada	154	58,3

¹n=264 para las variables donde no se indica el dato ²Foco sospecha de la infección

Variabes cuantitativas	n	Rango	Mediana	Percentiles		p¹
				25	75	
Edad (años)	237	18-91	65	52	74	
Días UCI	242	1-77	11	4	23	
Proteína C reactiva	46	10,00-600,00	185,00	42,50	306,25	0,177
Procalcitonina	46	0-120	10	3	40	0,096
SOFA	152	0-24	5	2	9	0,002
APACHE II	152	1-39	18	12	25	<0,005

¹Valor de p respecto al diagnóstico final de sepsis

De los 22 pacientes en los cuales analizamos más de un episodio de SRIS distinto: 5 de ellos presentaron días diferentes de permanencia en UCI y 2 de ellos tuvieron una evolución distinta en sus episodios de SRIS.

4.6.2. Resultados microbiológicos

Desde la recepción de los botes de HC hasta la identificación del microorganismo, cuando se detectaron como positivos, transcurrieron entre 48 y 72 horas. Los resultados negativos definitivos se informaron a los 5 días. El tiempo utilizado mediante la técnica de *SF* con extracción automatizada por el sistema MagNA Pure Compact fue de 4 horas, tanto para los resultados positivos como para los negativos.

Expresamos en la tabla 6, los resultados globales obtenidos. De los 264 episodios ensayados: 174 resultaron negativos tanto por el test de PCR *SeptiFast* como en sus respectivos hemocultivos-concordantes negativos- y 90 (34,1%) resultaron positivos por alguna de las dos técnicas.

Tabla 6.- Resultados globales obtenidos comparando la técnica de *SeptiFast* (*SF*) con el resultado en sus respectivos Hemocultivos (HC)

Resultados globales	n	%
<i>SF</i> -/HC-	174	65,9
<i>SF</i> +/HC+	28	10,6
<i>SF</i> +/HC-	38	14,4
<i>SF</i> -/HC+	12	4,5
<i>SF</i> +/HC+ discordantes	8	3,0
No en SML ¹	4	1,5
TOTAL	264	100

Resultados *SF* negativo y HC negativo (*SF*-/HC-), resultados *SF* positivo y HC positivo (*SF*+/HC+), resultados *SF*/HC discordantes (positivos por ambas técnicas, con identificación de distintos microorganismos), ¹No en SML (no incluidos en la lista maestra de *SF*)

De los 90 resultados positivos, en 28 casos (tabla 6) se obtuvo el mismo microorganismo tanto por SeptiFast (SF) como en su respectivo hemocultivo (HC)-concordantes positivos- y en 38 episodios (tabla 6) obtuvimos un resultado SF positivo con HC negativo (SF+/HC-). De los 38 episodios SF+/HC-, 24 estuvieron confirmados con otros cultivos (anexo IV) y en los 14 episodios restantes, se diagnosticó una sepsis clínica aunque no se pudo confirmar con otros cultivos.

En 12 episodios (tabla 6) obtuvimos un resultado de SF negativo siendo el HC positivo (SF-/HC+). Expresamos en la tabla 7, el detalle de los resultados de estos 12 episodios SF-/HC+ obtenidos.

Tabla 7.- Resultados obtenidos: SeptiFast (SF) negativo con hemocultivo (HC) positivo (SF-/HC+)

Episodio	SF	HC (Set 1)	HC (Set 2)	Observaciones
30	N	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Significado clínico
60	N	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Significado clínico
99	N	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Significado clínico
149	N	<i>E. faecalis</i>	N	Significado clínico
4	N	<i>C. krusei</i>	N	Significado clínico
107	N	SCN (2cepas)	SCN	Contaminante
57-2	N	SCN	SCN	Contaminante
179-1	N	<i>S. epidermidis</i>	No realizado	Contaminante
138-1	N	<i>E. faecalis+S. aureus</i>	<i>E. faecalis+S. aureus</i>	Incidencia PA
73	N	<i>S. pneumoniae</i>	N	Incidencia PA
213	N	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. viridans</i>	Incidencia PA
234	N	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	Incidencia PA

N= resultado negativo. SCN=Estafilococos coagulasa negativa. Incidencia PA=incidencia en la fase preanalítica

De estos 12 episodios (tabla 7): 5 tuvieron significación clínica demostrada (aunque 1 de ellos no está confirmado con otros cultivos), en 3 de estos 12 resultados (tabla 7) determinamos que

fueron contaminantes, y en 4 de los mismos (tabla 7) hubo incidencias en la fase preanalítica (PA); estando confirmado con otros cultivos sólo 1 de estos resultados. Las incidencias en la fase preanalítica de esos cuatro episodios fueron:

- Episodio 138-1: recibimos por separado las muestras de HC y sangre en EDTA para *SF*. Recibimos otro HC del mismo paciente al día siguiente (sin muestra para *SF*), cuyo resultado fue negativo.
- Episodio 73: de esta paciente, recibimos 8 botes de HC (4 sets) el mismo día, y una sola muestra de sangre en EDTA para *SF*. Se detecta *S. pneumoniae* en 4 botes (4/8), siendo los otros cuatro botes restantes negativos.
- Episodio 213: el hemocultivo correspondiente llega al laboratorio un día después de la muestra de sangre para *SF*. Desconocemos si el HC sufrió una demora en su llegada al laboratorio, o se tomó un día después de la muestra de sangre para *SF*.
- Episodio 234: llega un tubo de sangre en EDTA para *SF* junto con su HC correspondiente, que es el que se procesa; y en ese mismo día nos llega otro tubo más de sangre en EDTA rotulado con los demográficos del mismo paciente. Suponemos que es una muestra duplicada y la desecharmos, no la analizamos.

Por otro lado, obtuvimos 8 episodios (tabla 8), inicialmente catalogados como discordantes positivos entre *SF* y HC, encontrando confirmados mediante cultivos de muestras de otras procedencias (anexo IV) los aislamientos obtenidos en *SF* correspondientes a *C. krusei*, *S. aureus* y *E. coli* de los episodios respectivos 230-2, 13 y 35. Los aislamientos de SCN obtenidos por *SF* en los episodios 2-1 y 9-2, resultaron concordantes con lo obtenido en sus respectivos HC; al detectarse dos curvas de fusión diferentes en la PCR de *SF*. Se determinaron como contaminantes, según los criterios establecidos en el capítulo de material y métodos, los aislamientos de los episodios 230-2 y 13 obtenidos en los HC y el aislamiento de *Streptococcus*

spp. hallado mediante *SF* en el episodio 9-2. Finalmente, obtuvimos 4 resultados *SF* negativo/HC positivo (tabla 8) pero con microorganismos no incluidos en la SML de *SeptiFast*: 2 *Clostridium* spp., 1 Bacilo Gram Negativo anaerobio y 1 *Eubacterium limosum*.

Tabla 8.- Resultados obtenidos *SF*+/*HC*+ catalogados inicialmente como discordantes

Episodio	<i>SF</i>	HC (Set 1)	HC (Set 2)	Observaciones
230-2	<i>C. krusei</i>	<i>Corynebacterium</i> ¹ +SCN ¹	N	Contaminante ¹
13	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i> ¹	N	Contaminante ¹
35	<i>E. coli</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>C. perfringens</i>	No en SML ²
31	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. sporogenes</i>	N	No en SML ²
59	<i>P. aeruginosa</i>	BGN anaerobio	N	No en SML ²
47	<i>E. coli</i>	<i>E. limosum</i>	<i>E. limosum</i>	No en SML ²
2-1	<i>S. aureus</i> +SCN	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	Significado clínico
9-2	SCN+ <i>Streptococcus</i> spp.	<i>S. hominis</i>	<i>S. hominis</i>	Significado clínico

¹Se consideran contaminantes a los microorganismos detectados en los HC ²Resultados *SF*+/*HC*+ no incluidos en la lista maestra de *SF*. N= resultado negativo. SCN=Estafilococos coagulasa negativa. BGN= Bacilo Gram Negativo

El número y género-especie de los microorganismos considerados verdaderos patógenos obtenidos por cada una de las técnicas (*SF* y *HC*), quedan mostrados comparativamente en la tabla 9. Entre estos resultados (tabla 9), podemos destacar que los microorganismos más frecuentemente aislados fueron *S. aureus* (23/92) y *E. coli* (19/92); encontrándose en ambos casos una proporción 10/1 de aislamientos detectados sólo mediante la técnica *SF* respecto a los detectados sólo mediante el *HC*. *Streptococcus pneumoniae* fue detectado sólo por *SeptiFast* en 6 casos, frente a 1 del hemocultivo. *Aspergillus fumigatus* fue aislado en 4 episodios, y sólo fue detectado en nuestro estudio mediante la técnica de *SF*. Así mismo detectamos 3 *A. baumannii*, 2 de ellos sólo mediante *SF*. Ambos proceden de pacientes que presentaron una sepsis clínica, aunque sólo 1 está confirmado con otros cultivos.

Tabla 9.- Género-Especie y número de microorganismos incluidos y no incluidos en la lista maestra (SML) de SF, detectados en nuestro estudio mediante: sólo SeptiFast (SF), sólo Hemocultivo (HC) o por ambos métodos (SF/HC)¹

Microorganismos	SF (n)	HC (n)	SF/HC (n)	TOTAL (n)
Gram Positivos				
<i>S. aureus</i>	10	1	12	23
<i>S. pneumoniae</i>	6	1	1	8
<i>E. faecium</i>	1	0	0	1
<i>E. faecalis</i>	0	2	0	2
<i>Staphylococcus</i> coagulasa-negativos (SCN) ²	1	0	6	7
Gram Negativos				
<i>E. coli</i>	10	1	8	19
<i>P. aeruginosa</i>	5	4	2	11
<i>A. baumannii</i>	2	0	1	3
<i>Enterobacter (cloacae/aerogenes)</i>	2	0	0	2
<i>Klebsiella (pneumoniae/oxytoca)</i>	1	0	0	1
<i>Proteus mirabilis</i>	0	1	0	1
Hongos				
<i>Aspergillus fumigatus</i>	4	0	0	4
<i>Candida krusei</i>	1	1	0	2
No en SML³				
<i>Clostridium spp.</i>	0	3	0	3
<i>Salmonella spp.</i>	0	2	0	2
<i>Eubacterium spp.</i>	0	1	0	1
<i>Neisseria meningitidis</i>	0	1	0	1
BGN anaerobio	0	1	0	1
TOTAL	43	19	30	92

¹Mediante SeptiFast obtuvimos dos sepsis mixtas y mediante HC obtuvimos una sepsis mixta ²SCN con significación clínica. ³No en SML (no incluidos en la lista maestra de SF)

Detectamos en total 11 *P. aeruginosa* (tabla 9), de las que no se observa preponderancia en los aislamientos detectados mediante SF respecto de los detectados mediante el HC convencional: en total, cada técnica detectó 7 y 6 *P. aeruginosa* respectivamente. Todas las *P. aeruginosa* (5/5) detectadas sólo mediante SF, procedían de pacientes con sepsis clínicas; aunque sólo 2 de ellas estuvieron confirmadas con otros cultivos. En cuanto a los aislamientos de *Candida* spp., en la evaluación de la extracción automática, obtuvimos 2 *C. krusei*; detectándose una sólo mediante SF y otra sólo mediante el HC convencional. En el paciente del cual aislamos *C. krusei* mediante SF, se detectó también *C. krusei* en una muestra de

broncoaspirado. Mediante *SeptiFast* detectamos dos sepsis mixtas (*S. aureus*+SCN y *S. aureus*+*A. fumigatus*) y mediante HC obtuvimos una sepsis mixta (*E. faecalis*+*S. aureus*).

Expresamos ahora los resultados comparativos globales de los contaminantes obtenidos por cada uno de los métodos, en la tabla 10. La tasa de contaminación de nuestros hemocultivos fue de un 12,5%, mientras que para la técnica de *SeptiFast* la tasa de contaminación fue del 3,4%. El 75% del total de contaminantes, correspondieron a *Estafilococos coagulasa negativos* (SCN).

Tabla 10.- Resultados interpretados como contaminantes mediante: sólo *SeptiFast* (SF), sólo Hemocultivo (HC) o por ambos métodos (SF/HC)

Microorganismos contaminantes	SF (n)	HC (n)	SF/HC (n)	TOTAL (n)
Gram Positivos				
<i>Staphylococcus coagulasa negativos</i> (SCN)	3	25	2	30
<i>Streptococcus</i> spp.	4	2	0	6
No en SML				
<i>Corynebacterium</i> spp.	0	2	0	2
<i>Bacillus</i> spp.	0	1	0	1
<i>Propionibacterium</i> spp.	0	1	0	1
TOTAL	7	31	2	40

¹No en SML (no incluidos en la lista maestra de SF)

Expresamos en la tabla 11 los resultados globales obtenidos, preparados para su análisis estadístico, una vez reinterpretados los resultados discordantes y los contaminantes de ambos métodos; según los criterios detallados en el capítulo de material y métodos.

En cuanto al tratamiento previo a la obtención del hemocultivo recibido, en nuestro estudio, un 68,6% de los casos (181/264) habían recibido tratamiento antibiótico y/o antifúngico previo a la obtención de las muestras de sangre para hemocultivo y *SeptiFast* (tabla 11). Obtenemos un total de 26 episodios con resultado microbiológico negativo tanto mediante SF como por el HC, que sin embargo se diagnosticaron finalmente como sepsis clínica. Suponen un 9,8% de todos

los episodios, y un 23,4% de todas nuestras sepsis. En todos los casos (100%) existió tratamiento previo.

Tabla 11.- Resultados globales obtenidos comparando la técnica de SeptiFast (SF) con el Hemocultivo (HC), número de episodios por grupo con diagnóstico final (DF) de sepsis y número de episodios con diagnóstico final de sepsis que recibieron tratamiento antimicrobiano previo

Resultados globales ¹	Sepsis clínica o probada		Tratamiento	
	n	(%)	n	(%)
SF-/HC-	179	(67,8)	26	(100)
SF+/HC+	30	(11,4)	30	(60,0)
SF+/HC-	38	(14,4)	38	(76,3)
SF-/HC+	9	(3,4)	9	(77,8)
SF+/HC+ discordantes	4	(1,5)	4	(25,0)
No en SML	4	(1,5)	4	(75,0)
TOTAL	264	(100)	111	(68,6)

¹Datos globales reinterpretados los resultados discordantes y contaminantes. Resultados SF negativo y HC negativo (SF-/HC-), resultados SF positivo y HC positivo (SF+/HC+), resultados SF/HC discordantes (positivos por ambas técnicas, con identificación de distintos microorganismos), No en SML (no incluidos en la lista maestra de SF)

Todos los episodios SF+/HC- (38/38) tuvieron un diagnóstico final de sepsis (tabla 11); de los que un 76,3% (29/38) habían sido tratados con antibiótico y/o antifúngico previamente a la obtención del hemocultivo. Todos los episodios SF-/HC+ (9/9) tuvieron también un diagnóstico final de sepsis (tabla 11); de los que un 77,8% (7/9) habían recibido tratamiento antibiótico y/o antifúngico previo. Para los que tuvieron un resultado concordante positivo SF+/HC+, encontramos una tasa de tratamiento previo de un 60% (18/30). El estudio estadístico no encontró relación significativa entre el tratamiento antimicrobiano previo y el resultado microbiológico positivo o negativo (tabla 12); tanto en la técnica de SF (p=0,764) como para el HC (p=0,227).

Tabla 12.- Análisis descriptivo de las variables temperatura (>38,3°C ó <36°C), presencia de leucocitosis/leucopenia, existencia de tratamiento previo en muestras con resultado SF positivo y existencia de tratamiento previo en muestras con resultado de HC positivo

Variables cualitativas	n		Sepsis clínica o probada	p
			n (%)	
Temperatura (>38,3°C ó <36°C)	si	200	93 (46,5)	0,0051
	no	64	17 (26,6)	
Leucocitosis/Leucopenia	si	163	92 (56,4)	<0,0051
	no	101	18 (17,8)	
SF+/Tratamiento previo	si	48	48 (100)	0,7642
	no	24	24 (100)	
HC+/Tratamiento previo	si	29	29 (100)	0,2272
	no	18	18 (100)	

¹Relación estadística de las variables estudiadas con el diagnóstico final de sepsis ²Relación estadística de la influencia del tratamiento antimicrobiano previo en el resultado positivo de las técnicas SF y HC

4.7. Análisis estadístico de los datos

El estudio estadístico de los parámetros: temperatura >38,3°C o <36°C y leucocitosis/leucopenia (tabla 12), determinó que en nuestro trabajo existió relación significativa ($p < 0,05$) de ambos parámetros con el diagnóstico final de sepsis. La mediana de los valores de Proteína C reactiva/Procalcitonina para los pacientes con diagnóstico final de sepsis fue 258/19 respectivamente; mientras que obtuvimos valores de 101/4,6 para los pacientes cuyo diagnóstico final no fue sepsis. Para estos marcadores, no se encontró una relación estadísticamente significativa (tabla 5) con la presencia de sepsis ($p = 0,177$ y $p = 0,096$ respectivamente). Las medianas de los valores SOFA/APACHE II para los pacientes con diagnóstico final de sepsis fueron 7/21 respectivamente; mientras que obtuvimos valores de 4/15 para los pacientes cuyo diagnóstico final no fue sepsis. Encontramos relación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para ambos índices de gravedad (tabla 5), con la presencia de sepsis clínica o probada.

En la tabla 13 expresamos los datos microbiológicos globales cuantitativos de la técnica en estudio SF y el método convencional del HC, para su análisis estadístico.

Tabla 13.- Datos cuantitativos de las variables SeptiFast y hemocultivo para el análisis estadístico respecto al diagnóstico final (DF) de sepsis como criterio de referencia

	Positivos n (%)	Negativos n (%)	Contaminantes n (%)	TOTAL
SeptiFast	72 (27,3)	183 (69,3)	9 (3,4)	264
Hemocultivo	47 (17,8)	184 (69,7)	33 (12,5)	264
DF Sepsis	85	26		111

El análisis de concordancia de la técnica *SF* respecto al HC como criterio de referencia, ofreció un coeficiente kappa de 0,460 que corresponde a una concordancia moderada entre *SF* y HC, siendo el análisis estadísticamente significativo ($p < 0,05$). El análisis de concordancia de las técnicas *SF* y HC respecto al diagnóstico final de sepsis (DF) como criterio de referencia, arrojó índices kappa de 0,682 y 0,460 respectivamente; que corresponden a buena concordancia para *SF* y moderada para el HC, siendo $p < 0,05$ para ambas técnicas. En cuanto a la exactitud diagnóstica de *SF* y HC respecto al DF como criterio de referencia, obtuvimos valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para cada una de las técnicas; resultando para *SF*: 73,47%, 94,58%, 64,86% y 85,62%; y para el HC: 47,96%, 80,12%, 42,34% y 53,59% respectivamente.

ANEXO IV.- Resultados globales incluyendo nº de episodio (Nº), sexo del paciente (Sx), edad, días de permanencia en UCI (UCI), evolución (Out), presencia de fiebre o hipotermia (Tª), leucocitosis/leucopenia (Leu), diagnóstico inicial (DI), foco de sospecha (Foco), existencia de otros cultivos (O Cultivo), tratamiento previo antibiótico y/o antifúngico (Tratamiento), resultado de SeptiFast, resultado del Hemocultivo y diagnóstico final (DF)

Nº	Sx	Edad	UCI	Out	Tª	Leu	DI	Foco	O Cultivo	Tratamiento	SeptiFast	Hemocultivo	DF
1	M	58	31	EX	1	0	S	RESP	BAScantro	AF	N	N	N
2-1	H	53	13	EX	1	1	SS	FOD	neg	CTX+MTZ	<i>S. aureus</i> +SCN	<i>S. epidermidis</i>	C
2-2	H	53	13	EX	1	1	SS	FOD	HCstacon	CSF+IMI	<i>A. baumannii</i>	N	C
3	H	86	1	EX	1	1	S	RESP	BASesccol	CEF	N	N	N
4	M	76	13	EX	1	1	S	OR	ORpsear	AB+AF	N	<i>C. krusei</i>	C
5	M	66	7	EX	1	1	S	RESP	AGstrpne	N	<i>S. pneumonie</i>	N	C
6	M	79	9	SP	1	1	SS	OR	OResccol	N	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	P
7	H	68	4	SP	0	1	S	RESP	RESP	A/C	N	N	N
8	M	74	27	EX	0	1	S	RESP	BASsermar	N	N	N	N
9-1	M	45	19	SP	1	0	S	HDA	HDA	A/C	N	SCN	N
9-2	M	45	19	SP	1	1	S	HDA	HCstacon	A/C	SCN+ <i>Str. spp.</i>	<i>S. hominis</i>	C
10	H	70	5	SP	0	1	S	HDA	N	CTX+MTZ	N	N	N
11	M	78	18	SP	0	1	S	DIG	N	N	N	N	N
12	H	61	72	SP	0	1	S	DIG	ABCmixto	MRP	N	N	N
13	H	65	19	SP	1	1	S	HDA	BASstaur	N	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	C
14	H	69	2	EX	1	0	S	CV	N	A/C	N	N	N
15	M	67	1	EX	1	1	SS	FOD	N	LZD+CTZ	N	N	C
16	H	27	3	SP	1	0	S	DIG	N	N	N	SCN	N
17	H	65	30	EX	1	1	SS	DIG	LPEResccol	VCN+TZP	<i>E. coli</i>	N	C
18	H	71	10	SP	1	0	S	CV	HCstaur	CTX+MTZ	<i>S. aureus</i>	N	C
19	M	67	1	SP	1	1	S	OR	OResccol	CTX	<i>E. coli</i>	N	C
20	H	46	41	EX	1	0	S	DIG	neg	N	N	N	N
21	M	59	21	SP	1	1	SS	RESP	neg	N	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	P
22	M	83	18	EX	1	1	S	RESP	BASaspfum	IMI+CTX+VZ	<i>A. fumigatus</i>	N	C
24	H	73	7	EX	0	1	S	CV	HC	N	N	N	N
25	H	74	6	EX	0	1	S	CV	neg	NC	N	N	N
26	M	80	12	SP	0	1	S	RESP	RESP	CFP+LVX	N	N	N
27	M	85	1	EX	0	1	S	CV	N	N	N	N	N
28	M	74	52	EX	1	1	S	FOD	ESPhaeinf	N	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	P
29	H	72	8	EX	1	1	SS	FOD	neg	N	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	P
30	H	61	1	EX	1	1	SS	HDA	LPERpsear	IMI	N	<i>P. aeruginosa</i>	P
31	H	69	28	SP	0	1	S	DIG	neg	N	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. sporogenes</i>	C
32	H	68	10	EX	0	1	S	DIG	NC	CTX+CC	N	N	N
33	H	63	7	EX	1	1	SG	HDA	HDAstaur	N	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	P
34	H	37	12	SP	1	1	S	DIG	neg	TZP	N	N	N

Interpretación de abreviaturas de la tabla: **H**=Hombre, **M**=Mujer, **EX**=Exitus, **SP**=Superviviente, **1**=presencia, **0**=ausencia, **S**=Sepsis, **SG**=Sepsis Grave, **SS**=Shock séptico, **N**=Negativo, **C**=Sepsis clínica, **P**=Sepsis probada. Foco (F): **RESP**=respiratorio, **FOD**=desconocido, **OR**=urinario, **HDA**=herida, **DIG**=digestivo, **CV**=cardiovascular, **CER**=cerebral. **Otros cultivos-pruebas** y microorganismo aislado (CM): **neg**=negativos, **N**=no existieron. **CCmm**=Tipo de muestra-prueba y microorganismo aislado: Tipo de muestra (**BAS**=broncoaspirado, **ESP**=esputo, **RESP**=muestra respiratoria, **HC**=hemocultivo, **OR**=orina, **HDA**=herida, **ABC**=abceso, **DRE**=drenaje, **LPER**=líquido peritoneal, **AG**=antígeno, **GM**=galactomanano, **BG**=betaglucano, **BIL**=líquido biliar, **LCR**=líquido cefalorraquídeo). **Microorganismo aislado**: tres primeras letras de género y especie (ej. cantro=*Candida tropicalis*, stacon=*Staphylococcus coagulasa negativa*, etc). **Tratamiento previo**: ver apartado de abreviaturas

Continuación del ANEXO IV.- Resultados globales incluyendo nº de episodio (Nº), sexo del paciente (Sx), edad, días de permanencia en UCI (UCI), evolución (Out), presencia de fiebre o hipotermia (T^a), leucocitosis/leucopenia (Leu), diagnóstico inicial (DI), foco de sospecha (Foco), existencia de otros cultivos (O Cultivo), tratamiento previo antibiótico y/o antifúngico (Tratamiento), resultado de SeptiFast, resultado del Hemocultivo y diagnóstico final (DF)

Nº	Sx	Edad	UCI	Out	T ^a	Leu	DI	Foco	O Cultivo	Tratamiento	SeptiFast	Hemocultivo	DF
35	H	62	4	SP	1	1	SS	DIG	HCesccol, BIL mixto	LZD+LVX+MTZ	<i>E. coli</i>	<i>C. perfringens</i>	P
36	H	76	21	SP	1	1	S	DIG	DREesccol	NC	<i>E. coli</i>	N	C
37	M	23	4	SP	1	0	S	HDA	N	CTX+MTZ	N	<i>Bacillus</i> spp.	N
38	H	19	2	SP	1	0	S	CER	LCR	VCN+CTX+ACI	N	N	N
39	H	43	24	SP	1	0	S	DIG	ABCmixto	CTX+VCN+IMI	N	N	N
40-1	H	56	17	SP	1	1	S	CV	AGstrpne	CFP+VCN+CC	<i>S. pneumoniae</i>	N	C
40-2	H	56	17	SP	1	1	S	CV	HC	CTX+VCN	N	SCN	N
40-3	H	56	17	SP	1	0	S	CV	neg	N	N	SCN	N
41	H	68	30	SP	0	1	S	RESP	neg	NC	N	N	N
42	H	80	22	EX	1	1	S	DIG	HCacibau	N	<i>A. baumannii</i>	N	C
43	H	61	54	EX	1	0	S	CV	neg	N	N	N	N
44	H	46	10	SP	0	1	S	RESP	BASstaur	N	N	N	N
45	H	77	2	SP	0	1	S	DIG	N	CTX+MTZ	SCN	SCN	N
46	H	79	12	EX	0	1	S	HDA	ABC	N	N	N	N
47	H	70	21	EX	0	1	S	DIG	neg	N	<i>E. coli</i>	<i>E. limosum</i>	C
48	H	80	2	EX	1	0	S	DIG	N	NC	N	<i>C. perfringens</i>	P
49	H	60	47	EX	0	1	S	RESP	neg	NC	N	N	N
50	M	72	4	SP	0	1	S	CV	OResccol	A/C	N	N	N
51	M	75	4	SP	0	0	S	DIG	N	TZP+MTZ	N	N	N
52	M	72	28	EX	1	0	S	RESP	HCstaur	CFP	N	N	N
53	H	62	13	SP	0	1	S	RESP	neg	N	Str. spp.	N	N
54	H	65	10	EX	0	1	S	FOD	neg	N	N	N	N
55	M	78	5	EX	1	1	SS	DIG	HDApseae	CTA+MTZ	<i>E. faecium</i>	N	C
56	M	33	20	SP	1	0	S	RESP	AGstrpne	CTX	N	N	N
57-1	H	70	31	EX	1	1	S	RESP	BASacinbau	COL	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	P
57-2	H	70	31	EX	1	0	S	RESP	HC	IMI+COL	N	SCN	N
58	H	57	4	SP	1	0	S	DIG	N	CTX	N	N	N
59	M	69	2	EX	1	0	S	DIG	N	N	<i>P. aeruginosa</i>	bgn ANA	P
60	H	67	17	EX	1	1	SS	HDA	HDApseae	VCN+TZP	N	<i>P. aeruginosa</i>	P
61	M	53	6	SP	0	1	S	RESP	HCstrpne	CTX+CLA	<i>S. pneumoniae</i>	N	C
62	M	61	15	SP	1	1	S	RESP	neg	N	N	N	N
63	M	25	8	SP	0	1	S	DIG	ORcanalb	N	N	N	N
64	M	78	2	SP	0	1	S	OR	OR	IMI+CTX	N	N	N
65	M	64	27	SP	0	1	S	CV	HDA	A/C	N	N	N
66	H	73	8	SP	0	1	S	HDA	HDA	TZP+LZD	N	N	C

Interpretación de abreviaturas de la tabla: **H**=Hombre, **M**=Mujer, **EX**=Exitus, **SP**=Superviviente, **1**=presencia, **0**=ausencia, **S**=Sepsis, **SG**=Sepsis Grave, **SS**=Shock séptico, **N**=Negativo, **C**=Sepsis clínica, **P**=Sepsis probada. Foco (F): **RESP**=respiratorio, **FOD**=desconocido, **OR**=urinario, **HDA**=herida, **DIG**=digestivo, **CV**=cardiovascular, **CER**=cerebral. **Otros cultivos-pruebas** y microorganismo aislado (CM): **neg**=negativos, **N**=no existieron. CCmm=**Tipo de muestra-prueba y microorganismo aislado**: Tipo de muestra (**BAS**=broncoaspirado, **ESP**=esputo, **RESP**=muestra respiratoria, **HC**=hemocultivo, **OR**=orina, **HDA**=herida, **ABC**=absceso, **DRE**=drenaje, **LPER**=líquido peritoneal, **AG**=antígeno, **GM**=galactomanano, **BG**=betaglucano, **BIL**=líquido biliar, **LCR**=líquido cefalorraquídeo). **Microorganismo aislado**: tres primeras letras de género y especie (ej. canto=*Candida tropicalis*, stacon=*Staphylococcus coagulasa* negativa, etc). **Tratamiento previo**: ver apartado de abreviaturas

Continuación del ANEXO IV.- Resultados globales incluyendo nº de episodio (Nº), sexo del paciente (Sx), edad, días de permanencia en UCI (UCI), evolución (Out), presencia de fiebre o hipotermia (T^a), leucocitosis/leucopenia (Leu), diagnóstico inicial (DI), foco de sospecha (Foco), existencia de otros cultivos (O Cultivo), tratamiento previo antibiótico y/o antifúngico (Tratamiento), resultado de SeptiFast, resultado del Hemocultivo y diagnóstico final (DF)

Nº	Sx	Edad	UCI	Out	T ^a	Leu	DI	Foco	O Cultivo	Tratamiento	SeptiFast	Hemocultivo	DF
67	H	55	2	SP	1	0	S	CV	N	N	N	N	N
68	M	55	9	SP	1	0	S	RESP	N	CTX	N	N	N
69	M	54	3	SP	1	0	S	CV	N	N	N	N	N
70	H	74	3	SP	0	1	S	RESP	neg	A/C	N	N	N
71	H	79	3	SP	0	1	S	RESP	N	LVX	N	SCN	N
72-1	M	54	50	SP	1	0	S	DIG	N	A/C	N	SCN	N
72-2	M	54	50	SP	1	0	S	DIG	neg	CTA+CIP	N	N	N
73	M	24	9	SP	1	1	S	RESP	neg	N	N	<i>S. pneumoniae</i>	P
74	H	62	22	EX	1	1	S	CER	LCRneimen	CTX+VCN	N	N	N
75	M	86	6	SP	0	1	SS	OR	N	TZP	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	P
76	H	53	15	EX	1	1	SS	HDA	neg	CTX+ MTZ+FZ+LVX	N	SCN+S. viridans	C
77	H	63	4	SP	1	0	S	HDA	N	CTX+MTZ	N	N	N
78	H	52	6	SP	0	1	S	RESP	RESP	LVX+CTX	N	N	N
79	H	43	13	EX	1	1	S	RESP	GMaspfum	VCN	<i>A. fumigatus</i>	N	C
80	H	67	27	SP	1	1	S	HDA	HCesccol	N	<i>E. coli</i>	N	C
81	H	23	2	SP	1	0	S	RESP	N	N	N	N	N
82	M	76	23	SP	1	1	S	DIG	neg	N	<i>P. aeruginosa</i>	N	C
83	H	84	23	SP	1	0	S	RESP	HDAesccol	CFP+LVX+FZ	N	N	N
84	H	38	20	EX	1	0	S	CV	neg	N	N	N	N
85	H	54	13	SP	1	0	S	RESP	neg	CFP+LZD	N	N	N
86	H	76	15	EX	1	1	SG	FOD	neg	VCN	N	N	C
87	H	62	17	SP	1	0	S	CER	neg	N	N	N	N
88	M	61	12	EX	0	0	S	CER	neg	N	N	N	N
89	H	82	2	SP	0	1	S	HDA	HDA	NC	N	N	N
90	H	52	25	EX	0	1	S	RESP	BAScanspp	A/C	N	N	N
91-1	M	48	17	SP	1	0	S	DIG	COPaerspp	CIP	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	P
91-2	M	48	31	SP	1	0	S	CV	HCstaur	LZD	N	N	N
91-3	M	48	13	SP	0	0	S	DIG	N	NC	N	N	N
92	M	78	15	SP	1	0	S	CV	neg	N	N	SCN	N
93	H	68	12	EX	1	1	SS	HDA	HDApseae	MTZ	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	P
94	M	78	7	EX	1	1	SS	DIG	LPERmixto	MTZ	N	SCN	C
95	H	79	37	SP	0	1	S	DIG	LPER	AB+AF	<i>E. coli</i>	N	C
96	H	73	28	EX	1	0	S	CV	neg	IMI+LZD	N	N	N
97-1	H	51	43	SP	1	0	S	DIG	N	TZP	N	SCN	N
97-2	H	51	43	SP	1	0	S	DIG	HC	TZP+LZD+MUP	N	N	N
97-3	H	51	43	SP	1	0	S	DIG	HC	IMI	N	N	N

Interpretación de abreviaturas de la tabla: **H**=Hombre, **M**=Mujer, **EX**=Exitus, **SP**=Superviviente, **1**=presencia, **0**=ausencia, **S**=Sepsis, **SG**=Sepsis Grave, **SS**=Shock séptico, **N**=Negativo, **C**=Sepsis clínica, **P**=Sepsis probada. Foco (F): **RESP**=respiratorio, **FOD**=desconocido, **OR**=urinario, **HDA**=herida, **DIG**=digestivo, **CV**=cardiovascular, **CER**=cerebral. **Otros cultivos-pruebas** y microorganismo aislado (CM): **neg**=negativos, **N**=no existieron. **CCmm**=Tipo de muestra-prueba y microorganismo aislado: Tipo de muestra (**BAS**=broncoaspirado, **ESP**=esputo, **RESP**=muestra respiratoria, **HC**=hemocultivo, **OR**=orina, **HDA**=herida, **ABC**=absceso, **DRE**=drenaje, **LPER**=líquido peritoneal, **AG**=antígeno, **GM**=galactomanano, **BG**=betaglucano, **BIL**=líquido biliar, **LCR**=líquido cefalorraquídeo). **Microorganismo aislado**: tres primeras letras de género y especie (ej. cantro=*Candida tropicalis*, stacon=*Staphylococcus coagulasa negativa*, etc). **Tratamiento previo**: ver apartado de abreviaturas

Continuación del ANEXO IV.- Resultados globales incluyendo nº de episodio (Nº), sexo del paciente (Sx), edad, días de permanencia en UCI (UCI), evolución (Out), presencia de fiebre o hipotermia (Tª), leucocitosis/leucopenia (Leu), diagnóstico inicial (DI), foco de sospecha (Foco), existencia de otros cultivos (O Cultivo), tratamiento previo antibiótico y/o antifúngico (Tratamiento), resultado de SeptiFast, resultado del Hemocultivo y diagnóstico final (DF)

Nº	Sx	Edad	UCI	Out	Tª	Leu	DI	Foco	O Cultivo	Tratamiento	SeptiFast	Hemocultivo	DF
98	H	47	8	SP	1	1	S	CV	HC	A/C	SCN	SCN	C
99	H	55	12	EX	1	1	SG	HDA	HDApseae	VCN+IMI+CC	N	<i>P. aeruginosa</i>	P
100	H	72	7	SP	1	0	SS	CV	NC	IMI+LZD	N	N	C
101	H	60	26	EX	0	1	S	RESP	RESPpnejir	CTX+LVX	N	N	N
102-1	M	67	47	EX	1	1	SG	DIG	COPsalent	CTX+LVX	N	<i>S. enteritidis</i>	P
102-2	M	67	47	EX	1	0	S	DIG	HC	NC	N	N	N
103	H	85	5	SP	1	0	S	CV	N	N	N	N	N
104	H	75	1	EX	1	1	S	OR	N	TOB	N	N	N
105	H	27	2	SP	0	1	S	OR	OResccol	TOB+CTX	<i>E. coli</i>	N	C
106	M	67	11	SP	0	1	S	HDA	N	NC	<i>E. coli</i>	N	C
107	H	74	8	EX	0	0	S	CV	neg	N	N	SCN	N
108	M	43	16	SP	1	1	S	RESP	RESPstrpne	CTX	N	N	N
109	M	45	56	SP	1	0	S	CER	BGcanspp	N	N	N	N
110	M	53	34	EX	1	1	S	RESP	neg	CTX+LVX+AV	N	N	N
111	M	69	3	EX	1	1	S	FOD	HCpseae	TZP+AK	<i>P. aeruginosa</i>	SCN	C
112-1	H	56	35	SP	1	1	S	DIG	BASstaaur	CTX+TZP+CSF	<i>S. aureus</i>	N	C
112-2	H	56	35	SP	1	0	S	DIG	HC	IMI+LVX	N	N	N
113	H	73	5	EX	1	0	SS	HDA	N	IMI	N	N	C
114	H	42	10	SP	0	1	S	RESP	RESP	LVX+RIF+CLA	N	N	N
115	M	75	26	EX	1	0	S	CV	HC	N	N	N	N
116	H	68	2	SP	0	1	S	RESP	RESP	LVX	N	N	N
117	M	91	3	SP	0	1	S	DIG	N	TZP	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	P
118	M	18	17	EX	1	1	S	RESP	BASaspfum	AB	<i>A. fumigatus</i>	N	C
119	M	83	22	SP	1	1	S	DIG	neg	A/C	N	N	N
120	H	72	7	EX	1	0	S	OR	neg	N	N	N	N
121	H	41	4	SP	1	1	S	CER	LCRstrpne	CTX+VCN	<i>S. pneumoniae</i>	N	C
122	H	75	4	EX	1	1	SG	CV	neg	CTX+MTZ	<i>S. aureus</i>	N	C
124	H	74	1	EX	1	1	S	CV	BASstrpne	CTX+CC	<i>S. pneumoniae</i>	<i>Corynebacterium spp.</i>	C
125	H	38	2	SP	1	0	S	RESP	N	N	N	N	N
126-1	H	74	37	EX	1	0	S	RESP	RESPcanspp	N	<i>Str. spp.</i>	N	N
126-2	H	74	37	EX	1	0	S	RESP	RESPstrpne	IMI+LZD	N	SCN	C
127	H	76	21	EX	0	1	S	DIG	OR	IMI+VZ+ANF	N	N	N
128	H	29	4	EX	1	0	SS	CER	LCRneimen	CTX+VCN	N	<i>N. meningitidis</i>	P
129	H	74	1	EX	0	1	S	FOD	OResccol	N	N	SCN	N
130	H	69	5	SP	1	0	S	DIG	neg	CTX+MTZ	N	N	C
131-1	H	51	3	SP	1	0	S	DIG	HC	IMI	N	N	N

Interpretación de abreviaturas de la tabla: **H**=Hombre, **M**=Mujer, **EX**=Exitus, **SP**=Superviviente, **1**=presencia, **0**=ausencia, **S**=Sepsis, **SG**=Sepsis Grave, **SS**=Shock séptico, **N**=Negativo, **C**=Sepsis clínica, **P**=Sepsis probada. Foco (F): **RESP**=respiratorio, **FOD**=desconocido, **OR**=urinario, **HDA**=herida, **DI**=digestivo, **CV**=cardiovascular, **CER**=cerebral. **Otros cultivos-pruebas** y microorganismo aislado (CM): **neg**=negativos, **N**=no existieron. **CCmm**=Tipo de muestra-prueba y microorganismo aislado: Tipo de muestra (**BAS**=broncoaspirado, **ESP**=esputo, **RESP**=muestra respiratoria, **HC**=hemocultivo, **OR**=orina, **HDA**=herida, **ABC**=absceso, **DRE**=drenaje, **LPER**=líquido peritoneal, **AG**=antígeno, **GM**=galactomanano, **BG**=betaglucano, **BIL**=líquido biliar, **LCR**=líquido cefalorraquídeo). **Microorganismo aislado**: tres primeras letras de género y especie (ej. cantro=*Candida tropicalis*, stacon=*Staphylococcus coagulasa* negativa, etc). **Tratamiento previo**: ver apartado de abreviaturas

Continuación del ANEXO IV.- Resultados globales incluyendo nº de episodio (Nº), sexo del paciente (Sx), edad, días de permanencia en UCI (UCI), evolución (Out), presencia de fiebre o hipotermia (T^a), leucocitosis/leucopenia (Leu), diagnóstico inicial (DI), foco de sospecha (Foco), existencia de otros cultivos (O Cultivo), tratamiento previo antibiótico y/o antifúngico (Tratamiento), resultado de SeptiFast, resultado del Hemocultivo y diagnóstico final (DF)

Nº	Sx	Edad	UCI	Out	T ^a	Leu	DI	Foco	O Cultivo	Tratamiento	SeptiFast	Hemocultivo	DF
131-2	H	51	8	SP	0	1	SS	DIG	HCpromir	CTX+MTZ+VCN	N	N	C
132	M	78	4	SP	1	1	S	OR	OResccol	CTX	<i>S. aureus</i>	N	C
133	H	28	3	SP	1	0	S	DIG	LPERstalug	NC	N	N	N
134	M	82	7	EX	1	0	S	RESP	neg	CTX	N	N	N
135	M	86	7	SP	1	1	S	RESP	neg	CTX+CC	N	N	N
136	H	65	9	SP	1	0	S	CER	neg	N	N	N	N
137	H	48	9	SP	1	1	SG	RESP	LPLEstrpne	IMI	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	P
138-1	H	75	7	SP	1	1	S	DIG	N	N	N	<i>E. faecalis+S. aureus</i>	P
138-2	H	75	49	EX	1	1	S	HDA	ABCesccol	IMI	N	N	N
139	M	68	7	EX	1	0	S	CV	N	N	N	N	N
140	H	75	9	EX	1	1	SS	OR	OR	CTX	N	N	C
141	H	69	8	EX	1	0	S	CV	neg	N	SCN	N	N
142	M	29	16	SP	1	1	S	RESP	AGstrpne	A/C	<i>S. pneumoniae</i>	N	C
143	H	75	5	SP	0	1	S	RESP	RESPstrpne	CTX	N	SCN	N
144-1	M	67	14	SP	1	0	SS	HDA	HDAentfae	TZP	N	N	C
144-2	M	67	14	SP	1	0	S	HDA	HCEublim	TZP+MTZ	N	N	N
144-3	M	67	6	EX	1	0	SS	HDA	neg	A/C	SCN	<i>S. sanguinis</i>	P
144-4	M	67	6	EX	1	1	SS	HDA	HCstacon	LZD+IMI	SCN	N	C
145	M	74	5	EX	1	1	S	CER	neg	N	N	N	N
146	H	79	11	EX	1	0	S	RESP	neg	A/C	N	N	N
147	H	69	1	SP	1	0	S	RESP	RESPstrpne	CTX+MTZ	N	N	N
148	H	29	4	SP	1	0	S	HDA	ORMixta HDAentfae,	CTA	N	N	N
149	H	73	48	EX	1	1	S	HDA	HCEublim	TMP	N	<i>E. faecalis</i>	P
150	H	20	3	SP	1	1	S	CER	neg	CTX+VCN	N	<i>S. hominis</i>	N
151	M	27	1	SP	1	0	S	CER	neg	ACI	N	N	N
152	H	49	8	SP	1	1	S	DIG	COPsalspp	N	N	<i>Salmonella spp.</i>	P
153	M	73	6	SP	1	1	SS	CV	N	A/C	SCN	<i>S. haemolyticus</i>	P
155	M	56	37	EX	1	1	SG	RESP	BASstaur	N	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	P
156	H	70	11	EX	1	0	S	RESP	LPLE	IMI	N	N	N
157	H	55	13	EX	1	0	S	FOD	neg	N	SCN	N	N
158	M	78	31	EX	1	0	SS	FOD	RESPcanalb	AF	N	N	C
159	H	64	1	EX	1	1	SS	DIG	N	IMI	<i>S. aureus</i>	N	C
160	H	64	3	EX	1	0	SG	CER	N	CTX+AMP	N	N	C

Interpretación de abreviaturas de la tabla: **H**=Hombre, **M**=Mujer, **EX**=Exitus, **SP**=Superviviente, **1**=presencia, **0**=ausencia, **S**=Sepsis, **SG**=Sepsis Grave, **SS**=Shock séptico, **N**=Negativo, **C**=Sepsis clínica, **P**=Sepsis probada. Foco (F): **RESP**=respiratorio, **FOD**=desconocido, **OR**=urinario, **HDA**=herida, **DIG**=digestivo, **CV**=cardiovascular, **CER**=cerebral. **Otros cultivos-pruebas** y microorganismo aislado (CM): **neg**=negativos, **N**=no existieron. **CCmm**=Tipo de muestra-prueba y microorganismo aislado: Tipo de muestra (**BAS**=broncoaspirado, **ESP**=esputo, **RESP**=muestra respiratoria, **HC**=hemocultivo, **OR**=orina, **HDA**=herida, **ABC**=absceso, **DRE**=drenaje, **LPER**=líquido peritoneal, **AG**=antígeno, **GM**=galactomanano, **BG**=betaglucano, **BIL**=líquido biliar, **LCR**=líquido cefalorraquídeo). **Microorganismo aislado**: tres primeras letras de género y especie (ej. cantro=*Candida tropicalis*, stacon=*Staphylococcus coagulasa* negativa, etc). **Tratamiento previo**: ver apartado de abreviaturas

Continuación del ANEXO IV.- Resultados globales incluyendo nº de episodio (Nº), sexo del paciente (Sx), edad, días de permanencia en UCI (UCI), evolución (Out), presencia de fiebre o hipotermia (Tª), leucocitosis/leucopenia (Leu), diagnóstico inicial (DI), foco de sospecha (Foco), existencia de otros cultivos (O Cultivo), tratamiento previo antibiótico y/o antifúngico (Tratamiento), resultado de SeptiFast, resultado del Hemocultivo y diagnóstico final (DF)

Nº	Sx	Edad	UCI	Out	Tª	Leu	DI	Foco	O Cultivo	Tratamiento	SeptiFast	Hemocultivo	DF
161	M	71	8	SP	1	0	S	CER	neg	N	N	N	N
162	H	52	5	SP	1	1	S	CV	N	VCN	N	N	N
163	H	63	11	EX	1	1	S	CV	neg	CTX	N	N	N
164	H	75	46	SP	1	0	S	HDA	HCpseae	CFP	N	N	N
165	M	77	26	EX	1	1	S	CV	neg	IMI+VCN	N	N	N
166	H	44	16	EX	1	0	S	CV	HC	CTX	N	N	N
167	M	40	1	SP	1	1	S	CER	LCRstrpyo	NEO	N	N	N
168	M	58	10	SP	1	0	S	RESP	neg	N	N	N	N
169	H	41	54	EX	1	0	S	RESP	GMaspfum	N	N	N	N
170	H	52	3	SP	1	0	S	CV	N	A/C	N	N	N
171	M	64	2	EX	1	1	S	HDA	N	VCN+TZP	N	N	N
172	H	69	2	EX	0	1	SG	CER	neg	N	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	P
173	M	80	28	EX	0	1	S	OR	OResccol	IMI	N	N	C
174	H	47	11	SP	1	1	S	RESP	neg	N	<i>E. cloacae</i>	N	C
175	M	69	2	EX	1	1	S	DIG	LPER	N	N	N	N
176-1	M	77	5	EX	0	1	S	OR	DREprosp	CIP+MTZ	N	N	N
176-2	M	77	5	EX	0	1	S	OR	HC	MTZ	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	P
177	M	59	23	SP	1	0	S	CER	LCR	VCN+IMI	N	SCN	N
178	H	76	2	EX	1	1	S	DIG	N	CTX+MTZ+CC	N	N	N
179-1	H	65	47	SP	1	1	SS	DIG	HDAmixto	IMI	N	<i>S. epidermidis</i>	P
179-2	H	65	47	SP	0	1	S	DIG	CAT	N	N	N	N
180	M	50	9	SP	1	1	S	OR	OR	CTX	N	N	N
181	M	23	6	SP	1	1	S	DIG	HC	IMI	N	N	N
182	H	43	2	SP	1	0	S	CV	HCstacon	CTX+VCN+LVX	SCN	N	C
183-1	H	28	55	SP	0	1	S	HDA	LPER	N	N	N	N
183-2	H	28	55	SP	0	1	S	HDA	HCpseae	IMI	N	N	N
184	M	57	16	SP	0	1	S	FOD	HCstaur	N	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	P
185	H	44	3	SP	1	0	S	DIG	N	CTX+MTZ	N	N	N
186	M	87	4	SP	0	1	S	OR	N	TZP	N	N	N
187	H	52	68	SP	1	1	S	HDA	HDAentcloa	N	<i>E. cloacae</i>	N	C
188	M	35	13	EX	1	1	S	RESP	neg	CEF+CC	N	N	N
189	H	71	26	EX	1	1	S	DIG	Hcesccol	IMI+LZD	<i>E. coli</i>	N	C
190	H	68	3	SP	1	1	S	RESP	LPER	N	N	N	N
191	H	81	6	SP	1	1	SS	OR	OResccol	TZP	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	P
192	H	42	43	SP	1	0	S	CV	HC, OR	CTX+MTZ	N	N	N

Interpretación de abreviaturas de la tabla: **H**=Hombre, **M**=Mujer, **EX**=Exitus, **SP**=Superviviente, **1**=presencia, **0**=ausencia, **S**=Sepsis, **SG**=Sepsis Grave, **SS**=Shock séptico, **N**=Negativo, **C**=Sepsis clínica, **P**=Sepsis probada. Foco (F): **RESP**=respiratorio, **FOD**=desconocido, **OR**=urinario, **HDA**=herida, **DIG**=digestivo, **CV**=cardiovascular, **CER**=cerebral. **Otros cultivos-pruebas** y microorganismo aislado (CM): **neg**=negativos, **N**=no existieron. **CCmm**=Tipo de muestra-prueba y microorganismo aislado: Tipo de muestra (**BAS**=broncoaspirado, **ESP**=esputo, **RESP**=muestra respiratoria, **HC**=hemocultivo, **OR**=orina, **HDA**=herida, **ABC**=absceso, **DRE**=drenaje, **LPER**=líquido peritoneal, **AG**=antígeno, **GM**=galactomanano, **BG**=betaglucano, **BIL**=líquido biliar, **LCR**=líquido cefalorraquídeo). **Microorganismo aislado**: tres primeras letras de género y especie (ej. cantro=*Candida tropicalis*, stacon=*Staphylococcus coagulasa* negativa, etc). **Tratamiento previo**: ver apartado de abreviaturas

Continuación del ANEXO IV.- Resultados globales incluyendo nº de episodio (Nº), sexo del paciente (Sx), edad, días de permanencia en UCI (UCI), evolución (Out), presencia de fiebre o hipotermia (T^a), leucocitosis/leucopenia (Leu), diagnóstico inicial (DI), foco de sospecha (Foco), existencia de otros cultivos (O Cultivo), tratamiento previo antibiótico y/o antifúngico (Tratamiento), resultado de SeptiFast, resultado del Hemocultivo y diagnóstico final (DF)

Nº	Sx	Edad	UCI	Out	T ^a	Leu	DI	Foco	O Cultivo	Tratamiento	SeptiFast	Hemocultivo	DF
193	H	49	9	SP	0	0	S	RESP	BAScanalb	N	N	N	N
194	H	40	35	SP	1	0	S	CV	HC	CTX	N	N	N
195	M	74	22	EX	1	0	S	DIG	LPERcanalb	N	N	N	N
196	H	50	6	SP	1	0	S	RESP	RESP	CLA+A/C	N	N	N
197	M	71	3	EX	1	1	SG	DIG	N	MTZ+GEN	N	N	C
198-1	H	47	36	SP	1	1	SS	FOD	N	VCN+IMI	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	P
198-2	H	47	36	SP	1	1	SS	FOD	HCstaur	LZD+FZ	N	N	P
199	M	76	19	EX	0	1	SG	HDA	HDAacibau	IMI	N	N	C
200	H	66	6	EX	1	0	S	CV	neg	N	N	N	N
201	H	65	4	EX	1	1	SG	CER	neg	NC	N	N	C
202	H	69	13	SP	1	1	SS	DIG	HC	CTX+MTZ	N	N	C
203	H	73	10	EX	0	1	S	HDA	HC, ABC	N	N	N	N
204	H	70	4	SP	0	0	S	CV	N	N	N	N	N
205	M	70	4	EX	1	1	S	CV	N	N	<i>K. pneumoniae/oxy</i>	N	C
206	H	62	15	EX	0	1	S	RESP	RESPstrpne	AF	N	N	N
207-1	H	49	28	EX	1	1	SS	HDA	HDA	VCN+IMI	N	SCN	C
207-2	H	49	31	EX	1	1	SG	HDA	HDAstaur	A/C	N	N	C
208	H	63	1	EX	1	1	S	OR	ORcantro	N	N	N	N
209	H	75	3	SP	1	0	S	CV	CATstacon	N	SCN	<i>S. hominis</i>	P
210	M	68	1	EX	1	1	SS	RESP	BASaspfum	CFP+VCN+VZ	N	N	C
211	H	53	9	EX	0	1	S	RESP	BASstrpne	N	<i>S. aureus</i>	N	C
212-1	H	64	12	SP	1	0	S	OR	N	A/C	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	P
212-2	H	64	12	SP	1	0	S	OR	HC	TZP	N	N	N
212-3	H	64	2	SP	1	0	S	OR	N	A/C	N	N	N
213	M	79	2	EX	1	1	SS	FOD	neg	CTX	N	<i>P. mirabilis+Str.viridans</i>	P
214	M	61	45	EX	1	1	SS	HDA	neg	N	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	P
215	M	65	2	EX	1	1	SS	HDA	N	TZP	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	P
216	M	62	24	EX	1	0	S	CER	HC	CTX	N	N	N
217-1	H	75	60	SP	1	0	S	CV	NC	N	N	SCN	N
217-2	H	75	60	SP	1	0	S	CV	NC	N	N	SCN	N
218	H	50	4	EX	1	1	S	RESP	LPLEmycspp	N	N	N	N
219	H	79	16	SP	1	1	S	CV	CATpseae	N	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	P
220	H	58	3	SP	1	0	S	DIG	N	A/C	N	N	N
221	M	76	2	SP	1	0	S	RESP	N	N	N	N	N
222	M	85	11	EX	1	1	S	HDA	N	N	N	N	N
223	H	53	37	EX	1	1	S	RESP	BASstaur	N	N	N	N

Interpretación de abreviaturas de la tabla: **H**=Hombre, **M**=Mujer, **EX**=Exitus, **SP**=Superviviente, **1**=presencia, **0**=ausencia, **S**=Sepsis, **SG**=Sepsis Grave, **SS**=Shock séptico, **N**=Negativo, **C**=Sepsis clínica, **P**=Sepsis probada. Foco (F): **RESP**=respiratorio, **FOD**=desconocido, **OR**=urinario, **HDA**=herida, **DIG**=digestivo, **CV**=cardiovascular, **CER**=cerebral. **Otros cultivos-pruebas** y microorganismo aislado (CM): **neg**=negativos, **N**=no existieron. **CCmm**=Tipo de muestra-prueba y microorganismo aislado: Tipo de muestra (**BAS**=broncoaspirado, **ESP**=esputo, **RESP**=muestra respiratoria, **HC**=hemocultivo, **OR**=orina, **HDA**=herida, **ABC**=absceso, **DRE**=drenaje, **LPER**=líquido peritoneal, **AG**=antígeno, **GM**=galactomanano, **BG**=betaglucano, **BIL**=líquido biliar, **LCR**=líquido cefalorraquídeo). **Microorganismo aislado**: tres primeras letras de género y especie (ej. cantro=*Candida tropicalis*, stacon=*Staphylococcus coagulans* negativa, etc). **Tratamiento previo**: ver apartado de abreviaturas

Continuación del ANEXO IV.- Resultados globales incluyendo nº de episodio (Nº), sexo del paciente (Sx), edad, días de permanencia en UCI (UCI), evolución (Out), presencia de fiebre o hipotermia (T^a), leucocitosis/leucopenia (Leu), diagnóstico inicial (DI), foco de sospecha (Foco), existencia de otros cultivos (O Cultivo), tratamiento previo antibiótico y/o antifúngico (Tratamiento), resultado de SeptiFast, resultado del Hemocultivo y diagnóstico final (DF)

Nº	Sx	Edad	UCI	Out	T ^a	Leu	DI	Foco	O Cultivo	Tratamiento	SeptiFast	Hemocultivo	DF
224	H	70	44	EX	1	0	S	RESP	RESPcanspp	VCN+AF	<i>S. aureus</i>	N	C
225	H	83	12	SP	1	0	S	DIG	NC	CTX+MTZ	N	SCN	N
226	M	71	12	SP	1	0	S	RESP	RESPvirinf	N	<i>Str. spp.</i>	N	N
227	M	84	4	EX	1	1	S	DIG	N	IMI+VCN	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	P
228	M	71	6	SP	0	1	S	RESP	neg	N	N	N	N
229	H	70	22	SP	1	0	S	DIG	HC,HDA	NC	N	SCN	C
230-1	H	64	77	EX	1	1	S	RESP	BASpseae	CTX+AV	<i>P. aeruginosa</i>	N	C
230-2	H	64	77	EX	1	1	S	RESP	BAScankru	CFP+COL	<i>C. krusei</i>	<i>Corynebacterium</i> +SCN	C
231	H	74	19	SP	1	1	S	CER	HC	IMI	N	N	N
232-1	H	45	13	EX	1	1	SS	RESP	BASstaur	N	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	P
232-2	H	45	13	EX	1	1	SS	RESP	BASmixto	CTX+LVX+LZD	<i>S. aureus</i> + <i>A. fumig</i>	N	C
233	H	45	1	EX	1	1	S	OR	N	IMI	N	N	N
234	H	64	29	SP	0	1	SS	DIG	HDAesccol	VCN	N	<i>E. coli</i>	P
235	H	52	13	SP	1	0	S	RESP	RESP	IMI	SCN	SCN	N
236	H	51	8	EX	1	1	SS	HDA	HDAstaur	TZP+VCN+RIF+ANF	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	P
237	H	53	3	SP	1	0	S	DIG	N	N	N	N	N
238	H	63	49	SP	1	0	SG	HDA	ABCklespp	CTX+MTZ	N	N	C
239	H	69	8	EX	0	1	S	RESP	RESP	LVX	N	<i>Propionibacterium</i> <i>spp.</i>	N

Interpretación de abreviaturas de la tabla: **H**=Hombre, **M**=Mujer, **EX**=Exitus, **SP**=Superviviente, **1**=presencia, **0**=ausencia, **S**=Sepsis, **SG**=Sepsis Grave, **SS**=Shock séptico, **N**=Negativo, **C**=Sepsis clínica, **P**=Sepsis probada. Foco (F): **RESP**=respiratorio, **FOD**=desconocido, **OR**=urinario, **HDA**=herida, **DIG**=digestivo, **CV**=cardiovascular, **CER**=cerebral. **Otros cultivos-pruebas** y microorganismo aislado (CM): **neg**=negativos, **N**=no existieron. **CCmm**=Tipo de muestra-prueba y microorganismo aislado: Tipo de muestra (**BAS**=broncoaspirado, **ESP**=esputo, **RESP**=muestra respiratoria, **HC**=hemocultivo, **OR**=orina, **HDA**=herida, **ABC**=absceso, **DRE**=drenaje, **LPER**=líquido peritoneal, **AG**=antígeno, **GM**=galactomanano, **BG**=betaglucano, **BIL**=líquido biliar, **LCR**=líquido cefalorraquídeo). **Microorganismo aislado**: tres primeras letras de género y especie (ej. *Candida tropicalis*, *Staphylococcus coagulasa negativa*, etc). **Tratamiento previo**: ver apartado de abreviaturas

5. DISCUSIÓN

5.1. Incidencia y mortalidad

La sepsis en España, según la Sociedad Española de Medicina Intensiva, Crítica y Unidades Coronarias (SEMICYUC) supone en la actualidad alrededor de unos 175.000 casos al año (360 casos por cada 100.000 habitantes), de los que un 29% (50.000 casos/año) son sepsis graves y un 8% (15.000 casos/año) presentan un shock séptico. Su incidencia está aumentando alrededor de un 8% cada año por factores como mayor prevalencia de procesos crónicos en la población por un incremento en la esperanza de vida, mayor número de aplicación de cirugías invasivas o mayor prevalencia de estados de inmunodepresión inducidos por fármacos o por otras causas. La tasa de mortalidad varía según los estudios, pero puede considerarse del 20-50% para la sepsis, aumentando para sepsis grave y shock séptico hasta un 47% y 84% respectivamente (León y cols, 2007). En nuestro estudio, obtuvimos una mortalidad del 37,7% (58/154) para los casos en que el síndrome de respuesta inflamatorio sistémico (SRIS) no fue debido a una sepsis y de un 56,4% (62/110) en aquellos en que se confirmó el diagnóstico de sepsis. La mortalidad de nuestro estudio para los casos de sepsis grave junto con los de shock séptico fue del 70,4% (38/54); encontrando nuestros datos dentro de los rangos descritos para este tipo de pacientes críticos.

5.2. Etiología de la sepsis

Nuestra tasa global de bacteriemia-fungemia se situó en el 32,2 %, algo más alta que lo hallado en otros estudios de pacientes críticos: 23% para Dierkes y cols, 2009 o 20% para Lodes y cols, 2012; pero similar a algunos otros autores como Klemm y cols, 2007 (37%)

o Rath y cols, 2012 (36%). Aunando las etiologías de bacteriemias de origen nosocomial, comunitario y asociadas a cuidados sanitarios que se pueden dar en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs), encontramos en la bibliografía (Sabatier y cols, 2009; Cisneros y cols, 2007) una incidencia similar, aunque con ligero predominio, de las bacteriemias producidas por Gram Positivos frente a las bacteriemias producidas por Gram Negativos. Los porcentajes exactos varían según los autores-tipo de pacientes asistidos en las UCIs de cada hospital; pero los microorganismos principalmente aislados por este orden son *S. aureus*, *S. pneumoniae* y Estafilococos coagulasa negativos, entre las bacterias Gram Positivas, y *E. coli* y *P. aeruginosa* entre las bacterias Gram Negativas. Estos datos son totalmente coherentes con los obtenidos por nosotros: 47,8% de bacterias Gram Positivas, 45,6% de bacterias Gram Negativas y el 6,6% restante correspondió a aislamientos fúngicos. Entre los Gram Positivos, *S. aureus* (25%) fue el predominante, seguido de *S. pneumoniae* (8,7%) y Estafilococos coagulasa negativa (SCN). Y entre los Gram Negativos, el microorganismo más frecuentemente aislado fue *E. coli* (20,6%) seguido de *P. aeruginosa* (11,9%).

5.3. Contribución de los marcadores biológicos al diagnóstico de sepsis

Está reconocido por las sociedades científicas, que el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica debido a una sepsis es difícil de distinguir de otras condiciones que producen un SRIS no infeccioso (Fernández y cols, 2010). Para nuestra serie, esta dificultad queda patente, pues tuvimos un 58,3% de casos en los que el SRIS diagnosticado no fue debido finalmente a una sepsis. En el año 2001 la Conferencia para la definición de la sepsis (Levy y cols, 2003) estableció una lista de los signos a reconocer, como guía para el diagnóstico de la sepsis, entre los que se encuentra la fiebre (que en los pacientes de UCI puede tener una causa infecciosa o no) o un recuento elevado de

leucocitos (que también podemos encontrar en muchos procesos no infecciosos). Ninguno de ellos es específico de la sepsis. En nuestro estudio un 75,7% de los pacientes presentaron fiebre o hipotermia, y un 61,7% presentaron leucocitosis o leucopenia, que se correlacionó ($p < 0,05$) con el diagnóstico final de sepsis. Sin embargo sólo un 41,7% de los episodios que cumplieron los criterios de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), se confirmaron como sepsis clínica o probada.

También se ha estudiado la utilidad de los marcadores biológicos disponibles para ayudar al diagnóstico de sepsis como: citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-8, IL-10), proteína C reactiva, procalcitonina, endotoxina, adrenomedulina, péptidos natriuréticos, proteína ligadora de lipopolisacáridos, etc. Determinándose que algunos de ellos como proteína C reactiva y procalcitonina pueden aportar una mayor aproximación al diagnóstico de sepsis, cuando encontramos niveles de estos parámetros aumentados en suero. Pero aún no existe un marcador “gold standard” para distinguir fielmente un SRIS infeccioso de uno que no lo es (Fernández y cols, 2010). Nuestros pacientes presentaron medianas elevadas tanto de proteína C reactiva como de procalcitonina (185/10 respectivamente), pero no encontramos relación significativa con un diagnóstico certero de sepsis. Disponemos de los valores de proteína C reactiva / procalcitonina sólo de 46 pacientes, lo que quizá haya influido a la hora de no poder obtener conclusiones válidas.

Entre las bases para la toma de decisiones diagnóstico-terapéuticas de los pacientes sépticos, está la categorización de la gravedad mediante determinados índices como pueden ser SOFA y APACHE II (León y cols, 2007). Disponemos de los datos de estos índices para 152 pacientes incluidos en nuestro estudio, encontrando valores medios de 5/18 para SOFA/APACHE II; lo que puede justificar nuestra alta tasa de tratamiento antibiótico/antifúngico previo del 67,1% y la mortalidad global obtenida del 46,4%. El estudio estadístico de estos parámetros, encontró diferencias significativas entre los

valores de SOFA/APACHE II para los pacientes en los que se confirmó una sepsis, respecto de aquellos en los que no se confirmó ($p < 0,05$). A pesar de nuestros buenos resultados de p entre los índices de gravedad y la presencia de sepsis, en una de las últimas revisiones para las definiciones de sepsis y shock séptico (Singer y cols, 2016; Seymour y cols, 2016), se consideró que SOFA no define sepsis; pero sí, que la presencia de al menos dos criterios de qSOFA (quick SOFA) como estado mental alterado, frecuencia respiratoria ≥ 22 respiraciones/minuto y presión arterial sistólica ≤ 100 mmHg, predicen una más alta mortalidad y una más prolongada estancia hospitalaria en los pacientes con sospecha de sepsis. Según las recomendaciones de la SCCM (Society of Critical Care Medicine), las escalas de puntuación de gravedad pueden desempeñar un papel importante en la toma de decisiones diagnóstico-terapéuticas, pero tampoco deberían usarse en decisiones como por ejemplo, priorizar a los pacientes para recibir o no un tratamiento (SCCM, 1994; Arias y Balibrea, 2001).

5.4. Calidad de nuestro estudio

Dark y cols en 2015, realizan una revisión sistemática de todos los estudios publicados hasta el momento sobre *SeptiFast*, para determinar la seguridad de este test a la hora de hacer recomendaciones sobre su utilidad clínica, ante la sospecha de una sepsis. Concluyendo, que no existía ningún estudio hasta ese momento que cumpliera todos los criterios STARD (Standards for Reporting Diagnostic Accuracy) de calidad. Entre estos criterios STARD (Bossuyt y cols, 2003) para determinar la seguridad de los estudios en el diagnóstico, se incluyen: una muestra de pacientes representativa, descripción de los criterios de inclusión y exclusión de pacientes, descripción suficiente del test y del método de referencia empleado, inclusión de test ciegos, así como explicación de los resultados ininterpretables.

Nuestro estudio recoge 264 episodios analizados, de un total de 237 pacientes; muestra poblacional que consideramos suficientemente representativa, además de significativa y homogénea a la hora de comparar y analizar los resultados; ya que todos nuestros pacientes procedían de la UCI de adultos y de un único hospital, dato importante a la hora de valorar el tratamiento antibiótico/antifúngico aplicado, por la posible variabilidad interhospitalaria en los protocolos de tratamiento antimicrobiano empírico de los procesos infecciosos. Sólo algunos autores que publicaron trabajos de UCI como Lehmann y cols, 2010 o Lodes y cols, 2012, se acercan en número de muestras a las procesadas por nosotros (453 y 258 muestras respectivamente), pero estas procedían de un notable menor número de pacientes que nosotros (52 y 108 pacientes respectivamente).

Los criterios de inclusión de los pacientes, casos-episodios excluidos del estudio, así como el fundamento y procedimientos tanto del test *SeptiFast* como del hemocultivo, están explícitamente detallados en la sección de material y métodos. Nuestros ensayos podrían considerarse ciegos, pues las muestras sanguíneas para *SeptiFast* se fueron analizando seguidamente a su recepción en el laboratorio de Microbiología, ofreciendo el resultado -en todos los casos- con anterioridad al resultado del Hemocultivo (6-24 horas frente a 48-72 horas). Igualmente, hallamos algunos resultados difíciles de interpretar, que describimos en la sección de resultados. Otro criterio de calidad que cumple nuestro estudio, y que raramente está detallado en los trabajos publicados hasta el momento (Dark y cols, 2015), es la descripción de la existencia o no de tratamiento antibiótico y/o antifúngico previo a la toma de las muestras; y en caso afirmativo, cuál o cuáles fueron.

5.5. Sensibilidad mínima analítica de la técnica molecular *SeptiFast*

En cuanto a la sensibilidad mínima analítica de la técnica de *SF*, obtenemos una mayor sensibilidad que otros autores como Lehmann y cols, 2008; aunque igual para la

extracción manual y la extracción automática ensayada. Nuestra evaluación detectó microorganismos en sangre, mediante ambas variantes de extracción, a concentraciones de 3 UFC/ml para *E. coli* y *S. aureus* y de 30 UFC/ml para *C. krusei*; mientras que Lehmann y cols, 2008 calculó la sensibilidad mínima analítica del test en 30 UFC/ml para todos los patógenos incluidos en la lista maestra (SML), excepto para *C. glabrata*, SCN y *Streptococcus* spp. que quedó establecida en 100 UFC/ml. Estos resultados sólo fueron comprobados una vez por cada variante de extracción, quizá esta sea la razón de la diferencia respecto a nuestros datos. Sin embargo, nuestra sensibilidad es más coincidente con la aportada por la casa comercial para esta técnica de PCR; que obtuvo resultados de 30 UFC/ml para el 100% (n=20) de las cepas ensayadas de *C. krusei* y 3 UFC/ml para *E. coli* (20/20) y *S. aureus* (8/20) de las cepas ensayadas.

5.6. Extracción automatizada

Se han publicado numerosos trabajos estudiando el potencial beneficio que SeptiFast aportaría en el diagnóstico de la sepsis en pacientes críticos (Lehmann y cols, 2010; Yanagihara y cols, 2010; Lodes y cols, 2012); pero en prácticamente todos se utiliza el método de extracción manual recomendado por el fabricante, siendo el tiempo de respuesta global al médico solicitante de unas 6 horas. Nosotros pretendemos evaluar este test utilizando una adaptación específica de la extracción automática de los ácidos nucleicos, mediante MagNA Pure Compact (Roche Diagnostics); que podría acortar el tiempo de respuesta al clínico y también reduciría los posibles errores derivados de la manipulación de las muestras en la etapa de extracción. Sólo hemos encontrado dos estudios muy recientes que utilizan la extracción automática mediante MagNA Pure Compact: Tafelsky y cols, 2015 y Suberviola y cols, 2016. El segundo trabajo difiere del nuestro en que utiliza la técnica de SeptiFast (SF) como criterio comparativo de referencia

para el hemocultivo (HC). Burdino y cols 2013 observa cómo *SF* obtiene una menor tasa de contaminación, distinguiendo mejor los Estafilococos coagulasa negativa (SCN) sin valor clínico que el HC. El software de identificación de *SeptiFast* (SIS) facilita la interpretación de los posibles contaminantes, en base al cut-off establecido para cada grupo de los microorganismos. Nuestra tasa de contaminación global para los HC fue superior a la que obtuvimos para *SF* utilizando la adaptación de extracción automática (12,5% frente a 3,4%). Otros autores (Dierkes y cols, 2009; Lodes y cols, 2012) obtienen también menor número de aislamientos sin valor clínico, como pueden ser los SCN, mediante *SF* respecto al HC.

5.7. Superioridad en la detección de microorganismos mediante *SeptiFast* respecto al hemocultivo

Paralelamente al resto de trabajos (Dierkes y cols, 2009; Lehmann y cols, 2009; Wallet y cols, 2010; Lodes y cols, 2012; Rath y cols, 2012), nosotros detectamos mediante *SF* mayor número de microorganismos patógenos que mediante el HC (73 frente a 49); a pesar de que *SF* tiene un panel de detección limitado sólo a 25 patógenos. En nuestro estudio, encontramos 8 aislamientos a partir del HC que no cubría el espectro de *SF* y 6 de estos 8 pertenecieron a episodios donde el foco de origen era digestivo; lo que podría orientar a tener precaución al interpretar clínicamente resultados *SF* falsos negativos, en pacientes que tengan criterios similares de posible sepsis asociada a patologías digestivas. Encontramos superioridad numérica en la técnica de *SF* para todos microorganismos detectados incluidos en la lista maestra (SML), excepto para *E. faecalis* (0/2), *P. mirabilis* (0/1) y *Candida* spp. (1/1). De los casos en que se aisló *E. faecalis*, uno de ellos sólo se había detectado en un set de dos, con lo que podría estar en baja concentración sanguínea, siendo esta una posible razón de la no detección mediante *SF*. El otro *E. faecalis*,

corresponde a una sepsis polimicrobiana cuya muestra sufrió una incidencia preanalítica, llegándonos los botes de HC por separado de la muestra para *SF*. Desconocemos si las muestras se tomaron en momentos diferentes. El aislamiento de *P. mirabilis* coincidió con el anterior resultado discordante al obtenerse sólo en un set de dos, además de haber tenido una incidencia preanalítica del mismo tipo. *S. pneumoniae* se detectó en nuestro estudio en 6 ocasiones mediante *SF*, frente a 1 del HC; estando en todas las ocasiones confirmado con otros cultivos y/o pruebas. Cuatro de estos seis resultados falsos negativos mediante hemocultivo, estaban tratados previamente a la toma de muestras con una cefalosporina, lo que podría justificar su no detección mediante el sistema tradicional de hemocultivo. *Aspergillus fumigatus* sólo fue detectado mediante *SF*. Los cuatro aislamientos detectados de *Aspergillus fumigatus*, estuvieron confirmados con otros cultivos y/o pruebas, eliminándose así la posibilidad de que su hallazgo sea debido a una contaminación producida en el procesamiento de las muestras. Este microorganismo está asociado a mal pronóstico en pacientes críticos y normalmente no crece en los hemocultivos, por lo que consideramos estos resultados de gran interés, aún estando en bajo número en nuestro estudio.

5.8. Exactitud diagnóstica

Obtenemos para nuestra técnica de PCR a tiempo real *SeptiFast*, una sensibilidad del 73,47% y una especificidad del 94,58%; mientras que para el HC obtenemos valores del 47,96% y 80,12% de sensibilidad y especificidad respectivamente. Los valores de sensibilidad y especificidad son más altos para *SF* que para el HC; pudiendo estar la explicación al mejor valor de especificidad para *SF*, en la alta tasa de contaminación por SCN obtenida en nuestra serie, en su mayoría clasificados como contaminantes por el software de identificación de *SeptiFast* (SIS). Nuestros datos de sensibilidad y

especificidad para *SF*, son similares a los obtenidos por otros autores como Sitnik y cols, 2011 (sensibilidad 75%, especificidad 90%) o Chang y cols, 2013 (sensibilidad 75%, especificidad 92%); aunque estos datos pueden variar entre los distintos trabajos dependiendo de factores metodológicos como tipo de pacientes incluidos en el estudio, espectro de microorganismos encontrados, tasa de tratamiento antimicrobiano previo o diferencias en el criterio de referencia utilizado. El uso de los datos clínicos y de laboratorio (diagnóstico final) como criterio de referencia para el cálculo de la sensibilidad y especificidad, había sido ya utilizado por otros autores previamente como Wallet y cols, 2010; Pasqualini y cols, 2012 o Herne y cols, 2013; encontrando cada uno de ellos valores de sensibilidad y especificidad para *SF* de: 78% y 99%, 71% y 100%, 88,3% y 99% respectivamente. Nuestros datos de sensibilidad y especificidad, son similares a los dos primeros autores (Wallet y cols, 2010; Pasqualini y cols, 2012) y nuestro dato de sensibilidad, algo menor que lo hallado por Herne y cols, 2013.

Obtenemos para *SeptiFast*, una concordancia moderada frente al HC convencional ($\kappa=0,460$); dato similar a lo encontrado en otros trabajos de UCI como Bravo y cols, 2011 o Pasqualini y cols, 2012, que obtuvieron un índice kappa de 0,5. Sin embargo la concordancia es buena para *SF* ($\kappa=0,682$) si consideramos el diagnóstico final de sepsis como criterio de referencia.

Los valores predictivos tanto positivo (VPP) como negativo (VPN) para la técnica molecular *SeptiFast* fueron muy superiores a los obtenidos para el HC convencional: VPP 64,86% frente a un 42,34% y VPN 85,62% frente a un 53,59%, respectivamente. El mejor VPN de *SF* en nuestra serie, ha sido debido a una menor tasa de contaminación en la técnica de PCR y mejor discriminación a través del software de identificación de *SeptiFast* de los microorganismos patógenos respecto de aquellos que no dieron una señal adecuada para considerarse como tales. Esto podría suponer una gran aportación en la

toma de decisiones del manejo del paciente con sospecha de sepsis en cuanto al desescalado antibiótico, al igual que había sido ya reportado por Wallet y cols, 2010 y Lodes y cols, 2012; e importante para prevenir posibles toxicidades, resistencias antimicrobianas y reducir de los costes derivados de un tratamiento inapropiado, coincidiendo con lo reportado por Dellinger y cols, 2012.

5.9. Influencia del tratamiento antimicrobiano previo en los resultados

En nuestro trabajo no encontramos diferencias significativas, en cuanto a la influencia del tratamiento antimicrobiano recibido previamente a la toma de las muestras, en la positividad de las técnicas comparadas: 76,3% (29/38) de los casos *SeptiFast* positivo/hemocultivo negativo (*SF+/HC-*) habían sido tratados previamente, frente al 77,8% (7/9) de los casos *SeptiFast* negativo/hemocultivo positivo (*SF-/HC+*). Además, un 23,4% de todas nuestras sepsis no pudieron filiarse al obtener resultado negativo tanto para *SF* como para el HC. El 100% de estos casos (26/26) habían recibido tratamiento antimicrobiano previo a la extracción de las muestras. Esto difiere de las conclusiones obtenidas en otros trabajos como Vince 2008 o Mongelli 2015; pero la razón para ello podría estar en el bajo número de resultados *SF-/HC+* que obtuvimos: 9 casos. No podemos tener certeza, sólo mediante nuestro trabajo, de si los resultados *SF-/HC+* o el resultado negativo de esas 26 sepsis no filiadas, se debieron a la influencia del tratamiento antimicrobiano o a otros factores descritos en la bibliografía; que pueden inhibir la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como: presencia en la muestra de leucocitosis, colágeno, IgG, mioglobina, heparina o antivirales (Schrader y cols, 2012). Serían necesarios más estudios enfocados a la investigación de estos factores, para dilucidar la afectación del tratamiento antimicrobiano previo en los resultados microbiológicos.

5.10. Tiempo de respuesta en total (TAT)

El factor primordial que afecta a la evolución del paciente y a los costes globales de un episodio, es la aplicación de un rápido y adecuado tratamiento antibiótico (Vallés y cols, 2003; Kumar y cols, 2009; Westh y cols, 2009; Lodes y cols, 2012; Lyle y Boyd, 2013). Se calcula que el riesgo de muerte aumenta al doble a las 24 horas de retraso en la administración de un antibiótico adecuado, en caso de bacteriemia (Fraser y cols, 2006) y a las 12 horas de retraso en la administración de antifúngicos en caso de candidemia (Morrell y cols, 2005). El tiempo medio de identificación del microorganismo a partir del hemocultivo tradicional se sitúa entre 48 y 72 horas. Es cierto que se puede ofrecer una información preliminar, más rápida, a través de la tinción de Gram de los hemocultivos positivos (en ocasiones de gran ayuda para los clínicos); pero también es cierto que en algunos casos, esta información es limitada a la hora de plantear cambios en las pautas de tratamiento, sobretodo en posibles sepsis por Bacilos Gram Negativos, donde se deben tener en cuenta la existencia de multirresistencias en algunos grupos de estas bacterias. En cuanto a fungemias y microorganismos potencialmente multirresistentes, en nuestro estudio detectamos sólo mediante SF: 4 *A. fumigatus*, 2 *A. baumannii*, 5 *P. aeruginosa* y 1 *C. krusei*. Todos ellos, se consideraron verdaderos patógenos al presentarse en pacientes que fueron diagnosticados clínicamente de sepsis.

El tiempo de respuesta al clínico de la técnica molecular SeptiFast, mediante la extracción manual-que propone el fabricante- es de 6 horas; pero nosotros hemos conseguido reducirlo a 4 horas utilizando la extracción automatizada, que además disminuye las posibles contaminaciones derivadas de una excesiva manipulación en su procesamiento. En el caso en que SF se hubiese instaurado dentro de los protocolos diagnósticos de rutina de la UCI, habría supuesto un ahorro en tiempo de respuesta mínimo de 44 horas (1,8 días) para 30 casos de sepsis (número de episodios donde

obtuvimos un resultado concordante positivo *SF/HC*) además de un posible desescalado antibiótico en nuestros 153 casos descartados de sepsis (con resultado concordante negativo *SF/HC*), sin tener en cuenta los 38 episodios más de sepsis con resultado *SF+/HC-* que gracias a la aportación de esta técnica molecular, habrían podido filiarse correctamente.

5.11. Comparación con otras técnicas moleculares con marcado CE

Del resto de técnicas de PCR con marca CE que están actualmente disponibles en el mercado para detectar ADN de patógenos a partir de una muestra sanguínea: SepsitTest® (Molzylm, Bremen, Alemania) permite la identificación de unos 300 patógenos diferentes, pero sin identificación de especie y con el inconveniente del alto riesgo de contaminaciones de ADN debido a los procesos de postamplificación de los amplicones. Su tiempo de realización para todo el proceso está entre 8 y 12 horas, por lo que se cuestiona su utilidad como test de diagnóstico rápido (Mühl y cols, 2010). VYOO® (SIRS-Lab, Jena, Alemania) puede detectar 34 especies de bacterias y 6 especies de hongos, así como 5 marcadores de resistencia; pero el tiempo de respuesta al clínico mediante este método es también de unas 8 horas. En un estudio realizado por Fitting 2012, se obtiene una concordancia con el hemocultivo del 46,2%, concluyendo los autores en una necesidad de mejorar el procedimiento. IRIDICA BAC BSI Assay® (Abbott Molecular, IL, EUA) puede identificar unos 750 microorganismos entre bacterias y hongos, pero también necesita de 8 horas para tipificar la posible sepsis. En la práctica rutinaria de un laboratorio de Microbiología, disponemos de unas 7-8 horas diarias de jornada laboral. Para que las técnicas moleculares pudiesen rendir el servicio pretendido a pacientes críticos objeto de nuestro estudio, en cuanto a la aplicación de un adecuado tratamiento antibiótico lo más rápido posible (Lodes y cols, 2012; Kurmar y cols, 2009;

Lyle y Boyd, 2013; Westh y cols, 2009); lo ideal sería poder disponer de una técnica con buena exactitud diagnóstica, y completar el procedimiento de la técnica- desde la recepción y registro de la muestra, pasando por la extracción de ADN, amplificación y detección de los productos amplificados, hasta la información del resultado- en no más de esa jornada laboral. Las técnicas que necesitan 8 horas en su procesamiento, en la realidad diaria, no pueden dar el resultado en una jornada laboral; pues hay que tener en cuenta la demora en el circuito de las muestras desde su extracción al paciente en la planta de UCI hasta su llegada al laboratorio de Microbiología. Así pues hasta el momento, de entre las técnicas moleculares disponibles, sólo *SeptiFast* mediante la extracción automática ensayada por nosotros, reúne estos criterios de buena exactitud diagnóstica y TAT, pudiendo ofrecer los resultados en sólo 4 horas de trabajo, o lo que es lo mismo, en la misma jornada laboral en la que se ha tomado la muestra.

6. CONCLUSIONES

6.1. Eficacia de la extracción automatizada frente a la extracción manual

- La técnica molecular *SeptiFast* (*SF*), detectó microorganismos en sangre a concentraciones de 3 UFC/ml, tanto mediante extracción manual como con extracción automatizada mediante MagNA Pure Compact. La sensibilidad mínima analítica de *SF* para *Candida krusei* se situó en 30 UFC/ml.
- La sensibilidad de la técnica *SF* aumentó al diluir el extraído; al evitar de esta forma, posibles inhibiciones de la reacción en cadena de la polimerasa.
- La extracción manual de ADN en *SF*, requiere una alta manipulación de la muestra; que lo hace laborioso y proclive a la contaminación.
- El volumen de lisado necesario para la extracción manual es notablemente mayor (1 ml), que el necesario para la extracción automatizada (215 µl); aportando ambas extracciones un volumen final de elución similar.
- Aplicando la extracción automatizada de *SF*, aumentó la sensibilidad, simplicidad y rapidez respecto a la extracción manual; siendo posible una detección e identificación de el/los microorganismo/s responsables de la sepsis en 4 horas, frente a 6 horas necesarias mediante extracción manual.

6.2. *SeptiFast* con extracción automatizada frente a hemocultivo

- Mediante *SF* se detectaron microorganismos no hallados por hemocultivo, aunque también el hemocultivo (HC) detectó patógenos no encontrados mediante *SF*; siendo una de las razones, la limitada lista de microorganismos capaces de ser detectados mediante esta técnica.

- La técnica molecular *SF* discriminó mejor los microorganismos contaminantes que la técnica tradicional del HC; haciéndose especialmente útil, en el apoyo clínico a la interpretación del hallazgo de *Estafilococos coagulasa negativa* en la sangre de los pacientes.
- La exactitud diagnóstica de *SF* fue superior a la del HC convencional, utilizando el diagnóstico final de sepsis como criterio de referencia.
- La influencia del tratamiento antimicrobiano previo en los resultados de ambas técnicas diagnósticas (*SF* y HC), no fue significativa en nuestra serie. Sería necesario ampliar el estudio con un mayor número de resultados hemocultivo positivo con *SF* negativo, para obtener conclusiones válidas a este respecto.

6.3. Ventajas de *SeptiFast* con extracción automatizada en el manejo del paciente crítico

- *SeptiFast*, representa una ventaja que puede ser crucial en el tiempo de adecuación del tratamiento en pacientes críticos; tanto en el caso de resultados negativos como positivos:
 - podría contribuir a disminuir la mortalidad intra-UCI por un ajuste más rápido del tratamiento antimicrobiano y más orientado a la etiología de las sepsis (por una mayor filiación de estas)
 - reduciría posibles toxicidades farmacológicas
 - contribuiría al control del desarrollo de resistencias
 - evitaría costes innecesarios en cuanto a tratamiento; participando en la toma de decisiones para un más rápido desescalado antibiótico
- Sigue siendo necesaria la realización de hemocultivos, en los pacientes críticos con sospecha de sepsis; debido mayormente a que hasta el momento, este test molecular

SF sólo identifica 25 de los microorganismos más frecuentemente productores de sepsis.

- La técnica molecular LightCycler® SeptiFast utilizando una extracción automatizada mediante MagNA Pure Compact, puede contribuir junto con los métodos habituales de cultivo, a un diagnóstico más rápido de bacteriemia y fungemia en pacientes críticos.

7. ABREVIATURAS

7.1. ABREVIATURAS GENERALES

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANA	anaerobio
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
ARN	Ácido ribonucleico
BGN	Bacilo Gram Negativo
CI	control interno
CN	control negativo
DF	diagnóstico final
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ETS	Secuencia Transcrita Externa
F	Hongos
FRET	Energía de Resonancia de Förster
GN	bacterias Gram Negativas
GP	bacterias Gram Positivas
HC/s	Hemocultivo/s
HC+	Resultado positivo en hemocultivo
HC-	Resultado negativo en hemocultivo
HCl	Ácido clorhídrico
IC₉₅	Intervalo de confianza del 95%
IgG	Inmunoglobulina G
IL	interleuquina
ITS	Interespaciador de Tránsito Interno
κ	índice kappa
ml	mililitros
MM	Mezcla Maestra
N	Resultado negativo
NTS	Espaciador No Transcrito
p	valor p o significación estadística
PaCO₂	Presión arterial de CO ₂
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCT	Procalcitonina
rARN	Ácido ribonucleico ribosómico
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
SCN, CoNS	Estafilococos coagulasa negativos
SF	SeptiFast
SF-	Resultado negativo en SeptiFast
SF+	Resultado positivo en SeptiFast

SIS	Septi <i>Fast</i> Identification Software
SML	Lista maestra de Septi <i>Fast</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
SOFA	Sepsis-related Organ Failure Assessment
SRIS	Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica
TAT	tiempo de respuesta en total
TM	temperaturas de fusión
UCI/s	Unidad/es de Cuidados Intensivos
UFC	Unidades formadoras de colonias
VPN	valor predictivo negativo
VPP	valor predictivo positivo

7.2. ABREVIATURAS DE ANTIMICROBIANOS

A/C	amoxicilina/clavulánico
AB	antibiótico no especificado
ACI	aciclovir
AF	antifúngico no especificado
AK	amikacina
AMP	ampicilina
ANF	anfotericina
AV	oseltamivir
CC	clindamicina
CEF	cefazolina
CFP	cefepime
CIP	ciprofloxacina
COL	colistina
CSF	caspofungina
CTA	ceftriaxona
CTX	cefotaxima
CTZ	ceftazidima
FZ	fluconazol
GEN	gentamicina
IMI	imipenem
LVX	levofloxacina
LZD	linezolid
MRP	meropenem
MTZ	metronidazol
MUP	mupirocina
N	sin tratamiento
NC	no conocemos dato
NEO	neomicina

RIF	rifampicina
TMP	trimetoprim/sulfametoxazol
TOB	tobramicina
TZP	piperacilina/tazobactam
VCN	vancomicina
VZ	voriconazol

8. ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y ANEXOS

8.1 Tablas

Tabla 1.- Lista maestra (SML) de los microorganismos detectados mediante LightCycler® SeptiFast.....	8
Tabla 2.- Condiciones de temperatura, número de ciclos y tiempos de las distintas etapas de la amplificación de la PCR mediante LightCycler® SeptiFast.....	33
Tabla 3.- Resumen de resultados de las evaluaciones de las distintas variantes ensayadas preliminarmente, de la técnica SeptiFast (SF) respecto al hemocultivo (HC).....	45
Tabla 4.- Patologías causa de ingreso en UCI, de los pacientes y/o episodios estudiados.....	48
Tabla 5.- Análisis descriptivo de los datos clínico-epidemiológicos.....	49
Tabla 6.- Resultados globales obtenidos comparando la técnica de SeptiFast (SF) con el resultado en sus respectivos Hemocultivos (HC).....	50
Tabla 7.- Resultados obtenidos: SeptiFast (SF) negativo con hemocultivo (HC) positivo (SF-/HC+).....	51
Tabla 8.- Resultados obtenidos SF+/HC+ catalogados inicialmente como discordantes..	53
Tabla 9.- Género-Especie y número de microorganismos incluidos y no incluidos en la lista maestra (SML) de SF, detectados en nuestro estudio mediante: sólo SeptiFast (SF), sólo Hemocultivo (HC) o por ambos métodos (SF/HC).....	54
Tabla 10.- Resultados interpretados como contaminantes mediante: sólo SeptiFast (SF), sólo Hemocultivo (HC) o por ambos métodos (SF/HC).....	55
Tabla 11.- Resultados globales obtenidos comparando la técnica de SeptiFast (SF) con el Hemocultivo (HC), número de episodios por grupo con diagnóstico final (DF) de sepsis y	

número de episodios con diagnóstico final de sepsis que recibieron tratamiento antimicrobiano previo..... 56

Tabla 12.- Análisis descriptivo de las variables temperatura ($>38,3^{\circ}\text{C}$ $<36^{\circ}\text{C}$), presencia de leucocitosis/leucopenia, existencia de tratamiento previo en muestras con resultado *SF* positivo y existencia de tratamiento previo en muestras con resultado de HC positivo.....57

Tabla 13.- Datos cuantitativos de las variables *SeptiFast* y hemocultivo para el análisis estadístico respecto al diagnóstico final (DF) de sepsis como criterio de referencia.....58

8.2 Figuras

Figura 1.- Sistema Bactec-9240® (Becton Dickinson)..... 23

Figura 2.- Pasos de la extracción manual, desde la lisis mecánica de la muestra hasta la purificación del ADN..... 28

Figura 3.- Aparato de extracción automática MagNA Pure Compact ® (izquierda) y cartucho de reactivos (derecha)..... 28

Figura 4.- Aparato LightCycler® 2.0 para amplificación molecular con carruseles para los capilares..... 29

Figura 5.- Distribución de los reactivos (mezcla de detección, mezcla maestra, controles) y muestras en el bloque refrigerado de *SeptiFast*..... 30

Figura 6.- Regiones ITS. Genes que codifican para el ARN ribosómico..... 32

Figura 7.- Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (FRET). Figura 7.A.- Adición de dos secuencias oligonucleotídicas marcadas con cromóforos. Figura 7.B.- Excitación, transferencia y emisión de energía entre los cromóforos.....34

Figura 8.- Curvas de temperaturas de fusión en la amplificación de la PCR de *SeptiFast* 35

Figuras 9.A-F.- Interfaz del software de identificación de patógenos (SIS; SeptiFast Identification Software, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)..... 36

Figura 10.- Distribución de las curvas de fusión y sus respectivos canales de detección (canal 610, canal 640, canal 670, canal 705) para los distintos microorganismos G (+) = Gram Positivos, G (-) = Gram Negativos, Fungi = hongos y los controles internos (IC)..... 37

8.3 Anexos

ANEXO I.- Protocolo para la recogida de datos de los pacientes.....17

ANEXO II.- Consentimiento informado.....19

ANEXO III.- Herramientas de cálculo de los Índices de gravedad APACHE-II y SOFA..... 20

ANEXO IV.- Resultados globales incluyendo nº de episodio (Nº), sexo del paciente (Sx), edad, días de permanencia en UCI (UCI), evolución (Out), presencia de fiebre o hipotermia (T^a), leucocitosis/leucopenia (Leu), diagnóstico inicial (DI), foco de sospecha (Foco), existencia de otros cultivos (O Cultivo), tratamiento previo antibiótico y/o antifúngico (Tratamiento), resultado de SeptiFast, resultado del Hemocultivo y diagnóstico final (DF).....60

9. AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha salido adelante tras mucho amor-horas de dedicación; pero no me habría sido posible sin el apoyo emocional, en forma de palabras, tiempo o ejemplo de muchas personas. Así pues, agradezco la inspiración recibida para llevar a cabo este trabajo, a todas las personas que he tenido la fortuna de encontrar en este camino.

Especialmente sí me gustaría nombrar:

a mis padres por darme la posibilidad de elegir mi vocación. A mi familia y amigos por su cariño y apoyo sin condiciones. A mi pareja por su comprensión en los momentos en los que le he privado de mi tiempo. A Estrella Martín por su estímulo continuo. A Jose Carlos Palomares por su abnegación hacia el trabajo. A Beatriz Puche y Nieves Sivianes por su ayuda con la parte técnica. A Cristóbal León por su confianza en mí. A Alejandro Úbeda y Paco Lucena por su ayuda con los datos clínicos. A Carmen Almeida por su ayuda con la Estadística. A Filo por facilitarme la búsqueda de datos en el archivo y a Pepe (Roche) por la colaboración en el filtrado de datos.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. **ACCP/SCCM.** American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20: 864-874.
2. **Arias J** y Balibrea JL. Utilización de índices de gravedad en la sepsis. *Cir Esp* 2001; 70: 314-323
3. **Bossuyt PM,** Reitsma JB, Bruns DE, y cols. The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration. Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy. *Ann Intern Med* 2003; 138: 1-12.
4. **Bravo D,** Blanquer J, Tormo M, y cols. Diagnostic accuracy and potential clinical value of the LightCycler SeptiFast assay in the management of bloodstream infections occurring in neutropenic and critically ill patients. *Int J Infect Dis* 2011; 15: 326-331.
5. **Burdino E,** Ruggiero T, Alice T, y cols. Combination of conventional blood cultures and the SeptiFast molecular test in patients with suspected sepsis for the identification of bloodstream pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 79: 287-292.
6. **Cisneros JM,** Cobo J, Pujol M, y cols. Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25: 111-130.

7. **Crowe M**, Ispahani P, Humphreys H, y cols. Bacteraemia in the adult intensive care unit of a teaching hospital in Nottingham, UK, 1985-1996. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 377-384.
8. **Chang SS**, Hsieh WH, Liu TS, y cols. Multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis -a systemic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2013; 8.
9. **Dark PM**, Dean P y Warhurst G. Bench-to-bedside review: the promise of rapid infection diagnosis during sepsis using polymerase chain reaction-based pathogen detection. *Crit Care* 2009; 13: 217.
10. **Dark P**, Dunn G, Chadwick P, y cols. The clinical diagnostic accuracy of rapid detection of healthcare-associated bloodstream infection in intensive care using multipathogen real-time PCR technology. *BMJ Open* 2011.
11. **Dark P**, Blackwood B, Gates S, y cols. Accuracy of LightCycler (®) SeptiFast for the detection and identification of pathogens in the blood of patients with suspected sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med* 2015; 41: 21-33.
12. **Dellinger RP**, Levy MM, Rhodes A, y cols. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med* 2013; 41: 580-637.

13. **Dierkes C**, Ehrenstein B, Siebig S, y cols. Clinical impact of a commercially available multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis. *BMC Infect Dis* 2009; 9: 126.
14. **Edbrooke DL**, Hibbert CL, Kingsley JM, y cols. The patient-related costs of care for sepsis patients in a United Kingdom adult general intensive care unit. *Crit Care Med* 1999; 27: 1760-1767.
15. **Fernández LM**, López L, Ortega D, y cols. Marcadores biológicos de sepsis e inflamación. Taller del Laboratorio Clínico. Comité de Formación Continuada. Rev Lab Clin. *Asociación Española de Biopatología Médica* 2010; 7.
16. **Fitting C**, Parlato M, Adib-Conquy M, y cols. DNAemia detection by multiplex PCR and biomarkers for infection in systemic inflammatory response syndrome patients. *PLoS One* 2012; 7: 38916.
17. **Fraser A**, Paul M, Almanasreh N, y cols. Benefit of appropriate empirical antibiotic treatment: thirty-day mortality and duration of hospital stay. *Am J Med* 2006; 119: 970-976.
18. **Garnacho-Montero J**, Ortiz-Leyba C, Herrera-Melero I, y cols. Mortality and morbidity attributable to inadequate empirical antimicrobial therapy in patients admitted to the ICU with sepsis: a matched cohort study. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 436-441.

19. **Herne V**, Nelovkov A, Kütt M, y cols. Diagnostic performance and therapeutic impact of LightCycler SeptiFast assay in patients with suspected sepsis. *Eur J Microbiol Immunol* 2013; 3: 68-76.
20. **Ibrahim EH**, Sherman G, Ward S, y cols. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* 2000; 118: 146-155.
21. **Klemm M**, Prinz M, Nowak A, y cols. Clinical application of SeptiFast, a PCR method for the detection of bacteraemia, in intensive care patients. *Infection* 2007; 35: 12.
22. **Knaus WA**, Draper EA, Wagner DP, y cols. Prognosis in acute organ-system failure. *Ann Surg* 1985; 202: 685–693.
23. **Kollef MH**, Sherman G, Ward S, y cols. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest* 1999; 115: 462-474.
24. **Kollef MH**. Diagnosis of Ventilator-Associated Pneumonia. *N Engl J Med* 2006; 355: 2691-2693.
25. **Kumar A**, Ellis P, Arabi Y, y cols. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest* 2009; 136: 1237-1248.
26. **Landis JR** y Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33: 159-174.

27. **Lehmann LE**, Hunfeld KP, Emrich T, y cols. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol* 2008; 197: 313-324.
28. **Lehmann LE**, Alvarez J, Hunfeld KP, y cols. Potential clinical utility of polymerase chain reaction in microbiological testing for sepsis. *Crit Care Med* 2009; 12: 3085-3090.
29. **Lehmann LE**, Herpichboehm B, Kost GJ, y cols. Cost and mortality prediction using polymerase chain reaction pathogen detection in sepsis: evidence from three observational trials. *Crit Care* 2010; 14: 18.
30. **León C**, García-Castrillo L, Moya M, y cols. Documento de Consenso (SEMES-SEMICYUC). Recomendaciones del manejo diagnóstico-terapéutico inicial y multidisciplinario de la sepsis grave en los Servicios de Urgencias hospitalarios. *Med Intensiva* 2007; 31: 375-387.
31. **Levy MM**, Fink MP, Marshall JC, y cols. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 2003; 31: 1250-1256.
32. **Lodes U**, Bohmeier B, Lippert H, y cols. PCR-based rapid sepsis diagnosis effectively guides clinical treatment in patients with new onset of SIRS. *Langenbecks Arch Surg* 2012; 397: 447-455.

33. **Louie RF**, Tang Z, Albertson TE, y cols. Multiplex polymerase chain reaction detection enhancement of bacteremia and fungemia. *Crit Care Med* 2008; 36: 1487-1492.
34. **Lyle N** y Boyd J. The potential for PCR based testing to improve diagnosis and treatment of sepsis. *Curr Infect Dis Rep* 2013; 15: 372-379.
35. **Mancini N**, Carletti S, Ghidoli N, y cols. The Era of Molecular and Other Non-Culture-Based Methods in Diagnosis of Sepsis. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23: 235-251.
36. **Marco F** y Sancho S. El hemocultivo. En *Microbiología aplicada al paciente crítico*, Editado por Zaragoza R. Ed. Médica Panamericana, Madrid. 2007; 80-82.
37. **Mongelli G**, Romeo MA, Denaro C, y cols.: Added value of multi-pathogen probe-based real-time PCR SeptiFast in the rapid diagnosis of bloodstream infections in patients with bacteraemia. *Journal of Medical Microbiology* 2015; 64: 670-675.
38. **Morrell M**, Fraser VJ y Kollef MH. Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3640-3645.
39. **Mühl H**, Kochem AJ, Disqué C, y cols. Activity and DNA contamination of commercial polymerase chain reaction reagents for the universal 16S rDNA real-

- time polymerase chain reaction detection of bacterial pathogens in blood. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 66: 41-49.
40. **Murray PR**, Baron EJ, Jorgensen JH, y cols. Manual of clinical microbiology. 9th edition. *American Society for Microbiology*. Washington 2007.
41. **Nolte FS** y Caliendo AM. Molecular detection and identification of microorganisms. In *Manual of Clinical Microbiology*, 9th edition. Edited by P.R. Murray. ASM Press. Washington. 2007; 218-244.
42. **Pasqualini L**, Mencacci A, Leli C, y cols. Diagnostic performance of a multiple real-time PCR assay in patients with suspected sepsis hospitalized in an internal medicine ward. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 1285-1288.
43. **Peters RP**, Van Agtmael MA, Danner SA, y cols. New developments in the diagnosis of bloodstream infections. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 751-760.
44. **Rangel-Frausto MS**, Pittet D, Costigan M, y cols. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 1995; 273: 117-123.
45. **Rath PM**, Saner F, Paul A, y cols. Multiplex PCR for rapid and improved diagnosis of bloodstream infections in liver transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2069-2071.
46. **Sabatier C**, Peredo R, y Vallés J. Bacteriemia en el paciente crítico. *Med Intensiva* 2009; 33.

47. **Sands KE**, Bates DW, Lanken PN y cols. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA* 1997; 278: 234-240.
48. **SCCM** (Society of Critical Care Medicine) Ethics Committee. Consensus statement on the triage of critically ill patients. *JAMA* 1994; 20: 1200-1203.
49. **Schrader C**, Schielke A, Ellerbroek L, y cols. PCR inhibitors-ocurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* 2012; 113: 1014-1026.
50. **SEIMC** (Sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica). Procedimientos en microbiología clínica. 2002; disponible en:
<http://www.seimc.org/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia>
51. **Seymour CW**, Coopersmith CM, Deutschman CS, y cols. Application of a Framework to Assess the Usefulness of Alternative Sepsis Criteria. *Crit Care Med* 2016; 44: 122-130.
52. **Seymour CW**, Liu VX, Iwashyna TJ, y cols. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 762-774.
53. **Singer M**, Deutschman CS, Seymour CW, y cols. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 801-810.

54. **Sitnik R**, Marra AR, Petroni RC, y cols. SeptiFast for diagnosis of sepsis in severely ill patients from a Brazilian hospital. *Einstein* 2014; 12: 191-197.
55. **Störmer M**, Kleesiek K y Dreier J. High-volume extraction of nucleic acids by magnetic bead technology for ultrasensitive detection of bacteria in blood components. *Clin Chem* 2007; 53: 104-110.
56. **Strålin K**, Ehn F, Giske CG, y cols. The IRIDICA PCR/Electrospray Ionization–Mass Spectrometry Assay on Bronchoalveolar Lavage for Bacterial Etiology in Mechanically Ventilated Patients with Suspected Pneumonia. *PLoS One* 2016; 11: 159694.
57. **Suberviola B**, Márquez-López A, Castellanos-Ortega A, y cols. Microbiological Diagnosis of Sepsis: Polymerase Chain Reaction System Versus Blood Cultures. *Am J Crit Care* 2016; 25: 68-75.
58. **Tafelski S**, Nachtigall I, Adam T, y cols. Randomized controlled clinical trial evaluating multiplex polymerase chain reaction for pathogen identification and therapy adaptation in critical care patients with pulmonary or abdominal sepsis. *J Int Med Res* 2015; 43: 364-77.
59. **Vallés J**, Rello J, Ochagavía A, y cols. Community-acquired bloodstream infection in critically ill adult patients: impact of shock and inappropriate antibiotic therapy on survival. *Chest* 2003; 123: 1615-1624.

60. **Vince A**, Lepej SZ, Barsic B, y cols. LightCycler SeptiFast assay as a tool for the rapid diagnosis of sepsis in patients receiving antimicrobial therapy. *Critical Care* 2008; 12: 8.
61. **Wallet F**, Nseir S, Baumann L, y cols. Preliminary clinical study using a multiplex real-time PCR test for the detection of bacterial and fungal DNA directly in blood. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 774-779.
62. **Wellinghausen N**, Kochem AJ, Disqué C, y cols. Diagnosis of Bacteremia in Whole-Blood Samples by Use of a Commercial Universal 16S rRNA Gene-Based PCR and Sequence Analysis. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2759-2765.
63. **Westh H**, Lisby G, Breysse F, y cols. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 544-551.
64. **Yanagihara K**, Kitagawa Y, Tomonaga M, y cols. Evaluation of pathogen detection from clinical samples by real-time polymerase chain reaction using a sepsis pathogen DNA detection kit. *Crit Care* 2010; 14: 159.

