



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA
BACTERIEMIA

Autor: María Isabel Prieto Martín

Fecha: Febrero 2020

Tutor: Ángela Gómez Alférez

ÍNDICE

1	RESUMEN	2
2	OBJETIVOS	3
3	INTRODUCCIÓN	3
3.1	BACTERIEMIA	3
3.2	DIAGNÓSTICO	4
4	METODOLOGIA.....	5
5	RESULTADOS Y DISCUSION.....	5
5.1	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO BASADOS EN EL CULTIVO	5
5.2	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO NO BASADOS EN EL CULTIVO	9
5.2.1	TÉCNICAS BASADAS EN LA DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	10
5.2.2	TÉCNICAS BASADAS EN EL ESTUDIO DEL PROTEOMA BACTERIANO	13
5.3	BIOMARCADORES.....	17
6	CONCLUSIÓN	17
7	BIBLIOGRAFÍA	18

1 RESUMEN

Los dos objetivos principales de un laboratorio de Microbiología Clínica son la correcta identificación de los microorganismos causantes de la infección, en este caso de la bacteriemia, junto con el estudio de su sensibilidad a los antimicrobianos. La consecución de ambos resulta vital para la elección del tratamiento antibiótico más adecuado, siendo la rapidez en la obtención de los resultados un factor que mejora significativamente el pronóstico de la enfermedad.

En general, el hemocultivo sigue siendo la técnica de referencia para el diagnóstico de esta patología ya que los cuadros de bacteriemia cursan con una cantidad de microorganismos en sangre muy pequeña, lo que dificulta su detección de forma directa. La lentitud de este procedimiento supone una importante demora diagnóstica que implica la instauración de un tratamiento antibiótico empírico en el paciente durante un tiempo prolongado, hasta que se conocen los resultados definitivos. En los últimos años, distintas técnicas rápidas de diagnóstico basadas en el estudio del genoma o el proteoma bacteriano, han ido incorporándose paulatinamente a la rutina diagnóstica tradicional y han permitido disminuir de forma importante el tiempo de obtención de los resultados de identificación y sensibilidad del microorganismo causal. La mayor rapidez diagnóstica permite un ajuste precoz del tratamiento, disminuyendo el tiempo de terapia empírica, aportando una cierta mejora en el, cada vez más importante, problema de resistencia de las bacterias a ciertos antibióticos.

Los nuevos equipos de diagnóstico se incorporan dependiendo de la disponibilidad de cada laboratorio, teniendo en cuenta la relación beneficio-coste. El mayor rendimiento se

consigue siempre y cuando exista un equipo de trabajo multidisciplinar correctamente coordinado, de esta forma, se mejora la atención sanitaria del paciente y disminuyen los gastos sanitarios al disminuir el gasto en antibióticos y la estancia del paciente en el hospital.

2 OBJETIVOS

Este trabajo parte de la búsqueda bibliográfica con los objetivos de: destacar la importancia que tiene el diagnóstico de la bacteriemia y conocer las características principales de los métodos de diagnóstico habituales, incluyendo sus ventajas e inconvenientes, y así, poder comparar los métodos convencionales de cultivo con las técnicas moleculares más modernas, entendiendo el avance que han supuesto estas últimas en el diagnóstico de la patología.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 BACTERIEMIA

La bacteriemia se define como la presencia de bacterias en el torrente sanguíneo. Ello puede dar lugar a un episodio clínico variable que puede oscilar desde cuadros asintomáticos, cuando las bacterias son rápidamente controladas por los mecanismos de defensa (bacteriemia transitoria) hasta el shock séptico (fracaso multiorgánico). La respuesta desmesurada del huésped a la infección recibe el nombre de sepsis o septicemia. Para la detección de pacientes con riesgo de desarrollar sepsis, existe una escala nueva de medida, llamada qSOFA (*quick sepsis related organ failure assesment*) que al incluir criterios clínicos (véase ilustración 1), hace que sea fácilmente aplicable a cualquier nivel asistencial.



Ilustración 1. Escala quick SOFA

El origen de la bacteriemia puede ser diverso. La invasión de estos microorganismos puede producirse desde un foco infeccioso extravascular (a través de capilares sanguíneos o vasos linfáticos), o bien, desde un foco intravascular, como por ejemplo, a partir de la implantación de catéteres intravenosos.

Los focos de infección más frecuentes son: el tracto genitourinario, abscesos, heridas quirúrgicas, el tracto biliar y los catéteres intravasculares. Según el lugar de adquisición pueden clasificarse en comunitarias, asociadas a cuidados sanitarios o nosocomiales. Si bien es cierto que un 25% de las mismas son de origen desconocido. La tabla 1 hace referencia a alguna de las características de las bacteriemias atendiendo a este lugar de adquisición.

En cuanto a la incidencia, se dan entre 5 y 30 casos por cada 1.000 pacientes hospitalizados, dependiendo de la población estudiada. Además, la sepsis se asocia con una elevada morbilidad y con una mortalidad de entre el 10% y el 30%, convirtiéndose en la principal causa infecciosa de muerte, afectando a 100-150 de cada 100.000 habitantes al año. Estas características explican que el Servicio de Microbiología Clínica dé especial importancia a la detección de esta patología, centrándose especialmente en el diagnóstico y el pronóstico de la misma.

Adquisición de la bacteriemia	Incidencia*	Etiología (%)				Microorganismos principales	Polimicrobiana (%)	Origen** (%)	Mortalidad (%)	Ref.
		Gram+	Gram-	Hongos	Anaerobios					
Comunitaria	6-10	31	68	0	1	<i>E. coli</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>S. aureus</i>	5-6	Urinario (46-53) Respiratorio (12-27) Desconocido (9)	11-16	4-7
Asociada a cuidados sanitarios	-	32	64	0,3	3	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>K. pneumoniae</i>	7-8	Urinario (17-43) Catéter vascular (12-42) Desconocido (12)	20-34	4,5,7
Nosocomial	6	65	25	9,5	0-2	ECN <i>S. aureus</i> Enterococos	13-53	Catéter vascular (26-52) Urinario (18-33) Desconocido (16)	27-37	4,5,7,8

*Expresada en n.º episodios por 1.000 ingresos.

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

ECN: estafilococos coagulasa negativa.

Tabla 1. Principales características de las bacteriemias agrupadas según el lugar de adquisición

3.2 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico definitivo de la bacteriemia se establece cuando se aísla el microorganismo causal en la sangre del enfermo mediante el cultivo de la misma; es lo que se conoce como hemocultivo. Se trata del método más tradicional, aunque sigue siendo el principal método de diagnóstico. Su mayor limitación es la lentitud a la hora de emitir los resultados, sin embargo, permite aislar múltiples patógenos, siempre que se utilicen los medios de cultivo y las técnicas microbiológicas adecuadas, así como conocer la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos. Será necesario, en la mayoría de los casos, el empleo de nuevas técnicas diagnósticas basadas, generalmente, en la detección del genoma del microorganismo o en el estudio del proteoma bacteriano, con el objetivo de mejorar el diagnóstico y llevarlo a cabo en el menor tiempo posible.

La lentitud de los procedimientos de diagnóstico tradicionales supone la instauración, en el paciente, de un tratamiento empírico basado en la administración de antibióticos de amplio espectro, lo cual, ejerce una presión negativa en la selección de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos. Este tratamiento se corrige o se ajusta cuando se obtienen los resultados definitivos del diagnóstico. De modo que, los beneficios serán mayores cuanto antes se obtengan los resultados y se aplique el tratamiento definitivo.

4 METODOLOGIA

Para llevar a cabo este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica de distintas bases de datos de la literatura científica, como son: SEIMC (Sociedad Española de enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica). Distintos artículos incluidos en ELSEVIER, empresa de análisis que asiste a instituciones y profesionales en el progreso de la ciencia y cuidados avanzados en materia de salud. O “*Journal of Microbiological Methods*” que publica artículos académicos, así como, notas y artículos de revisión que incluyen métodos novedosos, o bien, mejoras significativas en los métodos científicos ya existentes. A lo largo del trabajo también se mencionarán instituciones que han sido consultadas como la *European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), *Infectious Diseases Society of America* (IDSA), o *American Society for Microbiology* (ASM).

5 RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO BASADOS EN EL CULTIVO

La cantidad de microorganismos que hay en el torrente sanguíneo durante un episodio de bacteriemia es escaso, oscila entre 10 y 10⁴ UFC/ml, pudiendo ser inferior a 0,1 UFC/ml en un 20% de los casos. De modo que, no se utilizan los exámenes directos de la sangre mediante tinción, sino que, para conseguir un diagnóstico rápido, tenemos que utilizar técnicas muy sensibles. Actualmente, el hemocultivo, es el principal método de diagnóstico para conocer la etiología de la bacteriemia. Es un método fácil, de modo que cualquier centro puede llevarlo a cabo. Y permite obtener el microorganismo viable, lo cual es necesario para conocer su sensibilidad a los antimicrobianos mediante un antibiograma. Como desventajas, encontramos un cierto retraso en la obtención de los resultados debido al tiempo que requiere, por lo que se ve disminuido su valor práctico. Además, en pacientes con situaciones algo distintas, como puede ser un tratamiento antibiótico o una infección ocasionada por hongos, el resultado puede ser erróneo.

Es ante la sospecha de que el paciente presenta un cuadro de bacteriemia (fiebre, escalofríos, hipotermia en neonatos y ancianos, u otros signos de infección o sepsis), cuando se toma la decisión de realizar un hemocultivo; no existe una recomendación universal. Si el resultado es positivo, se procede a realizar una tinción de Gram, a partir de una alícuota del hemocultivo, que confirmaría la presencia de bacterias y permitiría redactar un informe preliminar. A partir de este momento, se continúa con la identificación del microorganismo mediante subcultivos en medio sólido y sistemas rápidos no basados en cultivo, que dependerán de los algoritmos que siga cada centro.

A partir de la sangre del hemocultivo positivo se suele hacer un antibiograma para conocer la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos mediante métodos fenotípicos como son el método de difusión con discos o del gradiente de difusión. Estos resultados serán considerados preliminares ya que instituciones como la EUCAST (*European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing*) recomiendan, para poder hablar de resultados definitivos, llevar a cabo el antibiograma a partir de las colonias aisladas en el subcultivo sólido.

EXTRACCIÓN DE MUESTRAS:

El máximo rendimiento que podemos obtener en esta prueba diagnóstica, se consigue cuando las maniobras de extracción de la muestra de sangre han sido llevadas a cabo correctamente. Esto implica que:

- A. El volumen de la muestra de sangre, el momento y el lugar de extracción, y el número de extracciones han de ser los adecuados.**
- ✓ **¿Cómo?** La sangre se obtiene mediante venopunción (extracción periférica), cambiando de localización en cada hemocultivo. No se extraerá la muestra a través de dispositivos intravasculares como catéteres, tal y como lo recomienda el *American College of Physicians*, a no ser que se pretenda averiguar si el foco de infección está en el mismo.
 - ✓ **¿Cuándo?** La extracción se lleva a cabo en el momento en el que hay presencia de microorganismos en sangre. Normalmente, se da cuando la persona tiene escalofríos, lo cual, precede a la fiebre. Se deberá realizar antes de administrar el antibiótico, o bien, si ya se ha administrado, cuando éste se encuentre en una concentración lo más baja posible (concentración valle), de esta forma evitaremos los falsos negativos.
 - ✓ **¿Cuánto?** El volumen de sangre que se recoge en cada extracción es el factor más importante, se siguen las recomendaciones de la *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) y *American Society for Microbiology* (ASM), en las cuales, se relaciona el volumen con el peso del paciente. En el caso de los niños, oscila entre 1 y 5 ml por hemocultivo, mientras que en los adultos, se toman de 10 a 20 ml de sangre. La muestra de sangre que se extrae tiene que ser diluida para neutralizar las propiedades bactericidas de la sangre y el antibiótico que puede haber tomado el paciente previamente. En las muestras de los niños la dilución es 1:5, mientras que en los adultos es 1:10. (Tabla 2).
 - ✓ **Número de extracciones:** La probabilidad de encontrar el microorganismo causal aumenta si aumentamos el número de extracciones:
 - 1 hemocultivo → 60-80%
 - 2 hemocultivos → 80-90%
 - 3 hemocultivos → 95-99%

Un único hemocultivo se suele hacer ante la sospecha de bacteriemia en niños, se utiliza un solo frasco con un ambiente aerobio porque la probabilidad de infección por anaerobios en los niños es muy pequeña. En adultos se hacen 2 ó 3 hemocultivos en los dos tipos de frascos, aerobio y anaerobio (tabla 2). Se aconseja que haya un espacio de tiempo de 10 a 30 minutos entre la realización de dos hemocultivos. En caso de urgencia este tiempo puede disminuir e incluso se pueden llevar a cabo varios hemocultivos de forma simultánea a partir de distintas localizaciones, en distintas extremidades, por ejemplo.

Paciente	Niño	Adulto
Número de extracciones	1	2 ó 3
Medio	Aerobio	Aerobio y anaerobio
Volumen	1-5 ml	10-20 ml
Dilución	1:5	1:10

Tabla 2. Hemocultivos en adultos y en niños

B. Se han de conservar las condiciones de asepsia y la atmósfera de los frascos de cultivo, aerobia o anaerobia.

Es necesario resaltar la importancia de mantener las condiciones de asepsia durante la obtención de la muestra para el hemocultivo, desinfectando el lugar donde se va a realizar punción y los tapones de caucho de los frascos, generalmente con clorhexidina. Se toman otras medidas como el uso de guantes estériles y mascarilla desechable. Hay que inocular los frascos rápidamente, primero el anaerobio evitando la entrada de aire y luego el aerobio; agitarlos suavemente e identificarlos adecuadamente para que puedan ser transportados hasta los incubadores.

Los frascos, aerobios o anaerobios, contienen medios de cultivo ricos en determinados nutrientes que precisan los microorganismos para su crecimiento. Se incluyen otras sustancias entre las que podemos encontrar el SPS (polianetol sulfonato de sodio), un anticoagulante que neutraliza la actividad bactericida sanguínea e inhibe la acción de algunos antibióticos. De esta forma, evitamos que se interfiera en el crecimiento de las bacterias. Para contrarrestar el efecto del antibiótico que muchas veces se administra al paciente como tratamiento empírico, algunos medios incluyen carbón y resinas. Otro componente que pueden presentar los frascos, es un agente favorecedor de la lisis, que permitiría recuperar al microorganismo del interior del fagocito.

C. Duración de la incubación.

Con respecto a la duración de la incubación, un 85-90% de los hemocultivos son positivos en 48 horas, a no ser que se trate de microorganismos de crecimiento lento. Generalmente, se incuban durante 5-7 días antes de interpretarlos como negativos. Este tiempo sería suficiente para conseguir el crecimiento de la mayoría de bacterias. En determinadas ocasiones, el Servicio de Microbiología, tiene que hacer frente a bacterias que son más exigentes en cuanto a los nutrientes que requieren (necesitan un medio de cultivo especial), o que son de crecimiento lento, por lo que la incubación tiene que ser bastante larga. Son situaciones en las que se precisa la ayuda de las técnicas de microbiología molecular.

D. La muestra obtenida no ha de ser contaminada para evitar falsos positivos.

Es importante saber diferenciar los hemocultivos realmente positivos de aquellos que estén contaminados (falsos positivos). Según la NHSN (*National Healthcare Safety Network*) los hemocultivos contaminados son aquellos en los que encontramos especies propias del medio ambiente o comensales de la piel. Hay que tener en cuenta que algunas de estas especies sí puede dar lugar a una bacteriemia. Esta contaminación, que se relaciona directamente con la calidad asistencial, no debe superar el 3% de los hemocultivos totales que llegan al laboratorio. A su vez, se relaciona inversamente con el volumen de sangre, de modo que, cuanto menor es el volumen sanguíneo, mayor es la probabilidad de contaminación. Un falso positivo daría lugar a la administración innecesaria de antibióticos.

Una técnica incorrecta supone un resultado erróneo y por tanto, un aumento de la probabilidad de que el tratamiento instaurado sea ineficaz, lo que alteraría la salud del paciente y supondría un mayor gasto económico en el sistema sanitario.

TIPOS DE HEMOCULTIVOS:

En la actualidad, se utilizan métodos automatizados de lectura continua: incubadores específicos que disponen de programas informáticos que registran la curva de crecimiento, el tiempo de positividad, la cantidad de sangre que contienen etc. Los frascos se introducen en sistemas de incubación con una temperatura de 36 +/- 1°C en agitación continua, bajo una monitorización que pretende detectar aquellos frascos que sean positivos. En la tabla 3 se señalan las características más importantes de dos ejemplos de equipos:



Ilustración 2

Sistema BacT/Alert® VIRTUO™ (Ilustración 2)	Sistema BD BACTEC™ FX
Automático	Automático
Permite incubar, agitar y controlar el crecimiento de microorganismos aerobios, facultativos y anaerobios.	Permite incubar, agitar y controlar el crecimiento de microorganismos aerobios, facultativos y anaerobios.
Sistema colorimétrico: los microorganismos desprenden CO ₂ al medio, lo que ocasiona un cambio de pH, que hace que el sensor de la base cambie de color.	Sensor fluorimétrico de gases. Fotodetectores que miden la fluorescencia emitida por cada vial, también correspondiente con el CO ₂ liberado por los microorganismos.
Sistema de alerta por defecto o exceso de volumen de sangre inoculada.	Sistema de alerta por defecto o exceso de volumen de sangre inoculada.
Carga y descarga de frascos de cultivo automática. Cinta transportadora.	Existen sistemas satélites con un menor número de viales, que se localiza fuera del laboratorio, para el procesamiento rápido de muestras.

Tabla 3. Equipos automatizados para hemocultivo

PROCESAMIENTO DE LOS HEMOCULTIVOS POSITIVOS:

Cada laboratorio trabaja guiándose en una serie de protocolos que buscan procesar de forma continuada los hemocultivos y, sobre todo, informar rápidamente de los resultados que se van obteniendo. Se recomienda mantener una comunicación fluida, a partir de medios eficaces, con el personal encargado del paciente, de esta forma los resultados llegarán a los destinatarios lo antes posible, instaurándose el tratamiento eficaz de forma precoz. Será de ayuda, también, estar al día del historial clínico del paciente, para poder actualizar su situación clínica, conocer su enfermedad de base, saber si se le han administrado antimicrobianos etc.

A partir de un hemocultivo positivo se hace una tinción de Gram, de modo que, la observación al microscopio a 1.000 aumentos permite saber si el microorganismo es grampositivo o gramnegativo y describir su morfología, así como todo aquello que pueda orientar hacia una posible etiología. De forma independiente a la tinción de Gram, se siembran subcultivos en medios sólidos, también a partir del hemocultivo positivo. Siempre

se utilizan las placas de agar sangre y/o agar chocolate y, en función del resultado de la tinción de Gram, se valorará sembrar en otros medios. Se recomienda el cultivo en placas selectivas para bacilos gramnegativos y cocos grampositivos. La temperatura de incubación es de 37°C y las placas que incluyen sangre se introducen en una atmósfera de 5-10% de CO₂. Después de un mínimo de 24 horas en incubación, se observa si ha habido crecimiento microbiano, si el resultado es negativo se dejan más tiempo en incubación. La sangre procedente de los frascos anaerobios, se siembra en medios específicos para anaerobios a atmósferas determinadas, un tiempo de 48 horas como mínimo. Los métodos utilizados para anaerobios conllevan algo de dificultad, lo que hace que la incidencia de anaerobios sea distinta en los diferentes centros. Si el resultado no es positivo, se dejan las placas más tiempo en incubación, ya que se contempla la posibilidad de que se trate de bacterias con requerimientos especiales o de crecimiento lento.

5.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO NO BASADOS EN EL CULTIVO

El hemocultivo, como principal método diagnóstico de este tipo de infecciones, permite aislar el microorganismo causal y realizar un antibiograma para conocer su sensibilidad a los antimicrobianos. Sin embargo, como ya hemos visto, tiene inconvenientes:

- Demora diagnóstica: debido al tiempo que se tarda en aislar e identificar el microorganismo. Es su principal inconveniente.
- Falsos negativos: debido al tratamiento antibiótico previo que se administra a los pacientes, a la baja carga microbiana que hay en la sangre en un episodio de bacteriemia o a microorganismos exigentes que no crecen en los medios de cultivo de los frascos.
- Falsos positivos: como consecuencia de contaminaciones por la microbiota ambiental o de la piel.

La mejora del paciente con bacteriemia está condicionada por la rapidez diagnóstica y la administración precoz del tratamiento. Diversos estudios afirman que el riesgo de mortalidad por sepsis aumenta un 7,6% por cada hora de retraso en la instauración del tratamiento. Por ello y por la gravedad de la infección, se han desarrollado técnicas moleculares rápidas para el diagnóstico, normalmente basadas en la detección del ADN del microorganismo o el perfil del espectro de masas de sus proteínas, que permiten aumentar la velocidad de obtención de los resultados. Las más utilizadas parten de los hemocultivos positivos y consiguen mejorar la rapidez de obtención del diagnóstico. Existen otra serie de técnicas que se realizan directamente sobre muestras de sangre periférica, estas son aún más precoces en cuanto a la velocidad de obtención de resultados pero están menos validadas porque presentan una serie de inconvenientes que se tratarán a continuación.

Los siguientes puntos incluyen las técnicas basadas en el estudio del proteoma bacteriano (MALDI TOF), que permiten la identificación de la etiología de la enfermedad, y técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos (PCR), las cuales, además de la etiología, son capaces de localizar los genes relacionados con la resistencia de los microorganismos a algunos antimicrobianos.

5.2.1 TÉCNICAS BASADAS EN LA DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Las técnicas de detección de ácidos nucleicos se basan en métodos de amplificación del material genético. La PCR o reacción en cadena de la polimerasa, es un método molecular que consigue fabricar múltiples copias de una secuencia diana de ADN mediante un proceso de amplificación. La ADN polimerasa es la enzima encargada de llevar a cabo la reacción de amplificación. Para ello, la secuencia diana de ADN tiene que quedar comprendida entre dos secuencias conocidas con las que podrán hibridar oligonucleótidos complementarios que actuarán como cebadores. La PCR es una reacción que ocurre en un único tubo tras mezclar en él los componentes necesarios e incubarlos en un termociclador, aparato que permite variar la temperatura de incubación de forma programada. La reacción comprende los siguientes pasos (ilustración 3):

- I. Desnaturalización térmica del ADN molde.
- II. Los cebadores sintéticos presentan una secuencia característica que les permite hibridar uno a cada lado de la secuencia diana.
- III. La ADN polimerasa comienza la extensión de la hebra complementaria a partir de los cebadores.
- IV. Estos tres pasos se repiten un número determinado de veces hasta conseguir un gran número de copias del fragmento inicial de ADN.

Es un método con gran sensibilidad porque detecta muy bajas cantidades de ADN molde, y especificidad, porque detecta únicamente la secuencia de ácido nucleico para la que han sido diseñados los cebadores.

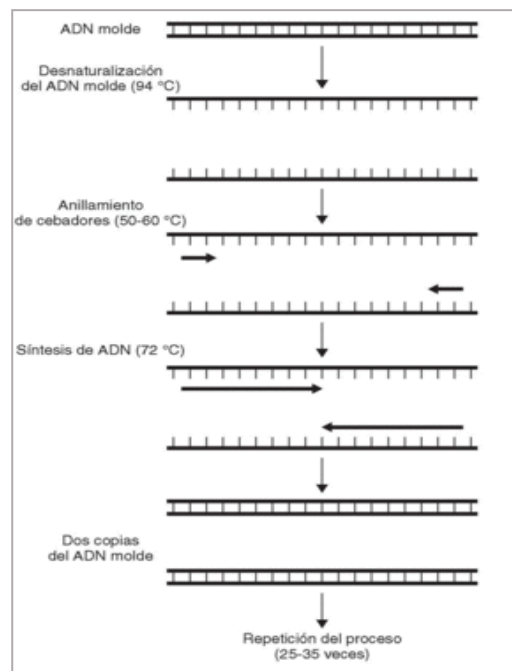


Ilustración 3

La PCR múltiple, logra amplificar simultáneamente en un único tubo distintas secuencias específicas (diferentes dianas). En los últimos años, se han empezado a desarrollar protocolos de PCR múltiple mediante la utilización de PCR a tiempo real, o PCRq (cuantitativa), es una variante utilizada para amplificar y, simultáneamente, cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación del ADN. Conlleva el uso de marcadores fluorescentes de forma que se pueda monitorizar la cinética de la reacción, conocer la cantidad de ADN molde y detectar la presencia de variaciones genéticas.

Existen sistemas comercializados basados en la PCR que parten directamente de muestras de sangre periférica y no del hemocultivo positivo. En general, se recomienda la recogida de sangre periférica en tubos con EDTA (anticoagulante). No se admiten los tubos con heparina porque inhibe la reacción de amplificación. Si las muestras de sangre no se van a procesar inmediatamente, pueden conservarse refrigeradas a unos 4°C o en algunos casos, congeladas a una temperatura de entre -20°C y -70°C, siempre siguiendo las recomendaciones del fabricante. Al ser métodos de elevada sensibilidad, se deben seguir las

precauciones de trabajo del laboratorio de microbiología con el objetivo de evitar contaminaciones.

Los primeros estudios comparativos encuentran una buena relación entre los resultados obtenidos por métodos convencionales (hemocultivo) y por sistemas basados en la PCR. En algunos casos, los métodos convencionales solo identificaban una bacteria como causante de la infección, mientras que la PCR localizaba dos o tres más, lo que demuestra su eficacia ante infecciones polimicrobianas. En otros pacientes, solo se obtenía un resultado positivo en la PCR, probablemente por la baja carga microbiana en sangre o porque se había administrado un antibiótico previamente; en ambos casos, los genes se mantienen y son amplificados por la reacción de la polimerasa. Ocurría, en muy pocos pacientes, que el hemocultivo sí era positivo, mientras que la PCR era negativa, esto es porque las especies que crecían en el hemocultivo contenían genoma que no se encontraba incluido en el "cassette" de la PCR. En este sentido, hay que considerar que se está detectando ADNemia y no bacterias viables, de modo que, los resultados de los métodos moleculares no son del todo equivalentes con el hemocultivo, dificultando la interpretación de los resultados de la PCR cuando no hay un hemocultivo positivo. Sobre todo porque estos sistemas pueden amplificar también bacterias contaminantes y no viables.

No es una técnica cuantitativa pero, algunos autores consideran que la presencia de ADN de un microorganismo de forma persistente en la sangre de un paciente con tratamiento antibiótico, es indicativo de bacteriemia complicada. Otros estudios, relacionan una elevada carga de ADN con una infección más severa o incluso con un peor pronóstico del paciente.

Inconvenientes:

- Son técnicas caras.
- Requieren una interpretación experta porque pueden poner de manifiesto ADN de bacterias no viables y/o contaminantes.
- Los microorganismos identificables son aquellos cuyo genoma se encuentra disponible en el "cassette" del sistema.
- Inconvenientes derivados del tipo de muestra:
 - Baja carga de microorganismos en sangre.
 - La variedad de microorganismos diferentes que pueden causar esta patología.
 - Cantidad de muestra analizada menor, de 1 a 5 ml de sangre.
 - La sangre contiene gran cantidad de ADN humano con respecto al ADN bacteriano, lo que puede afectar a la eficacia de la reacción.
 - Existen sustancias inhibitoras habituales del proceso de amplificación (hierro, hemoglobina, heparina...) que pueden hacer que los resultados sean inválidos o falsamente negativos.

Ventajas:

- Método molecular específico y preciso para identificar bacterias patógenas en muestras de sangre.

- Además de aportar información sobre la etiología del proceso, pueden ofrecer datos sobre la sensibilidad antibiótica del patógeno mediante la detección algunos de genes de resistencia antibiótica.
- Aportan rapidez. Detección directa de los microorganismos y de los genes de resistencia a los antibióticos en la sangre del paciente, sin necesidad de hacer un cultivo previo.
- La detección de los mecanismos de resistencia puede conducir hacia un cambio rápido de tratamiento. Especial relevancia tiene la detección de la resistencia a meticilina de *S.aureus* (SARM) y las multiresistencias de algunas enterobacterias.
- Son de gran ayuda cuando se trata de microorganismos de cultivo difícil o de crecimiento lento.
- Son eficaces también cuando la toma de muestras se realiza después de haber instaurado un tratamiento antimicrobiano, ya que el ADN puede permanecer en sangre durante un tiempo, a pesar de que los microorganismos ya no sean viables.
- Es eficaz en infecciones polimicrobianas.

Los sistemas más desarrollados son:

- *Light Cycler Septifast* (Roche diagnostics): método basado en la amplificación por PCR a tiempo real de las regiones ITS (*internal transcribed spacer*) del ADN ribosomal de bacterias y hongos, que se combina con sondas FRET (*fluorescence resonance energy transfer*). Detecta 25 especies de las bacterias más frecuentes causantes de bacteriemia, tanto grampositivas (*S.aureus*, *S.pneumoniae*, estafilococos coagulasa negativa...), como gramnegativas (*E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*...). Los resultados se obtienen en unas 5-6 horas. Requiere experiencia y un laboratorio adecuado. Puede detectar infecciones mixtas. Es un método cualitativo pero en el caso de estafilococo coagulasa negativa o *Streptococcus* spp. aplica un algoritmo semicuantitativo para reducir la detección de contaminantes. Presenta una correlación con el hemocultivo de entre el 43-83%.
- Sepsi Test (Molzym GmbH): utiliza cebadores de amplio espectro para el gen bacteriano 16S rDNA en un sistema de PCR a tiempo real. Utiliza un método de extracción que degradaría el ADN humano y el ADN bacteriano libre, por lo que, en teoría, solo se detectarían microorganismos viables. Según el fabricante se pueden detectar más de 345 especies bacterianas y fúngicas distintas. La PCR se completa en unas 4 horas, pero si el resultado es positivo, se lleva a cabo la secuenciación y alineamiento de las secuencias, que requiere entre 8 y 12 horas más. Es un método laborioso que requiere experiencia y laboratorios de biología molecular. No detecta marcadores de resistencia. Muestra una sensibilidad del 87% y una especificidad del 80% con respecto al hemocultivo.
- VYOO (SIRS-Lab): técnica basada en PCR multiplex que detecta 34 especies bacterianas (grampositivos, gramnegativos y anaerobios). También detecta 5 mecanismos de resistencia. Es un método bastante laborioso, que tarda unas 7 horas, requiere personal entrenado y laboratorios de biología molecular.

En general, son métodos que aportan información relevante y que permiten disminuir el tiempo de obtención de los resultados del diagnóstico. Al acelerar el diagnóstico, logran mejorar la atención médica, administrando el tratamiento eficaz lo antes posible, evitando el

deterioro de la condición del paciente. Sin embargo, la recomendación es utilizar los dos métodos, hemocultivo y PCR, compararlos y valorar los resultados en función de la situación clínica del paciente, de modo que los sistemas de PCR no deben sustituir al hemocultivo. Son sistemas bastante caros que cuentan con algún inconveniente, de modo que, la decisión de incluir o no esta metodología tiene que ser evaluada en cada laboratorio o en cada centro, valorando ventajas e inconvenientes, teniendo en cuenta que son pocos estudios los que han dejado claro que realmente haya beneficios clínicos y económicos vinculados a este tipo de técnicas moleculares.

Existen sistemas basados también en la reacción en cadena de la polimerasa pero, esta vez, parten de un hemocultivo positivo y, por tanto, evitan los inconvenientes derivados del tipo de muestra que tenían los anteriores y facilitan la interpretación de la prueba. Son los métodos más validados, presentan gran sensibilidad y especificidad. Permiten conocer la etiología del proceso y la sensibilidad antibiótica de los microorganismos al localizar material genético del patógeno y genes relacionados con resistencias antimicrobianas. Ofrecen datos de forma rápida por lo que tienen una importante utilidad clínica. Algunos ejemplos son:

- *FilmArray Blood Culture Identification Panel* (BioFire Diagnostics): sistema basado en una PCR que tiene lugar en una matriz de pocillos que contienen distintos cebadores y un fluorocromo. Detecta, en una hora, 11 especies y 15 géneros de bacterias grampositivas y gramnegativas. Detecta tres genes de resistencia: *mecA* (SARM), *VanA/B* (resistencia de enterococos a vancomicina) y *blaKPC* (enterobacterias productoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa).
- *Sepsis Flow chip* (Master Diagnostica): sistema que detecta la presencia de múltiples bacterias y mecanismos de resistencia en 3-4 horas. También detecta la presencia de diversos mecanismos de resistencia como la resistencia a vancomicina en *Enterococcus* spp. Muestra una excelente sensibilidad y especificidad.
- GeneXpert (Cepheid): realiza la PCR en tiempo real para la detección de *Staphylococcus aureus* y su resistencia a meticilina.
- Verigene (Nanosphere): detecta la presencia de genoma bacteriano mediante hibridación con oligonucleótidos específicos sintéticos marcados con nanopartículas de oro. En menos de 3 horas detecta distintas especies y géneros de bacterias grampositivas y gramnegativas, así como los principales genes atribuidos a las resistencias.

5.2.2 TÉCNICAS BASADAS EN EL ESTUDIO DEL PROTEOMA BACTERIANO

El MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) es una técnica basada en la ionización de las proteínas de los microorganismos mediante un haz de luz láser y su detección por un espectrómetro de masas. Las proteínas ionizadas son aceleradas por un campo eléctrico adquiriendo un tiempo de vuelo que depende de la relación carga/masa. Son detectadas por el espectrómetro de masas, que genera un espectro característico único (huella peptídica) para cada especie microbiana (ilustración 4).

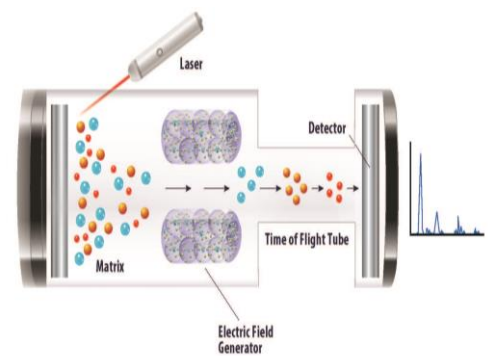


Ilustración 4

Así, podemos comparar éste con los espectros recogidos en una base de datos que conforma el sistema.

Se utiliza para conocer la etiología de la bacteriemia a partir de un hemocultivo positivo ya que si se hiciera a partir de la sangre del paciente, la carga microbiana sería demasiado baja para poder ser detectada. Aun así, a veces es necesario concentrar la carga proteica, especialmente en el caso de los cocos grampositivos, que son los más difíciles de identificar mediante este método. Esto se debe a que en el hemocultivo se producen más interferencias en el espectro proteico debido a la presencia de proteínas humanas, células sanguíneas y posiblemente, carbón. Se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante un subcultivo en medio sólido (3-4h) o mediante centrifugación. Una vez concentradas las bacterias de la muestra y retirados los componentes que puedan interferir en la identificación, se obtiene el llamado “pellet” bacteriano que va a permitir la identificación. Realmente, no existe un método estandarizado, los protocolos deben evaluarse y validarse en cada laboratorio.

El sistema logra la identificación exitosa en más del 80% de los casos pero la fiabilidad dependerá del tipo de microorganismo, siendo mayor en bacilos gramnegativos que en cocos grampositivos. Las infecciones polimicrobianas son otra de las limitaciones, de modo que en el mejor de los casos solo se identifica el microorganismo que se encuentra en una mayor proporción. Por ello, la tinción de Gram sigue siendo de obligada realización tras la positividad del hemocultivo (ilustración 5).

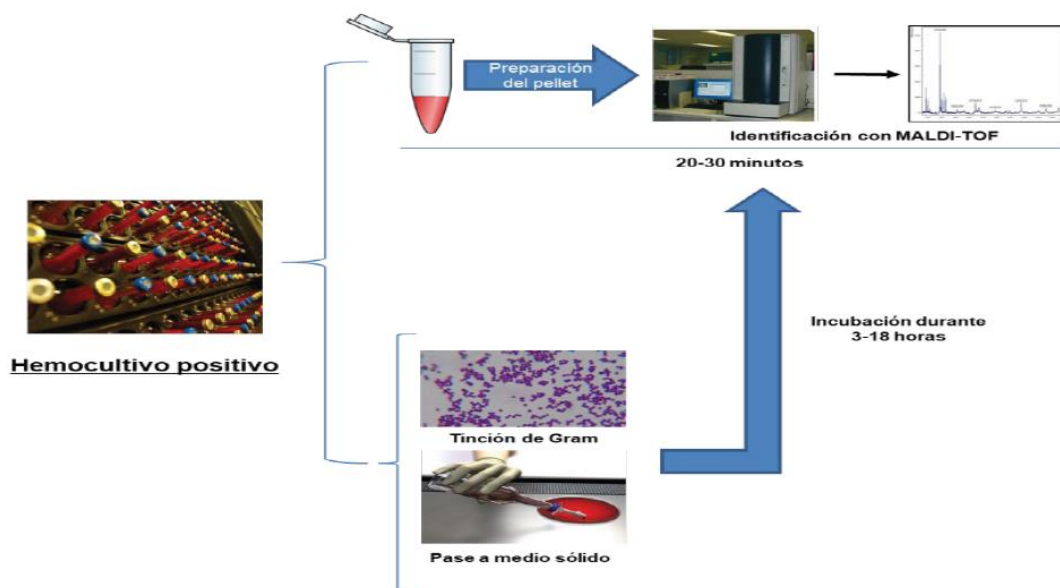


Ilustración 5. Identificación microbiológica con MALDI TOF a partir de hemocultivo positivo

Inconvenientes:

- La capacidad de identificación dependerá de los microorganismos incluidos en la base de datos. El proceso mejora día a día al incrementarse la base de datos de microorganismos que pueden ser detectados.
- Hay microorganismos que pueden dar un espectro semejante, como *Escherichia coli* y *Shigella* spp., y que el sistema no puede diferenciar. Será anunciado por el software

como una “advertencia” y habrá que analizar manualmente y de forma exhaustiva los picos de los espectros. En el caso de *Streptococcus pneumoniae*, *S.mitis* y *S.oralis*, pueden identificarse erróneamente como *S.pneumoniae*. Cuando ocurre esto, se suele informar solo a nivel de género o de grupo y se valorará si es necesaria la identificación a nivel de especie y qué metodología utilizar para ello.

- Existen limitaciones en identificaciones de bacteriemias polimicrobianas, aunque se está mejorando el análisis bioinformático de estos perfiles proteicos mixtos.
- Difícil identificación de cocos Gram positivos: existen estudios que muestran protocolos y resultados discrepantes en cuanto a sensibilidad y especificidad en función de los procedimientos empleados y de los criterios establecidos para considerar una identificación como correcta.
- A día de hoy, no es clínicamente útil para detectar resistencias antimicrobianas. Ya se conocen mecanismos mediante los cuales se podría llevar a cabo, aunque aún no están validados.

Ventajas:

- Identificación de bacterias de cultivo difícil o crecimiento lento, siempre que estén incluidas en la base de datos del sistema.
- Identificación rápida de bacterias con gran patogenicidad como *Brucella melitensis* o *Yersinia pestis*.
- Proporciona información precoz importante para el manejo clínico de las bacteriemias (rapidez). Con este sistema es posible identificar al agente causal en menos de 1 hora tras la positividad del frasco, lo cual permite adelantar 24-48 horas el diagnóstico etiológico.

Algún ejemplo de sistemas comercializados son:

- Microflex LT Biotyper (Broker Daltonics)
- VITEK MSIUD (BioMérieux)
- MALDI micro MX (Waters corporation)

Cada sistema tiene su propia base de datos de microorganismos, que es propiedad del sistema y que crean las propias compañías. Estas bases de datos pueden expandirse por parte del usuario e incorporar nuevas entradas que no estaban representadas. El sistema proporciona un resultado de identificación asociado a una puntuación que se refiere al grado de similitud entre el espectro de la muestra de estudio y los espectros de la base de datos del equipo. Estudios comparativos muestran que consiguen identificar a los microorganismos causales en más del 85% de los casos.

La localización del equipo en el laboratorio es fundamental porque son muy utilizados en el día a día. Por ejemplo el VITEK MS es un equipo de pie de dos metros de altura, mientras que el Biotyper es un equipo de mesa más pequeño, aunque por su peso suelen reforzarse los apoyos. Suelen estar alejados de cualquier tipo de vibración para conservar su estabilidad y hay que controlar la temperatura para evitar un sobrecalentamiento. La puesta a punto del equipo y su mantenimiento la lleva a cabo un técnico especializado que pertenece a la casa comercial.

Integración de MALDI-TOF y otras técnicas microbiológicas:

La incorporación de la proteómica, a través del MALDI-TOF, complementa ambas técnicas, tanto el cultivo como las técnicas basadas en la detección del genoma y permite identificar un gran número de microorganismos con gran rapidez. El fin es buscar la sinergia con otras técnicas para integrar sus resultados dentro del proceso diagnóstico ya que, en este caso, el MALDI TOF es más útil si se integran sus resultados con otras técnicas capaces de ofrecer el patrón de resistencia antibiótica del microorganismo. Por ejemplo, en relación con las bacteriemias producidas por cocos Grampositivos, que eran difíciles de identificar, los resultados de las infecciones por *Staphylococcus aureus* pueden ser óptimos cuando se da junto con la detección molecular por PCR de la resistencia a meticilina (tabla 4). Se puede ofrecer al clínico información útil sobre la antibioterapia en pocas horas. La utilización conjunta de estas técnicas supone una mejora en la cobertura antibiótica.

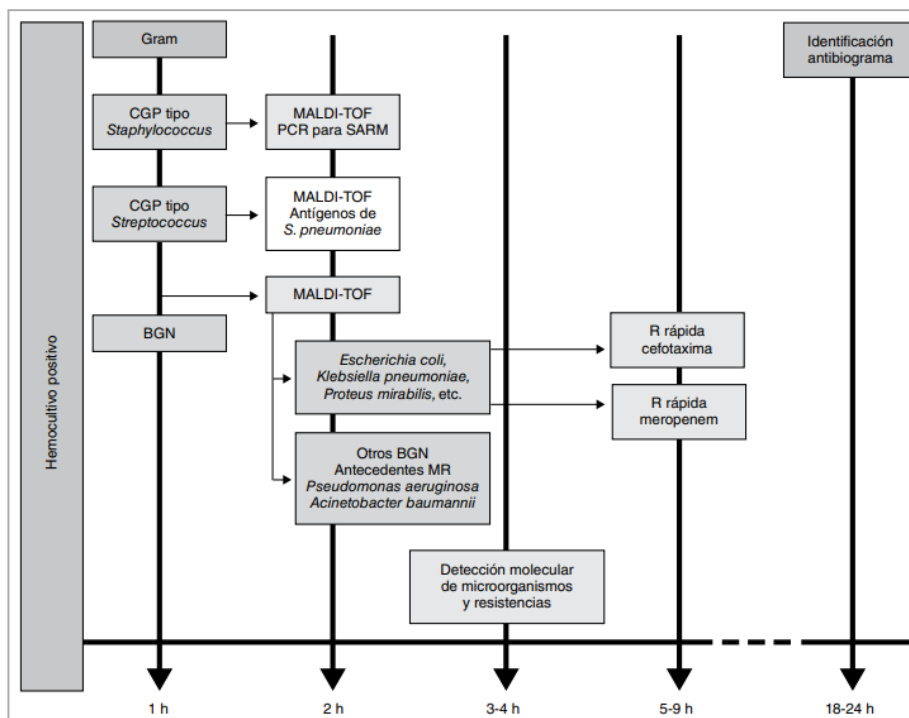


Tabla 4. Integración del MALDI TOF con otras técnicas microbiológicas

El MALDI TOF ha supuesto un gran avance en los métodos de diagnóstico microbiológico, aportando rapidez y fiabilidad. Ofrece información sobre la etiología de la bacteriemia de forma rápida, con una fiabilidad superior a la de las técnicas fenotípicas, pocos minutos después de conocer los resultados de la tinción de Gram y permitiendo un ajuste precoz de la terapia antimicrobiana.

La actualidad se centra en diversos estudios que tratan de medir el balance entre los beneficios clínicos del MALDI-TOF y los costes y/o ahorros generados para el sistema sanitario. Los beneficios clínicos que se observan son: administración temprana de la adecuada terapia antimicrobiana, morbilidad y mortalidad reducida, reducción de la estancia hospitalaria y reducción de los costes por cada paciente hospitalizado. Uno de los estudios más reciente cifra la reducción del tiempo requerido para la identificación, en comparación con el método convencional, en 60-65% (de 28 horas a 10-11 horas). Otros estudios cifran la reducción del tiempo requerido para la identificación en no menos de 24 horas.

Repercute, además, en un acortamiento de la estancia hospitalaria global del 40%, de la estancia en la UCI del 76% y del 14% en la duración de los tratamientos antimicrobianos. En total, se considera que el coste medio por paciente se había reducido prácticamente a la mitad. Por tanto, pese a la inversión inicial que supone la adquisición del equipo, ha demostrado mejorar el flujo de trabajo del laboratorio clínico y ser una opción coste-eficaz con respecto al enfoque microbiológico tradicional.

5.3 BIOMARCADORES

Se conoce como biomarcador a aquella molécula medible en una muestra biológica, cuyas concentraciones son indicativas del grado de respuesta inflamatoria sistémica provocada por un proceso infeccioso. Son de utilidad diagnóstica y pronóstica, y sirven para monitorizar la respuesta al tratamiento (indicar, cambiar o cesar la terapia antibiótica).

La PCT (procalcitonina) es una proteína sintetizada en la glándula tiroides y por las células neuroendocrinas del pulmón; es el precursor polipeptídico de la calcitonina y sus niveles en personas sanas son casi indetectables. Su cinética resulta muy útil para tomar decisiones de cribado en pacientes con sospecha de padecer una infección bacteriana ya que las citoquinas y endotoxinas liberadas en este proceso inhiben el paso de PCT a calcitonina, de modo que los niveles de PCT aumentan en una relación directa con la carga bacteriana. La concentración de PCT aumenta en sangre a las 2-6 horas tras el estímulo bacteriano y los valores máximos se alcanzan en 12-36 horas. Los valores de este marcador son superiores en infecciones causadas por bacilos gramnegativos. Mediante controles seriados se puede controlar la disminución de la PCT, lo cual, sería indicativo de que el proceso se está resolviendo o que ha cesado el estímulo bacteriano. Otra utilidad de la procalcitonina es la distinción entre hemocultivos positivos verdaderos, de aquellos que están contaminados.

La proteína C reactiva (PCR) es otro biomarcador, es liberada por los hepatocitos en cualquier tipo de proceso infeccioso lo que limita su capacidad diagnóstica y pronóstica. Tiene una cinética más lenta que la PCT por lo que es menos útil en el diagnóstico inicial del cuadro agudo. Además, la PCR puede continuar elevada aún cuando la infección esté remitiendo. La interleucina 6 (IL-6) se ha usado como biomarcador sobre todo en pediatría porque en los niños los valores de PCT son muy superiores a los de la población adulta. Su valor diagnóstico también es menor que el de la PCT. Otro ejemplo de biomarcador es la proadrenomedulina (MRproADM), la cual se ha mostrado superior a la PCT en la capacidad predictiva de mortalidad a corto y a medio plazo; también se ha mostrado su utilidad en la discriminación de infección bacteriana respecto a la vírica. Sus niveles aumentan con la edad lo que obliga a modificar los puntos de corte en mayores de 70 años.

Para que un biomarcador sea útil debe proporcionar información adicional a la que se obtiene con los datos clínicos del paciente con infección y ayudar a la hora de tomar decisiones. No pueden sustituir a las pruebas microbiológicas o complementarias que sean pertinentes.

6 CONCLUSIÓN

El diagnóstico precoz de la bacteriemia está directamente relacionado con una disminución de la morbi-mortalidad asociada a los pacientes con esta patología. Las técnicas de

diagnóstico rápido empleadas a día de hoy, han demostrado acelerar el proceso de obtención de los resultados si las comparamos con las técnicas tradicionales de cultivo. Este incremento de la rapidez diagnóstica supone una importante mejora en el manejo clínico del paciente. Los equipos de diagnóstico rápido aún no aportan la rapidez suficiente como para evitar los tratamientos empíricos pero sí han logrado disminuir su duración, causando un efecto de mejora sobre el problema de cepas bacterianas resistentes. La administración precoz del tratamiento definitivo mejora la calidad de la atención clínica y permite disminuir los gastos sanitarios al reducirse el tiempo de hospitalización del paciente y el gasto en antibióticos.

El impacto de estas técnicas se refleja directamente en la rapidez de la administración del tratamiento por lo que deberá existir una comunicación rápida y fluida entre los distintos profesionales de la salud, coordinándose para que la rapidez de los resultados se traduzca en la administración precoz del antibiótico.

Estos métodos aportan más ventajas sobre el hemocultivo, como son la identificación de microorganismos del cultivo difícil o de crecimiento lento y el correcto diagnóstico de infecciones polimicrobianas.

Cada laboratorio ha de valorar la instalación de estos equipos de diagnóstico rápido basándose en el impacto que pueden tener sobre la clínica del paciente y sobre la economía del centro. Por tanto, será cada laboratorio el que decida qué equipos instalar, también en función de los medios que posea, tanto económicos como materiales y de personal experimentado en este tipo de técnicas. Pero, en cualquier caso, la finalidad es complementar el método clásico del hemocultivo integrando las técnicas de las que se disponga, mejorando la calidad de la atención sanitaria, con un impacto directo demostrado en la supervivencia del paciente.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Rodríguez Díaz JC, Guna Serrano R, Larrosa Escartín N, Marín Arriaza M. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. 2017. 62. Rodríguez Díaz (coordinador). Procedimientos de microbiología clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017.
2. Oviaño García Marina, Rodríguez Sánchez Belén, Caballero Pérez Juan de Dios, Muñoz Bellido Juan Luis. Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la Microbiología Clínica. 2019. 65. Oviaño García (coordinador). Procedimientos de microbiología clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2019.
3. Fernández de Bobadilla Elena, Planes Reig Ana, Rodríguez Creixems Marta. Hemocultivos. 2003. 3a. Fernández de Bobadilla E (coordinador). Procedimientos de microbiología clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2003.

4. Guna Serrano María Remedio, Larrosa Escartín Nieves, Marín Arriaza Mercedes, Rodríguez Díaz Juan Carlos. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. Elsevier. Vol.37.Núm.5. Páginas 335-340 (Mayo 2019).
5. Cisneros-Herreros José Miguel, Cobo-Reinoso Javier, Pujol-Rojo Miquel, Rodríguez-Baño Jesús, Salavert-Lletí Miguel. Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. Guías de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Elsevier. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Vol. 25. Núm. 2. Páginas 111-130 (Febrero 2007).
6. Mervyn Singer, Clifford S. Deutschman, Christopher Warren Seymour, Manu Shankar Hari, Djilali Annane, Michael Bauer. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). JAMA 2016. 315(8):801810. Jama.2016.
7. Francesc Marco. Métodos moleculares para el diagnóstico de septicemia. Elsevier. Formación médica continuada: métodos de diagnóstico rápido en microbiología clínica. Vol.35. Núm. 9. Páginas 586-592 (Noviembre 2017).
8. Vila Jordi, Dolores Gómez María, Salavert Miguel, Bosch Jordi. Métodos de diagnóstico en microbiología clínica: necesidades clínicas. Elsevier. Formación médica continuada: métodos de diagnóstico rápido en microbiología clínica. Vol. 35. Núm.1. páginas 41-46 (Enero 2017).
9. Rodríguez Juan Carlos, Bratos Miguel Ángel, Merino Esperanza, Ezpeleta Carmen. Utilización del MALDI-TOF en el diagnóstico rápido de la sepsis. Elsevier. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Vol. 34 (supl 2). Páginas 19-25. 2016.
10. Méndez-Álvarez Sebastián, Pérez-Roth Eduardo. La PCR múltiple en microbiología clínica. Elsevier. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Vol. 22. Núm. 3. Páginas 183-192 (Marzo 2004).
11. Thompson Bonilla María del Rocío, Sandoval Guillermina Rosas, Lozano Manuel Lara, Merino García José Luis, Moreno Sandoval Hayde Nallely, Morán Mendoza Esmeralda, Rodriguez Gallegos Jorge, Gabina Calderón Rosete, Rangel Guerrero Sergio Israel, Salazar Salinas Juana, Núñez Ceballos Ricardo, González Barrios Juan Antonio. Diagnóstico molecular de la sepsis polimicrobiana en pacientes internados en la unidad de cuidados intensivos. ISSSTE. Rev Esp Méd Quir 2014;19:52-61.
12. López-Fabal M^a Fátima, Gómez-Garcés José Luis, López Lomba Marta, Ruiz Bastián Mario. Valoración de una técnica de PCR-múltiple en el diagnóstico rápido de la bacteriemia. *Official journal of the spanish society of chemotherapy*. Rev Esp Quimioter. 2018 Jun; 31(3): 263–267.

13. Sadaf Zafar Iqbal-Mirza, Vicente Serrano Romero de Ávila, Raquel Estévez-González, Dara Rodríguez-González, Eva Heredero-Gálvez, Agustín Julián-Jiménez. Capacidad de la procalcitonina para diferenciar bacteriemia verdadera de los hemocultivos contaminados en el servicio de urgencias. ELSEVIER. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Volumen 37, Issue 9, November 2019, Pages 560-568.
14. Agustín Julián-Jiménez, Francisco Javier Candel, Juan González-Del Castillo. Revisión utilidad de los biomarcadores para predecir bacteriemia en los pacientes con infección en urgencias. Rev. Esp. Quimioter 2017; 30(4): 245-256.