



REVISTA ESPAÑOLA DE Quimioterapia

SPANISH JOURNAL
OF CHEMOTHERAPY

ISSN: 0214-3429

Volumen 34

Número 3

Junio 2021

Páginas: 169-268



Publicación Oficial
de la Sociedad Española
de Quimioterapia

REVISTA ESPAÑOLA DE Quimioterapia

Revista Española de Quimioterapia tiene un carácter multidisciplinar y está dirigida a todos aquellos profesionales involucrados en la epidemiología, diagnóstico, clínica y tratamiento de las enfermedades infecciosas

Fundada en 1988 por la Sociedad Española de Quimioterapia

Indexada en
Science Citation Index
Expanded (SCI),
Index Medicus (MEDLINE),
Excerpta Medica/EMBASE,
Índice Médico Español (IME),
Índice Bibliográfico en Ciencias
de la Salud (IBECS)

Secretaría técnica
Dpto. de Microbiología
Facultad de Medicina
Avda. Complutense, s/n
28040 Madrid
revista@seq.es
Disponible en Internet:
www.seq.es

© Copyright 2020
Sociedad Española de
Quimioterapia

Reservados todos los derechos. Queda rigurosamente prohibida, sin la autorización escrita del editor, la reproducción parcial o total de esta publicación por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la reprografía y el tratamiento informático, y la distribución de ejemplares mediante alquiler o préstamo públicos, bajo las sanciones establecidas por la ley



Sociedad Española de Quimioterapia

Publicidad y Suscripciones
Sociedad Española de Quimioterapia
Dpto. de Microbiología
Facultad de Medicina
Avda. Complutense, s/n
28040 Madrid

Atención al cliente
Teléfono 91 394 15 12
Correo electrónico
info@seq.es

Consulte nuestra página web
www.seq.es

Publicación que cumple los requisitos de
soporte válido

ISSN
0214-3429

e-ISSN
1988-9518

Depósito Legal
M-32320-2012

Maquetación
Vic+DreamStudio

Impresión
España

Esta publicación se imprime en papel no ácido.
This publication is printed in acid free paper.

LOPD
Informamos a los lectores que, según lo previsto en el Reglamento General de Protección de Datos (RGPD) 2016/679 del Parlamento Europeo, sus datos personales forman parte de la base de datos de la Sociedad Española de Quimioterapia (si es usted socio)

Si desea realizar cualquier rectificación o cancelación de los mismos, deberá enviar una solicitud por e-mail a la Sociedad Española de Quimioterapia (info@seq.es)

Director
J. Barberán López

Secretario de Redacción
Luis Alou Cervera

Comité Editorial

F. Álvarez Lerma (Barcelona)
F. Baquero Mochales (Madrid)
E. Bouza Santiago (Madrid)
J. A. García Rodríguez (Salamanca)
M. Gobernado Serrano (Valencia)

J. Mensa Pueyo (Barcelona)
J. J. Picazo de la Garza (Madrid)
J. Prieto Prieto (Madrid)
B. Regueiro García (Santiago de Compostela)
A. Torres Martí (Barcelona)

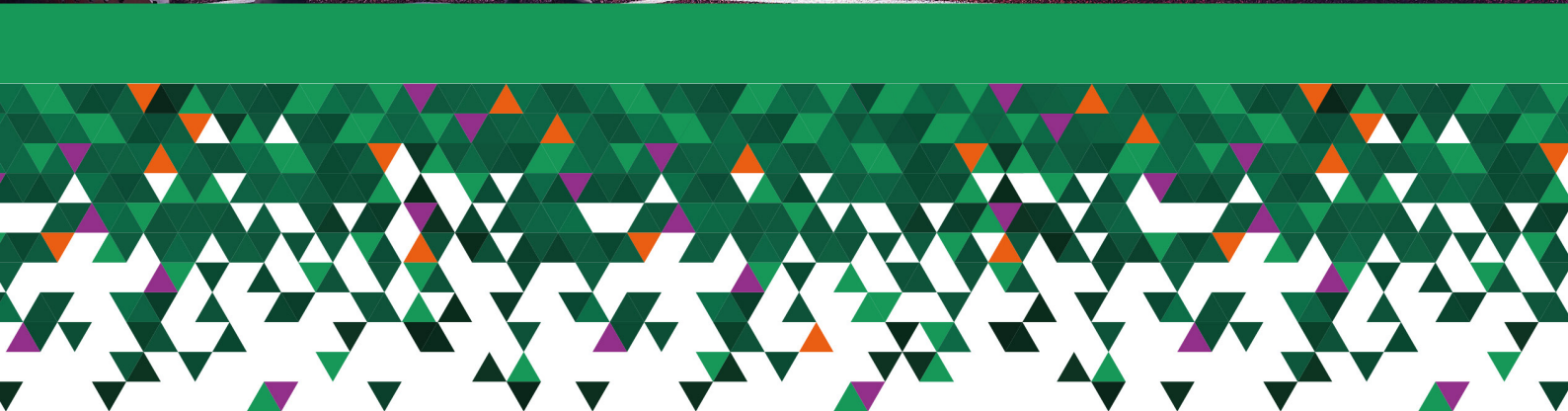
Consejo Editorial

L. Aguilar (Madrid)
J. I. Alós (Madrid)
J. R. Azanza (Pamplona)
J. Aragón (Las Palmas de Gran Canaria)
A. Artero (Valencia)
V. Asensi (Oviedo)
G. Barbeito (Santiago de Compostela)
J. M. Barbero (Madrid)
J. Campos (Madrid)
F.J. Candel (Madrid)
E. Cantón (Valencia)
R. Cantón (Madrid)
J. A. Capdevila Morell (Barcelona)
M. Casal (Córdoba)
J. Castillo (Zaragoza)
F. Cobo (Granada)
J. Cobo Reinoso (Madrid)
N. Cobos (Madrid)
J. L. del Pozo (Navarra)
R. De la Cámara (Madrid)
C. De la Calle (Barcelona)
M. Domínguez-Gil (Valladolid)
J. Eiros (Valladolid)
P. Escribano (Madrid)
A. Estella (Cádiz)
M. C. Fariñas Álvarez (Santander)
C. Fariñas (Santander)

J. Fortún (Madrid)
J. J. Gamazo (Vizcaya)
E. García Sánchez (Salamanca)
I. García García (Salamanca)
J. E. García Sánchez (Salamanca)
E. García Vázquez (Murcia)
J. Gómez Gómez (Murcia)
M. L. Gómez-Lus (Madrid)
J. González del Castillo (Madrid)
F. González Romo (Madrid)
J. J. Granizo (Madrid)
S. Grau (Barcelona)
J.M. Guardiola (Barcelona)
J. Guinea (Madrid)
X. Guirao (Barcelona)
J. Gutiérrez (Granada)
J. B. Gutiérrez (Córdoba)
B. Isidoro (Madrid)
P. Llinares (La Coruña)
J. E. Losa García (Madrid)
J. R. Maestre Vera (Madrid)
L. Martínez Martínez (Córdoba)
E. Maseda (Madrid)
R. Menéndez (Valencia)
P. Merino (Madrid)
P. Muñoz (Madrid)
J. L. Muñoz Bellido (Salamanca)
V. Navarro (Alicante)

M. Ortega (Barcelona)
J. Oteo (Madrid)
J. A. Oteo (Logroño)
E. Palencia Herrejón (Madrid)
A. Pascual Hernández (Sevilla)
J. Pasquau (Sevilla)
J. Pemán (Valencia)
J. L. Pérez-Arellano (Las Palmas)
B. Pérez-Gorricho (Madrid)
A. Ramos (Madrid)
J. M. Ramos (Alicante)
J. Reina (Palma de Mallorca)
M. A. Ripoll (Ávila)
I. Rodríguez-Avial (Madrid)
M. Ruiz (Alicante)
M. Sabriá (Barcelona)
M. Salavert (Valencia)
B. Sánchez Artola (Madrid)
M. Segovia (Murcia)
R. Serrano (Madrid)
D. Sevillano (Madrid)
A. Suárez (Madrid)
A. Tenorio (Huelva)
A. Torres (Murcia)
C. Vallejo (Oviedo)
J. Vila (Barcelona)
J. Yuste (Madrid)

Xydalba®
dalbavancina



**XYDALBA®, EL ÚNICO ANTIBIÓTICO
QUE PERMITE TRATAR TODO EL CURSO
DE LA INFECCIÓN* CON 1 SOLA DOSIS
INTRAVENOSA EN 30 MINUTOS^{1,2}**

Xydalba®

*Indicado para el tratamiento de infecciones bacterianas agudas de piel y de los tejidos blandos de la piel en adultos. ¹


ANGELINI
PHARMA

BIBLIOGRAFÍA:

1- Ficha técnica Xydalba

2- Centro de información online de medicamentos de la AEMPS (CIMA). Criterios de búsqueda: Principio activo (dalbavancina), cantidad de principios activos (1) y comercializado. Disponible en [último acceso febrero 2021]: <https://cima.aemps.es/cima/publico/lista.html>.

Sumario

REVISTA ESPAÑOLA DE Quimioterapia

Volumen 34
Número 3
Junio 2021

Revisión	Implicaciones clínicas de las especies del género <i>Mycoplasma</i> 169 David Gómez Rufo, Enrique García Sánchez, José Elías García Sánchez, María García Moro
	Papel de cefditoreno en el tratamiento de las infecciones comunitarias de piel y tejidos blandos: revisando la evidencia 185 Marta Dafne Cabañero-Navalón, Víctor García-Bustos, Miguel Salavert Lletí
Originales	Impacto de Sepsis Flow Chip, un método microbiológico novedoso y rápido, en el tratamiento de la bacteriemia causada por bacilos gramnegativos 193 Esperanza Merino, Adelina Gimeno, Mar Alcalde, Javier Coy, Vicente Boix, Carmen Molina-Pardines, María Paz Ventero, Antonio Galiana, Elena Caro, Juan Carlos Rodríguez
	Utilización de infusores elastoméricos de antibióticos en Hospitalización a Domicilio 200 Marta García-Queiruga, Begoña Feal Cortizas, Fernando Lamelo Alfonsín, Sonia Pertega Díaz, Isabel Martín-Herranz
	Utilidad de MALDI-TOF y REP-PCR frente a PFGE para el estudio epidemiológico de <i>Acinetobacter baumannii</i> 207 Cristina García-Salguero, Esther Culebras, Adela Alvarez-Buylla, Iciar Rodríguez-Avial, Alberto Delgado-Iribarren
	Evaluación de la adherencia a la higiene de manos en profesionales sanitarios en un hospital de tercer nivel en relación con la pandemia de SARS-CoV2 214 Alejandro De Arriba-Fernández, Manuel Jesús Molina-Cabrillana, Lluís Serra Majem
	Precisión diagnóstica de la combinación de la proteína C reactiva y la puntuación de Alvarado en pacientes de 2 a 20 años con sospecha de apendicitis aguda durante su atención en los servicios de urgencias 220 Kinda Altali Alhames, Francisco Javier Martín-Sánchez, Pedro Ruiz-Artacho, Francisco Javier Ayuso, Victoria Trenchs, Mikel Martínez Ortiz de Zarate, Carmen Navarro, Manuel Fuentes Ferrer, Cristina Fernández, Juan González del Castillo, Andrés Bodas
	Actividad antimicrobiana de ceftolozano-tazobactam en <i>Enterobacteriales</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en el programa de vigilancia SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends) en España (2016-2018) 228 Rafael Cantón, Elena Loza, Ricardo M. Arcay, Emilia Cercenado, Francisco Javier Castillo, Ramón Cisterna, Lidia Gálvez-Benítez, Fernando González Romo, Alicia Hernández-Cabezas, Jesús Rodríguez-Lozano, Ana Isabel Suárez-Barrenechea, Fe Tubau, Jazmín Díaz-Regañón, Diego López-Mendoza, And The Smart-Spain Working Group
	Tocilizumab reduce el riesgo de ingreso en UCI y la mortalidad en pacientes con infección por SARS-CoV-2 238 Estela Moreno-García, Verónica Rico, Laia Albiach, Daiana Agüero, Juan Ambrosioni, Marta Bodro, Celia Cardozo, Mariana Chumbita, Lorena De La Mora, Nicole García-Pouton, Carolina García-Vidal, Ana González-Cordón, Marta Hernández-Meneses, Alexy Inciarte, Montse Laguno, Lorna Leal, Laura Linares, Irene Macaya, Fernanda Meira, Josep Mensa, Antonio Moreno, Laura Morata, Pedro Puerta-Alcalde, Jhon Rojas, Montse Solá, Berta Torres, Manuel Torres, Adrià Tomé, Montse Tuset, Pedro Castro, Sara Fernández, Josep Maria Nicolás, Alex Almuedo-Riera, Jose Muñoz, Mariana Fernandez-Pittol, Maria Angeles Marcos, Dolors Soy, José Antonio Martínez, Felipe García, Alex Soriano

Sumario

REVISTA ESPAÑOLA DE Quimioterapia

Volumen 34
Número 3
Junio 2021

Originales breves	Introducción de un sistema de cribado complementario para la detección de infecciones de transmisión sexual en pacientes con piuria estéril	245
	Helena Gil-Campesino, Laura Sante, Enrique Callejas Castro, María Lecuona	
	Utilidad del hemocultivo en la infección del tracto urinario con fiebre en el anciano	249
	Elisa Álvarez Artero, Amaia Campo Núñez, Moisés García Bravo, Inmaculada García García, Moncef Belhassen Garcia, Javier Pardo Lledías	
Cartas al Director	Sepsis por <i>Pseudocitrobacter anthropi</i> en un paciente con infección del tracto urinario complicada	254
	Rocío Cebollada Sánchez, María José Lavilla Fernández, Ana Betrán Escartín, Diego Ortega Larrea, Luis Torres Sopena	
	Sospecha de artritis bacteriana en paciente VIH	256
	Inés Olaya García Rodríguez, Laura Sante Fernández, Ana Madueño Alonso, María del Mar Alonso Socas, María Lecuona Fernández	
	Primer caso de <i>Arcobacter cryaerophilus</i> en edad pediátrica en España	259
	Carlos Ruiz de Alegría Puig, María Macho Díaz, Jesús Agüero Balbín, Jorge Calvo Montes	
	Nefritis focal aguda bilateral por <i>Enterococcus faecalis</i> asociada a enfermedad de Kawasaki en un paciente pediátrico	261
	Ana Castellano-Martínez, Moisés Rodríguez-González	
	Aislamiento de <i>Turicella otitidis</i> en el contexto de la infección ótica	264
	José Manuel Mendez-Legaza, Irene López-Ramos, Moisés García Bravo, Almudena Tinajas Puertas, María Antonia García Castro	
	Uso de viñetas clínicas para cribar a los médicos de familia que pueden participar en un ensayo clínico sobre discontinuación de tratamiento antibiótico cuando éste ya no es necesario	267
	Carles Llor, Ana Moragas, Carolina Bayona, Josep M Cots	



Creating Possible

Durante más de 30 años, en Gilead hemos conseguido avances que parecían imposibles, dirigidos a personas con enfermedades que amenazaban su vida. Somos una compañía biofarmacéutica puntera, con productos pioneros en sus áreas y con una, cada vez más, prometedora cartera de medicamentos en investigación.

Pero nuestro compromiso aún va más allá. Innovamos con el propósito de eliminar barreras y conseguir que las personas que más lo necesitan puedan tener acceso a los avances en el cuidado de la salud. Trabajamos para conseguir un mundo mejor y más saludable para todos.



GILEAD

Creating Possible

Contents

REVISTA ESPAÑOLA DE Quimioterapia

Volume 34
Number 3
June 2021

Review	Clinical implications of the genus <i>Mycoplasma</i>	169
	David Gómez Rufo, Enrique García Sánchez, José Elías García Sánchez, María García Moro	
	Role of cefditoren in the treatment of community skin and soft tissue infections: revisiting the evidence	185
	Marta Dafne Cabañero-Navalón, Víctor García-Bustos, Miguel Salavert Lletí	
Originals	Impact of Sepsis Flow Chip, a novelty fast microbiology method, in the treatment of bacteremia caused by Gram-negative bacilli	193
	Esperanza Merino, Adelina Gimeno, Mar Alcalde, Javier Coy, Vicente Boix, Carmen Molina-Pardines, María Paz Ventero, Antonio Galiana, Elena Caro, Juan Carlos Rodríguez	
	Continuous infusion of antibiotics using elastomeric pumps in the hospital at home setting	200
	Marta García-Queiruga, Begoña Feal Cortizas, Fernando Lamelo Alfonsín, Sonia Pertega Díaz, Isabel Martín-Herranz	
	Usefulness of MALDI-TOF and REP-PCR against PFGE for the epidemiological study of <i>Acinetobacter baumannii</i>	207
	Cristina García-Salguero, Esther Culebras, Adela Alvarez-Buylla, Iciar Rodríguez-Avial, Alberto Delgado-Iribarren	
	Evolution of adherence to hand hygiene in health care professionals in a thirdlevel hospital in relation to the SARS-CoV2 pandemic	214
	Alejandro de Arriba-Fernández, Manuel Jesús Molina-Cabrillana, Lluís Serra Majem	
	Diagnostic accuracy of combining C-Reactive protein and Alvarado Score among 2-to-20-year-old patients with acute appendicitis suspected presenting to Emergency Departments	220
	Kinda Altali Alhames, Francisco Javier Martín-Sánchez, Pedro Ruiz-Artacho, Francisco Javier Ayuso, Victoria Trenchs, Mikel Martínez Ortiz de Zarate, Carmen Navarro, Manuel Fuentes Ferrer, Cristina Fernández, Juan González del Castillo, Andrés Bodas	
	Antimicrobial activity of ceftolozane-tazobactam against <i>Enterobacterales</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> recovered during the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program in Spain (2016-2018)	228
	Rafael Cantón, Elena Loza, Ricardo M. Arcay, Emilia Cercenado, Francisco Javier Castillo, Ramón Cisterna, Lidia Gálvez-Benítez, Fernando González Romo, Alicia Hernández-Cabezas, Jesús Rodríguez-Lozano, Ana Isabel Suárez-Barrenechea, Fe Tubau, Jazmín Díaz-Regañón, Diego López-Mendoza, and the SMART-Spain Working Group	

Contents

REVISTA ESPAÑOLA DE Quimioterapia

Volume 34
Number 3
June 2021

Originals	Tocilizumab reduces the risk of ICU admission and mortality in patients with SARS-CoV-2 infection	238
	Estela Moreno-García, Verónica Rico, Laia Albiach, Daiana Agüero, Juan Ambrosioni, Marta Bodro, Celia Cardozo, Mariana Chumbita, Lorena De la Mora, Nicole García-Pouton, Carolina García-Vidal, Ana González-Cordón, Marta Hernández-Meneses, Alexy Inciarte, Montse Laguno, Lorna Leal, Laura Linares, Irene Macaya, Fernanda Meira, Josep Mensa, Antonio Moreno, Laura Morata, Pedro Puerta-Alcalde, Jhon Rojas, Montse Solá, Berta Torres, Manuel Torres, Adrià Tomé, Montse Tuset, Pedro Castro, Sara Fernández, Josep Maria Nicolás, Alex Almuedo-Riera, Jose Muñoz, Mariana Fernandez-Pittol, Maria Angeles Marcos, Dolors Soy, José Antonio Martínez, Felipe García, Alex Soriano	
Brief report	Introduction of a complementary screening system for the detection of sexually transmitted infections in patients with sterile pyuria	245
	Helena Gil-Campesino, Laura Sante, Enrique Callejas Castro, María Lecuona	
	Utility of the blood culture in infection of the urinary tract with fever in the elderly	249
	Elisa Álvarez Artero, Amaia Campo Núñez, Moisés García Bravo, Inmaculada García García, Moncef Belhassen García, Javier Pardo Lledías	
Letters to the editor	<i>Pseudocitrobacter anthrapi</i> sepsis in a patient with complicated urinary tract	254
	Rocío Cebollada Sánchez, María José Lavilla Fernández, Ana Betrán Escartín, Diego Ortega Larrea, Luis Torres Sopena	
	Infection Bacterial arthritis' clinical suspicion in an HIV patient	256
	Inés Olaya García Rodríguez, Laura Sante Fernández, Ana Madueño Alonso, María del Mar Alonso Socas, María Lecuona Fernández	
	First case of <i>Arcobacter cryaerophilus</i> in paediatric age in Spain	259
	Carlos Ruiz de Alegria Puig, María Macho Díaz, Jesús Agüero Balbín, Jorge Calvo Montes	
	Bilateral acute focal nephritis by <i>Enterococcus faecalis</i> associated to Kawasaki disease in a pediatric patient	261
	Ana Castellano-Martínez, Moisés Rodríguez-González	
	Isolation of <i>Turicella otitidis</i> in ear infection	264
	José Manuel Mendez-Legaza, Irene López-Ramos, Moisés García Bravo, Almudena Tinajas Puertas, María Antonia García Castro	
	Use of clinical vignettes to screen general practitioners who can participate in a clinical trial about stopping antibiotic treatment when this is no longer necessary	267
	Carles Llor, Ana Moragas, Carolina Bayona, Josep M Cots	

David Gómez Rufo
Enrique García Sánchez
José Elías García Sánchez
María García Moro

Implicaciones clínicas de las especies del género *Mycoplasma*

Departamento de Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.

Article history

Received: 18 January 2021; Revision Requested: 4 February 2021; Revision Received: 9 February 2021; Accepted: 17 February 2021; Published: 18 March 2021

RESUMEN

Dentro del género *Mycoplasma*, las especies que tradicionalmente se han relacionado con cuadros infecciosos han sido principalmente *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. hominis* o *M. urealyticum*. Sin embargo, existen otras muchas que están implicadas y, que muchas veces, son desconocidas para los profesionales sanitarios. El objetivo de esta revisión es identificar todas las especies del género *Mycoplasma* que se han aislado en el hombre y determinar su participación en la patología infecciosa humana.

Palabras clave: *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma* spp., implicaciones clínicas, nuevas especies, mecanismos de patogenidad, diagnóstico, tratamiento.

Clinical implications of the genus *Mycoplasma*

ABSTRACT

Within *Mycoplasma* genus, *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. hominis* or *M. urealyticum* are the main species that have been traditionally linked to infectious processes. However, there are many other species involved in these conditions and that are, frequently, unfamiliar to healthcare professionals. The aim of this review is to identify all *Mycoplasma* genus species that have been isolated in human beings and to determine their involvement in infectious pathology.

Key words: *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma* spp., clinical implications, novel species, mechanisms of pathogenicity, diagnosis, treatment.

INTRODUCCIÓN

El término micoplasma es la forma genérica de referirse a los miembros de la clase *Mollicutes*, que se caracterizan por la ausencia de pared celular. Estas bacterias poseen un genoma extremadamente reducido, que limita su capacidad de biosíntesis, lo que les obliga a llevar un estilo de vida parásita [1]. En la familia *Mycoplasmataceae* se sitúan micoplasmas con implicaciones clínicas en el ser humano pertenecientes al género *Mycoplasma* y *Ureaplasma* [2].

La primera especie que se demostró que estaba implicada en un brote de pleuroneumonía en ganado vacuno fue aislada en 1898. Por este motivo, la comunidad científica empezó a referirse a ellas como *pleuropneumonia-like-organisms* (PPLO). Fueron considerados virus hasta 1931, cuando se demostró que formaban pequeñas colonias en las placas de agar. Al microscopio, se observó que presentaban una zona densa de crecimiento central rodeada de una zona periférica más clara, en forma de "huevo frito" [3].

En el año 1937 Dienes y Edsall [4] describen el primer aislamiento en el ser humano, *Mycoplasma hominis*. Más tarde, en 1954, Shepard [5] aisló un microorganismo que recordaba a los PPLO, pero las colonias eran de menor tamaño, pues carecen de la zona de crecimiento periférica. Por esta razón, se denominan cepas-T, del inglés "*tiny*", actualmente conocidas como *Ureaplasma* spp.

En años sucesivos comenzaron a conocerse cada vez más casos de micoplasmas que se aislaban en el ser humano, casi siempre a partir de muestras del tracto respiratorio y genital. El papel patogénico de algunos se refleja rápidamente en especies como *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma pneumoniae* o *Mycoplasma genitalium* [6]; mientras en otros, como *Mycoplasma fermentans* o *M. hominis*, no se evidencia su patogenicidad hasta varios años después [2].

El diagnóstico microbiológico mediante técnicas de cultivo tradicionales es complicado, ya que requieren condiciones

Correspondencia:
Enrique García Sánchez
Departamento de Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.
E-mail: engarsan@usal.es

especiales para su crecimiento, tienen un crecimiento lento o no son cultivables *in vitro* [7-9]. En la actualidad, estas dificultades se han solventado con la introducción de las técnicas moleculares para el diagnóstico microbiológico. Su aplicación ha sido determinante para que cada día se documenten nuevas implicaciones de estas bacterias en patología infecciosa.

La experiencia clínica demuestra que el diagnóstico de infección por micoplasmas es, con mucha frecuencia, por exclusión [10] ya que, durante mucho tiempo se pensó que eran oportunistas que afectaban casi siempre a personas inmunocomprometidas. Actualmente, las evidencias indican que muchas infecciones graves ocurren también en personas inmunocompetentes [11, 12]. Los avances en el conocimiento científico que se han producido en los últimos años han venido a aclarar aspectos relevantes de sus mecanismos patogénicos [13-15].

En la revisión se han incluido exclusivamente las especies de *Mycoplasma* en las que existen casos documentados de aislamientos en humanos.

ESPECIES IMPLICADAS EN PATOLOGÍA HUMANA

***M. amphoriforme*.** Se aisló por primera vez en 1999, en un paciente con inmunodepresión y bronquitis crónica [16]. Está relacionado filogenéticamente con *M. pneumoniae* [17], siendo muy común la coinfección por ambos. Está considerado un patógeno oportunista [18, 19]. El diagnóstico microbiológico se realiza por PCR ya que el cultivo es lento y laborioso [20]. El tratamiento es similar al utilizado para *M. pneumoniae* (macrólidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas) [21].

***M. arginini*.** Fue descubierto en 1968. Es un microorganismo asociado tradicionalmente con el mundo animal [22]. Hasta la fecha, se han comunicado 4 casos de infección por *M. arginini* en humanos: un trabajador de un matadero con infección diseminada mortal en un cuadro de linfoma no Hodgkin avanzado [23], una infección tras un ataque de un león [24], un cuadro de fascitis eosinofílica en un usuario de esteroides y suplementos derivados de origen animal [25] y un paciente inmunodeprimido con linfoma no Hodgkin avanzado que convivía con gatos. Estos animales son el reservorio habitual de *M. arginini*. Las evidencias analizadas indican que es una enfermedad zoonótica [26, 27] y que afecta con mayor probabilidad a pacientes inmunocomprometidos [28]. La presencia de fiebre, leucopenia, celulitis e infección posquirúrgica han sido los datos más relevantes en los pacientes infectados. El diagnóstico microbiológico se realizó por PCR y cultivo. Los hemocultivos no demostraron sensibilidad [26, 29]. Las tetraciclinas, macrólidos y quinolonas se consideran los antimicrobianos de elección [23, 25, 26].

***M. arthritidis*.** En 2015, se informa de una coinfección de *M. pneumoniae*, *M. hominis* y *M. arthritidis* en pacientes con artritis reumatoide [30]. Los estudios de patogenidad que se han llevado a cabo sugieren que al infectarse por bacteriófago MAV-1, *M. arthritidis* adquiere una mayor virulencia por activación del superantígeno MAM. Este actúa de forma

más efectiva frente a los linfocitos de ratones que frente a los humanos, esto explicaría su baja incidencia en el ser humano [31]. El diagnóstico microbiológico se realizó por PCR y cultivo. No existen evidencias sobre el patrón de sensibilidad de *M. arthritidis*.

***M. bovis*.** Un único caso documentado en humanos se comunicó en 1979 [32] en una mujer que previamente había estado en contacto con un fertilizante elaborado con estiércol de vaca. No obstante, esta tenía títulos altos de anticuerpos para *M. pneumoniae*, que acabaron bajando, sugiriendo que *M. bovis* no causó realmente la infección, sino que la colonizó de forma oportunista; una característica típica de su patogenidad ya descrita anteriormente en ganado bovino [33]. El diagnóstico microbiológico se realizó mediante cultivo; la PCR sería una alternativa. Las tetraciclinas fueron eficaces clínicamente [33].

***M. buccale*.** En su día fue descrito como *M. orale* tipo 2 [34, 35]. Forma parte de la microbiota de la boca [36] y no existen evidencias que indiquen que tiene significación clínica en humanos. El diagnóstico microbiológico se lleva a cabo mediante cultivo o PCR. No se han establecido tratamientos específicos [37].

***M. canis*.** El único aislamiento documentado data de 2018, tras mordedura de perro. El diagnóstico se realizó en cultivo enriquecido en ambiente microaerófilo, y confirmado por PCR. El paciente no desarrolló un cuadro infeccioso y no se han descrito alternativas terapéuticas [38].

***M. edwardii*.** Es un microorganismo antropozoonótico que se encuentra en el tracto respiratorio superior y urogenital de los perros. En el año 2015 se aisló *M. edwardii* en un niño con peritonitis polimicrobiana en la que se aislaron *M. edwardii*, *Kingella denitrificans*, *Actinomyces* spp. y *Capnocytophaga cynodegmi*. Este paciente tenía un perro como mascota. El diagnóstico microbiológico se llevó a cabo mediante cultivo y PCR [39].

***M. faucium*.** Fue descrito originalmente como *M. orale* tipo 3 [34], para pasar posteriormente a denominarse *M. faucium* [35]. Coloniza la orofaringe, siendo más común en personas con defectos sinusales o dentales. También se ha aislado en abscesos cerebrales [40, 41], procesos de gastritis crónica [42] y en abscesos diseminados en paciente con inmunodeficiencia primaria [43]. De las especies del género *Mycoplasma*, sólo se han aislado *M. salivarium* y *M. faucium* en abscesos cerebrales, lo que sugiere que puedan tener un papel patógeno específico [44]. Pertenecen al grupo de micoplasmas hidrolizantes de la arginina que, al producir amoníaco, logran neutralizar el ácido gástrico causando daño tisular [45]. El diagnóstico microbiológico se lleva a cabo mediante PCR y cultivo. Las tetraciclinas, fluoroquinolonas y macrólidos se consideran los antimicrobianos de elección [44, 45].

***M. felix*.** Se ha descrito un caso en 1997 en una mujer que es mordida por un gato [46]. Los antecedentes de la paciente son: artritis séptica de rodilla y cadera, hipogammaglobulinemia y tratamiento con corticoides; condiciones que favorecen la infección por micoplasma [28]. El diagnóstico micro-

biológico se realizó mediante cultivo, si bien la PCR debería ser una alternativa válida [47]. El tratamiento se llevó a cabo con ampicilina/sulbactam intravenoso y doxiciclina [46].

***M. fermentans*.** Fue aislado por primera vez a partir de una muestra de mucosa genital [48]. Ha sido asociado a múltiples patologías: artritis reumatoide [49-52], sarcoma de Kaposi [53], enfermedad de Behçet [54], síndrome de distrés respiratorio agudo en el adulto [55], patología de la articulación temporomandibular [56] y síndrome de fatiga crónica [57]. Aunque se pensaba que sólo afectaba a pacientes con VIH-1, se ha comprobado que no era correcta esta apreciación [58-61]. En cuanto a su patogenidad, poseen capacidad de invasión directa [62]. Además, pueden potenciar la apoptosis de células T inducida por concavalina A [63], y contienen una potente fosfoproteína fosfatasa que distorsiona la cascada de transducción normal del hospedador [64]. El diagnóstico microbiológico se realiza mediante PCR y cultivo. Doxiciclina y ciprofloxacino han resultado eficaces en el tratamiento [65, 66].

***M. genitalium*.** Este patógeno, de reservorio humano, fue aislado, en la década de los 80, a partir de muestras del tracto urogenital [67, 68]. Existe una mayor prevalencia en pacientes VIH+ [69]. Está implicado en cuadros de infertilidad en hombres y mujeres [70, 71], uretritis [72], cervicitis [73], enfermedad inflamatoria pélvica [74] y conjuntivitis [75]. Puede aparecer en cuadros de coinfección y también ser asintomático [76]. Sethi S et al. [77] han realizado un pormenorizado análisis de los mecanismos patogénicos de *M. genitalium*. El diagnóstico microbiológico, debido a las dificultades que tiene el cultivo, se lleva a cabo mediante PCR. Los antimicrobianos que se utilizan en el tratamiento son: azitromicina, moxifloxacino y doxiciclina; vigilando las resistencias [78, 79]. Como alternativas se han propuesto pristinamicina y minociclina [80].

***M. haemofelis*.** Se ha comunicado un único caso de zoonosis en un paciente VIH+ que convivía con gatos. Fue una coinfección de *M. haemofelis* con *Bartonella henselae*. No fue posible determinar el papel de esta bacteria en el cuadro clínico. La PCR es la prueba de elección para el diagnóstico microbiológico. El tratamiento con doxiciclina fue eficaz [81].

***M. hominis*.** Fue el primer micoplasma de origen humano en ser aislado [4]. Sus implicaciones clínicas son muy variadas: infección periprotésica [82, 83], artritis séptica [84, 85]; ventriculitis asociada a drenaje extraventricular [86], infecciones genitales femeninas [87, 88], neumonía [89], meningitis postoperatoria [90], meningitis neonatal [91], infección postrasplante [92-94], absceso intramedular [95], absceso pélvico [96], endocarditis [97], mediastinitis, pleuritis y pericarditis postoperatoria [98]; embarazo patológico [99], vaginosis bacteriana [100] y pielonefritis [101]. En cuanto a su patogenidad, *M. hominis* posee P50 y P100, que favorecen su adherencia a células eucariotas [102]. Asimismo, se ha descrito una proteína superficial muy inmunogénica (Vaa), que favorece su diseminación entre células. Así mismo, producen toxicidad local por el amoníaco resultante del metabolismo de la arginina; y su invasión de las mucosas se ve facilitada por la producción de proteasas frente a IgA [103]. El diagnóstico microbiológico se realiza mediante

PCR y cultivo y el tratamiento con doxiciclina, moxifloxacino y macrólidos [104].

***M. hyorhinis*.** Se ha asociado a varios tipos de cáncer y a su malignización, sobre todo en el carcinoma gástrico y de pulmón [105-107]. Se ha demostrado que la p37 estimula su capacidad de invasión y metástasis. Estudios de laboratorio evidencian que el uso de anticuerpos frente a p37 consigue inhibir la migración de células tumorales infectadas por *M. hyorhinis* [106, 108]. El diagnóstico microbiológico se ha realizado mediante PCR y cultivo.

***M. lipofaciens*.** Se ha descrito un único caso de transmisión a un veterinario que presentaba un cuadro autolimitado que cursó con dolor de garganta y rinitis. El diagnóstico se llevó a cabo mediante cultivo y PCR. No fue necesario instaurar un tratamiento con antimicrobianos [109].

***M. lipophilum*.** En 1974, DelGiudice et al. [110] proponen esta nueva especie dentro del género *Mycoplasma*. En este artículo se comunicaron dos aislamientos, uno procedente de la garganta de un paciente con mononucleosis y otro de esputo de un enfermo con neumonía atípica. No se ha vuelto a publicar ningún caso.

***M. maculosum*.** El único aislamiento descrito procede del líquido cefalorraquídeo de un paciente inmunodeprimido, que desarrolló una meningitis. Está considerado como una zoonosis ya que en su perro también se aisló *M. maculosum*. El diagnóstico se llevó a cabo mediante cultivo y PCR. Se ha observado que es resistente a los tratamientos habituales por lo que es necesario realizar pruebas de sensibilidad [111].

***M. orale*.** Se aisló en 1964 [112] y ha sido considerado un colonizador de la orofaringe sin implicaciones patogénicas. Sin embargo, se ha aislado en pacientes con leucemia [113, 114], en el líquido sinovial de un paciente con poliartritis [115], en infecciones en pacientes inmunodeprimidos [116, 117] y en sinusitis maxilar crónica [118]. Izutsu et al. [119] sugieren que *M. orale* interfiere en la regulación de los canales iónicos, reduciendo el número de canales Ca²⁺ en células submandibulares. El diagnóstico microbiológico se realiza mediante PCR. A la hora de abordar el tratamiento es necesario tener en cuenta la situación inmunológica del paciente dado que en situaciones de alteraciones de la inmunidad humoral pueden tener recaídas en la infección al cesar el tratamiento [117].

***M. ovis*.** Se han comunicado dos casos en veterinarios y personas que trabajan con animales, los dos en coinfección con *B. henselae*. El diagnóstico microbiológico se realiza mediante PCR. Son de elección doxiciclina o levofloxacino. Se debe asociar rifampicina si existe sospecha de coinfección con *B. henselae* [120, 121].

***M. penetrans*.** La mayor parte de los aislamientos se han realizado en pacientes VIH+, en los que favorece el desarrollo de sarcoma de Kaposi [122, 123]. También se han comunicado casos de bacteriemias y uretritis en pacientes seronegativos [124-126]. Entre sus mecanismos patogénicos destacan su capacidad para invadir activamente las células del hospedador e inducir la apoptosis de estas mediante la producción de endo-

nucleasas P40 [127]; y su inmunogenicidad se debe a que activan las células T V γ 9/V δ 2 [128]. El diagnóstico microbiológico se realiza mediante PCR y cultivo. Azitromicina, claritromicina, eritromicina y tetraciclinas han sido eficaces en el tratamiento [66].

***M. phocicerebrale*.** Es quizás el único patógeno de reservorio animal que infecta con regularidad a los humanos, concretamente a aquellos que están en contacto con focas. Es el causante del "dedo de foca" [129-131]. El diagnóstico microbiológico se realiza mediante cultivo y PCR. En el tratamiento se utiliza tetraciclina como antimicrobiano de elección y aureomicina como alternativa [132].

***M. pirum*.** Se ha aislado en pacientes con SIDA, aunque, de momento, no se conocen sus implicaciones clínicas [122, 133]. Aunque los micoplasmas suelen ser contaminantes de los cultivos se ha comprobado que *M. pirum*, nunca lo ha sido ni en el procesamiento de muestras procedentes de animales o de flora respiratoria [134]. Los casos descritos parecen indicar que su reservorio es humano. El diagnóstico microbiológico se realiza mediante cultivo y PCR. Es sensible a los macrólidos salvo a eritromicina [66].

***M. pneumoniae*.** Se trata de un patógeno exclusivamente humano [135]. Sus manifestaciones clínicas se producen mayoritariamente a nivel del tracto respiratorio, las extrapulmonares no son raras y con frecuencia graves. Puede afectar a personas sanas. En pacientes inmunocomprometidos los cuadros son más severos [136, 137].

En cuanto a la infección respiratoria, *M. pneumoniae* está implicado en la neumonía atípica [138], asma [139, 140], bronquitis crónica [141], distrés respiratorio agudo [142], bronquiolitis obliterante [143], empiema pleural [144] y faringitis aguda en niños [145].

Las manifestaciones extrapulmonares a nivel neurológico se han descrito: encefalitis [146, 147], encefalomiелitis diseminada [148], infarto cerebral [149, 150], cerebelitis aguda [151], miелitis transversa y síndrome de Guillain-Barré [152, 153], enfermedad de Weston Hurt [154], necrosis estriatal bilateral reversible [155]; meningitis crónica, hipertensión intracraneal y plexopatía braquial [156, 157]; neurorretinitis bilateral [158]; y casos de psicosis en adultos [159]. A nivel dermatológico: urticaria [160], dermatosis pustulosa subcorneal [161], púrpura de Henoch-Schönlein [162], úlcera vulvar [163], eritema multiforme [164] y exantema mucocutáneo inducido por *M. pneumoniae* [165, 166]. A nivel cardiovascular se han comunicado casos de endocarditis [167], miocarditis [168], pericarditis [169], taponamiento cardíaco [170] y enfermedad de Kawasaki [171].

Se han documentado manifestaciones digestivas como hepatitis, pancreatitis [172, 173, 174] y gastroenteropatía pierde proteínas [175]. A nivel musculoesquelético, se ha aislado en artrosis [176], miositis [177] y rabdomiólisis [178]. En el aparato urogenital, se ha implicado en nefritis intersticial [179], nefropatía IgA [180], glomerulonefritis y síndrome nefrótico [181, 182] y priapismo [183]. También se ha relacionado con enfermedades hematológicas: anemia hemolítica [184, 185], púrpura trombocitopénica trombótica [186], tromboci-

topenia inmune [187], mononucleosis infecciosa [172], infarto esplénico [188], coagulación intravascular diseminada [189] y trombocitosis reactiva [190].

Existen evidencias que lo relacionan con casos de conjuntivitis y uveítis [191, 192], otitis media [193, 194], pérdida de audición repentina [195], y Síndrome de Grisel [196]. El papel que puede desempeñar *M. pneumoniae* como agente etiológico de la miringitis bullosa está, en estos momentos, en entredicho [197-200].

He J et al. [201], Waites KB et al. [202] han realizado un pormenorizado análisis de los mecanismos patogénicos de daño directo e indirecto responsables de la patogenicidad de *M. pneumoniae*. Para realizar el diagnóstico microbiológico es recomendable la PCR que más sensible que la detección de antígenos. La serología es también una buena opción. El cultivo no se usa como diagnóstico rutinario por su lentitud, sin embargo, puede ser muy útil para el diagnóstico de las manifestaciones extrapulmonares ya que proporciona una evidencia directa de la presencia de micoplasmas viables [203].

El tratamiento de elección son los macrólidos, preferiblemente azitromicina a eritromicina, si bien se están documentando resistencias [204]. Como tratamientos alternativos se pueden emplear tetraciclinas y fluoroquinolonas [205]. Están en fase de desarrollo algunas vacunas [206].

***M. primatum*.** Se ha comunicado un aislamiento a partir de un cordón umbilical y otro en la uretra de una mujer de una muestra obtenida durante la autopsia [48, 207]. No se ha determinado el posible significado clínico de estos aislamientos [208].

***M. pulmonis*.** Este micoplasma ha sido aislado en dos ocasiones, ambas en personas con contacto habitual con ratas. En ninguno de los casos aparecieron manifestaciones clínicas. No se ha determinado el posible significado clínico de estos aislamientos [209, 210].

***M. salivarium*.** Tradicionalmente se ha considerado como parte de la flora bucal normal. Sin embargo, se han aislado en: leucoplasia oral [211], infección protésica en paciente con hipogammaglobulinemia [212], liquen plano oral [213], neumonía en una niña con leucemia [214], artritis séptica en un paciente con leucemia linfática crónica [215], artritis en un paciente con hipogammaglobulinemia [216], anemia de Falconi asociada a carcinoma oral [217], empiema pleural [218], absceso cerebral [219], absceso submasetérico [220], alteración de la unión temporomandibular [56], enfermedad respiratoria crónica [221], enfermedad periodontal [222] y en pacientes VIH+ [223]. El diagnóstico microbiológico se realiza mediante cultivo y PCR. Doxiciclina y clindamicina han sido eficaces en el tratamiento de estas infecciones [218, 219].

***M. spermatophilum*.** Ha sido aislado de muestras de semen y cérvix [224] y en un paciente con gastritis crónica [42]. No se ha determinado el posible significado clínico de estos aislamientos.

***M. suis*.** En 2007 se comunicaron los primeros casos de aislamiento de *M. suis*, en trabajadores de granjas de cerdos.

Tabla 1 Aspectos relevantes de las especies del género <i>Mycoplasma</i> que pueden tener implicaciones clínicas en el hombre.			
Especie	Aislamiento en el hombre	Significado clínico*	Antimicrobianos recomendados
<i>M.amphoriforme</i>	Si	Si	Macrólidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas [21].
<i>M. arginini</i>	Si	Si	Tetraciclinas, macrólidos y quinolonas [23, 25, 26].
<i>M. arthritidis</i>	Si	No determinado	No determinado
<i>M. bovis</i>	Si	No determinado	Tetraciclinas [33].
<i>M. buccale</i>	Si	No determinado	No determinado
<i>M. canis</i>	Si	No determinado	No determinado
<i>M. edwardii</i>	Si	No determinado	No determinado
<i>M. faucium</i>	Si	Si	Tetraciclinas, fluoroquinolonas y macrólidos [44, 45].
<i>M. felis</i>	Si	Si	Ampicilina/sulbactam intravenoso y doxiciclina [46].
<i>M. fermentans</i>	Si	Si	Doxiciclina y ciprofloxacino [65, 66].
<i>M. genitalium</i>	Si	Si	Azitromicina, moxifloxacino y doxiciclina; [78, 79]. Alternativas pristinamicina y minociclina [80].
<i>M. haemofelis</i>	Si	No determinado	Doxiciclina [81].
<i>M. hominis</i>	Si	Si	Doxiciclina, moxifloxacino y macrólidos [104].
<i>M. hyorhinis</i>	Si	Se ha asociado a varios tipos de cáncer y a su malignización [105, 106, 107].	No determinado
<i>M. lipofaciens</i>	Si	Si	No determinado [109].
<i>M. lipophilum</i>	Si	No determinado	No determinado [110]
<i>M. maculosum</i>	Si	Si	Es necesario realizar pruebas de sensibilidad [111].
<i>M. orale</i>	Si	Si	Es necesario tener en cuenta la situación inmunológica del paciente para evitar recaídas [117].
<i>M. ovis</i>	Si	Si	Doxiciclina o levofloxacino. Asociar rifampicina si existe sospecha de coinfección con <i>Bartonella henselae</i> [120, 121].
<i>M. penetrans</i>	Si	Si	Azitromicina, claritromicina, eritromicina y tetraciclinas [66].
<i>M. phocicerebrale</i>	Si	Si	Tetraciclina. Aureomicina como alternativa [132].
<i>M. pirum</i>	Si	Si	Es sensible a los macrólidos salvo a eritromicina [66].
<i>M. pneumoniae</i>	Si	Si	Macrólidos, preferiblemente azitromicina a eritromicina. Se han documentado resistencias [204]. Alternativas: tetraciclinas y fluoroquinolonas [205].
<i>M. primum</i>	Si	No determinado [208].	No determinado [208].
<i>M. pulmonis</i>	Si	No determinado [209, 210].	No determinado [209, 210].
<i>M. salivarium</i>	Si	Si	Doxiciclina y clindamicina [218, 219].
<i>M. spermatophilum</i>	Si	No determinado [42, 224].	No determinado [42, 224].
<i>M. suis</i>	Si	No determinado [225].	No determinado [225].
<i>U. parvum</i>	Si	Si	Doxiciclina y eritromicina [230].
<i>U. urealyticum</i>	Si	Si	Doxiciclina y moxifloxacino; en embarazadas utilizar eritromicina [1].

* El significado clínico en el hombre queda reflejado en el texto de la revisión.

Los autores indican que existe una estrecha relación filogenética entre los aislamientos procedentes de los animales y de las personas, lo cual podría sugerir una posible transmisión entre especies. Esta posibilidad deberá comprobarse en investigaciones adicionales [225]. Hasta la fecha, no se ha determinado el posible significado clínico de estos aislamientos.

***U. parvum*.** Está considerado como flora genital humana. Sin embargo, se ha aislado en pacientes inmunodeprimidos [226-228]. También se ha asociado con corioamnionitis [229-231]; vaginosis bacteriana [232]; coinfección con papilomavirus e infertilidad [233]; neumonía y sepsis en recién nacido [234]; infección de herida esternal [235]; orquitis, artritis séptica y endocarditis en pacientes con linfoma [236]; y uretritis no gonocócica [237]. El diagnóstico microbiológico se realiza mediante cultivo y PCR. Doxiciclina y eritromicina han sido eficaces en el tratamiento de estas infecciones [230].

***U. urealyticum*.** Lo más habitual es aislarlo como un patógeno oportunista en pacientes inmunocomprometidos en casos de poliartritis y artritis séptica [238-241]; absceso periférico [242], abscesos cerebrales [243], osteomielitis [244, 245], uretritis [246], pielonefritis [247], meningitis postrasplante [248] e infección periprotésica posquirúrgica [249]. También asociado a embarazos de riesgo y complicaciones neonatales [250]; corioamnionitis, enfermedad pélvica inflamatoria, enfermedad pulmonar crónica en pretérminos [251-253], infertilidad [254-256], prostatitis [257] y vaginosis bacteriana [232], bronquiolitis en niños [258], poliartritis séptica en paciente con leucemia linfoblástica aguda [259], empiema pleural en paciente con linfoma B difuso de célula grande [260], artritis séptica en paciente con LES [261], diabetes insípida [262], bacteriemia postquirúrgica [263], coinfección junto a *Chlamydia trachomatis* en el síndrome de Reiter [264, 265] y piuria estéril [266].

Desde el punto de vista de su patogenicidad es importante la capacidad para producir fosfolipasas A y C que provocan la liberación de ácido araquidónico, que induce la liberación de citocinas proinflamatorias. Así mismo, puede producir proteasas frente a IgA que facilitan la invasión de las mucosas [267]. El diagnóstico microbiológico se realiza mediante cultivo y PCR. Doxiciclina y moxifloxacino son eficaces en el tratamiento de estas infecciones; en embarazadas se debe utilizar eritromicina [1].

En la tabla 1 se reflejan los aspectos más significativos de las diferentes especies del género *Mycoplasma* que han sido aislados en el hombre.

FINANCIACIÓN

No ha habido ninguna fuente de financiación.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores manifiestan no existir conflictos de interés.

BIBLIOGRAFÍA

1. Combaz-Söhnchen N, Kuhn A. A systematic review of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* in Urogynaecology. Geburtshilfe Frauenheilkd. 2017; 77(12):1299-303. doi: 10.1055/s-0043-119687
2. Shepard MC, Lunceford CD, Ford DK, Purcell RH, Taylor-Robinson D, Razin S, et al. *Ureaplasma urealyticum* gen. nov., sp. nov.: Proposed Nomenclature for the Human T (T-Strain) Mycoplasmas. Int J Syst Bacteriol. 1974; 24(2): 160-71. <https://doi.org/10.1099/00207713-24-2-160>
3. Harwick HJ, Kalmanson GM, Guze LB. Human diseases associated with mycoplasmas—with an appendix on simple culture techniques. Calif Med. 1972; 116(5):1-7. PMID: 4565394
4. Dienes L, Edsall G. Observations on the L-Organism of Klieneberger. Proc Soc Exp Biol Med. 1937; 36(5):740-4. <https://doi.org/10.3181/00379727-36-9380>
5. Shepard MC. The recovery of pleuropneumonia-like organisms from Negro men with and without nongonococcal urethritis. Am J Syph Gonorrhea Vener Dis. 1954; 38(2): 113-24. PMID: 13138817
6. Taylor-Robinson D, Furr PM. Update on sexually transmitted mycoplasmas. Lancet. 1998; 351:S12-5. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)90004-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)90004-6)
7. Shepard MC, Lunceford CD. Differential agar medium (A7) for identification of *Ureaplasma urealyticum* (human T mycoplasmas) in primary cultures of clinical material. J Clin Microbiol. 1976; 3(6):613-25. PMID: 950379
8. Nübling CM, Baylis SA, Hanschmann KM, Montag-Lessing T, Chudy M, Kreß J, et al. World Health Organization International standard to harmonize assays for detection of Mycoplasma DNA. Appl Environ Microbiol. 2015;81(17):5694-702. doi: 10.1128/AEM.01150-15.
9. Conrado Fde O, do Nascimento NC, dos Santos AP, Zimpel CK, Messick JB, Biondo AW. Occurrence and identification of hemotropic mycoplasmas (Hemoplasmas) in free ranging and laboratory rats (*Rattus norvegicus*) from two Brazilian zoos. BMC Vet Res. 2015; 11:286. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0601-8>
10. Reissier S, Masson R, Guérin F, Viquesnel G, Petitjean-Lecherbonnier J, Pereyre S, et al. Fatal nosocomial meningitis caused by *Mycoplasma hominis* in an adult patient: case report and review of the literature. Int J Infect Dis. 2016; 48:81-3. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.05.015>
11. Rieber H, Frontzek A, Fischer M. Periprosthetic joint infection associated with *Mycoplasma hominis* after transurethral instrumentation in an immunocompetent patient. Unusual or underestimated? A case report and review of the literature. Int J Infect Dis. 2019; 82:86-8. doi: 10.1016/j.ijid.2019.03.012
12. Pascual A, Perez M-H, Jatón K, Hafen G, Di Bernardo S, Cotting J, et al. *Mycoplasma hominis* necrotizing pleuropneumonia in a previously healthy adolescent. BMC Infect Dis. 2010; 10:335. doi: 10.1186/1471-2334-10-335
13. Pitcher DG, Nicholas RAJ. Mycoplasma host specificity: Fact or fiction? Vet J. 2005; 170(3):300-6. doi: 10.1016/j.tvjl.2004.08.011
14. Rottem S. Interaction of Mycoplasmas with host cells. Physiol Rev.

- 2003; 83(2): 417-32. doi: 10.1152/physrev.00030.2002
15. Dessi D, Delogu G, Emonte E, Catania MR, Fiori PL, Rappelli P. Long-term survival and intracellular replication of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* cells: potential role of the protozoan in transmitting bacterial infection. *Infect Immun*. 2005; 73(2):1180-6. doi: 10.1128/IAI.73.2.1180-1186.2005
 16. Webster D, Windsor H, Ling C, Windsor D, Pitcher D. Chronic bronchitis in immunocompromised patients: association with a novel *Mycoplasma* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003; 22(9):530-4. doi: 10.1007/s10096-003-0980-9.
 17. Pitcher DG, Windsor D, Windsor H, Bradbury JM, Yavari C, Jensen JS, et al. *Mycoplasma amphoriforme* sp. nov., isolated from a patient with chronic bronchopneumonia. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005; 55(6):2589-94. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.63269-0>
 18. van Schaik ML, Patberg KW, Wallinga JG, Wolfhagen MJHM, Bruijnesteijn van Coppenraet LES. *Mycoplasma amphoriforme* vs *M. pneumoniae*: similarities and differences between patient characteristics in a regional hospital in the Netherlands. *J Med Microbiol*. 2018; 67(9):1348-50. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000809>
 19. Katsukawa C, Asai S, Mizutani K, Arai K, Kohdera U, Kushibiki C, et al. Novel isolation of *Mycoplasma amphoriforme* from a pediatric patient with protracted bronchitis in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2016; 69(5):450-1. doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.128
 20. Ling CL, Oravcova K, Beattie TF, Creer DD, Dilworth P, Fulton NL, et al. Tools for detection of *Mycoplasma amphoriforme*: a primary respiratory pathogen? *J Clin Microbiol*. 2014; 52(4):1177-81. doi: 10.1128/JCM.03049-13
 21. Pereyre S, Renaudin H, Touati A, Charron A, Peuchant O, Hassen AB, et al. Detection and susceptibility testing of *Mycoplasma amphoriforme* isolates from patients with respiratory tract infections. *Clin Microbiol Infect*. 2010; 16(7):1007-9. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02993.x
 22. Barile MF, DelGiudice RA, Carski TR, Gibbs CJ, Morris JA. Isolation and characterization of *Mycoplasma arginini*: spec. nov.*. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1968; 129(2):489-94. doi: 10.3181/00379727-129-33351
 23. Yechouron A, Lefebvre J, Robson HG, Rose DL, Tully JG. Fatal septicemia due to *Mycoplasma arginini*: a new human zoonosis. *Clin Infect Dis*. 1992; 15(3):434-8. doi: 10.1093/clind/15.3.434
 24. Prayson MJ, Venkatarayappa I, Srivastava M, Northern I, Burdette SD. Deep infection with *Mycoplasma arginini* in an open femur fracture secondary to an African lion bite: a case report. *Injury Extra*. 2008; 39(7):243-6. doi:10.1016/j.injury.2007.12.009
 25. Silló P, Pintér D, Ostorházi E, Mazán M, Wikonkál N, Pónyai K, et al. Eosinophilic fasciitis associated with *Mycoplasma arginini* infection. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(3): doi: 1113-7. 10.1128/JCM.05568-11
 26. Watanabe M, Hitomi S, Goto M, Hasegawa Y. Bloodstream infection due to *Mycoplasma arginini* in an immunocompromised patient. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(9):3133-5. doi: 10.1128/JCM.00736-12
 27. Tan RJ, Lim EW, Ishak B. Significance and pathogenic role of *Mycoplasma arginini* in cat diseases. *Can J Comp Med*. 1977; 41(3):349-54. PMID: 907911
 28. Roifman CM, Pandu Rao C, Lederman HM, Lavi S, Quinn P, Gelfand EW. Increased susceptibility to mycoplasma infection in patients with hypogammaglobulinemia. *Am J Med*. 1986; 80(4):590-4. doi: 10.1016/0002-9343(86)90812-0
 29. Waites KB, Canupp KC. Evaluation of BacT/ALERT system for detection of *Mycoplasma hominis* in simulated blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(12):4328-31. doi: 10.1128/JCM.39.12.4328-4331.2001
 30. Ataee RA, Golmohammadi R, Alishiri GH, Mirnejad R, Najafi A, Esmaeili D, et al. Simultaneous detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma arthritidis* in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis by multiplex PCR. *Arch Iran Med*. 2015; 18(6):345-50. PMID: 26058928
 31. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998; 62(4):1094-156. PMID: 9841667
 32. Madoff S, Pixley BQ, DelGiudice RA, Moellering RC. Isolation of *Mycoplasma bovis* from a patient with systemic illness. *J Clin Microbiol*. 1979; 9(6):709-11. PMID: 387817
 33. Bürki S, Frey J, Pilo P. Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*. *Vet Microbiol*. 2015; 179(1):15-22. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.024>
 34. Taylor-Robinson D, Chanock RM. Characterization of a newly identified mycoplasma from the human oropharynx. *Am J Epidemiol*. 1965; 81(2):180-91. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a120506
 35. Freundt EA, Taylor-Robinson D, Purcell RH, Chanock RM, Black FT. Proposal of *Mycoplasma buccale* nom. nov. and *Mycoplasma faucium* nom. nov. for *Mycoplasma orale* "Types" 2 and 3, respectively. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1974; 24(2):252-5. doi: 10.1099/00207713-24-2-252
 36. Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and Ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18(4):757-89. doi: 10.1128/CMR.18.4.757-789.2005
 37. Aoki S, Ito S, Watanabe T. UV survival of human mycoplasmas: evidence of dark reactivation in *Mycoplasma buccale*. *Microbiol Immunol*. 1979; 23(3):147-58. doi: 10.1111/j.1348-0421.1979.tb00451.x
 38. Klein S, Klotz M, Eigenbrod T. First isolation of *Mycoplasma canis* from human tissue samples after a dog bite. *New Microbes New Infect*. 2018; 25:14-5. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.05.003>
 39. Lalan SP, Warady BA, Blowey D, Waites KB, Selvarangan R. *Mycoplasma edwardii* peritonitis in a patient on maintenance peritoneal dialysis. *Clin Nephrol*. 2015; 83(1):45-8. doi: 10.5414/CN107976
 40. Al Masalma M, Lonjon M, Richet H, Dufour H, Roche P-H, Drancourt M, et al. Metagenomic analysis of brain abscesses identifies specific bacterial associations. *Clin Infect Dis*. 2012; 54(2):202-10. doi: 10.1093/cid/cir797
 41. Al Masalma M, Raoult M, Armougom F, Scheld WM, Dufour H, Roche P-H, et al. The expansion of the microbiological spectrum of brain abscesses with use of multiple 16s ribosomal DNA sequencing. *Clin Infect Dis*. 2009; 48(9):1169-78. doi: 10.1086/597578

42. Kwon H-J, Kang J-O, Cho S-H, Kang H-B, Kang K-A, Kim J-K, et al. Presence of human mycoplasma DNA in gastric tissue samples from Korean chronic gastritis patients. *Cancer Sci.* 2004; 95(4):311-5. doi: 10.1111/j.1349-7006.2004.tb03208.x
43. Dominguez-Pinilla N, Allende LM, Rosain J, Gallego M del C, Chaves F, Deswarte C, et al. Disseminated abscesses due to *Mycoplasma faucium* in a patient with activated PI3K δ syndrome type 2. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018; 6(5):1796-1798.e2. doi: 10.1016/j.jaip.2018.02.014
44. Edouard S, Courtois GD, Gautret P, Jouve JL, Minodier P, Noël G et al. High Prevalence of *Mycoplasma faucium* DNA in the Human Oropharynx. *J Clin Microbiol* 2016; 54(1):194-6. doi: 10.1128/JCM.02068-15
45. Meseguer-Peinado MA, Acosta-Boga B, Matas-Andreu L, Codina-Grau G. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012; 30(8):500-4. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.10.020>
46. Bonilla HF, Chenoweth CE, Tully JG, Blythe LK, Robertson JA, Ogneovski VM, et al. *Mycoplasma felis* septic arthritis in a patient with hypogammaglobulinemia. *Clin Infect Dis.* 1997; 24(2):222-5. doi: 10.1093/clinids/24.2.222
47. Płoneczka-Janeczko K, Kiełbowicz Z, Bania J, Bednarek K. Real-time PCR detection of *Mycoplasma felis* in domestic cats suffering from chronic conjunctivitis (Poland). *Pol J Vet Sci.* 2011; 14(4):679-81. doi: 10.2478/v10181-011-0103-y
48. Ruiter M, Wentholt HMM. The occurrence of a pleuropneumonia-like organism in fuso-spirillary infections of the human genital mucosa. *J Invest Dermatol.* 1952; 18(4): 313-25. doi: 10.1038/jid.1952.36
49. Gilroy CB, Keat A, Taylor-Robinson D. The prevalence of *Mycoplasma fermentans* in patients with inflammatory arthritides. *Rheumatology (Oxford).* 2001; 40(12):1355-8. doi: 10.1093/rheumatology/40.12.1355
50. Johnson S, Sidebottom D, Bruckner F, Collins D. Identification of *Mycoplasma fermentans* in synovial fluid samples from arthritis patients with inflammatory disease. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(1):90-3. PMID: 10618069
51. Williams MH, Brostoff J, Roitt IM. Possible role of *Mycoplasma fermentans* in pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Lancet.* 1970; 296(7667):277-80. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(70\)91328-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(70)91328-0)
52. Kawahito Y, Ichinose S, Sano H, Tsubouchi Y, Kohno M, Yoshikawa T, et al. *Mycoplasma fermentans* glycolipid-antigen as a pathogen of rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 369(2):561-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.02.079
53. Cuccuru MA, Cottoni F, Fiori PL, Masala MV, Cerimele D. PCR Analysis of *Mycoplasma fermentans* and *M. penetrans* in Classic Kaposi's Sarcoma. *Acta Derm Venereol.* 2005; 85(5):459-60. doi: 10.1080/00015550510033714
54. Zouboulis CC, Turnbull JR, Mühlradt PF. Association of *Mycoplasma fermentans* with Adamantiades-Behçet's Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2003;528:191-4. doi: 10.1007/0-306-48382-3_37
55. Lo SC, Wear DJ, Green SL, Jones PG, Legier JF. Adult respiratory distress syndrome with or without systemic disease associated with infections due to *Mycoplasma fermentans*. *Clin Infect Dis.* 1993; 17 Supl 1:S259-63. doi: 10.1093/clinids/17.supplement_1.s259
56. Watanabe T, Shibata K, Yoshikawa T, Dong L, Hasebe A, Domon H, et al. Detection of *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma fermentans* in synovial fluids of temporomandibular joints of patients with disorders in the joints. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1998; 22(3):241-6. doi: 10.1111/j.1574-695X.1998.tb01212.x
57. Vojdani A, Chopra PC, Tagle C, Andrin R, Samimi B, Lapp CW. Detection of *Mycoplasma* genus and *Mycoplasma fermentans* by PCR in patients with Chronic Fatigue Syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1998; 22(4):355-65. doi: 10.1111/j.1574-695X.1998.tb01226.x
58. Ainsworth JG, Hourshid S, Webster ADB, Gilroy CB, Taylor-Robinson D. Detection of *Mycoplasma fermentans* in healthy students and patients with congenital immunodeficiency. *J Infect.* 2000; 40(2):138-40. doi: 10.1016/s0163-4453(00)80005-5
59. Katseni VL, Ryait BK, Ariyoshi K, Bieniasz PD, Weber JN, Taylor-Robinson D, et al. *Mycoplasma fermentans* in individuals seropositive and seronegative for HIV-1. *Lancet.* 1993; 341(8840):271-3. doi: 10.1016/0140-6736(93)92617-3
60. Liu Y, Dong Y, Wen Y, Peng S, Liao J, Liu Y. Association of *Mycoplasma fermentans* and the risk of HIV-1 infection: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2020; 99(2):e18499. doi: 10.1097/MD.00000000000018499
61. Beecham H, Lo S, Lewis D, Comer S, Riley K, Oldfield E. Recovery from fulminant infection with *Mycoplasma fermentans* (incognitus strain) in non-immunocompromised host. *Lancet.* 1991; 338(8773):1014-5. doi: 10.1016/0140-6736(91)91874-t
62. Yavlovich A, Higazi AA, Rottem S. Plasminogen binding and activation by *Mycoplasma fermentans*. *Infect Immun.* 2001; 69(4):1977-82. doi: 10.1128/IAI.69.4.1977-1982.2001
63. Nicolson GL, Nasralla MY, Nicolson NL. The pathogenesis and treatment of mycoplasmal infections. *Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter.* 1998; 17(11): 81-7. [https://doi.org/10.1016/S1069-417X\(00\)88885-8](https://doi.org/10.1016/S1069-417X(00)88885-8)
64. Shibata K, Noda M, Sawa Y, Watanabe T. Acid phosphatase purified from *Mycoplasma fermentans* has protein tyrosine phosphatase-like activity. *Infect Immun.* 1994; 62(1):313-5. doi: 10.1128/IAI.62.1.313-315.1994
65. Lo SC, Buchholz CL, Wear DJ, Hohm RC, Marty AM. Histopathology and doxycycline treatment in a previously healthy non-AIDS patient systemically infected by *Mycoplasma fermentans* (incognitus strain). *Mod Pathol.* 1991; 4(6):750-4. PMID: 1788266
66. Poulin SA, Perkins RE, Kundsins RB. Antibiotic susceptibilities of AIDS-associated mycoplasmas. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(4):1101-3. doi: 10.1128/JCM.32.4.1101-1103.1994
67. Tully JG, Cole RM, Taylor-Robinson D, Rose DL. A newly discovered *Mycoplasma* in the human urogenital tract. *Lancet.* 1981; 317(8233):1288-91. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(81\)92461-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(81)92461-2)
68. Tully JG, Taylor-Robinson D, Rose D., Cole RM, Bove JM. *Mycoplasma genitalium*, a new species from the human urogenital tract. *Int.*

- J. Syst. Bacteriol. 1983; 33(2):387-96. doi: 10.1128/CMR.00006-11
69. Napierala Mavedzenge S, Weiss HA. Association of *Mycoplasma genitalium* and HIV infection: a systematic review and meta-analysis. AIDS. 2009; 23(5):611-20. doi: 10.1097/QAD.0b013e328323da3e
 70. Li WN, Zhu WB, Liu G. Correlation of *Mycoplasma genitalium* infection with male infertility. Zhonghua Nan Ke Xue. 2018; 24(11):999-1004. PMID: 32212474
 71. Lis R, Rowhani-Rahbar A, Manhart LE. *Mycoplasma genitalium* infection and female reproductive tract disease: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 2015; 61(3):418-26. doi: 10.1093/cid/civ312
 72. Hamasuna R. *Mycoplasma genitalium* in male urethritis: diagnosis and treatment in Japan. Int J Urol. 2013; 20(7):676-84. doi: 10.1111/iju.12152
 73. Falk L, Fredlund H, Jensen JS. Signs and symptoms of urethritis and cervicitis among women with or without *Mycoplasma genitalium* or *Chlamydia trachomatis* infection. Sex Transm Infect. 2005; 81(1):73-8. doi: 10.1136/sti.2004.010439
 74. Short VL, Totten PA, Ness RB, Astete SG, Kelsey SF, Murray P, et al. The demographic, sexual health and behavioural correlates of *Mycoplasma genitalium* infection among women with clinically suspected pelvic inflammatory disease. Sex Transm Infect. 2010; 86(1):29-31. doi: 10.1136/sti.2009.037721
 75. Björnelius E, Jensen JS, Lidbrink P. Conjunctivitis associated with *Mycoplasma genitalium* infection. Clin Infect Dis. 2004; 39(7):e67-9. doi: 10.1086/423809
 76. Fernández-Huerta M, Espasa M. *Mycoplasma genitalium* co-infection with *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* among asymptomatic patients: the silent wick for macrolide resistance spread. Sex Transm Infect. 2019; 95(5):391. doi: 10.1136/sextrans-2018-053848
 77. Sethi S, Singh G, Samanta P, Sharma M. *Mycoplasma genitalium*: An emerging sexually transmitted pathogen. Indian J Med Res. 2012; 136(6):942-55. PMID: 23391789
 78. Soni S, Horner P, Rayment M, Pinto-Sander N, Naous N, Parkhouse A, et al. British Association for Sexual Health and HIV national guideline for the management of infection with *Mycoplasma genitalium* (2018). Int J STD AIDS. 2019; 30(10):938-50. doi: 10.1177/0956462419825948
 79. Adelantado Lacasa M, Beristain X. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* infection and antibiotic resistance in Navarra (North Spain). Sex Transm Infect. 2019; 95(7):549. doi: 10.1136/sextrans-2019-054083
 80. Gnanadurai R, Fifer H. *Mycoplasma genitalium*: A Review. Microbiology. 2020; 166(1):21-9. doi: 10.1099/mic.0.000830
 81. dos Santos AP, dos Santos RP, Biondo AW, Dora JM, Goldani LZ, de Oliveira ST, et al. Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. Emerging Infect Dis. 2008; 14(12):1922-4. doi: 10.3201/eid1412.080964
 82. Xiang L, Lu B. Infection due to *Mycoplasma hominis* after left hip replacement: case report and literature review. BMC Infect Dis. 2019; 19(1):50. doi: 10.1186/s12879-019-3686-z
 83. Rieber H, Frontzek A, Fischer M. Periprosthetic joint infection associated with *Mycoplasma hominis* after transurethral instrumentation in an immunocompetent patient. Unusual or underestimated? A case report and review of the literature. Int J Infect Dis. 2019; 82:86-8. doi: 10.1016/j.ijid.2019.03.012
 84. Wu TS, Yu KH, Kuo AJ, Chia JH, Lu SC, Leu HS, et al. *Mycoplasma hominis* septic arthritis with concomitant gouty arthritis. J Clin Rheumatol. 2012; 18(8):411-2. doi: 10.1097/RHU.0b013e318278ed74
 85. Phuah CL, Javid B, Aliyu SH, Lever AM. A case of *Mycoplasma hominis* septic arthritis postpartum. J Infect. 2007; 55(5):e135-7. doi: 10.1016/j.jinf.2007.08.006
 86. Diab A, AlMusawi SSM, Hudhiah D, Magzoub R, Al Rashed AS, Al Musawi TS. Iatrogenic ventriculitis due to *Mycoplasma hominis*: a case report and review of the literature. Am J Case Rep. 2019; 20:406-11. doi: 10.12659/AJCR.914284
 87. Fürnkranz U, Henrich B, Walochnik J. *Mycoplasma hominis* impacts gene expression in *Trichomonas vaginalis*. Parasitol Res. 2018; 117(3): 841-7. doi: 10.1007/s00436-018-5761-6
 88. Dessi D, Margarita V, Cocco AR, Marongiu A, Fiori PL, Rappelli P. *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma hominis*: new tales of two old friends. Parasitology. 2019; 146(9):1150-5. doi: 10.1017/S0031182018002135
 89. Sáez A, Monteagudo I, Miñambres E, Ots E, Rodríguez-Borregán JC, García C. Pneumonia due to *Mycoplasma hominis* in a healthy adult. Scand J Infect Dis. 2003; 35(4):282-4. doi: 10.1080/0036554021000027005
 90. Zhou M, Wang P, Chen S, Du B, Du J, Wang F, et al. Meningitis in a Chinese adult patient caused by *Mycoplasma hominis*: a rare infection and literature review. BMC Infect Dis. 2016; 16(1):557. doi: 10.1186/s12879-016-1885-4
 91. Hata A, Honda Y, Asada K, Sasaki Y, Kenri T, Hata D. *Mycoplasma hominis* meningitis in a neonate: case report and review. J Infect. 2008; 57(4):338-43. doi: 10.1016/j.jinf.2008.08.002
 92. Dixit A, Alexandrescu S, Boyer D, Graf EH, Vargas SO, Silverman M. *Mycoplasma hominis* empyema in an 18-Year-old Stem Cell and lung transplant recipient: case report and review of the literature. J Pediatric Infect Dis Soc. 2017; 6(4):e173-e176. doi: 10.1093/jpids/pix049
 93. Sampath R, Patel R, Cunningham SA, Arif S, Daly RC, Badley AD, et al. Cardiothoracic transplant recipient *Mycoplasma hominis*: an uncommon infection with probable donor transmission. EBioMedicine. 2017; 19:84-90. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.04.026
 94. Horiuchi K, Matsumoto T, Ohno Y, Kasuga E, Negishi T, Yaguchi T, et al. Intra-abdominal *Mycoplasma hominis* infection in a liver transplant recipient: a case report. Jpn J Infect Dis. 2014; 67(3):232-3. doi: 10.7883/yoken.67.232
 95. Whitson WJ, Ball PA, Lollis SS, Balkman JD, Bauer DF. Postoperative *Mycoplasma hominis* infections after neurosurgical intervention: A review. J Neurosurg Pediatr. 2014; 14(2):212-8. doi: 10.3171/2014.4.PEDS13547
 96. Vijayan V, Woods GL, Donnell DR, Romero JR. Pelvic abscess secondary to *Mycoplasma hominis* after vaginal laceration. J Pediatr Adolesc Gynecol. 2018; 31(2):146-8. doi: 10.1016/j.jpog.2017.08.004

97. Gagneux-Brunon A, Grattard F, Morel J, Suy F, Fuzellier J-F, Verhoeven P, et al. *Mycoplasma hominis*, a rare but true cause of infective endocarditis. *J Clin Microbiol*. 2015; 53(9):3068-71. doi: 10.1128/JCM.00827-15
98. García-de-la-Fuente C, Miñambres E, Ugalde E, Sáez A, Martínez-Martínez L, Fariñas MC. Post-operative mediastinitis, pleuritis and pericarditis due to *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* with a fatal outcome. *J Med Microbiol*. 2008; 57(Pt 5):656-7. doi: 10.1099/jmm.0.47632-0
99. Capoccia R, Greub G, Baud D. *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and adverse pregnancy outcomes: current opinion in infectious diseases. 2013; 26(3):231-40. doi: 10.1097/QCO.0b013e328360db58
100. Cox C, Watt AP, McKenna JP, Coyle PV. *Mycoplasma hominis* and *Gardnerella vaginalis* display a significant synergistic relationship in bacterial vaginosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016; 35(3):481-7. doi: 10.1007/s10096-015-2564-x
101. Küchle C, Abele-Horn M, Menninger M, Held E, Heesemann J. *Mycoplasma hominis*. A rare causative agent of acute pyelonephritis. *Dtsch Med Wochenschr*. 1997; 122(17):542-4. doi: 10.1055/s-2008-1047651
102. Henrich B, Feldmann RC, Hadding U. Cytoadhesins of *Mycoplasma hominis*. *Infect Immun*. 1993; 61(7):2945-51. doi: 10.1128/IAI.61.7.2945-2951.1993
103. Boesen T, Fedosova NU, Kjeldgaard M, Birkelund S, Christiansen G. Molecular design of *Mycoplasma hominis* Vaa adhesin. *Protein Sci*. 2001; 10(12):2577-86. doi: 10.1110/ps.ps.31901
104. Krause R, Schubert S. In-vitro activities of tetracyclines, macrolides, fluoroquinolones and clindamycin against *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* ssp. isolated in Germany over 20 years. *Clin Microbiol Infect*. 2010; 16(11):1649-55. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03155.x
105. Huang S, Li J-Y, Wu J, Meng L, Shou C-C. Mycoplasma infections and different human carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2001; 7(2):266-9. doi: 10.3748/wjg.v7.i2.266
106. Yang H, Qu L, Ma H, Chen L, Liu W, Liu C, et al. *Mycoplasma hyorhinis* infection in gastric carcinoma and its effects on the malignant phenotypes of gastric cancer cells. *BMC Gastroenterol*. 2010; 10:132. doi: 10.1186/1471-230X-10-132
107. Boyarskikh UA, Shadrina AS, Smetanina MA, Tsepilov YA, Oskorbin IP, Kozlov VV, et al. *Mycoplasma hyorhinis* reduces sensitivity of human lung carcinoma cells to Nutlin-3 and promotes their malignant phenotype. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2018; 144(7):1289-300. doi: 10.1007/s00432-018-2658-9
108. Gong M, Meng L, Jiang B, Zhang J, Yang H, Wu J, et al. p37 from *Mycoplasma hyorhinis* promotes cancer cell invasiveness and metastasis through activation of MMP-2 and followed by phosphorylation of EGFR. *Mol Cancer Ther*. 2008; 7(3):530-7. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-2191
109. Lierz M, Jansen A, Hafez HM. Avian *Mycoplasma lipofaciens* transmission to veterinarian. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14(7):1161-3. doi: 10.3201/eid1407.071703
110. DelGiudice RA, Purcell RH, Carski TR, Chanock RM. *Mycoplasma lipophilum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1974; 24(2):147-53. <https://doi.org/10.1099/00207713-24-2-147>
111. Heilmann C, Jensen L, Jensen JS, Lundstrom K, Windsor D, Windsor H, et al. Treatment of resistant *Mycoplasma* infection in immunocompromised patients with a new pleuromutilin antibiotic. *J Infect*. 2001; 43(4):234-8. doi: 10.1053/jinf.2001.0910
112. Taylor-Robinson D, Canchola J, Fox H, Chanock RM. A newly identified oral *Mycoplasma* (*M. orale*) and its relationship to other human mycoplasmas. *Am J Epidemiol*. 1964; 80(1):135-48. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a120454
113. Murphy WH, Bullis C, Dabich L, Heyn R, Zarafonitis CJ. Isolation of mycoplasma from leukemic and nonleukemic patients. *J Natl Cancer Inst*. 1970; 45(2):243-51. <https://doi.org/10.1093/jnci/45.2.243>
114. Tallgren LG, Wegelius R, Andersson LC, Jansson E. Eosinophilic leukaemia — recovery of *Mycoplasma orale* from the bone marrow. *Acta Med Scand*. 1974; 195(1-6): 87-92. doi: 10.1111/j.0954-6820.1974.tb08102.x
115. Schaeferbeke T. Systematic detection of mycoplasmas by culture and polymerase chain reaction (PCR) procedures in 209 synovial fluid samples. *Rheumatology*. 1997; 36(3):310-4. doi: 10.1093/rheumatology/36.3.310
116. Paessler M, Levinson A, Patel JB, Schuster M, Minda M, Nachamkin I. Disseminated *Mycoplasma orale* infection in a patient with common variable immunodeficiency syndrome. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002; 44(2):201-4. doi: 10.1016/s0732-8893(02)00429-7
117. Ketchersid J, Scott J, Lew T, Banaei N, Kappagoda S. Recurrent multifocal *Mycoplasma orale* infection in an immunocompromised patient: A Case Report and Review. *Case Rep Infect Dis*. 2020; 8852115. <https://doi.org/10.1155/2020/8852115>
118. Müller HE, Sethi KK, Tolsdorff P. Über eine mischinfektion mit *Mycoplasma orale* Typ 1 und *Staphylococcus aureus* bei sinusitis maxillaris. *Dtsch Med Wochenschr*. 1972; 97(22):865-9. doi: 10.1055/s-0028-1107458
119. Izutsu KT, Fatherazi S, Belton CM, Oda D, Cartwright FD, Kenny GE. *Mycoplasma orale* infection affects K+ and Cl- currents in the HSG salivary gland cell line. *In Vitro CellDevBiol-Animal*. 1996; 32(6):361-5. doi: 10.1007/BF02722962
120. Sykes JE, Lindsay LL, Maggi RG, Breitschwerdt EB. Human coinfection with *Bartonella henselae* and two hemotropic mycoplasma variants resembling *Mycoplasma ovis*. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(10):3782-5. doi: 10.1128/JCM.01029-10
121. Maggi RG, Mascarelli PE, Havenga LN, Naidoo V, Breitschwerdt EB. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. *Parasit Vectors*. 2013; 6(1):103. doi: 10.1186/1756-3305-6-103
122. Hussain AI, Robson WLM, Kelley R, Reid T, Gangemi JD. *Mycoplasma penetrans* and other mycoplasmas in urine of Human Immunodeficiency Virus-positive children. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(5):1518-23. doi: 10.1128/JCM.37.5.1518-1523.1999
123. Wang RY, Shih JW, Weiss SH, Grandinetti T, Pierce PF, Lange M, et al. *Mycoplasma penetrans* infection in male homosexuals with AIDS: high seroprevalence and association with Kaposi's sarcoma. *Clin Infect Dis*. 1993; 17(4):724-9. doi: 10.1093/clinids/17.4.724

124. Preiswerk B, Imkamp F, Vorburger D, Hönke RV, Keller PM, Wagner K. *Mycoplasma penetrans* bacteremia in an immunocompromised patient detected by metagenomic sequencing: a case report. BMC Infect Dis. 2020; 20(1):7. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4723-7>
125. Yáñez A, Cedillo L, Neyrolles O, Alonso E, Prévost M-C, Rojas J, et al. *Mycoplasma penetrans* bacteremia and primary antiphospholipid syndrome. Emerg Infect Dis. 1999; 5(1):164-7. doi: 10.3201/eid0501.990122
126. de Cordova CMM, Takei K, Rosenthal C, Miranda MARB, Vaz AJ, da Cunha RAF. Evaluation of IgG, IgM, and IgA antibodies to *Mycoplasma penetrans* detected by ELISA and immunoblot in HIV-1-infected and STD patients, in São Paulo, Brazil. Microbes Infect. 1999; 1(13):1095-101. doi: 10.1016/s1286-4579(99)00206-3
127. Bendjennat M, Blanchard A, Loutfi M, Montagnier L, Bahraoui E. Role of *Mycoplasma penetrans* endonuclease P40 as a potential pathogenic determinant. Infect Immun. 1999; 67(9):4456-62. doi: 10.1128/IAI.67.9.4456-4462.1999
128. Eberl M, Hintz M, Jamba Z, Beck E, Jomaa H, Christiansen G. *Mycoplasma penetrans* is capable of activating Vγ9/Vδ2 T cells while other human pathogenic mycoplasmas fail to do so. Infect Immun. 2004; 72(8):4881-3. doi: 10.1128/IAI.72.8.4881-4883.2004
129. Baker AS, Ruoff KL, Madoff S. Isolation of *Mycoplasma* species from a patient with seal finger. Clin Infect Dis. 1998; 27(5):1168-70. doi: 10.1086/514980
130. Westley BP, Horazdovsky RD, Michaels DL, Brown DR. Identification of a novel *Mycoplasma* species in a patient with septic arthritis of the hip and seal finger. Clin Infect Dis. 2016; 62(4):491-3. doi: 10.1093/cid/civ875
131. White CP, Jewer DD. Seal finger: A case report and review of the literature. Can J Plast Surg. 2009; 17(4):133-5. doi: 10.1177/229255030901700415
132. Hartley JW, Pitcher D. Seal Finger—tetracycline is first line. J Infect. 2002; 45(2):71-5. doi: 10.1053/jinf.2002.1027
133. Chen L, Wu J, Wang B, Xu J, Huan X. Study of *Mycoplasma pirum* infection and related factors among male HIV/AIDS patients. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. 2015; 36(8):825-8. doi: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.08.012
134. Tully JG. Current status of the mollicute flora of humans. Clin Infect Dis. 1993; 17:S2-9. doi: 10.1093/clinids/17.supplement_1.s2
135. Huber BM, Meyer Sauteur PM, Unger WWJ, Hasters P, Eugster MR, Brandt S, et al. Vertical transmission of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Neonatology. 2018; 114(4): 332-6. doi: 10.1159/000490610
136. Taylor-Robinson D, Webster AD, Furr PM, Asherson GL. Prolonged persistence of *Mycoplasma pneumoniae* in a patient with hypogammaglobulinaemia. J Infect. 1980; 2(2):171-5. doi: 10.1016/s0163-4453(80)91284-0
137. Johnston CL, Webster AD, Taylor-Robinson D, Rapaport G, Hughes GR. Primary late-onset hypogammaglobulinaemia associated with inflammatory polyarthritis and septic arthritis due to *Mycoplasma pneumoniae*. Ann Rheum Dis. 1983; 42(1):108-10. doi: 10.1136/ard.42.1.108
138. Cunha CB. The first atypical pneumonia: the history of the discovery of *Mycoplasma pneumoniae*. Infect Dis Clin North Am. 2010; 24(1):1-5. doi: 10.1016/j.idc.2009.10.007
139. Yeh J-J, Wang Y-C, Hsu W-H, Kao C-H. Incident asthma and *Mycoplasma pneumoniae*: A nationwide cohort study. J Allergy Clin Immunol. 2016; 137(4):1017-23.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2015.09.032
140. Lieberman D, Lieberman D, Printz S, Ben-Yaakov M, Lazarovich Z, Ohana B, et al. Atypical pathogen infection in adults with acute exacerbation of bronchial asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2003; 167(3):406-10. doi: 10.1164/rccm.200209-9960C
141. Buscho RO, Saxtan D, Shultz PS, Finch E, Mufson MA. Infections with viruses and *Mycoplasma pneumoniae* during exacerbations of chronic bronchitis. J Infect Dis. 1978; 137(4):377-83. doi: 10.1093/infdis/137.4.377
142. Szyrmf B, Jacobs F, Fichet J, Hamzaoui O, Prat D, Avenel A, et al. *Mycoplasma*-related pneumonia: a rare cause of acute respiratory distress syndrome (ARDS) and of potential antibiotic resistance. Rev Mal Respir. 2013; 30(1):77-80. doi: 10.1016/j.rmr.2012.06.012.
143. Li Y-N, Liu L, Qiao H-M, Cheng H, Cheng H-J. Post-infectious bronchiolitis obliterans in children: a review of 42 cases. BMC Pediatr. 2014; 14(1):238. doi: 10.1186/1471-2431-14-238
144. Chen F-L, Jean S-S, Ou T-Y, Yu F-L, Lee W-S. Pulmonary empyema caused by co-infections of *Mycoplasma pneumoniae* and *Fusobacterium necrophorum*: A rare case of Lemierre syndrome. J Microbiol Immunol Infect. 2017; 50(4):552-4. doi: 10.1016/j.jmii.2016.11.007
145. Esposito S, Blasi F, Bosis S, Droghetti R, Faelli N, Lastrico A, et al. Aetiology of acute pharyngitis: the role of atypical bacteria. J Med Microbiol. 2004; 53(Pt 7):645-51. doi: 10.1099/jmm.0.05487-0.
146. Daxboeck F, Blacky A, Seidl R, Krause R, Assadian O. Diagnosis, treatment, and prognosis of *Mycoplasma pneumoniae* childhood encephalitis: systematic review of 58 cases. J Child Neurol. 2004; 19(11):865-71. doi: 10.1177/08830738040190110401
147. Powers JM, Johnson MD. Mycoplasmal panencephalitis: a neuropathologic documentation. Acta Neuropathol. 2012; 124(1):143-8. doi: 10.1007/s00401-012-0960-1
148. Stamm B, Moschopoulos M, Hungerbuehler H, Guarner J, Genrich GL, Zaki SR. Neuroinvasion by *Mycoplasma pneumoniae* in acute disseminated encephalomyelitis. Emerging Infect Dis. 2008; 14(4):641-3. doi: 10.3201/eid1404.061366
149. Mélé N, Turc G. Stroke associated with recent *Mycoplasma pneumoniae* infection: a systematic review of clinical features and presumed pathophysiological mechanisms. Front Neurol. 2018; 9:1109. doi: 10.3389/fneur.2018.01109
150. Jin X, Zou Y, Zhai J, Liu J, Huang B. Refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia with concomitant acute cerebral infarction in a child: A case report and literature review. Medicine (Baltimore). 2018; 97(13):e0103. doi: 10.1097/MD.00000000000010103.
151. Rosés-Noguer F, Raspall-Chaure M, Macaya-Ruiz A, del Toro-Riera M, Vázquez-Méndez E, Roig-Quilis M. Atrofia cerebelosa secundaria a cerebelitis aguda por *Mycoplasma pneumoniae*. Rev Neurol. 2006; 42(8):466-70. doi: <https://doi.org/10.33588/rn.4208.2005429>

152. Topcu Y, Bayram E, Karaoglu P, Yis U, Guleryuz H, Kurul SH. Co-existence of myositis, transverse myelitis, and Guillain Barré syndrome following *Mycoplasma pneumoniae* infection in an adolescent. *J Pediatr Neurosci.* 2013; 8(1):59-63. doi: 10.4103/1817-1745.111428
153. Meyer Sauter PM, Roodbol J, Hackenberg A, de Wit M-CY, Vink C, Berger C, et al. Severe childhood Guillain-Barré syndrome associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection: a case series. *J Peripher Nerv Syst.* 2015; 20(2):72-8. doi: 10.1111/jns.12121
154. Magun R, Verschoor CP, Bowdish DME, Provias J. *Mycoplasma pneumoniae*, a trigger for Weston Hurst syndrome. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2016; 3(1):e187. doi: 10.1212/NXI.0000000000000187
155. Yuan Z-F, Chen B, Mao S-S, Shen J, Yu Y-L, Gao F, et al. Reversible bilateral striatal lesions following *Mycoplasma pneumoniae* infection associated with elevated levels of interleukins 6 and 8. *Brain Dev.* 2016; 38(1):149-53. doi: 10.1016/j.braindev.2015.04.008
156. Robnik B, Keše D, Rojko T, Horvat-Ledinek A, Pražnikar A, Beović B. Unilateral brachial plexopathy, a rare complication of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *J Infect Chemother.* 2018; 24(4):309-11. doi: 10.1016/j.jiac.2017.11.008
157. Kidron D, Barron SA, Mazliah J. Mononeuritis multiplex with brachial plexus neuropathy coincident with *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Eur Neurol.* 1989; 29(2):90-2. doi: 10.1159/000116385
158. Karampatsas K, Patel H, Basheer SN, Prendergast AJ. Chronic meningitis with intracranial hypertension and bilateral neuroretinitis following *Mycoplasma pneumoniae* infection. *BMJ Case Rep.* 2014; 2014. doi: 10.1136/bcr-2014-207041
159. Banerjee B, Petersen K. Psychosis following mycoplasma pneumonia. *Mil Med.* 2009; 174(9):1001-4. doi: 10.7205/milmed-d-00-8209
160. Wu C-C, Kuo H-C, Yu H-R, Wang L, Yang KD. Association of acute urticaria with *Mycoplasma pneumoniae* infection in hospitalized children. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2009; 103(2):134-9. doi: 10.1016/S1081-1206(10)60166-4
161. Bohelay G, Duong TA, Ortonne N, Chosidow O, Valeyrie Allanore L. Subcorneal pustular dermatosis triggered by *Mycoplasma pneumoniae* infection: a rare clinical association. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015; 29(5):1022-5. doi: 10.1111/jdv.12446
162. Kuźma-Mroczkowska E, Pańczyk-Tomaszewska M, Szmigielska A, Szymanik-Grzelak H, Roszkowska-Blaim M. *Mycoplasma pneumoniae* as a trigger for Henoch-Schönlein purpura in children. *Cent Eur J Immunol.* 2015; 40(4):489-92. doi: 10.5114/ceji.2015.56976
163. Vieira-Baptista P, Machado L, Costa AR, Beires J, Martinez-de-Oliveira J. *Mycoplasma pneumoniae*: a rare cause of vulvar ulcers or an undiagnosed one? *J Low Genit Tract Dis.* 2013; 17(3):330-4. doi: 10.1097/LGT.0b013e3182710896
164. Bau JT, Cooper CL. Erythema multiforme major associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Can Med Assoc J.* 2019; 191(43):E1195. doi: <https://doi.org/10.1503/cmaj.190850>
165. Martínez-Pérez M, Imbernón-Moya A, Lobato-Berezo A, Churrua-Grijelmo M. *Mycoplasma pneumoniae*-induced mucocutaneous rash: a new syndrome distinct from erythema multiforme? Report of a new case and review of the literature. *Actas Dermosifiliogr.* 2016; 107(7):e47-51. doi: 10.1016/j.ad.2015.09.023
166. Canavan TN, Mathes EF, Frieden I, Shinkai K. *Mycoplasma pneumoniae*-induced rash and mucositis as a syndrome distinct from Stevens-Johnson syndrome and erythema multiforme: a systematic review. *J Am Acad Dermatol.* 2015; 72(2):239-45. doi: 10.1016/j.jaad.2014.06.026
167. Scapini JP, Flynn LP, Sciacaluga S, Morales L, Cadario ME. Confirmed *Mycoplasma pneumoniae* endocarditis. *Emerging Infect Dis.* 2008; 14(10):1664-5. doi: 10.3201/eid1410.080157
168. Yamane Y, Kawai C. A case of myocarditis caused by *Mycoplasma pneumoniae*. *Jpn Circ J.* 1978; 42(11):1279-87. doi: 10.1253/jcj.42.1279
169. Vijay A, Stendahl JC, Rosenfeld LE. *Mycoplasma pneumoniae* pericarditis. *Am J Cardiol.* 2019; 123(8):1383-4. doi: 10.1016/j.amjcard.2019.01.014
170. Sawhney V, Maksunova O, Ahsan S, Ozkor M, Westwood M. Lesson of the month 1: Pericardial mass and cardiac tamponade associated with *Mycoplasma pneumoniae*. *Clin Med (Lond).* 2014; 14(5):549-51. doi: 10.7861/clinmedicine.14-5-549
171. Tang Y, Yan W, Sun L, Huang J, Qian W, Hou M, et al. Kawasaki disease associated with *Mycoplasma pneumoniae*. *Ital J Pediatr.* 2016; 42(1):83. doi: 10.1186/s13052-016-0292-1
172. Narita M. Pathogenesis of extrapulmonary manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infection with special reference to pneumonia. *J Infect Chemother.* 2010; 16(3):162-9. doi: 10.1007/s10156-010-0044-x
173. Carrascosa MF, Lucena MI, Andrade RJ, Caviedes JRS, Lavín AC, Moñes JC, et al. Fatal acute hepatitis after sequential treatment with levofloxacin, doxycycline, and naproxen in a patient presenting with acute *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin Ther.* 2009; 31(5):1014-9. doi: 10.1016/j.clinthera.2009.05.012
174. Valdés Lacasa T, Duarte Borges MA, García Marín A, Gómez Cuervo C. Acute pancreatitis caused by *Mycoplasma pneumoniae*: an unusual etiology. *Clin J Gastroenterol.* 2017; 10(3):279-82. doi: 10.1007/s12328-017-0733-4
175. Carvajal Roca E, Fornes Vivas R, Tronchoni Belda M. Una complicación digestiva de la infección por *Mycoplasma* a tener en cuenta. *An Pediatr (Barc).* 2019; 91(3):199-200. doi: 10.1016/j.anpedi.2018.07.002
176. Azumagawa K, Kambara Y, Murata T, Tamai H. Four cases of arthritis associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Pediatr Int.* 2008; 50(4):511-3. doi: 10.1111/j.1442-200X.2008.02622.x
177. Brunner J, Jost W. [Myositis caused by a mycoplasma infection]. *Klin Padiatr.* 2000; 212(3):129-30. doi: 10.1055/s-2000-9666
178. Kaler J, Mukhtar O, Khan B, Shrestha B, Kaler R, Ting B, et al. Rhabdomyolysis: an unusual presentation of *Mycoplasma pneumoniae* infection in an adult-a case report and literature review. *Case Rep Med.* 2018; 2018:6897975. doi: 10.1155/2018/6897975
179. Andrews PA, Lloyd CM, Webb MC, Sacks SH. Acute interstitial nephritis associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Nephrol Dial Transplant.* 1994; 9(5):564-6. doi: 10.1093/ndt/9.5.564

180. Suzuki K, Hirano K, Onodera N, Takahashi T, Tanaka H. Acute IgA nephropathy associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Pediatr Int*. 2005; 47(5):583-5. doi: 10.1111/j.1442-200x.2005.02113.x
181. Siomou E, Kollios KD, Papadimitriou P, Kostoula A, Papadopoulos ZL. Acute nephritis and respiratory tract infection caused by *Mycoplasma pneumoniae*: case report and review of the literature. *Pediatr Infect Dis J*. 2003; 22(12):1103-6. doi: 10.1097/01.inf.0000104531.58503.90
182. Campbell JH, Warwick G, Boulton-Jones M, McLay A, Jackson B, Stevenson RD. Rapidly progressive glomerulonephritis and nephrotic syndrome associated with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Nephrol Dial Transplant*. 1991; 6(7):518-20. doi: 10.1093/ndt/6.7.518
183. Hirshberg SJ, Charles RS, Ettinger JB. Pediatric priapism associated with *Mycoplasma pneumoniae*. *Urology*. 1996; 47(5):745-6. doi: 10.1016/s0090-4295(96)00029-5
184. Wandro C, Dolatshahi L, Blackall D. Severe warm autoimmune hemolytic anemia in a 7-month-old infant associated with a *Mycoplasma pneumoniae* infection. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2018; 40(7):e439-41. doi: 10.1097/MPH.0000000000001001
185. Khan FY, A yassin M. *Mycoplasma pneumoniae* associated with severe autoimmune hemolytic anemia: case report and literature review. *Braz J Infect Dis*. 2009; 13(1):77-9. doi: 10.1590/s1413-86702009000100018
186. Bar Meir E, Amital H, Levy Y, Kneller A, Bar-Dayana Y, Shoenfeld Y. *Mycoplasma-pneumoniae*-induced thrombotic thrombocytopenic purpura. *Acta Haematol*. 2000; 103(2):112-5. doi: 10.1159/000041030
187. Gouveia C, Evangelista V, Almeida R, Baptista AM. Immune thrombocytopenia associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Eur J Case Rep Intern Med*. 2018; 5(3):000817. doi: 10.12890/2018_000817
188. Pachet A, Dumestre-Perard C, Moine M, Marlu R, Rubio A, Bost-Bru C. Splenic infarction associated with transient anti-prothrombin antibodies is a rare manifestation of acute *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Arch Pediatr*. 2019; 26(8):483-6. doi: 10.1016/j.arcped.2019.10.001
189. Chrysanthopoulos C, Eboriadou M, Monti K, Soubassi V, Sava K. Fatal disseminated intravascular coagulation caused by *Mycoplasma pneumoniae*. *Pediatr Infect Dis J*. 2001; 20(6):634-5. doi: 10.1097/00006454-200106000-00021
190. Cunha BA, Perez FM. *Mycoplasma pneumoniae* community-acquired pneumonia (CAP) in the elderly: Diagnostic significance of acute thrombocytosis. *Heart Lung*. 2009; 38(5):444-9. doi: 10.1016/j.hrtlng.2008.10.005
191. Dhaliwal K, Enright K. Rare extrapulmonary complications of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *BMJ Case Rep*. 2016; 2016:bcr2015214044. doi: 10.1136/bcr-2015-214044
192. Weinstein O, Shneck M, Levy J, Lifshitz T. Bilateral acute anterior uveitis as a presenting symptom of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Can J Ophthalmol*. 2006; 41(5):594-5. doi: 10.1016/S0008-4182(06)80028-1
193. Lofgren DH, Lenkeit C, Palanisamy J, Brown J. *Mycoplasma pneumoniae* induced rash and mucositis with bilateral otitis media and sinusitis. *Cureus*. 2020; 12(3):e7449. doi: 10.7759/cureus.7449
194. Rätty R, Kleemola M. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by polymerase chain reaction in middle ear fluids from infants with acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J*. 2000; 19(7):666-8. doi: 10.1097/00006454-200007000-00022
195. García Berrocal JRG, Ramírez-Camacho R, Portero F, Vargas JA. Role of viral and *Mycoplasma pneumoniae* infection in idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Acta Otolaryngol*. 2000; 120(7):835-9. doi: 10.1080/000164800750061688
196. Falsaperla R, Piattelli G, Marino S, Marino SD, Fontana A, Pavone P. Grisel's syndrome caused by *Mycoplasma pneumoniae* infection: a case report and review of the literature. *Childs Nerv Syst*. 2019; 35(3):523-7. doi: 10.1007/s00381-018-3970-z
197. Mellick LB, Verma N. The *Mycoplasma pneumoniae* and bullous myringitis myth. *Pediatr Emerg Care*. 2010; 26(12):966-8. doi: 10.1097/PEC.0b013e3181fe9298
198. Cramer L, Emara DM, Gadre AK. *Mycoplasma* an unlikely cause of bullous myringitis. *Ear Nose Throat J*. 2012; 91(6):E30-1. PMID: 22711400
199. Devaraja K. Myringitis: An update. *J Otol*. 2019; 14(1): 26-9. doi: 10.1016/j.joto.2018.11.003.
200. Kasinathan S, Kondamudi NP. Bullous Myringitis. 2020 Apr 22. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL). Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553029/>
201. He J, Liu M, Ye Z, Tan T, Liu X, You X, et al. Insights into the pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Med Rep*. 2016; 14(5):4030-6. doi: 10.3892/mmr.2016.5765
202. Waites KB, Xiao L, Liu Y, Balish MF, Atkinson TP. *Mycoplasma pneumoniae* from the respiratory tract and beyond. *Clin Microbiol Rev*. 2017; 30(3):747-809. doi: 10.1128/CMR.00114-16
203. Daxboeck F, Krause R, Wenisch C. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2003; 9(4):263-73. doi: 10.1046/j.1469-0691.2003.00590.x
204. Lee H, Yun KW, Lee HJ, Choi EH. Antimicrobial therapy of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018; 16(1):23-34. doi: 10.1080/14787210.2018.1414599
205. Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2004; 17(4):697-728. doi: 10.1128/CMR.17.4.697-728.2004
206. Linchevski I, Klement E, Kliment E, Nir-Paz R. *Mycoplasma pneumoniae* vaccine protective efficacy and adverse reactions--Systematic review and meta-analysis. *Vaccine*. 2009; 27(18):2437-46. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.01.135
207. Thomsen AC. The isolation of *Mycoplasma primatum* during an autopsy study of the mycoplasma flora of the human urinary tract. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B*. 1974; 82B(5):653-6. doi: 10.1111/j.1699-0463.1974.tb00232.x
208. Rawadi G, Dujancourt-Henry A, Lemerrier B, Roulland-Dussoix D. Phylogenetic position of rare human mycoplasmas, *Mycoplasma*

- faucium*, *M. buccale*, *M. primum* and *M. spermatophilum*, based on 16S rRNA gene sequences. Int J Syst Bacteriol. 1998; 48(1):305-9. doi: 10.1099/00207713-48-1-305
209. Ferreira JB, Yamaguti M, Marques LM, Oliveira RC, Neto RL, Buzinhan M, et al. Detection of *Mycoplasma pulmonis* in laboratory rats and technicians. Zoonoses Public Health. 2008; 55(5):229-34. doi: 10.1111/j.1863-2378.2008.01122.x
 210. Piasecki T, Chrzastek K, Kasprzykowska U. *Mycoplasma pulmonis* of rodents as a possible human pathogen. Vector Borne Zoonotic Dis. 2017; 17(7):475-7. https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2104
 211. Mizuki H, Abe R, Mikami T. Ultrastructural changes during the life cycle of *Mycoplasma salivarium* in oral biopsies from patients with oral leukoplakia. Front Cell Infect Microbiol. 2017; 7:403. doi: 10.3389/fcimb.2017.00403. eCollection 2017.
 212. Thoendel M, Jeraldo P, Greenwood-Quaintance KE, Chia N, Abdel MP, Steckelberg JM, et al. A novel prosthetic joint infection pathogen, *Mycoplasma salivarium*, identified by metagenomic shotgun sequencing. Clin Infect Dis. 2017; 65(2):332-5. doi: 10.1093/cid/cix296.
 213. Mizuki H, Abe R, Kogi S, Mikami T. Immunohistochemical detection of *Mycoplasma salivarium* in oral lichen planus tissue. J Oral Pathol Med. 2017; 46(8):649-56. doi: 10.1111/jop.12568
 214. Gregory JE, Chisom JL, Naiman JL. *Mycoplasma salivarium* in the blood of a child with leukemia. J Natl Med Assoc. 1978; 70(11):847-8. PMID: 281539
 215. Büchsel M, Pletschen L, Fleiner M, Häcker G, Serr A. A case of septic arthritis caused by a *Mycoplasma salivarium* strain resistant towards ciprofloxacin and clarithromycin in a patient with chronic lymphatic leukemia. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016; 86(1):115-7. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.018
 216. So AK, Furr PM, Taylor-Robinson D, Webster AD. Arthritis caused by *Mycoplasma salivarium* in hypogammaglobulinaemia. Br Med J (Clin Res Ed). 1983; 286(6367):762-3. doi: 10.1136/bmj.286.6367.762
 217. Henrich B, Rumming M, Sczyrba A, Velleuer E, Dietrich R, Gerlach W, et al. *Mycoplasma salivarium* as a dominant coloniser of Fanconi anaemia associated oral carcinoma. PLoS One. 2014; 9(3):e92297. doi: 10.1371/journal.pone.0092297
 218. Baracaldo R, Foltzer M, Patel R, Bourbeau P. Empyema caused by *Mycoplasma salivarium*. J Clin Microbiol. 2012; 50(5):1805-6. doi: 10.1128/JCM.06839-11
 219. Ørsted I, Gertsen JB, Schønheyder HC, Jensen JS, Nielsen H. *Mycoplasma salivarium* isolated from brain abscesses. Clin Microbiol Infect. 2011; 17(7):1047-9. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03462.x
 220. Grisold AJ, Hoenigl M, Leitner E, Jakse K, Feierl G, Raggam RB, et al. Submasseteric abscess caused by *Mycoplasma salivarium* infection. J Clin Microbiol. 2008; 46(11):3860-2. doi: 10.1128/JCM.00807-08
 221. Montagna MT, Barbuti S. The significance of the presence of «*Mycoplasma pharyngis*» and «*Mycoplasma salivarium*» in patients with chronic respiratory disease (author's transl). Ann Sclavo. 1981; 23(1):20-32. PMID: 7294916
 222. Forest N. [Characterization of *Mycoplasma salivarium* in periodontal diseases]. J Biol Buccale. 1979; 7(4):321-30. PMID: 294428
 223. Chattin-Kacouris BR, Ishihara K, Miura T, Okuda K, Ikeda M, Ishikawa T, et al. Heat shock protein of *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma orale* strains isolated from HIV-seropositive patients. Bull Tokyo Dent Coll. 2002; 43(4):231-6. doi: 10.2209/tdcpublication.43.231
 224. Hill AC. *Mycoplasma spermatophilum*, a new species isolated from human spermatozoa and cervix. Int J Syst Bacteriol. 1991; 41(2):229-33. doi: 10.1099/00207713-41-2-229
 225. Yuan CL, Liang AB, Yao CB, Yang ZB, Zhu JG, Cui L, et al. Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. Am J Vet Res. 2009; 70(7):890-4. doi: 10.2460/ajvr.70.7.890
 226. Smith M, Crews JD, Cheek N, Srivastava R, Appachi E. Hyperammonemic encephalopathy due to *Ureaplasma parvum* infection in an immunocompromised child. Pediatrics. 2019; 144(2):e2019060. doi: 10.1542/peds.2019-0601
 227. Graetz R, Meyer R, Shehab K, Katsanis E. Successful resolution of hyperammonemia following hematopoietic cell transplantation with directed treatment of *Ureaplasma parvum* infection. Transpl Infect Dis. 2018; 20(2):e12839. doi: 10.1111/tid.12839
 228. MacKenzie CR, Nischik N, Kram R, Krauspe R, Jäger M, Henrich B. Fatal outcome of a disseminated dual infection with drug-resistant *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma parvum* originating from a septic arthritis in an immunocompromised patient. Int J Infect Dis. 2010; 14:e307-9. doi: 10.1016/j.ijid.2010.02.2253
 229. Kasprzykowska U, Elias J, Elias M, Mączyńska B, Sobieszczańska BM. Colonization of the lower urogenital tract with *Ureaplasma parvum* can cause asymptomatic infection of the upper reproductive system in women: a preliminary study. Arch Gynecol Obstet. 2014; 289(5):1129-34. doi: 10.1007/s00404-013-3102-7
 230. Martínez MA, Ovalle A, Santa-Cruz A, Barrera B, Vidal R, Aguirre R. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma parvum* (*Ureaplasma urealyticum* biovar 1) and *Ureaplasma urealyticum* (*Ureaplasma urealyticum* biovar 2) from patients with adverse pregnancy outcomes and normal pregnant women. Scand J Infect Dis. 2001; 33(8):604-10. doi: 10.1080/00365540110026782
 231. Sweeney EL, Kallapur SG, Gisslen T, Lambers DS, Chougnet CA, Stephenson S-A, et al. Placental infection with *Ureaplasma* species is associated with histologic chorioamnionitis and adverse outcomes in moderately preterm and late-preterm infants. J Infect Dis. 2016; 213(8):1340-7. doi: 10.1093/infdis/jiv587
 232. Sanchez-Garcia EK, Contreras-Paredes A, Martinez-Abundis E, Garcia-Chan D, Lizano M, de la Cruz-Hernandez E. Molecular epidemiology of bacterial vaginosis and its association with genital micro-organisms in asymptomatic women. J Med Microbiol. 2019; 68(9):1373-82. doi: 10.1099/jmm.0.001044
 233. Zanolta N, Campisciano G, Morassut S, Castro-Silva E, Luksa V, Zito G, et al. Emerging role for *Ureaplasma parvum* serovar 3: Active infection in women with silent high-risk human papillomavirus and in women with idiopathic infertility. J Cell Physiol. 2019; 234(10):17905-11. doi: 10.1002/jcp.28423
 234. Morioka I, Fujibayashi H, Enoki E, Yokoyama N, Yokozaki H, Matsuo

- M. Congenital pneumonia with sepsis caused by intrauterine infection of *Ureaplasma parvum* in a term newborn: a first case report. *J Perinatol*. 2010; 30(5):359-62. doi: 10.1038/jp.2009.145
235. Walkty A, Lo E, Manickam K, Alfa M, Xiao L, Waites K. *Ureaplasma parvum* as a cause of sternal wound infection. *J Clin Microbiol*. 2009; 47(6):1976-8. doi: 10.1128/JCM.01849-08
236. Korytny A, Nasser R, Geffen Y, Friedman T, Paul M, Ghanem-Zoubi N. *Ureaplasma parvum* causing life-threatening disease in a susceptible patient. *BMJ Case Rep*. 2017; 2017:bcr2017220383. doi: 10.1136/bcr-2017-220383
237. Maeda S, Deguchi T, Ishiko H, Matsumoto T, Naito S, Kumon H, et al. Detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* (biovar 1) and *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) in patients with non-gonococcal urethritis using polymerase chain reaction-microtiter plate hybridization. *Int J Urol*. 2004; 11(9):750-4. doi: 10.1111/j.1442-2042.2004.00887.x
238. Lehmer RR, Andrews BS, Robertson JA, Stanbridge EJ, de la Maza L, Friou GJ. Clinical and biological characteristics of *Ureaplasma urealyticum* induced polyarthritis in a patient with common variable hypogammaglobulinemia. *Ann Rheum Dis*. 1991; 50(8): 574-6. doi: 10.1136/ard.50.8.574
239. Lee AH, Ramanujam T, Ware P, Edelstein PH, Brooks JJ, Freundlich B, et al. Molecular diagnosis of *Ureaplasma urealyticum* septic arthritis in a patient with hypogammaglobulinemia. *Arthritis Rheum*. 1992; 35(4):443-8. doi: 10.1002/art.1780350414
240. Forgacs P, Kundsins RB, Margles SW, Silverman ML, Perkins RE. A case of *Ureaplasma urealyticum* septic arthritis in a patient with hypogammaglobulinemia. *Clin Infect Dis*. 1993; 16(2):293-4. doi: 10.1093/clind/16.2.293
241. Arber C, Buser A, Heim D, Weisser M, Tyndall A, Tichelli A, et al. Septic polyarthritis with *Ureaplasma urealyticum* in a patient with prolonged agammaglobulinemia and B-cell aplasia after allogeneic HSCT and rituximab pretreatment. *Bone Marrow Transplant*. 2007; 40(6):597-8. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705766>
242. Diaz Pallares C, Griener T, Vaughan S. *Ureaplasma urealyticum* disseminated multifocal abscesses in an immunocompromised adult patient: a case report. *BMC Infect Dis*. 2020; 20(1):47. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4771-z>
243. Deetjen P, Maurer C, Rank A, Berli A, Schubert S, Hoffmann R. Brain Abscess caused by *Ureaplasma urealyticum* in an adult patient. *J Clin Microbiol*. 2014; 52(2): 695-8. doi: 10.1128/JCM.02990-13
244. Frangogiannis NG, Cate TR. Endocarditis and *Ureaplasma urealyticum* osteomyelitis in a hypogammaglobulinemic patient. A case report and review of the literature. *J Infect*. 1998; 37(2):181-4. doi: 10.1016/s0163-4453(98)80174-6
245. Mohiuddin AA, Corren J, Harbeck RJ, Teague JL, Volz M, Gelfand EW. *Ureaplasma urealyticum* chronic osteomyelitis in a patient with hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol*. 1991; 87(1):104-7. doi: 10.1016/0091-6749(91)90219-e
246. Taylor-Robinson D, Furr PM, Webster AD. *Ureaplasma urealyticum* causing persistent urethritis in a patient with hypogammaglobulinemia. *Genitourin Med*. 1985; 61(6):404-8. doi: 10.1136/sti.61.6.404
247. Schwartz DJ, Elward A, Storch GA, Rosen DA. *Ureaplasma urealyticum* pyelonephritis presenting with progressive dysuria, renal failure, and neurologic symptoms in an immunocompromised patient. *Transpl Infect Dis*. 2019; 21(2):e13032. doi: 10.1111/tid.13032
248. Geißdörfer W, Sandner G, John S, Gessner A, Schoerner C, Schröppel K. *Ureaplasma urealyticum* meningitis in an adult patient. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(3): 1141-3. doi: 10.1128/JCM.01628-07
249. Roerdink RL, Douw CM, Leenders ACAP, Dekker RS, Dietvorst M, Oosterbos CJM, et al. Bilateral periprosthetic joint infection with *Ureaplasma urealyticum* in an immunocompromised patient. *Infection*. 2016; 44(6):807-10. doi: 10.1007/s15010-016-0912-0
250. Yoon BH, Romero R, Lim J-H, Shim S-S, Hong J-S, Shim J-Y, et al. The clinical significance of detecting *Ureaplasma urealyticum* by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with preterm labor. *Am J Obstet Gynecol*. 2003; 189(4):919-24. doi: 10.1067/s0002-9378(03)00839-1
251. Honma Y, Yada Y, Takahashi N, Momoi MY, Nakamura Y. Certain type of chronic lung disease of newborns is associated with *Ureaplasma urealyticum* infection in utero. *Pediatr Int*. 2007; 49(4):479-84. doi: 10.1111/j.1442-200X.2007.02391.x
252. Kotecha S, Hodge R, Schaber JA, Miralles R, Silverman M, Grant WD. Pulmonary *Ureaplasma urealyticum* is associated with the development of acute lung inflammation and chronic lung disease in preterm infants. *Pediatr Res*. 2004; 55(1):61-8. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000100757.38675.50>
253. Abele-Horn M, Wolff C, Dressel P, Pfaff F, Zimmermann A. Association of *Ureaplasma urealyticum* biovars with clinical outcome for neonates, obstetric patients, and gynecological patients with pelvic inflammatory disease. *J Clin Microbiol*. 1997; 35(5): 1199-202. doi: 10.1128/JCM.35.5.1199-1202.1997
254. Imudia AN, Detti L, Puscheck EE, Yelian FD, Diamond MP. The prevalence of *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections, and the rubella status of patients undergoing an initial infertility evaluation. *J Assist Reprod Genet*. 2008; 25(1):43-6. doi: 10.1007/s10815-007-9192-z
255. Liu D-F, Jiang H, Hong K, Zhao L-M, Tang L-F, Liu J-M, et al. [A meta-analysis of *Ureaplasma urealyticum* infection and Chinese male infertility]. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2008; 14(7):618-23. PMID: 18686383
256. Huang C, Zhu HL, Xu KR, Wang SY, Fan LQ, Zhu WB. *Mycoplasma* and *Ureaplasma* infection and male infertility: a systematic review and meta-analysis. *Andrology*. 2015; 3(5):809-16. doi: 10.1111/andr.12078
257. Ohkawa M, Yamaguchi K, Tokunaga S, Nakashima T, Fujita S. *Ureaplasma urealyticum* in the urogenital tract of patients with chronic prostatitis or related symptomatology. *Br J Urol*. 1993; 72(6):918-21. doi: 10.1111/j.1464-410x.1993.tb16297.x
258. Reina Prieto J, del Valle Millán JM, Borrell Solé N, Deya Gómez L. Aislamiento de *Ureaplasma urealyticum* en las muestras respiratorias de dos pacientes con bronquiolitis. *An Esp Pediatr*. 1993; 38(4):301-3. PMID: 8480940
259. Balsat M, Galicier L, Wargnier A, Pereyre S, Itzykson R, Zouakhi M,

- et al. Diagnosis of *Ureaplasma urealyticum* septic polyarthritis by PCR assay and electrospray ionization mass spectrometry in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(9):3456-8. doi: 10.1128/JCM.00963-14
260. Canoui E, Blanc K, Loubinoux J, Valade S, Hamard C, Lefebvre A, et al. The value of molecular techniques to diagnose *Ureaplasma urealyticum* and *Nocardia farcinica* pleuropneumonia in a patient with diffuse large B-cell lymphoma. *Int J Infect Dis.* 2017; 64:93-5. doi: 10.1016/j.ijid.2017.09.015
261. Goulenok TM, Bialek S, Gaudart S, Bébéar C, Fantin B. *Ureaplasma urealyticum* destructive septic arthritis in a patient with systemic lupus erythematosus after rituximab therapy. *Joint Bone Spine.* 2011; 78(3):323-4. doi: 10.1016/j.jbspin.2010.11.010
262. Murdaca G, Russo R, Spanò F, Ferone D, Albertelli M, Schenone A, et al. Autoimmune central diabetes insipidus in a patient with *Ureaplasma urealyticum* infection and review on new triggers of immune response. *Arch Endocrinol Metab.* 2015; 59(6): 554-8. doi: 10.1590/2359-3997000000072
263. Daxboeck F, Iro E, Tamussino K, Krause R, Assadian O, Wenisch C. Bacteremia with *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in patients undergoing hysterectomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003; 22(10):608-11. doi: 10.1007/s10096-003-1001-8
264. Pavlica L, Drasković N, Kuljić-Kapulica N, Nikolić D. Isolation of *Chlamydia trachomatis* or *Ureaplasma urealyticum* from the synovial fluid of patients with Reiter's syndrome. *Vojnosanit Pregl.* 2003; 60(1):5-10. doi: 10.2298/vsp0301005p
265. Smith RJ. Evidence for *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum* in a patient with Reiter's disease. *J Adolesc Health Care.* 1989; 10(2):155-9. doi: 10.1016/0197-0070(89)90108-3
266. Nassar FA, Abu-Elamreen FH, Shubair ME, Sharif FA. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma hominis*, *genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* by polymerase chain reaction in patients with sterile pyuria. *Adv Med Sci.* 2008; 53(1):80-6. doi: 10.2478/v10039-008-0020-1
267. Kapatais-Zoumbos K, Chandler DK, Barile MF. Survey of immunoglobulin A protease activity among selected species of *Ureaplasma* and *Mycoplasma*: specificity for host immunoglobulin A. *Infect Immun.* 1985; 47(3): 704-9. doi: 10.1128/IAI.47.3.704-709.1985.

Marta Dafne Cabañero-Navalón
Víctor García-Bustos
Miguel Salavert Lletí

Papel de cefditoreno en el tratamiento de las infecciones comunitarias de piel y tejidos blandos: revisando la evidencia

Unidad de Enfermedades Infecciosas. Área Clínica Médica. Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia.

Article history

Received: 13 May 2021; Accepted: 17 May 2021; Published: 24 May 2021

RESUMEN

Cefditoreno pivoxilo es una cefalosporina oral de tercera generación de espectro ampliado con eficacia frente a gram-negativos, grampositivos y algunos anaerobios, incluyendo a aquellos microorganismos más frecuentes causantes de infecciones de piel y tejidos blandos (IPTB). Pese a que todavía no se dispone de puntos de corte de sensibilidad, multitud de estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos reafirman el uso de cefditoreno para las IPTB. En pacientes con IPTB, incluyendo aquellas causadas por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, cefditoreno ha demostrado tasas elevadas de curación clínica tras compararse con otras cefalosporinas orales.

Palabras clave: Cefditoreno pivoxilo, cefalosporinas, infecciones de piel y tejidos blandos.

Role of cefditoreno in the treatment of community skin and soft tissue infections: revisiting the evidence

ABSTRACT

Cefditoreno pivoxil is a third-generation oral cephalosporin with extended spectrum against gram-negative, gram-positive, and several anaerobic microorganisms, including those frequently implicated in skin and soft tissue infections (SSTI). Despite the fact that there are no approved breakpoint criteria for cefditoreno susceptibility, many pharmacokinetic and pharmacodynamic studies reassert cefditoreno as a good oral antibiotic for the treatment of SSTI. Regarding patients with SSTI, including those infections caused by *Staphylococcus aureus*

and *Streptococcus pyogenes*, cefditoreno showed high cure rates when compared to other oral cephalosporins.

Key words: Cefditoreno pivoxil, cephalosporins, skin and soft tissue infections.

INTRODUCCIÓN

Cefditoreno pivoxilo es una cefalosporina de tercera generación de espectro ampliado con eficacia antimicrobiana frente a bacterias gramnegativas, bacterias grampositivas y algunos microorganismos anaerobios [1-4]. Por su amplio espectro de acción, es la cefalosporina oral con mayor cobertura, similar a la de otras cefalosporinas de tercera generación de administración intravenosa como la ceftriaxona o la cefotaxima [3,5,6]. Esto se debe, fundamentalmente, a la adición sobre la estructura química de la cefalosporina de un grupo aminotiazolidil en la posición C7 del núcleo *cefem* que establece la acción frente a las bacterias gramnegativas; y a la adición en posición C3 del grupo metiltiazol, que determina la acción sobre las bacterias grampositivas [6,7].

Cefditoreno está formulado como éster pivoxilo, aumentando así su biodisponibilidad oral [8]. Presenta una eliminación renal en forma activa e inalterada, exhibiendo altas concentraciones urinarias que favorecen su presencia y actividad frente a microorganismos presentes en el lumen urinario [9]; además, alcanza una excelente concentración tisular, lo que la convierte en una alternativa útil en las infecciones de piel y tejidos blandos (IPTB). Su acción es rápidamente bactericida [10] y muestra efecto post-antibiótico [1,2,4]. Además, si bien no se dispone de puntos de corte de sensibilidad consensuados, diversos estudios muestran que la resistencia a cefditoreno puede ser menor con respecto a otras cefalosporinas o agentes β -lactámicos, debido a su estabilidad frente a las β -lactamasas y a las elevadas concentraciones alcanzadas en algunos tejidos o en localizaciones intraluminales de otros tractos o sistemas [11].

Correspondencia:
Miguel Salavert Lletí
Unidad de Enfermedades Infecciosas. Área Clínica Médica. Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia.
Av. Fernando Abril Martorell, nº 106; 46016-Valencia.
E-mail: Salavert_mig@gva.es

En esta revisión se actualiza la evidencia sobre el papel actual de cefditoreno en el manejo de las IPTB comunitarias, prestando atención a los datos disponibles sobre la actividad antibacteriana tanto *in vitro* como *in vivo* contra los patógenos más frecuentemente aislados en función de la actual fármaco-epidemiología de las resistencias en nuestro medio. Además, se revisan los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos del antibiótico y su importancia en la interpretación de la sensibilidad, la erradicación microbiológica, así como la tolerancia y seguridad, y se actualiza la información sobre la efectividad clínica en IPTB.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE CEFDITORENO FRENTE A LOS MICROORGANISMOS IMPLICADOS EN INFECCIONES DE PIEL Y TEJIDOS BLANDOS

Esta cefalosporina, cefditoreno, presenta un amplio espectro de actividad frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, incluyendo los patógenos más frecuentes asociados a infecciones respiratorias, urinarias y de piel y tejidos blandos, destacando entre ellos *Staphylococcus aureus* (sensible a meticilina), *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y otras especies del género, de los grupos B, C y G de Lancefield, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, e, incluso, bacterias anaerobias como *Clostridium perfringens* o *Peptostreptococcus* spp. [11-14].

Dentro del espectro etiológico de las IPTB, cefditoreno ha mostrado excelente actividad contra cepas de *S. aureus* sensible a meticilina (cloxacilina) en varios estudios clínicos, con valores de CMI₅₀ de 0,25-0,50 mg/L y CMI₉₀ de 0,5 a 1 mg/L [4,8,12,15]. Así, se considera la cefalosporina oral más potente contra este agente y hasta 4 a 8 veces más activa que ceftriaxona y ceftazidima [4]. En cepas resistentes a meticilina, sin embargo, no presenta actividad y en aquellas con resistencia a macrólidos, determinada por la resistencia a eritromicina, la clindamicina se ha mostrado como una opción más potente (CMI₉₀ 0,12 mg/L). Por otro lado, otro de los microorganismos etiológicos causantes de IPTB, *S. pyogenes*, se considera altamente sensible a las penicilinas y no se han identificado hasta el momento cepas con CMI superior a 0,12 mg/L. La resistencia a macrólidos en esta especie, mediada por las bombas de eflujo de macrólidos (gen *mef(E)*), o la resistencia cruzada añadida a lincosamidas y estreptogramina B (MLS_B) suponen una limitación en la antibioterapia contra *S. pyogenes* [16,17]. Sin embargo, tanto en cepas sensibles como resistentes a macrólidos (e incluso lincosamidas), todos los trabajos hasta la fecha coinciden en tasas de sensibilidad del 100% frente a *S. pyogenes*, con CMI₉₀ de 0,03 mg/L [4,12] a 0,06 mg/L [15,17] para cefditoreno, comparable a otras cefalosporinas o β-lactámicos de administración parenteral. Dentro del género *Streptococcus* spp., cabe destacar, además, estudios recientes sobre la actividad de cefditoreno frente a *Streptococcus agalactiae* en aislados obtenidos de muestras vaginales y rectales de mujeres embarazadas y no embarazadas [18,19]. Del mismo modo que *S. pyogenes*, todas las cepas de estreptococo β-hemolítico del grupo B estudiadas hasta el momento han mostrado completa

sensibilidad a cefditoreno, incluyendo aquellas con resistencia a otros grupos antibióticos como quinolonas o macrólidos, de porcentaje nada desdeñable [18,19].

Si bien no se encuentran dentro de la microbiología más habitual de las IPTB, objetivo de la presente revisión, el amplio uso de esta cefalosporina de tercera generación en infecciones de vías respiratorias obliga a mentar su actividad antimicrobiana frente a especies como *S. pneumoniae* o *H. influenzae*. Cefditoreno ha demostrado, igualmente, una elevada actividad intrínseca frente a *S. pneumoniae* en numerosos estudios clínicos, tanto *in vitro* como *in vivo*, incluyendo trabajos más recientes con múltiples serotipos y en un escenario posterior a la introducción de la vacunación con la vacuna antineumocócica conjugada 13-valente en múltiples regiones geográficas, incluyendo Europa, Asia y América [4,12,15,20-24]. En resumen, presenta CMI₉₀ menores de 0,06 mg/L y frecuentemente menores de 0,03 mg/L para aquellos aislados sensibles a penicilinas, mientras que, en aquellas cepas con sensibilidad intermedia o resistentes a penicilina, la CMI₉₀ de cefditoreno varía entre 0,25 y 0,5 mg/L y 0,5 a 1 mg/L, respectivamente. Es interesante remarcar los valores menores de CMI de cefditoreno en estos dos últimos perfiles de sensibilidad en comparación con otras cefalosporinas, tanto orales como parenterales, otros β-lactámicos, o macrólidos. De hecho, cabe remarcar que la tasa de respuesta clínica tras el tratamiento con cefditoreno en el trabajo de Granizo *et al.* [25] en cepas resistentes a la penicilina fue del 97,4%. Respecto a *H. influenzae*, la presión antibiótica ha facilitado la emergencia y diseminación de cepas resistentes a la ampicilina y β-lactamasa negativas (BLNAR) por mutaciones en el gen *ftsI*, además de cepas resistentes a amoxicilina-clavulánico productoras de β-lactamasas (BLPACR) [26]. No obstante, la actividad de cefditoreno frente a *H. influenzae*, independientemente de la presencia de mutaciones en el gen *ftsI* o de la producción de β-lactamasas, ha demostrado ser elevada, siendo también la cefalosporina oral más potente y con eficacia comparable a cefalosporinas parenterales o las quinolonas, con CMI₉₀ de 0,03 mg/L [12].

No disponemos, sin embargo, de tanta evidencia sobre la actividad antibacteriana de cefditoreno en bacilos gramnegativos, agentes etiológicos de diversas infecciones comunitarias. En el amplio estudio llevado a cabo por Tempera *et al.* en 2010 [12], cefditoreno y las cefalosporinas parenterales de tercera generación presentaron la mayor actividad frente a *E. coli* en comparación con otros agentes de uso común, como las quinolonas, con menores CMI₉₀ y alcanzando una sensibilidad del 100% de sus cepas. De entre el resto de las cefalosporinas fue, de hecho, aquella con menores CMI, con CMI₅₀ y CMI₉₀ de 0,03 y 0,5 mg/L, respectivamente. Estos datos confirman la evidencia inicial de que cefditoreno posee buena actividad contra bacilos gramnegativos y, en concreto, frente a *E. coli* [10]. Este hecho cobra mayor relevancia en un contexto de crecientes resistencias a quinolonas en el ámbito comunitario, con tasas que, en algunas series, alcanzan el 30%, superando el 40% en infecciones hospitalarias [27]. Tales datos ponen en cuestión el paradigma previo de las quinolonas como tratamiento empírico de primera elección en varias infecciones comunitarias, sin

olvidar los riesgos y el perfil de toxicidad alertado de estas últimas. En el caso de *K. pneumoniae*, cefditoreno y levofloxacino han demostrado los valores más bajos de CMI₉₀, incluso habiendo detectado algunas cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) resistentes a todos los antibióticos estudiados. Así, mientras que para ceftriaxona las CMI₅₀ y CMI₉₀ fueron de 0,25 y más de 64 mg/L respectivamente en 100 aislamientos, cefditoreno mostró una media de CMI₅₀ y CMI₉₀ de 0,25 y 2 mg/L, respectivamente, sólo superado por levofloxacino. Estos datos son similares a los obtenidos *in vitro* en enterobacterias aisladas en muestras de orina por Cuevas y colaboradores [28], en el que la CMI₅₀/CMI₉₀ de cefditoreno contra todos los aislamientos fue de 0,12/0,5 mg/L, respectivamente, inhibiendo el 96,5% de todos los aislamientos a concentración de 1 mg/L y siendo uniformemente activo contra todos ellos (incluyendo *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Proteus mirabilis*, entre otros) con la excepción de las cepas productoras de BLEE o enzimas AmpC.

En los estudios de Jones *et al.*, y Cuevas *et al.* [2, 28], se evidenció además una notable actividad frente a *P. mirabilis*, y *Salmonella* spp. (CMI₉₀ 0,12-1 mg/L). Sin embargo, presentaba una actividad más limitada contra *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens* y otras bacterias indol-positivas, con un rango de CMI₅₀ de 0,12-1 mg/L y CMI₉₀ > 16 mg/L; además, mostrando una ausencia de actividad bactericida contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* spp. y otros bacilos gramnegativos no fermentadores.

Por otra parte, la actividad anaeróbica de cefditoreno es más reducida. Con unas CMI₉₀ que varían desde 0,39 a 1,56 mg/L, ha demostrado actividad frente a algunas cepas de *C. perfringens*, *Bacteroides* spp. y *Peptostreptococcus* spp. [4, 5].

FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINÁMICA DE CEFDITORENO: EFECTIVIDAD Y RELEVANCIA EN LA INTERPRETACIÓN DE LA SENSIBILIDAD

Como se ha comentado antes, cefditoreno pivoxilo es el profármaco de la forma activa de cefditoreno. Tras su administración por vía oral, se hidroliza rápidamente por esterasas del tracto gastrointestinal en forma de cefditoreno, el compuesto activo, y pivalato, atravesando la mucosa intestinal a través de difusión pasiva [3]. Cabe destacar que su biodisponibilidad oral es particularmente variable en función del estado de ayuno del paciente. Su administración, tras una ingesta rica en contenido graso, mejora notablemente su absorción y consigue aumentar de un 15-20% hasta aproximadamente un 70% el área media bajo la curva (AUC), y hasta un 50% la concentración plasmática máxima (C_{max}) media del fármaco, en comparación con su toma en ayunas, debido a su mejor absorción [3, 29-31]. Este hecho traduce la importancia de una adecuada toma, tras la prescripción apropiada, para conseguir los objetivos terapéuticos, optimizar la concentración plasmática de fármaco y el tiempo por encima de la concentración mínima inhibitoria (CMI), de especial relevancia en el caso de los agentes β -lactámicos como cefditoreno y antibióticos bactericidas

tiempo-dependientes, o con efecto post-antibiótico. Además, traduce la importancia de considerar la condición de ayuno de los pacientes en estudios farmacodinámicos [25,32], así como la importancia de las consideraciones farmacocinéticas/farmacodinámicas (PK/PD) en la erradicación microbiana.

En la actualidad no existen puntos de corte establecidos por la EUCAST para la determinación de resistencia a cefditoreno, si bien algunos autores y agencias consideran sensibles aquellos aislamientos con un rango de CMI \leq 0,125 o de \leq 0,5 mg/L en patógenos respiratorios comunitarios [20], o de CMI \leq 1 mg/L en el caso de patógenos no respiratorios (incluidas enterobacterias) causantes de otras infecciones comunitarias [28,33]. Los estudios PK/PD pueden ser determinantes en la interpretación de la sensibilidad, y pueden relacionarse con la erradicación bacteriana y los resultados terapéuticos [34]. En fármacos tiempo-dependientes, es fundamental maximizar el tiempo de exposición del microorganismo a concentraciones del fármaco por encima de la CMI. Las cefalosporinas presentan eficacia terapéutica fundamentalmente con efecto bacteriostático con tiempos por encima de la CMI ($t > \text{CMI}$) a partir del 40% del intervalo entre dos dosis consecutivas, y alcanzan efecto bactericida en porcentajes de tiempo mayores y de forma directamente proporcional al $t > \text{CMI}$ [26]. Por ello, diversos estudios han tenido como objetivo analizar el $t > \text{CMI}$ de cefditoreno. A la dosis habitual de 200 mg cada 12 horas, se ha documentado actividad, incluso, contra infecciones por *S. pneumoniae* con resistencia intermedia la penicilina (CMI₉₀ 0,5 mg/L), manteniendo $t > \text{CMI}$ de 54% y, a la dosis de 400 mg cada 12h, del 45% en *S. pneumoniae* resistente a penicilinas, siendo superior al 90% en cepas sensibles [13,35]. Estos datos fueron corroborados, además, en un ensayo clínico fase I de un grupo español, con $t > \text{CMI}$ del 94,4% para cepas de *S. pneumoniae* con CMI \leq 0,06 mg/L y de 44,1% para cepas con CMI de 1 mg/L, a dosis de 400 mg, dos veces al día [9]. Sin embargo, algunos trabajos de simulación han documentado reducciones prácticamente del 100% del inóculo en cepas de *S. pneumoniae* con $t > \text{CMI}$ de aproximadamente un 20% [11], e incluso, supervivencia del 100% en modelos simulados de sepsis neumocócica en ratones con CMI elevadas de hasta 1-2 mg/L, y $t > \text{CMI}$ del fármaco libre del 20% y $t > \text{CMI}$ de la concentración plasmática total del 35%.

Contrariamente, en un estudio de simulación PK/PD realizado recientemente con el objetivo de comparar las cefalosporinas orales cefuroxima, cefixima y cefditoreno en modelos de infección de vías urinarias no complicada, ninguno de los regímenes posológicos de cefditoreno, considerando en el análisis su fracción libre, proporcionó alta probabilidad de erradicación microbiológica para ese valor de CMI [36]. Sin embargo, otros estudios han demostrado que, si bien la fracción libre es la fracción activa, la extrapolación de la forma activa de fármaco a través de la total y en función de la tasa de unión a proteínas plasmáticas, no es adecuada, y lleva a subestimar la actividad antimicrobiana [37]. Considerando el fármaco total, la dosis de 400 mg cada 12h consiguió probabilidades de alcanzar el efecto bactericida de más del 80% para CMI \leq 0,25 mg/L, en comparación con 0,03 mg/L, incluyendo en el modelo únicamente la

fracción libre y mostrando mejores perfiles para cefixima [36].

La distribución del fármaco es amplia, alcanzando concentraciones óptimas, no sólo en plasma, sino en mucosa bronquial, líquido de revestimiento epitelial de la vía aérea, piel, amígdalas y orina, entre otros [3,38]. Además, algunos estudios han demostrado concentraciones proporcionalmente mayores en orina [9,39].

Hay que destacar, asimismo, la elevada tasa de unión de cefditoreno a proteínas plasmáticas, que alcanza aproximadamente un 88% [3,37,40]. Este hecho puede limitar de forma relativa su actividad en pacientes desnutridos o con hipoalbuminemia, ya que algunos estudios con simulaciones han demostrado que la actividad de las concentraciones totales de fármaco en presencia de albúmina o suero es significativamente mayor que la exhibida por la fracción libre calculada [11,25]. Debido a la importante hidrosolubilidad del fármaco y su eliminación por vía renal, la disminución del filtrado glomerular en pacientes con insuficiencia renal por debajo de 50 mL/min afecta de forma significativa y clínica a su aclaramiento [3], por lo que se recomienda ajuste de dosis en estos casos, a 200 mg cada 12h en filtrados glomerulares estimados entre 50-30 mL/min, y un máximo de 200 mg cada 24h por debajo de 30 mL/min [29-31]. Por el contrario, la afectación hepática no supone un condicionante mayor para su administración y, si bien no existen datos de la concentración plasmática en pacientes con insuficiencia hepática grave (estadio Child-Pugh C), no se ve afectada de forma clínicamente significativa en casos de disfunción hepática leve o moderada (Child-Pugh A y B) y no se requiere ajuste posológico [3, 30, 31]. Otros factores como la edad o el sexo pueden afectar a la farmacocinética de cefditoreno, pero estas variaciones no son clínicamente relevantes [26].

Por último, en la progresiva situación actual de comorbilidad y pluripatología de los pacientes, muchos de ellos añosos con fragilidad y sometidos a polifarmacia, cabe destacar el perfil favorable de interacciones medicamentosas de cefditoreno, sin afectación directa en la farmacocinética de otros agentes coadministrados de prescripción frecuente. Sin embargo, su absorción y, por tanto, su biodisponibilidad, el $t_{>CMI}$ y la subsecuente actividad antimicrobiana pueden verse comprometidas por fármacos que provoquen elevación del pH gástrico como los inhibidores de la bomba de protones (IBP), los anti-H₂ o los antiácidos [3,26].

CONSIDERACIONES SOBRE TOLERANCIA Y SEGURIDAD DEL CEFDITORENO

De acuerdo con la FDA y la AEMPS, cefditoreno es considerado un fármaco seguro [29-31]. Dada su eliminación renal, se requiere ajuste de dosis proporcional a la disminución del filtrado glomerular. Sus efectos adversos más frecuentes son de índole gastrointestinal, fundamentalmente diarrea (11% de los pacientes tratados con 200 mg y 15% en los tratados con 400 mg) y náuseas (4% en aquellos que recibieron dosis de 200 mg y 6% en los que recibieron dosis de 400 mg) [29-31].

En 2009, el grupo de Granizo *et al.* realizó una revisión sistemática donde se recogieron los datos de seguridad encontrados en 13 ensayos clínicos que emplearon cefditoreno en el tratamiento de infecciones respiratorias comunitarias. Se demostró que cefditoreno tenía un perfil de efectos adversos similar al de sus comparadores (claritromicina, cefuroxima, cefpodoxima y amoxicilina-clavulánico). No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la prevalencia de náuseas, dispepsia o dolor abdominal. Sí que se demostró una menor incidencia de vaginosis bacteriana en las mujeres que tomaban cefditoreno, y mayor incidencia de diarrea en el grupo tratado con cefditoreno por faringoamigdalitis, atribuyéndose al menor número de estudios realizados en faringoamigdalitis tratados con otros comparadores antibióticos (8.3% vs 3,2% respectivamente) [41].

La hidrólisis de cefditoreno pivoxilo a cefditoreno produce la formación de pivalato. El pivalato se elimina por vía renal en forma de pivalocarnitina. Se ha documentado que, tras regímenes prolongados de tratamiento con cefditoreno, la carnitina plasmática disminuía un 39% a los 7 días de tratamiento con una pauta de 200 mg diarios y un 63% a los 14 días de administración de una dosis diaria de 400 mg [29]. También se observó la recuperación de los niveles de carnitina a los 7 días del cese de su administración. Por ello, la deficiencia de carnitina o los defectos congénitos del metabolismo que resulten en un déficit de carnitina son contraindicaciones absolutas para la administración de cefditoreno, y este debe administrarse con precaución en pacientes con sarcopenia [42,43]. También, debe evitarse su administración prolongada y priorizarse los tratamientos en pauta corta [42,44].

EFICACIA CLÍNICA DE CEFDITORENO EN LAS INFECCIONES COMUNITARIAS DE PIEL Y TEJIDOS BLANDOS

Las infecciones de piel y tejidos blandos (IPTB) forman un amplio conjunto de cuadros clínicos que resultan del compromiso de la barrera y mecanismos de defensa cutáneos e invasión microbiana, con afectación de la piel, los anejos cutáneos, el tejido celular subcutáneo, la fascia profunda o, incluso, el músculo estriado [45]. De gravedad y pronóstico variable, constituyen una de las infecciones más prevalentes en nuestro medio, y algunas de ellas como la fascitis necrotizante están asociadas a una elevada morbimortalidad [46].

Los cocos grampositivos aerobios, particularmente *S. aureus* y *S. pyogenes*, son los patógenos más frecuentemente implicados en su etiopatogenia, seguidos de *Streptococcus* de grupos B, C y G, enterobacterias, *P. aeruginosa* y anaerobios como *Bacteroides* del grupo *fragilis* y *C. perfringens*. Estos últimos, más frecuentemente encontrados en infecciones poli-microbianas.

Cefditoreno ha demostrado tener excelente actividad frente a aislados de *S. aureus* sensibles a meticilina (SAMS). Además, respecto al conjunto de las cefalosporinas orales, es aquella con mayor actividad intrínseca frente a *S. pyogenes*,

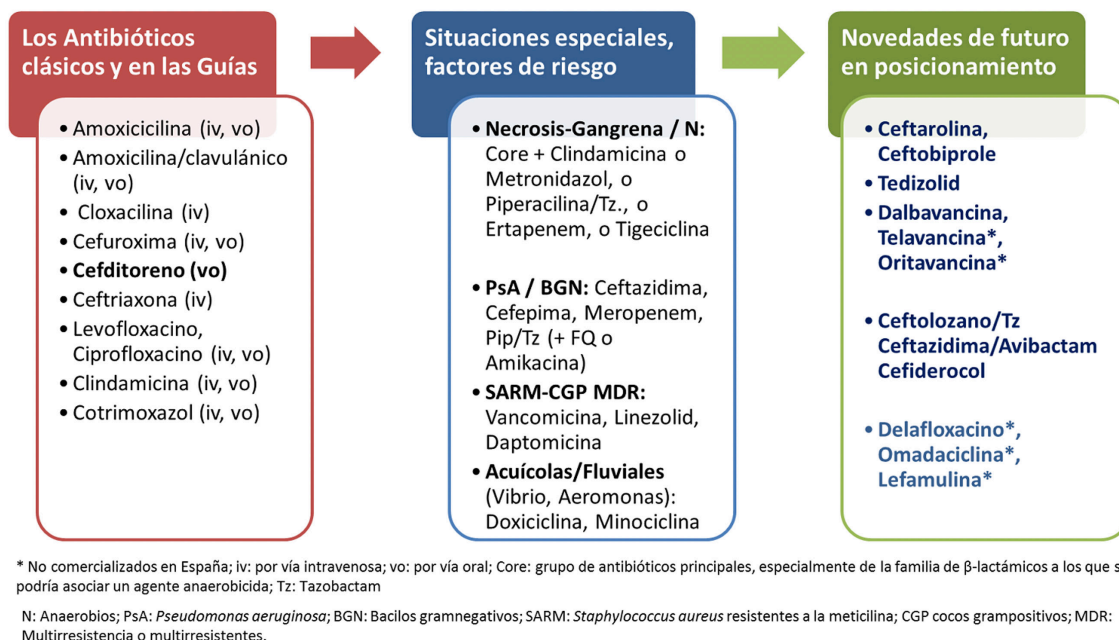


Figura 1 Opciones de tratamiento antibiótico en las infecciones de piel y tejidos blandos (IPTB) con antiguos y nuevos fármacos según características o etiología de la infección

con valores de CMI $\leq 0,06$ mg/L [12,15,17]. Su espectro añadido sobre bacterias gramnegativas y cierta actividad anaeróbica [1-3] le han convertido en una opción muy adecuada para tratar las IPTB comunitarias [4,29-31,47].

Bucko *et al.* publicaron dos ensayos clínicos aleatorizados, con doble ciego, multicéntricos y paralelos, investigando el papel de cefditoreno en pacientes con IPTB no complicadas, con edad ≥ 12 años, en comparación con cefadroxilo y cefuroxima, en un total de más de 1600 pacientes [47]. En el primer estudio se comparó cefditoreno 200 o 400 mg/12h con cefuroxima 250 mg/12h; mientras que en el segundo se comparó con cefadroxilo 500 mg/12h, todos planificando una duración de 10 días de tratamiento. Las tasas de curación clínica fueron del 85% (443/523) para cefditoreno 200 mg, 83% (427/516) para cefditoreno 400 mg, 88% (234/265) para cefuroxima y 85% (211/248) para cefadroxilo, y no existió evidencia significativa de superioridad de ningún régimen antibiótico sobre otro. Sin embargo, la erradicación conseguida en los pacientes tratados con cefditoreno 200 mg., con aislamiento microbiológico conocido, fue significativamente menor que en los pacientes tratados con cefuroxima y mayor que en los tratados con cefadroxilo, respectivamente; en este último caso, favoreciendo al cefditoreno en infecciones por *Peptostreptococcus* spp. Las tasas de erradicación de pacientes con IPTB por *S. aureus* tratado con cefditoreno 200 mg, o 400 mg, o cefuroxima fueron del 83%, 87% y 88% en el primer estudio y de 83%, 78% y 82% en el comparativo con cefadroxilo, respectivamente. Las tasas de erradicación microbiológica de *S. pyogenes*, por otra parte, fueron del 90%, 90% y 100% en el primer estudio comparan-

do cefditoreno 200 mg y 400 mg con cefuroxima, y del 91%, 100% y 100% en comparación con cefadroxilo.

En un ensayo clínico multicéntrico doble-cego más antiguo y de tamaño muestral más modesto (159) llevado a cabo en 1993 por Arata y cols. [48] se comparó cefditoreno (200 mg., tres veces al día) con cefaclor (250 mg., 3 veces al día) en IPTB (incluyendo erisipela, celulitis, forunculosis, carbunco, linfangitis y linfadenitis). La efectividad fue similar en ambos grupos, con un 97,3% (71/73) de curación clínica con cefditoreno versus 90,3% (65/72) en el grupo tratado con cefaclor. La mejoría clínica global en el día 5º de tratamiento fue, por un lado, de 92,4% en el grupo de cefditoreno y de 84,8% en el grupo de cefaclor, sin alcanzar significatividad estadística. Ambos regímenes, asimismo, fueron similares en cuanto a las tasas de erradicación microbiológica en pacientes con aislamientos documentados, siendo éstas de 90% y 91,2% para cefditoreno y cefaclor, respectivamente.

Más allá de los, cabe decir, escasos ensayos clínicos originales, se puede destacar el estudio en vida real publicado por Hernández Tejeda *et al.* en 2018 sobre la eficacia clínica de cefditoreno en pacientes con problemas vasculares e IPTB leve a moderada, incluyendo úlceras vasculares tanto arteriales como venosas, flebitis, piodermas, pie diabético, entre otras [49]. Realizaron un estudio observacional, longitudinal y prospectivo de 126 pacientes en la práctica clínica habitual que recibieron cefditoreno 200 mg (26/126) o 400 mg (100/126) cada 12h, durante 7 o 14 días en función de la evolución clínica y gravedad, obteniendo tasas de curación clínica del 97%.

Con todo lo comentado hasta ahora, pese a la multitud y variedad de opciones antimicrobianas existentes de antiguos y nuevos fármacos (Figura 1), es posible ubicar a cefditoreno en el tratamiento de las IPTB, bien en aquellas formas leves o moderadas no complicadas de manejo ambulatorio o bien como adecuada y segura opción oral en tratamientos de continuidad, permitiendo el cambio y la desescalada desde regímenes intravenosos previamente administrados en pacientes del entorno hospitalario con buena evolución clínica y respuesta favorable.

CONCLUSIONES

Cefditoreno es una cefalosporina de tercera generación, pero de administración por vía oral y con buena tolerancia y seguridad, que presenta un amplio espectro de actividad frente a bacterias grampositivas, gramnegativas, y cierta actividad frente a algunos anaerobios, incluyendo los patógenos más frecuentes asociados a IPTB, que amplía, en algunos casos, la cobertura de otros antibióticos de administración parenteral. Pese a que no dispone de puntos de corte de sensibilidad, multitud de estudios PK/PD centrados tanto en actividad y eficacia antimicrobiana como también en contrarrestar la selección de resistencias, han ayudado a conocer los datos de sensibilidad y apoyan, así, su indicación en el tratamiento de las IPTB comunitarias. En la población de pacientes con infección comunitaria no complicada de piel y tejidos blandos, incluyendo aquellas causadas por *S. aureus* y *S. pyogenes*, cefditoreno ha demostrado buena actividad y excelentes tasas de curación clínica tanto en ensayos clínicos como en los estudios de vida real.

Por otra parte, también es importante resaltar que cefditoreno puede usarse como antibiótico por vía oral en la estrategia de desescalada terapéutica de IPTB complicadas tras la administración de cefalosporinas de tercera generación intravenosas, permitiendo el alta hospitalaria de forma precoz con seguridad y buena adherencia gracias a su adecuada tolerancia.

CONFLICTO DE INTERÉS

Este manuscrito ha sido redactado como parte de un programa de formación financiado por Meiji Pharma Spain, S.A.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tamura A, Okamoto R, Yoshida T, Yamamoto H, Kondo S, Inoue M, et al. In vitro and in vivo antibacterial activities of ME1207, a new oral cephalosporin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988;32(9):1421-6. DOI: 10.1128/aac.32.9.1421
2. Jones RN, Pfaller MA, Jacobs MR, Appelbaum PC, Fuchs PC. Cefditoren in vitro activity and spectrum: a review of international studies using reference methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001;41(1-2):1-14. DOI: 10.1016/s0732-8893(01)00274-7
3. Wellington K, Curran MP. Cefditoren pivoxil: a review of its use in the treatment of bacterial infections. *Drugs*. 2004;64(22):2597-618. DOI: 10.2165/00003495-200464220-00009
4. Biedenbach DJ, Jones RN. Update of cefditoren activity tested against community-acquired pathogens associated with infections of the respiratory tract and skin and skin structures, including recent pharmacodynamic considerations. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;64(2):202-12. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.01.017
5. Hernandez-Martin J, Roma E, Salavert M, Domenech L, Poveda JL. [Cefditoren pivoxil: A new oral cephalosporin for skin, soft tissue and respiratory tract infections]. *Rev Esp Quimioter*. 2006;19(3):231-46.
6. Barberan J, Mensa J. [Cefditoren and community-acquired lower respiratory tract infections (corrected)]. *Rev Esp Quimioter*. 2009;22(3):144-50.
7. Yamada M, Watanabe T, Miyara T, Baba N, Saito J, Takeuchi Y, et al. Crystal structure of cefditoren complexed with *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 2X: structural basis for its high antimicrobial activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(11):3902-7. DOI: 10.1128/AAC.00743-07
8. Li H, Xu K, Wang Y, Zhang H, Li T, Meng L, et al. Phase I clinical study of edaravone in healthy Chinese volunteers: safety and pharmacokinetics of single or multiple intravenous infusions. *Drugs R D*. 2012;12(2):65-70. DOI: 10.2165/11634290-000000000-00000
9. Sadaba B, Azanza JR, Quetglas EG, Campanero MA, Honorato J, Coronel P, et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic serum and urine profile of cefditoren following single-dose and multiple twice- and thrice-daily regimens in healthy volunteers: a phase I study. *Rev Esp Quimioter*. 2007;20(1):51-60.
10. Jones RN, Biedenbach DJ, Johnson DM. Cefditoren activity against nearly 1000 non-fastidious bacterial isolates and the development of in vitro susceptibility test methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000;37(2):143-6. DOI: 10.1016/s0732-8893(00)00135-8
11. Sevillano D, Aguilar L, Alou L, Gimenez MJ, Torrico M, Gonzalez N, et al. Urine bactericidal activity against *Escherichia coli* isolates exhibiting different resistance phenotypes/genotypes in an in vitro pharmacodynamic model simulating urine concentrations obtained after oral administration of a 400-milligram single dose of cefditoren-pivoxil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(3):1184-6. DOI: 10.1128/AAC.01247-07
12. Tempera G, Furneri PM, Carlone NA, Cocuzza C, Rigoli R, Musumeci R, et al. Antibiotic susceptibility of respiratory pathogens recently isolated in Italy: focus on cefditoren. *J Chemother*. 2010;22(3):153-9. DOI: 10.1179/joc.2010.22.3.153
13. Clark CL, Nagai K, Dewasse BE, Pankuch GA, Ednie LM, Jacobs MR, et al. Activity of cefditoren against respiratory pathogens. *J Antimicrob Chemother*. 2002;50(1):33-41. DOI: 10.1093/jac/dkf076
14. Lee MY, Ko KS, Oh WS, Park S, Lee JY, Baek JY, et al. In vitro activity of cefditoren: antimicrobial efficacy against major respiratory pathogens from Asian countries. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;28(1):14-8. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2006.02.014
15. Stefani S, Mezzatesta ML, Fadda G, Mattina R, Palu G, Rossano F, et al. Antibacterial activity of cefditoren against major community-acquired respiratory pathogens recently isolated in Italy. *J Che-*

- mother. 2008;20(5):561-9. DOI: 10.1179/joc.2008.20.5.561
16. Prieto J, Calvo A, Gomez-Lus ML. Antimicrobial resistance: a class effect? *J Antimicrob Chemother.* 2002;50 Suppl S2:7-12. DOI: 10.1093/jac/dkf508
 17. Gracia M, Diaz C, Coronel P, Gimeno M, Garcia-Rodas R, Rodriguez-Cerrato V, et al. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pyogenes* in Central, Eastern, and Baltic European Countries, 2005 to 2006: the cefditoren surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009;64(1):52-6. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.12.018
 18. Genovese C, D'Angeli F, Di Salvatore V, Tempera G, Nicolosi D. *Streptococcus agalactiae* in pregnant women: serotype and antimicrobial susceptibility patterns over five years in Eastern Sicily (Italy). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020;39(12):2387-96. DOI: 10.1007/s10096-020-03992-8
 19. Gomi Y, Wang L, Matsushima H, Kawabe A, Kikugawa A, Takagi A, et al. Variations in antibiotic susceptibility of group B *Streptococcus* in Japanese women: A long-term population-based cohort study. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2019;58(6):805-7. DOI: 10.1016/j.tjog.2019.09.014
 20. Gimenez MJ, Aguilar L, Granizo JJ. Revisiting cefditoren for the treatment of community-acquired infections caused by human-adapted respiratory pathogens in adults. *Multidiscip Respir Med.* 2018;13:40. DOI: 10.1186/s40248-018-0152-5
 21. Fenoll A, Gimenez MJ, Robledo O, Coronel P, Gimeno M, Casal J, et al. Activity of cefditoren against clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* showing non-susceptibility to penicillins, cephalosporins, macrolides, ketolides or quinolones. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;29(2):224-6. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2006.08.046
 22. Fenoll A, Aguilar L, Robledo O, Gimenez MJ, Tarrago D, Granizo JJ, et al. Influence of the beta-lactam resistance phenotype on the cefuroxime versus cefditoren susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* recovered from children with acute otitis media. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(2):323-7. DOI: 10.1093/jac/dkm209
 23. Fritsche TR, Biedenbach DJ, Jones RN. Update of the activity of cefditoren and comparator oral beta-lactam agents tested against community-acquired *Streptococcus pneumoniae* isolates (USA, 2004-2006). *J Chemother.* 2008;20(2):170-4. DOI: 10.1179/joc.2008.20.2.170
 24. Seral C, Suarez L, Rubio-Calvo C, Gomez-Lus R, Gimeno M, Coronel P, et al. In vitro activity of cefditoren and other antimicrobial agents against 288 *Streptococcus pneumoniae* and 220 *Haemophilus influenzae* clinical strains isolated in Zaragoza, Spain. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;62(2):210-5. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.06.007
 25. Granizo JJ, Sadaba B, Honorato J, Gimenez MJ, Sevillano D, Aguilar L, et al. Monte Carlo simulation describing the pharmacodynamic profile of cefditoren in plasma from healthy volunteers. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31(4):396-8. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2007.10.024
 26. Di Marco F, Braido F, Santus P, Scichilone N, Blasi F. The role of cefditoren in the treatment of lower community-acquired respiratory tract infections (LRTIs): from bacterial eradication to reduced lung inflammation and epithelial damage. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(3):321-32.
 27. Ana Betrán MJL, Rocío Cebollada, José Manuel Calderón, Luis Torres. Resistencia antibiótica de *Escherichia coli* en infecciones urinarias nosocomiales y adquiridas en la comunidad del Sector Sanitario de Huesca 2016-2018. *Revista Clínica de Medicina de Familia.* 2020;13(3):Epub 23-Nov-2020.
 28. Cuevas O, Cercenado E, Gimeno M, Marin M, Coronel P, Bouza E, et al. Comparative in vitro activity of cefditoren and other antimicrobials against Enterobacteriaceae causing community-acquired uncomplicated urinary tract infections in women: a Spanish nationwide multicenter study. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;67(3):251-60. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.02.013
 29. Food and Drug Administration. Spectracef prescribing information [Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2005/021222s009lbl.pdf].
 30. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Prospecto Meiact 200 mg. [Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/p/65943/Prospecto_65943.html].
 31. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Prospecto Meiact 400 mg. [Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/p/65975/Prospecto_65975.html].
 32. Lodise TP, Kinzig-Schippers M, Drusano GL, Loos U, Vogel F, Bulitta J, et al. Use of population pharmacokinetic modeling and Monte Carlo simulation to describe the pharmacodynamic profile of cefditoren in plasma and epithelial lining fluid. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(6):1945-51. DOI: 10.1128/AAC.00736-06
 33. Hatzaki D, Poulakou G, Katsarolis I, Lambri N, Souli M, Deliolanis I, et al. Cefditoren: Comparative efficacy with other antimicrobials and risk factors for resistance in clinical isolates causing UTIs in outpatients. *BMC Infect Dis.* 2012;12:228. DOI: 10.1186/1471-2334-12-228
 34. Ball P, Baquero F, Cars O, File T, Garau J, Klugman K, et al. Antibiotic therapy of community respiratory tract infections: strategies for optimal outcomes and minimized resistance emergence. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49(1):31-40. DOI: 10.1093/jac/49.1.31
 35. Blasi F, Concia E, Mazzei T, Moretti AM, Nicoletti G, Novelli A, et al. Role of the oral Beta-lactams in the treatment of exacerbations of chronic bronchitis: critical analysis and therapeutics recommendations. *J Chemother.* 2010;22 Suppl 1:3-4. DOI: 10.1179/joc.2010.22. Supplement-1.3
 36. Rodriguez-Gascon A, Aguirre-Quinonero A, Canut-Blasco A. Are oral cefuroxime axetil, cefixime and cefditoren pivoxil adequate to treat uncomplicated acute pyelonephritis after switching from intravenous therapy? A pharmacokinetic/pharmacodynamic perspective. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2020; 38 (7):306-11. DOI: 10.1016/j.eimc.2019.12.017
 37. Sevillano D, Gimenez MJ, Alou L, Aguilar L, Cafini F, Torrico M, et al. Effects of human albumin and serum on the in vitro bactericidal activity of cefditoren against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(1):156-8. DOI: 10.1093/jac/dkm115
 38. Sanchez Artola B, Barberan J. [Cefditoren: a reality for the treatment

- of community infections]. *Rev Esp Quimioter.* 2017;30(6):407-12.
39. Monmaturapoj T, Montakantikul P, Mootsikapun P, Tragulpiankit P. A prospective, randomized, double dummy, placebo-controlled trial of oral cefditoren pivoxil 400mg once daily as switch therapy after intravenous ceftriaxone in the treatment of acute pyelonephritis. *Int J Infect Dis.* 2012;16(12):e843-9. DOI: 10.1016/j.ijid.2012.07.009
40. Cafini F, Yuste J, Gimenez MJ, Sevillano D, Aguilar L, Alou L, et al. Enhanced in vivo activity of cefditoren in pre-immunized mice against penicillin-resistant *S. pneumoniae* (serotypes 6B, 19F and 23F) in a sepsis model. *PLoS One.* 2010;5(8):e12041. DOI: 10.1371/journal.pone.0012041
41. Granizo JJ, Aguilar L, Gimenez MJ, Coronel P, Gimeno M, Prieto J. Safety profile of cefditoren. A pooled analysis of data from clinical trials in community-acquired respiratory tract infections. *Rev Esp Quimioter.* 2009;22(2):57-61.
42. Brass EP, Mayer MD, Mulford DJ, Stickler TK, Hoppel CL. Impact on carnitine homeostasis of short-term treatment with the pivalate prodrug cefditoren pivoxil. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;73(4):338-47. DOI: 10.1016/s0009-9236(02)17636-3
43. Kim H, Chu K, Jung KH, Lee ST, Kim JM, Lee SK. Acquired encephalopathy associated with carnitine deficiency after cefditoren pivoxil administration. *Neurol Sci.* 2012;33(6):1393-6. DOI: 10.1007/s10072-012-0939-7
44. Ito M, Fukuda M, Suzuki Y, Wakamoto H, Ishii E. Carnitine-related hypoglycemia caused by 3 days of pivalate antibiotic therapy in a patient with severe muscular dystrophy: a case report. *BMC Pediatr.* 2017;17(1):73. DOI: 10.1186/s12887-017-0835-7
45. Silverberg B. A Structured Approach to Skin and Soft Tissue Infections (SSTIs) in an Ambulatory Setting. *Clin Pract.* 2021;11(1):65-74. DOI: 10.3390/clinpract11010011
46. Sartelli M, Guirao X, Hardcastle TC, Kluger Y, Boermeester MA, Rasa K, et al. 2018 WSES/SIS-E consensus conference: recommendations for the management of skin and soft-tissue infections. *World J Emerg Surg.* 2018;13:58. DOI: 10.1186/s13017-018-0219-9
47. Bucko AD, Hunt BJ, Kidd SL, Hom R. Randomized, double-blind, multicenter comparison of oral cefditoren 200 or 400 mg BID with either cefuroxime 250 mg BID or cefadroxil 500 mg BID for the treatment of uncomplicated skin and skin-structure infections. *Clin Ther.* 2002;24(7):1134-47. DOI: 10.1016/s0149-2918(02)80024-8
48. Arata J. A double blind comparative study of cefditoren pivoxil versus cefaclor in treatment of skin and skin structure infections. *Chemotherapy.* 1993;41(1):57-77. DOI: 10.11250/chemotherapy1953.41.57
49. Hernández-Tejeda RV GSM, Ranero Juárez GA, Martínez Gama D, Mondragón P, Flores Trejo LY, Galicia Tapia J. Clinical efficacy of cefditoren for skin and soft tissue infection treatment. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2018;38(1):12-6.

Esperanza Merino¹
Adelina Gimeno²
Mar Alcalde³
Javier Coy²
Vicente Boix¹
Carmen Molina-Pardines²
Maria Paz Ventero²
Antonio Galiana⁴
Elena Caro¹
Juan Carlos Rodríguez²

Impact of Sepsis Flow Chip, a novelty fast microbiology method, in the treatment of bacteremia caused by Gram-negative bacilli

¹Department of Infectious diseases, General University Hospital of Alicante-ISABIAL, Spain.

²Department of Microbiology, General University Hospital of Alicante-ISABIAL, Spain.

³Department of Infectious Diseases, Hospital Universitario Santa Lucia, Cartagena, Murcia

⁴Department of Microbiology, FISABIO, General University Hospital of Elche. Elche, Spain.

Article history

Received: 21 September 2020; Revision Requested: 26 December 2020; Revision Received: 21 January 2021; Accepted: 27 January 2021; Published: 23 March 2021

ABSTRACT

Objective. The aim of this study was to assess the impact of the information provided by the new Sepsis Chip Flow system (SFC) and other fast microbiological techniques on the selection of the appropriate antimicrobial treatment by the clinical researchers of an antimicrobial stewardship team.

Methods. Two experienced clinical researchers performed the theoretical exercise of independently selecting the treatment for patients diagnosed by bacteremia due to bacilli gram negative (BGN). At first, the clinicians had only available the clinical characteristics of 74 real patients. Sequentially, information regarding the Gram stain, MALDI-TOF, and SFC from Vitro were provided. Initially, the researchers prescribed an antimicrobial therapy based on the clinical data, later these data were complementing with information from microbiological techniques, and the clinicians made their decisions again.

Results. The data provided by the Gram stain reduced the number of patients prescribed with combined treatments (for clinician 1, from 23 to 7, and for clinician 2, from 28 to 12), but the use of carbapenems remained constant. In line with this, the data obtained by the MALDI-TOF also decreased the combined treatment, and the use of carbapenems remained unchanged. By contrast, the data on antimicrobial resistance provided by the SFC reduced the carbapenems treatment.

Conclusions. From the theoretical model the Gram stain and the MALDI-TOF results achieved a reduction in the combined treatment. However, the new system tested (SFC), due to the resistance mechanism data provided, not only reduced the combined treatment, it also decreased the prescription of the carbapenems.

Key words: Bloodstream infection, MALDI-TOF, Sepsis Chip Flow, gram negative bacilli.

Impacto de Sepsis Flow Chip, un método microbiológico novedoso y rápido, en el tratamiento de la bacteriemia causada por bacilos gramnegativos

RESUMEN

Objetivo. Nuestro trabajo trata de aportar información sobre el impacto del nuevo sistema Sepsis Chip Flow system (SFC) y otras técnicas de diagnóstico microbiológico rápido en la selección del tratamiento antibiótico apropiado por el equipo de infectólogos dentro de un grupo multidisciplinar PROA.

Método. Dos infectólogos con amplia experiencia clínica llevan a cabo un ejercicio teórico de forma independiente seleccionando los tratamientos de los pacientes diagnosticados de bacteriemia por bacilos gramnegativos. En primer lugar, los infectólogos solo tienen acceso a los datos reales de 74 pacientes. Secuencialmente, se les aporta información de los resultados de la tinción de Gram, MALDI-TOF y SFC (Vitro). Inicialmente, los infectólogos prescriben un tratamiento antibiótico en base a los datos clínicos y más tarde, van modificando los tratamientos en base a la información microbiológica recibida.

Resultados. Los datos aportados por la tinción de Gram reducen el número de pacientes pautados con tratamientos combinados (para el clínico 1, de 23 a 7, y en el clínico 2, de 28 a 12), pero el uso de carbapenémicos permanece constante. En la misma línea, los datos aportados por MALDI-TOF también disminuyen el número de tratamientos antibióticos combinados aunque sigue sin modificarse el número de tratamientos con carbapenémicos. Por contra, los datos de resistencia antibiótica aportados por SFC reducen el número de tratamientos con carbapenémicos.

Conclusiones. A partir del modelo teórico, la tinción de Gram y los resultados de MALDI-TOF lograron una reducción en el tratamiento combinado. Sin embargo, el nuevo sistema probado (SFC), debido a los datos de mecanismos de resistencia proporcionados, no solo redujo el tratamiento combinado sino que también disminuyó la prescripción de los carbapenémicos.

Palabras clave: Bacteremia, MALDI-TOF, Sepsis Chip Flow, bacilos gramnegativos.

Correspondence:
Carmen Molina Pardines
Department of Microbiology, General University Hospital of Alicante-ISABIAL, Spain.
C/Pintor Baeza, 12. CP:03010.
E-mail: carmenmolinapardines@gmail.com

INTRODUCTION

Bloodstream infections (BSI), also called bacteremia, are associated with high rates of morbidity and mortality. The microbiological identification of the causative pathogens is crucial for optimal management. Therefore, a faster identification of the microorganisms causing the bacteremia could enable the appropriate species-specific therapy to be started earlier, thereby improving patient outcome and reducing the potential development of resistance and possible side effects [1,2].

Today, the treatment of Gram-negative bacilli (GNB)-BSI is particularly complicated due to the high rates of resistance from multiple resistance mechanisms, opening up only limited treatment options. Furthermore, due to the emergence of multi-drug resistant (MDR) GNB, early targeted treatment is key for both avoiding of broad-spectrum antimicrobials and ensuring the correct treatment of the pathogen. On the other hand, the cautious administration of the antimicrobials performed by the antimicrobial stewardship team (AST) helps to prevent the development of antimicrobial resistance over the long term [3].

Integrating the fast diagnostic laboratory techniques with AST has been demonstrated to improve patient outcome compared to the standard microbiology reporting [4]. In fact, it is evident that the development of the MALDI-TOF provides timely and accurate identification of the organism, and when combined with the AST it can shorten the length of the hospital stay and the costs for the treatment of the GNB-BSI. However, the MALDI-TOF does not provide information regarding resistance [5].

The Sepsis Flow Chip (SFC, Master Diagnostica) assay is a recent developed and commercialized system based on a multiplex PCR. SFC provide an automated molecular diagnostic test for the identification of the genus, species and genetic resistance determinants for a broad panel of the commonest GNB organisms isolated from blood cultures. It has an approximate turn-around time of 4 hours from the positive blood cultures. The assay can detect at the genus/species level 12 bacteria and 1 yeast (*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Listeria monocytogenes*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus* spp., *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis* and *Candida albicans*; also it detects the generic category "Enterobacteriaceae". SFC assay detects the most important genetic resistance determinants involved in resistance to methicillin and vancomycin in Gram-positive pathogens and determinants related to beta-lactam resistance mechanisms such as ESBLs and carbapenemase production in Gram-negative bacteria (*mecA*, *vanA/B*, *blaCTX*, *blaSHV*, *blaSME*, *blaKPC*, *blaNMC/IMI*, *blaGES*, *blaIMP*, *blaGIM*, *blaVIM*, *blaSPM*, *blaSIM*, *blaNDM*, *blaOXA-23*, *blaOXA-24*, *blaOXA-48*, *blaOXA-51* and *blaOXA-58*.)

This test has been recently demonstrated to have a high sensitivity and specificity for organism and resistance

identification [6]. However, the impact of SFC results on the management of BGN-BSI has not been analyzed yet, due to this system has been recent commercialized.

The purpose of this study was to evaluate the impact of the identification and resistance data provided by SFC, as a complement of MALDI-TOF information, on the antimicrobial therapy prescribed by the AST. The evaluation was performed on a theoretical model generated from clinical patient data, in order to avoid the variability presents in the clinical routine.

MATERIAL AND METHODS

Study location and design. This single-center study was conducted at the General University Hospital of Alicante (Spain), a 780-bed tertiary hospital.

In this study, 74 consecutive patients were included in a retrospective manner. All the patients were above the age of 18 years and experiencing the first episode of GNB bacteremia (mono or polymicrobial BSI). This study was performed under the written authorization of the CEIm (Ethic Committee of research with drugs) with implementation of the national legal standards and the guidelines established in the Declaration of Helsinki (2000). Data on the demographic characteristics, comorbid status (Charlston index), clinical signs and symptoms of infections, severity of illness (Pitt score), immunosuppressive therapy and microbiology results were collected from each patient. Also, the infection-related characteristics of the infection source (according to the definitions published by CDC) were included. Details of the syndromes and clinical characteristics of the patients are available as supplementary data (S1).

The clinical data obtained were anonymized. Information on the epidemiology of the infectious process and the prescribed antimicrobial therapy was removed before providing the clinical data to the clinical researchers who conducted this study.

Microbiological tests. Microbiological results provided to clinical researchers were obtained as a part of the clinical routine when the infectious process occurred, following these protocols:

All the blood samples obtained were subjected to identical processing methods using the BACTEC automated blood cultures system (BD diagnostics), and standard aerobic and anaerobic blood cultures media. The specimens were Gram-stained when the blood culture bottle showed up as positive. They were analyzed by the MALDI-TOF (Bruker, Germany) for routine identification, and then for a new identification process and detecting resistance mechanisms by SFC.

In addition, positive blood culture specimens were inoculated on the appropriate solid agar media and subsequently identified using the conventional clinical microbiology procedures. The antimicrobial susceptibilities were performed with the Microscan (Beckman). Antimicrobial susceptibilities were determined according to the EUCAST guidelines.

Definitions. The BSI onset was defined as the collection

time of the first blood sample which yielded the study isolate (index blood culture). Treatment was considered active when the infecting organism was susceptible *in vitro* to at least one prescribed antimicrobial agent. Treatment was considered optimal when the antimicrobial exhibited *in vitro* activity and targeted the isolated pathogen based on the patients' overall clinical features, and when it was available, it was in line with the current clinical guidelines.

Antimicrobial recommendations were classified as escalation, meaning a change from a narrow spectrum to a broad-spectrum antimicrobial (with one or more antimicrobials), de-escalation or narrowing the coverage to target the isolated organisms, or discontinuing therapy when the antimicrobial treatment was stopped.

Antimicrobial treatment recommendation. To evaluate this technique in several clinical conditions, two skilled clinicians were selected from two different hospitals. One of them, from a tertiary hospital with complex patients (severe immunosuppression, solid transplants, haematological diseases, cancer and complex surgery) and a high incidence of multidrug resistant pathogens; and the other one from a second level hospital, without these characteristics. Both therapies were in line with the clinical guidelines approved by the infectious diseases commission of each hospital.

Theoretical antimicrobial therapy. In order to know the usefulness of these techniques, particularly the SFC which is recent developed and not evaluated in the clinical practice yet, without the variability associated with clinical routines, two clinical researchers specialized in infectious diseases (one from the same hospital, and the other from another General Hospital) prescribed the antimicrobial therapy according to the information available at different levels:

- First, as an empirical therapy, based on the clinical characteristics.
- Second, using the previous data plus Gram-stain report.
- Third, using the previous data plus the information provided by MALDI-TOF.
- Fourth, using the previous data plus SFC data.
- Fifth, or definitive antimicrobial therapy with the full susceptibility test including the culture and the antibiogram.

Statistical analysis. The categorical variables were expressed as counts (percentage). To evaluate the differences between the empirical treatments and the prescribed treatments after the different techniques the chi-square or Fisher's exact test were used. The contrasts were carried out using IBM SPSS Statistics version 22.0 Software, and a $p < 0.05$ was necessary to consider significative differences.

RESULTS

The analysis was performed on 74 patients with BSI, caused by *Escherichia coli* (38), *Klebsiella pneumoniae* (9), polymicrobial (8), *Klebsiella oxytoca* (4), *Enterobacter cloacae* (3), *Proteus mirabilis* (2), *Stenotrophomonas maltophilia* (2), *Serratia marc-*

escens (2), *Achromobacter* (1), *Citrobacter koseri* (1), *Bacteroides thetaiotaomicron* (1), *Campylobacter jejuni* (1), *Acinetobacter baumannii* (1) and *Pseudomonas aeruginosa* (1). Resistance to the third generation cephalosporins was present in 18/74 (24.3%) and to the carbapenems in 4/74 (5.4%).

The empirical treatments decided by the researchers, based on the analysis of the patient's data only showed significative differences in the choice of the carbapenems (22 versus 37, $p = 0.012$).

The information provided by the Gram stain was helpful in preventing combined treatments, since the prescription of this type of treatment was significative reduced by the clinician 1 ($p = 0.001$) and clinician 2 ($p = 0.003$), but it was not helpful in reducing the use of carbapenems. This also occurred after applying the MALDI-TOF data, because the combined treatments were significative decreased ($p < 0.0001$ in both cases), but the prescription for carbapenems remained unchanged (Table 1).

However, the information generated by the SFC, providing data on the antimicrobial susceptibility of the microorganism, produced a decrease in the use of carbapenems (17 and 32 cases, respectively). This reduction was significative in the case of clinician 2 ($p < 0.0001$) (Table 1).

The agreement concordance between the treatments proposed by the clinical researchers showed significative differences in the use of carbapenems when the treatment was prescribed based on empirical data ($p = 0.012$), gram data ($p = 0.001$), and MALDI-TOFF data ($p = 0.005$). Only, the carbapenems prescription did not show differences after knowing SFC data.

Moreover, the antimicrobial therapies prescribed based on the fast-molecular techniques (MALDI-TOF plus SFC) were in line with the treatment selected using the culture and antibiogram data, without show significative differences.

On analyzing whether the treatments based on the empirical data were correct, it became evident that in 16.2% of the cases (researcher 1) and in 10.9 % of the cases (researcher 2) the prescription therapy was inappropriate, because the treatment involved drugs to which the causal agent was resistant. These percentages of inappropriate treatment dropped to 13.8% (clinician 1) and 8.1 % (clinician 2) using data from the Gram stain, and to 10.8 % (researcher 1) and 4.1 % (researcher 2) using the information from the MALDI-TOF. The highest percentage of correct prescription treatment was achieved by using the SFC data (plus previous data), and showed significative differences when compared to treatment proposed using empirical data ($p = 0.001$ for clinician 1, and $p = 0.016$ for clinician 2); with this information only a 1.4% of the antimicrobial therapies selected by the two clinical researchers were inappropriate (Table 2).

These results indicated that the SFC was useful as a complemented the MALDI-TOF information. The SFC provided data regarding the susceptibility to the third-generation cephalosporins in 84.6% of the cases of monomicrobial bacteremia, and in 77.8% of the polymicrobial ones (Table 3a); and carbapenems resistance in 93.8% and 88.8% of the cases (Table 3b).

Table 1	Antimicrobial prescription and treatment changes proposed by the clinicians. The treatments of both clinicians were statistically compared.	
Clinical situation	Clinician 1	Clinician 2
Empirical treatment	Carbapenem: 22 (29.7 %) Combined treatment: 23 (31.1 %)	Carbapenem: 37 (50 %) Combined treatment: 28 (37.8 %)
Treatment after Gram	Carbapenem: 22 (29.7 %) Combined treatment: 7 (9.4 %) ^a Treatment change Escalation: 1 (1.3 %) De-escalation: 19 (25.7 %) Antibiotic change: 2 (2.7 %) Carbapenem de-escalated: 0 (0 %) Carbapenem scheduled: 0 (0 %)	Carbapenem: 43 (58.1 %) Combined treatment: 12 (16.2 %) ^a Treatment change Escalation: 0 (0 %) De-escalation: 22 (29.7 %) Antibiotic change: 7 (9.5 %) Carbapenem de-escalated: 0 (0 %) Carbapenem scheduled: 6 (8.1 %)
Treatment after MALDI TOF	Carbapenem: 25 (33.8 %) Combined treatment: 3 (4.1 %) ^b Treatment change Escalation: 0 (0 %) De-escalation: 3 (4.1 %) Antibiotic change: 13 (17.6 %) Carbapenem de-escalated: 1 (1.3 %) Carbapenem scheduled: 7 (9.4 %)	Carbapenem: 42 (56.7 %) Combined treatment: 5 (6.7 %) ^b Treatment change Escalation: 1 (1.3 %) De-escalation: 7 (9.5 %) Antibiotic change: 26 (35.1 %) Carbapenem de-escalated: 4 (5.4 %) Carbapenem scheduled: 3 (4.1 %)
Treatment after SFC	Carbapenem: 14 (18.9%) Combined treatment: 9 (12.1 %) ^a Treatment change Escalation: 5 (6.7 %) De-escalation: 0 (0 %) Antibiotic change: 26 (35.1 %) Carbapenem de-escalated: 17 (22.9 %) Carbapenem scheduled: 3 (4.1 %)	Carbapenem: 12 (16.2 %) ^b Combined treatment: 3 (4.1 %) ^b Treatment change Escalation: 1 (1.3 %) De-escalation: 3 (4.1 %) Antibiotic change: 40 (54.1 %) Carbapenem de-escalated: 32 (43.2 %) Carbapenem scheduled: 2 (2.7 %)
Treatment after cultures	Carbapenem: 14 (18.9 %) Combined treatment: 8 (10.8 %) Treatment change Escalation: 0 (0 %) De-escalation: 1 (1.3 %) Antibiotic change: 5 (6.7 %) Carbapenem de-escalated: 1 (1.3 %) Carbapenem scheduled: 1 (1.3 %)	Carbapenem: 13 (17.6 %) Combined treatment: 3 (4.1 %) Treatment change Escalation: 2 (2.7 %) De-escalation: 0 (0 %) Antibiotic change: 3 (4.1 %) Carbapenem de-escalated: 0 (0 %) Carbapenem scheduled: 1 (1.3 %)

^a indicates $p < 0.05$; ^b indicates $p < 0.0001$. SFC: Sepsis Chip Flow system

DISCUSSION

In a large majority of the cases the bacteremia treatment must begin empirically because the microbiological techniques at present are not fast enough. However, the increase in the MDR microorganisms often results in inappropriate treatment and the

prescription of broad-spectrum drugs or even combinations of several antibiotics [7,8]. In the case of incorrect treatments, it is very important to adjust the treatment as soon as possible, in light of the microbiological results, because the data from several studies support that the precocity of an accurate antibiotic treatment is crucial for a good clinical outcome [9–12].

Table 2 Correct treatments (active and optimum) were scheduled after receiving the results from the different diagnostic tests, taking the reference as the culture data and antimicrobial susceptibility of the microorganism.

	Empirical treatment	Gram	MALDI-TOF	SFC
Clinician 1	62/74 (83.8 %)	64/74 (86.5 %)	66/74 (89.2 %)	73/74 (98.6 %) ^a
Clinician 2	66/74 (89.1 %)	68/74 (91.9 %)	71/74 (95.9 %)	73/74 (98.6 %) ^a

^aindicates p < 0.05. SFC: Sepsis Chip Flow system

Table 3a Evaluation of the SFC in bacteremia caused by a single microorganism.

Microorganism	Identification ^a	Resistance detection to cephalosporins 3rd (ESBL)	Resistance detection to carbapenems (carbapenemases)
<i>Escherichia coli</i> (n= 38)	Right	(38/38) 100%	(38/38) 100%
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n= 9)	Right	(9/9) 100%	(9/9) 100%
<i>Klebsiella oxytoca</i> (n=4)	Partial)	(4/4) 100%	(4/4) 100%
<i>Proteus mirabilis</i> (n=2)	Partial	(2/2) 100%	(2/2) 100%
<i>Enterobacter cloacae</i> (n=2)	Partial	(0/2) 0%	(2/2) 100%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (n=2)	Right	(0/2) 0%	(0/2) 0%
<i>Serratia marcescens</i> (n=2)	Partial	(1/2) 50%	(2/2) 100%
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (n=1)	No identification	(0/1) 0%	(1/1) 100%
<i>Citrobacter koseri</i> (n=1)	Partial	(1/1) 100%	(1/1) 100%
<i>Bacteroides thetaiotamicum</i> (n=1)	No identification	(0/1) 0%	(1/1) 100%
<i>Campylobacter jejuni</i> (n=1)	No identification	(0/1) 0%	(1/1) 100%
<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=1)	Right	(0/1) 0%	(1/1) 100%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=1)	Right	(0/1) 0%	(1/1) 100%
TOTAL (n=65)	Right: 51 (78.5%) Partial: 13 (20%) No identification: 3 (4.6%)	Sensibility ESBL: 100% Global data: 55/65 (84.6%)	Sensibility: 64/65 (98.5%)

SFC: Sepsis Chip Flow system; ESBL: extended-spectrum beta-lactamase

^aRight: Identification was made correctly: species and gender; Partial: Only the presence of an enterobacteria was identified. The genus and species were unknown; No identification: The identification of the microorganism was not achieved

Regarding the clinical usefulness of the different techniques assessed in this study, it is highlighted that, as had been repeatedly reported, their data are very helpful when a multi-disciplinary group with the capability of using them to modify the empirical treatments early (in hours) is involved. The data provided by the cultures are usually available late (24-48 hours) [13-16].

In this study, the efficacy of several techniques were analyzed in a combined manner. Some techniques provided information regarding only the etiology of the infection, while others also reported the antimicrobial susceptibility of the microorganism involved. The results revealed that their data were complementary: Gram stain and MALDI-TOF significantly decreased the combined treatments, while the SFC facilitated a reduction in the use of carbapenems.

These data also confirmed the accuracy of the SFC in identifying the BGN and resistance markers in BSI. Moreover, the combination of MALDI-TOF information and the data provided by this novelty system, SFC, provides a potential reduction in the times to prescribe both effective and optimal antibiotic therapies in the treatment of BGN-BSI. This new system identifies the commonest BGN pathogens related to BSI, and confirms the data provided by the MALDI-TOF in the inconclusive cases, for example polymicrobial infections. Additionally, SFC provides complementary information on the main mechanisms of resistance to the beta-lactams of these microorganism. It is limited, as it cannot detect resistance to the 3rd generation cephalosporins due to cAMP overproduction and resistance to the carbapenems by mechanisms other than the production of the carbapenemases. SFC could even

Table 3b Evaluation of SFC in bacteremia caused by more than one microorganism.			
Microorganism	Identification ^a	Resistance detection to cephalosporins 3 rd	Resistance detection to carbapenems
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Streptococcus gallolyticus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Partial: <i>E. faecalis</i> no identified to species level	Right	Right
<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Partial: <i>P. putida</i> no identified	Fail: Resistance of BGN no identified	Fail: Resistance of <i>S. maltophilia</i> no identified
<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Right	Fail: AMPc no detected	Right
<i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Partial: <i>E. faecalis</i> no identified to species level	Right	Right
<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Partial: <i>E. faecalis</i> no identified to species level.	Right	Right
<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter asburiae</i>	Partial: <i>E. asburiae</i> no identified to species level.	Right	Right
<i>Enterobacter ludwigii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Partial: <i>E. ludwigii</i> and <i>E. faecalis</i> no identified to species level.	Right	Right
<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Streptococcus gallolyticus</i>	Partial: <i>M. morganii</i> no identified to species level.	Right	Right
Coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Right	Right	Right
Total	Right: 2/9 (22.2 %) Partial 7/9 (77.8 %)	Right 7/9 (77.8%) Partial 1/9 (11.1 %)	Right 8/9 (88.8 %)

SFC: Sepsis Chip Flow system; ESBL: extended-spectrum beta-lactamase

^aRight: Identification was made correctly: species and gender; Partial: Only the presence of an enterobacteria was identified. The genus and species were unknown; No identification: The identification of the microorganism was not achieved

more helpful, in hospitals without the MALDITOF technique, as SFC is a fast method (around 4 hours) to identify the main microorganisms isolated in blood cultures and some of their resistance mechanisms, while the conventional culture and phenotypic study of resistance usually delays 24–48 hours the diagnostic [17].

Therefore, the present study shows the great clinical usefulness of implementing the new SFC system as complement of the fast microbiological techniques established, while confirming that the multidisciplinary groups responsible for the clinical management of these serious and complex pathologies are essential in today's world [18].

FUNDING

FISABIO Foundation UGP-15-196.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest

REFERENCES

- O'Brien DJ, Gould IM. Maximizing the impact of antimicrobial stewardship. *Curr Opin Infect Dis.* 2013;26(4):352–8.
- Kuehn BM. IDSA: Better, Faster Diagnostics for Infectious Diseases Needed to Curb Overtreatment, Antibiotic Resistance. *JAMA.* 2013;310(22):2385.
- Hagiwara D, Sato K, Miyazaki M, Kamada M, Moriwaki N, Nakano T, et al. The Impact of Earlier Intervention by an Antimicrobial Stewardship Team for Specific Antimicrobials in a Single Weekly Intervention. *Int J Infect Dis.* 2018;77:34–39.
- Wolk DM, Dunne WM. New Technologies in Clinical Microbiology. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9 Supplement):S62–7.

5. Ruiz-Aragón J, Ballester-Téllez M, Gutiérrez-Gutiérrez B, de Cuento M, Rodríguez-Baño J, Pascual Á. Direct bacterial identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry: A systematic review and meta-analysis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018;36(8):484–92.
6. Galiana A, Coy J, Gimeno A, Guzman NM, Rosales F, Merino E, et al. Evaluation of the Sepsis Flow Chip assay for the diagnosis of blood infections. Chang Y-F, editor. *PLoS One*. 2017;12(5):e0177627.
7. Carrara E, Pfeffer I, Zusman O, Leibovici L, Paul M. Determinants of inappropriate empirical antibiotic treatment: systematic review and meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;51(4):548–53.
8. Nimmich EB, Bookstaver PB, Kohn J, Justo JA, Hammer KL, Albrecht H, et al. Development of Institutional Guidelines for Management of Gram-Negative Bloodstream Infections: Incorporating Local Evidence. *Hosp Pharm*. 2017;52(10):691–7.
9. Mwaigwisya S, Assiri RAM, O'Grady J. Emerging commercial molecular tests for the diagnosis of bloodstream infection. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15(5):681–92.
10. Raman G, Avendano E, Berger S, Menon V. Appropriate initial antibiotic therapy in hospitalized patients with gram-negative infections: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2015;15(1):395.
11. Pulido MR, Garcia-Quintanilla M, Martin-Pena R, Cisneros JM, McConnell MJ. Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(12):2710–7.
12. Merino E, Caro E, Ramos JR, Boix V, Gimeno A, Rodríguez JC, et al. Impact of a stewardship program on bacteraemia in adult inpatients. *Rev Esp Quimioter*. 2017;30(4):257–63.
13. Sothoron C, Ferreira J, Guzman N, Aldridge P, McCarter YS, Jankowski CA. A Stewardship Approach To Optimize Antimicrobial Therapy through Use of a Rapid Microarray Assay on Blood Cultures Positive for Gram-Negative Bacteria. Munson E, editor. *J Clin Microbiol*. 2015;53(11):3627–9.
14. Perez KK, Olsen RJ, Musick WL, Cernoch PL, Davis JR, Peterson LE, et al. Integrating rapid diagnostics and antimicrobial stewardship improves outcomes in patients with antibiotic-resistant Gram-negative bacteremia. *J Infect*. 2014;69(3):216–25.
15. Delport JA, Strikwerda A, Armstrong A, Schaus D, John M. MALDI-ToF short incubation identification from blood cultures is associated with reduced length of hospitalization and a decrease in bacteremia associated mortality. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(7):1181–6.
16. Rivard KR, Athans V, Lam SW, Gordon SM, Procop GW, Richter SS, et al. Impact of antimicrobial stewardship and rapid microarray testing on patients with Gram-negative bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(10):1879–87.
17. Cantón R, Gómez G, de la Pedrosa E. Impacto económico de los métodos de diagnóstico rápido en Microbiología Clínica: precio de la prueba o impacto clínico global. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35(10):659–66.
18. Dik J-WH, Poelman R, Friedrich AW, Panday PN, Lo-Ten-Foe JR, Assen S van, et al. An integrated stewardship model: antimicrobial, infection prevention and diagnostic (AID). *Future Microbiol*. 2016;11(1):93–102.

Marta García-Queiruga¹
Begoña Feal Cortizas¹
Fernando Lamelo Alfonsín²
Sonia Pertega Díaz³
Isabel Martín-Herranz¹

Continuous infusion of antibiotics using elastomeric pumps in the hospital at home setting

¹Servicio de Farmacia. Complejo Hospitalario Universitario A Coruña. Spain

²Servicio de Hospitalización a Domicilio. Complejo Hospitalario Universitario A Coruña.

³Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Universitario A Coruña.

Article history

Received: 15 October 2020; Revision Requested: 23 November 2020; Revision Received: 12 December 2020; Accepted: 11 January 2021; Published: 16 March 2021

ABSTRACT

Introduction. To describe the avoided costs and to analyze the effectiveness of intravenous antibiotic treatment in continuous perfusion in patients at Hospital at Home Units (HHU) administered using elastomeric infusion pumps (EIP) prepared in a Hospital Pharmacy Service (HPS).

Materials and methods. Retrospective observational study of the number and type of EIP prepared in the HPS and of the treated patients. Study period: January 2017–December 2018. Analyzed data: demographic data of patients, location of infection, responsible microorganism, medication and type of EIP, dose and duration of treatment and its effectiveness in terms of cure or non-cure or patient's death. Economic valuation considering: costs of EIP, nursing time needed for preparation and cost of HHU care.

Results. A total of 1,688 EIP to treat 102 patients resulted in 106 episodes of outpatient treatment of parenteral antibiotic therapy (OPAT) for 1,409 days, thereby avoiding 1,409 days of hospital admission. A total of 59.8% of the patients were men and the mean age was 70.5 ± 17 years. A 31.1% and 68.9% of the cases were empirical and pathogen-directed treatments, respectively. The most used antimicrobials were piperacillin/tazobactam (42.7%), ceftazidime (24.5%), meropenem (19.8%), ceftolozane/tazobactam (2.8%), and cloxacillin (1.9%). Mean duration of treatment was 13.29 ± 8.60 days. Location of infection: respiratory (42.5%), urinary (17.9%), skin and soft tissue (12.3%), bacteraemia (11.3%), osteomyelitis (7.5%), abdominal (3.8%) and 4.7% in other locations. The cure rate was 84%. Total avoided cost: 580,788.28€ in the 24 months studied.

Conclusion. This program represents very important economic savings for the health system, and the effectiveness of the antibiotic treatment has not been compromised.

Key words: Elastomeric infusion pumps, Hospital at Home Units, OPAT.

Utilización de infusores elastoméricos de antibióticos en Hospitalización a Domicilio

RESUMEN

Objetivo. Describir los costes evitados y analizar la efectividad del tratamiento con antibióticos por vía intravenosa en perfusión continua en pacientes en unidades de Hospitalización a Domicilio (HD) administrados con bombas de infusión elastoméricas (BIE) preparadas en un Servicio de Farmacia Hospitalaria (SFH).

Método. Estudio observacional retrospectivo del número y tipo de BIE preparados en el SFH y pacientes tratados entre enero 2017 y diciembre 2018. Los datos analizados fueron: datos demográficos de pacientes, localización de la infección, microorganismo, medicación y tipo de BIE, dosis y duración del tratamiento y efectividad en términos de curación o no curación o muerte. Valoración económica: coste de BIE, tiempo de enfermería necesario para la preparación y coste de la atención en HD.

Resultados. Se analizaron 1.688 BIE preparados para tratar 102 pacientes que resultaron en 106 episodios de tratamiento ambulatorio durante 1.409 días, evitando así 1.409 días de ingreso hospitalario. El 59,8% de los pacientes eran hombres y la edad media $70,5 \pm 17$ años. El 31,1% de los tratamientos fueron empíricos versus 68,9% dirigidos por patógeno. Los antimicrobianos más empleados fueron piperacilina-tazobactam (42,7%), ceftazidima (24,5%), meropenem (19,8%), ceftolozano-tazobactam (2,8%) y cloxacilina (1,9%). La duración media del tratamiento fue de

Correspondence:
Marta García-Queiruga.
Servicio de Farmacia. Complejo Hospitalario Universitario A Coruña.
C/ As Xubias 84, 1ª planta. 15006 A Coruña. Spain
Phone: +34 981 176480
E-mail: marta.garcia.queiruga@sergas.es

13,29 \pm 8,60 días. Localización de la infección: respiratorias (42,5%), urinarias (17,9%), piel y partes blandas (12,3%), bacteriemias (11,3%), osteomielitis (7,5%), abdominales (3,8%) y un 4,7% en otras localizaciones. La tasa de curación del 84%. El coste total evitado fue de 580.788,28€ durante los 24 meses de estudio.

Conclusiones. Este programa representa un ahorro económico muy importante para el sistema de salud, y la efectividad del tratamiento con antibióticos no se ha visto comprometida.

PALABRAS CLAVE: Infusores elastoméricos, hospitalización a domicilio, TADE.

INTRODUCTION

The outpatient treatment of parenteral antibiotic therapy (OPAT) is defined as the administration of parenteral treatments to patients not admitted at hospital, with duration of at least two doses on different days. It constitutes alternative care to hospital admission in patients with infectious pathology and in Spain it is usually done by the Hospital at Home Units (HHU).

The administration of intravenous antimicrobials at home was first described in 1974 in children with cystic fibrosis [1], and has grown rapidly as an alternative to hospitalization. Several factors have contributed to this growth, such as the containment of costs, the development of antimicrobials that can be administered once or twice a day, advances in vascular access, development of new administration systems, acceptance and/or patients' and health professionals' preference, among others [2].

Recent systematic reviews have described more than 60,000 episodes of OPAT, without finding differences in the duration of treatment or adverse effects compared with hospitalized patients. Another favorable aspect identified by patients is the perception of greater well-being when staying at home instead of hospitalisation and the increase in free time and autonomy [3].

A large variety of infections have been treated with OPAT, these being the most frequent complicated soft tissue infections, namely osteomyelitis, complicated urinary tract infection, endocarditis and bacteremia [4].

As key points in the OPAT, a basic requirement is a health team with adequate experience, such as the HHU, which allows outpatient treatment and control of serious and complex situations, such as infectious processes, which often require an extension of the hospital stay, requiring long intravenous treatments without an effective oral alternative. Without these, HHU patients should remain hospitalized [5]. Another important aspect is the design of devices for infusion, such as portable programmable pumps or elastomeric infusion pumps (EIP), which allow effective and safe infusion of most antimicrobials. The EIP offer, as additional advantages, the ease of handling; they are light, silent and they do not require an external power supply for their operation, allowing total mobility of the patient and facilitating their return to work, family and social life. The main limitations are predetermined

flows, restrictions in the diluent, variability in the duration of the infusion, absence of warning alarms in case of occlusions and stability data of home conditions [6]. It is important to know that the flow rate of the EIP can be affected by several factors such as the variation in temperature, the position it is placed during its administration with respect to the patient's vascular access, viscosity, filling volume and storage temperature. Differences in flow rate have been described between clinical practices in relation to calibration conditions of up to 50%. This could cause a lack of clinical response or prolonged or too rapid duration of infusions [7].

Another facilitator aspect is the administration of beta-lactam antibiotics in prolonged perfusion. In observational studies clinical benefit is shown in certain situations, without adverse effects.

It has been seen that the emergence of resistance to antibiotics such as piperacillin/tazobactam or meropenem was not related to the mode of administration [8].

The preparation of EIP in laminar flow cabinets is essential to guarantee the absence of microbiological contamination when preparing doses for several days. In addition, a shorter time of dose preparation has been demonstrated in the pharmacy service compared to nursing units [9]. The involvement of the pharmacy service is essential in aspects such as: antibiotic stability times, adverse effects, interactions, pharmacokinetic monitoring, dilution volumes depending on the maximum possible concentration, stability at room temperature or refrigerated, selection of the most suitable device for the patient, registration of incidents, etc. [10].

The central axis of the OPAT process is the patient, and both they and their caregiver must be properly informed, know the management of the infusion technique in case of self-administration, and understand the benefits, risks and possible complications of OPAT, as well as recognize the complications derived and the action required in case of occurrence. This aspect is very relevant since some authors found that OPAT produces anxiety in patients [11].

The aim of this paper is to describe the avoided costs and to analyze the effectiveness of intravenous antibiotic treatment in continuous perfusion in patients with HHU administered using EIP prepared in the Hospital Pharmacy Service (HPS).

MATERIAL AND METHODS

A retrospective observational study was conducted on the number and type of EIP for continuous perfusion of antibiotics prepared in a HPS and of the patients treated during the period January 2017-December 2018 by HHU.

All the patients who were treated with antibiotics administered intravenously in continuous perfusion by EIP and in the care of the HHU were included in the study. The main criterion for the administration of antibiotics was that the patient did not have a caregiver with sufficient capacity

or availability of time for the administration of the antibiotic according to the corresponding time schedule.

Patients who received OPAT using EIP in intermittent infusion and those who were not managed by the HHU were excluded from the study.

Demographic data of the treated patients, localization of the infection, responsible microorganism, medication and type of EIP used, dose and duration of the treatment and its effectiveness in terms of cure of the infection, non-cure or patient's death have been analyzed.

For the economic valuation, several items have been considered: costs of the EIP, nursing time needed for their preparation and cost of HHU care, which includes cost of transport and cost of all sanitary care.

These data have been compared with the avoided cost corresponding with the days of hospital admission.

The cost of the medication has not been included since it was considered the same whether the patient remains hospitalized or goes home. Neither the physician nor pharmacist's work time has been analyzed considering it equivalent in either hospital admissions or management by HHU.

As the basis for the calculation of hospital admission costs, the regional normative has been considered [12], according to which a day of home hospitalization cost €80.70, and the cost per hospital admission day is €528.95.

In addition, according to the regional normative [13] to estimate the costs of nursing work needed for the preparation of the EIP, it has been considered that €15.81 per hour is around the cost incurred and it has been estimated that a nurse prepares an average of 10 EIP per hour.

The EIP used were manufactured by Baxter Healthcare Corporation for those of 24-hour duration (120 ml volume and flow rate of 5 ml/h; with 240 ml volume and a flow rate of 10 ml/h), and Dosi-Fuser Leventon (240 mL volume and flow rate of 20 ml/h). Stability information provided was based on stability data of each medication in the refrigerator and at room temperature. The HHU nurse goes daily to the patient's home to change the EIP.

The unit cost of the EIP was €29.70 for the 12-hour devices (2 required per day: daily cost of treatment €59.40), €32.89 for the 120 ml/24-hour devices and €25.63 for the 240 ml/24-hour devices, therefore, the average cost per day of treatment with EIP of around €39.30 (range €25.63-59.40/day).

The clinical data have been obtained from the patient's electronic medical records at the end of treatment and 30 days after. The cure rate, hospital readmission, relapse of the infection and cases of death have been evaluated.

A descriptive analysis of the collected data was carried out. The qualitative variables are described as frequencies and percentages, the quantitative variables as mean, standard deviation, median and range. The cure rate according to the

treatment received was compared with the chi-squared test, and the duration of treatment using the Mann-Whitney test. Average savings per patient were compared using Wilcoxon's signed Rank test.

RESULTS

A total of 1,688 EIP were prepared to treat 102 patients, which resulted in 106 episodes of OPAT for 1,409 days. These avoided 1,409 days of hospital admission.

Four patients received two cycles of antibiotic treatment during this period.

168.8 hours of nursing work were required in the pharmacy service for preparing the EIP in aseptic and validated conditions.

Economic results. The antibiotics prepared in EIP, dose, type of device, number of patients treated, days of treatment and costs of EIP and nursing work are shown in Table 1.

The cost of hospitalization at home was €113,706.3 and the cost of the 1,688 EIP, not considering the medication, was €48,127.25.

The estimated cost of 1 month of antibiotic treatment when performed by hospital admission was €15,867.37, and by HHU it was €1,024.64. Such difference between both modalities corresponds mostly by the great difference of the value of the stay in both services.

The estimated avoided cost for 1,409 days of hospital admission was €745,290.55.

Regarding these data, it was estimated that the total avoided cost when performing OPAT using EIP instead of with the patient admitted, was €580,788.28 for the 24 months of the study period.

The mean cost per patient in HHU was found to be 1,696.4 ± 1,284.4 euros, with a median of €1,419.4 and a range of €318.3 to 9,548.3. The mean cost per patient in hospital admission would be 7,031.0 ± 4551.0 euros, with a median of €6,347.4, and a range of 1,057.9 to 32,365.9 euros.

Thus, the average savings per patient would be 5,334.6 ± 3,690.6 euros, with a median of 4,630.3 euros (range: -973.0; 25,677.3). The significance value (Wilcoxon's signed Rank test, $p < 0.001$).

Clinical results. Demographic and clinical data of the patients who received OPAT with EIP during this period are detailed in Table 2.

59.8% of the patients were men and the mean age was 70.5 ± 17 years (range 19-100 years).

In 31.1% of the treatments performed were empirical versus 68.9% with directed treatment after identifying the microorganisms responsible for the infection.

The antimicrobials used were piperacillin/tazobactam in 42.7% of cases, meropenem in 19.8%, ceftazidime in 24.5%, ceftolozane/tazobactam in 2.8% and cloxacillin in 1.9%

followed by ampicillin, aztreonam, cefazolin and cefepime in 0.9% of cases each.

For the group of empirically treated cases, 60.6% of the treatments were performed with piperacillin/tazobactam, 27.3% with meropenem and 12.1% with ceftazidime.

Regarding the location of the infection, 42.5% of the cases were respiratory infections, followed by 17.9% urinary infections, 12.3% skin and soft tissue infections, 11.3% bacteremia, 7.5 % osteomyelitis, 3.8% abdominal infections and 4.7% other locations.

The rate of cases treated empirically corresponds to 66.7% of respiratory infections, 9.1% of skin and soft tissue infections, 6.1% of urinary, abdominal and other infection locations, as well as 3% of bacteremia and osteomyelitis.

In relation to the microorganisms responsible for the infection, *Pseudomonas aeruginosa* was isolated in a microbiological culture in 40.6% of the cases, *Klebsiella pneumoniae* OXA-48 in 5.7%, *Klebsiella* spp. in 1.9%, Gram-positive cocci in 11.3%, and other Gram-negative bacilli in 9.4% of cases.

In relation to the duration of treatment, the mean number of treatment days was 13.29 ± 8.60 (range 2-61 days). In the analysis by groups, for the empirically treated cases, the days of treatment averaged 11.31 ± 6.90 days, while in the group of targeted treatments it was 14.18 ± 9.17 days. There were no statistically significant differences in the duration of treatment

for cases treated empirically versus directed ($p=0.75$). Although the respiratory infection required fewer days of treatment compared to the rest of the infections (11.9 vs 19.1), no statistically significant differences were found ($p=0.21$).

Depending on the location of the infection, the duration of treatment is detailed in Table 3. Osteomyelitis required a longer period of antibiotic treatment, with a mean of 24.87 ± 17.19 days of treatment, followed by skin and soft tissue infections with 17.15 ± 9.34 days, other locations with 13.90 ± 6.94 days, abdominal infections with 14.12 ± 6.78 days and respiratory infections with 10.55 ± 5.21 days, and urinary infections with 11.36 ± 7.03 days of treatment.

Considering the therapeutic efficacy, a cure rate of 84% has been observed. 3.8% of cases required hospital readmission due to poor evolution, 2.8% required treatment change and 9.4% ended in death (two cases due to poor outcomes of the infectious process in elderly patients with multiple pathologies, one due to ovarian cancer and one due to chronic lymphatic leukaemia). It was observed that there were clinical differences in mortality in the group of patients aged 79 years or older (nine patients died), however, no statistically significant differences were found in the age group <70 years.

When comparing empirically treated patients with pathogen-directed treated, no statistically significant differences were observed in terms of cure ($p=0.867$).

Table 1 Elastomeric infusion pumps for continuous perfusion prepared in 2017 and 2018.

Antimicrobial	Dose	EIP type (volume/duration)	Nº patients	Days of treatment	EIP cost (€)	Nursing work time (h)/cost (€)
Ampicillin	6 g/12 h	240 ml/12 h	1	9.5	564.30	1.9/30.04
Aztreonam	6 g/24 h	240 ml/24 h	1	7	179.41	0.7/11.07
Cefazolin	3 g/24 h	120 ml/24 h	1	13	427.57	1.3/20.55
Cefepime	8 g/24 h	120 ml/24 h	1	18	592.02	1.8/28.46
Ceftazidime	6 g/24 h	120 ml/24 h	24	304	9998.56	30.4/480.62
	8 g/24 h	240 ml/24 h	2	39	999.57	3.9/61.66
Ceftolozane-tazobactam	6 g/24 h	240 ml/24 h	1	21	538.23	2.1/33.20
	3 g/12 h	240 ml/12 h	2	22	1306.8	4.4/69.56
Cloxacillin	12 g/24 h	240 ml/24 h	2	31	794.53	3.1/49.01
Meropenem	1 g/12 h	240 ml/12 h	1	245	14553	49/774.69
	1,5 g/12 h	6 (2 patients received 2 cycles)				
	3 g/12 h		12			
Piperacillin-tazobactam	16 g/24 h	240 ml/24 h	3	677	17351.51	67.7/1070.34
	12 g/24 h	42 (2 patients received 2 cycles)				
	9 g/24 h	120 ml/24 h	2	25	822.25	2.5/39.52
	6 g/24 h		1			
TOTAL			102	1,409	48,127,25	168.8/2,668.72

Table 2	Demographic and clinical data
Age	Mean 70,5±17 years (range 19–100) Median 73,0 years
Sex	Nº cases
Men	61
Women	45
Location of the infection	Nº cases
Bacteraemia	12
Skin and soft tissue infection	13
Abdominal infection	4
Respiratory infection	45
Urinary infection	19
Osteomyelitis	8
Endocarditis	2
Central nervous system infection	1
Other	3
Pathogen-directed treatments (bacteria isolated in microbiologic culture)	Nº cases with isolations
<i>Klebsiella pneumoniae</i> OXA-48	5
<i>Klebsiella</i> spp.	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
Other Gram-negative bacilli (<i>Proteus</i> spp., <i>Morganella morganii</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Escherichia coli</i>)	10
Gram-positive cocci (<i>Staphylococcus</i> spp. and <i>Streptococcus</i> spp.)	12
Empirical treatments (nº cases)	33

DISCUSSION

This article describes the economic and clinical results of patients who received OPAT in continuous perfusion, using EIP managed by HHU. We have selected the administration of the antibiotic in prolonged perfusion (infusion in 24 hours at constant flow rate) for various reasons, among which it stands out that it allows reconciliation of the placement of the EIP and administration of the antibiotic with the visit of the HHU staff to the domicile. The 24-hour administration allows the nursing staff to change the device without requiring the patient's or family's intervention. In addition, a meta-analysis has shown that continuous perfusion of carbapenems and piperacillin/tazobactam was associated with lower mortality when compared to intermittent perfusion administration [14], and in the case of beta-lactams, reaching higher plasma concentrations than intermittent administration [15].

Although the use of ampicillin in the outpatient setting has been traditionally avoided due to its short half-life and short stability in solution, recent data support the safe and effective administration by continuous infusion in the community [16–18]. In addition, for ampicillin, the purpose of

continuous administration in our patients is justified thanks to the greater comfort for the patient and also allows the patient to be admitted to the HHU, since with the usual interval of administration every 4 or 6 hours it would not be possible.

The preparation of the EIP was performed in all cases centrally in the pharmacy service under aseptic conditions, in order to prevent potential harm to the patient due to microbiological contamination, excessive content of endotoxins in the mixture, or errors in the preparation. These aspects are especially relevant because the medication is dispensed to be administered in the patient's home [19].

For ampicillin and ceftolozane/tazobactam for the 24-hour infusion, it was necessary to use two EIP a day of 12 hours' duration for reasons of stability related with concentration. In the case of meropenem, two EIP of 12 hours' duration were used every day due to the instability of meropenem at room temperature [20].

Regarding the economic results and assuming that the duration of the treatment is the same whether the patient was admitted to the hospital or in HHU, the use of home EIP in the study period of 24 months avoided the use of 1409 hospital bed days, which meant a decrease in costs for the health

Table 3
Duration of antibiotic treatment at home considering the location of the infection.

Location of infection	Mean (days)	Standard deviation	Median
Respiratory	10.55	5.21	10.00
Bacteraemia	14.16	6.78	14.00
Skin and soft tissue	17.15	9.34	16.00
Urinary	11.37	7.30	10.00
Abdominal	14.12	6.78	11.75
Osteomyelitis	24.87	17.09	20.00
Other	13.90	6.94	15.00
Total	13.29	8.60	12.00

system of 77.92%. The great difference between the costs per day of hospitalization compared to stay at home (€528.95 versus €80.70 respectively) stands out. González Ramallo *et al.* found that the cost of each episode of hospital at home hospitalization was 80% less than that of hospitalization [21], which is consistent with our series. Some authors have argued that OPAT could reduce health costs mainly due to the reduction of days of hospital stay. A reduction of 47% in hospital costs has been found, and other authors have identified a saving of 7394 days of hospital stay over a period of 44 months, which was related to potential savings of 1.5 million pounds [22,23]. The number of bed days saved represents an additional advantage for the hospital by not blocking beds, or the need for using measures to prevent the transmission of nosocomial infections often caused by multi-resistant microorganisms that require the patient's isolation.

Concerning the type of infection, these results show that many infectious processes can be treated in the context of HHU, the most frequent being, in our case, respiratory and urinary infections (45% and 17.6%) which agrees with the research of Mirón-Rubio *et al.*, where these infections represent 72% of their series [24] and in contrast with other publications in which bone infection and skin and soft tissue infections were the most frequent [25]. Respiratory infection presents a more unpredictable clinical course, and an increased risk of complications, which is why close monitoring by HHU professionals is necessary, closely assessing patients.

The average age of our patients was 70.5 years, which reflects an ageing population group, with 35% of patients aged 80 years or older, older than the cohorts studied in other research [26]. The therapeutic success in curing the infectious process was 84%, with a readmission rate at 30 days of 3.4%. A mortality of 9.4% (10 patients) has been observed, although in three patients this was due to complications of their basal disease and the rest due to important comorbidities. Nine of the 10 deaths occurred in the population group over 70 years. Other authors have described cure rates ranging from 72.5% to 95% [25]. In a recently published study also using

EIP in continuous perfusion [27], 92% cure rates are described. However, the average age of this group was 59 years, which probably indicates a population without multiple comorbidities and absence of multi-resistant bacteria.

There is a trend towards an increase in the number of patients and the number of EIPs prepared in 2017 compared to 2018 (39 patients, 579 infusers versus 67 patients and 1109 infusers respectively), which gives an idea of the satisfaction of the health staff and the good operation of the procedure.

Some limitations of this study are that the patient or the home care team has not evaluated the satisfaction of the procedure and also that neither catheter complications in hospital admission nor in HHU have been evaluated. Another limitation could be that for the calculation of costs of the health system, the cost of readmission and retreatment has not been evaluated.

As a conclusion of this work, we can say that this procedure represents a very important economic saving for the health system, and the effectiveness of the antibiotic treatment has not been compromised.

The OPAT in continuous perfusion and the collaboration of the Pharmacy Service and Hospital at Home Units allows a type of safe, effective and efficient health care, allowing the patient to achieve a more adequate recovery with his family and social environment, avoiding complications of a diverse nature that the conventional hospital admission supposes.

FUNDING

None to declare.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest

REFERENCES

1. Rucker RW, Harrison GM. Outpatient intravenous medications in the management of cystic fibrosis. *Pediatrics*. 1974;54:358-60. PMID: 4213282
2. Tice AD. Practice Guidelines for outpatient parenteral antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis*. 2004;38:1651-72. doi: 10.1086/420939
3. Mitchell E, Czoski Murray C, Meads D, Minton J, Wright J, Twiddy M. Clinical an cost-effectiveness, safety and acceptability of community intravenous antibiotic service models: CIVAS systematic review. *BMJ Open* 2017;7:e013560. doi:10.1136/bmjopen-2016-013560
4. Chapman AL. Outpatient parenteral antimicrobial therapy. *BMJ*. 2013;346:f1585. doi: 10.1136/bmj.f1585
5. González Ramallo V, Valdivieso B, Ruiz V. Hospitalización a Domicilio. *Med Clin*. 2002;118:659-64. doi: 10.1016/s0025-7753(02)72488-3
6. Baxter Corporation. Baxter-Elastomeric-Pumps-Clinician-Guide

2011. [Access 13 December 2019] Available from: <https://www.capca.ca/wp-content/uploads/Baxter-Elastomeric-Pumps-Clinician-Guide11.pdf>.
7. Hobbs JG, Ryan MK, Ritchie B, Sluggett JK, Sluggett AJ, Ralton L, et al. Protocol for a randomised crossover trial to evaluate patient and nurse satisfaction with electronic and elastomeric portable infusion pumps for the continuous administration of antibiotic therapy in the home: the Comparing Home Infusion Devices (CHID) study. *BMJ Open* 2017;7:e016763. doi:10.1136/bmjopen-2017-016763
 8. Dhaese SAM, De Kezel M, Callant M, Boelens J, De Bus L, Depuydt P, et al. Emergence of antimicrobial resistance to piperacillin/tazobactam or meropenem in the ICU: Intermittent versus continuous infusion. A retrospective cohort study. *J Crit Care*. 2018; 47:164–168. doi: 10.1016/j.jcrc.2018.07.003
 9. Cuesta-Lopez I, Sánchez-Cuervo M, Candela-Toha A, Benedi-González J, Bermejo-Vicedo T. Impact of the implementation of vasoactive drug protocols on costs in the treatment of critically ill patients. *Farm Hosp*. 2018; 42(2):62–67. doi: 10.7399/fh.10844
 10. Ruiz-Campuzano M, García-Vázquez E, Hernández-Roca JJ, Gómez-Gómez J, Canteras-Jordana M, Mené-Fenor E, et al. Design and implementation of an outpatient parenteral antimicrobial therapy program in primary care: the experience at a second level hospital. *Rev Esp Quimioter*. 2017;30(1):19–2730. PMID: 27898208
 11. Bamford KB, Desai M, Aruede MJ, Lawson W, Jacklin A, Dean Franklin B, et al. Patient's views and experience of intravenous and oral antimicrobial therapy: room for change. *Injury*. 2011;42(Suppl 5):S24:S2742. doi: 10.1016/S0020-1383(11)70129-2
 12. DECRETO 56/2014 de 30 de abril, por el que se establecen las tarifas de los servicios sanitarios prestados en los centros dependientes del Servicio Gallego de Salud y en las fundaciones públicas sanitarias. [Access 13 December 2019] Available at: https://www.xunta.gal/dog/Publicados/2014/20140521/AnuncioC3K1-140514-0001_es.html
 13. ORDEN de 10 de febrero de 2017 por la que se dictan instrucciones sobre la confección de nóminas del personal al servicio de la Administración autonómica para el año 2017 [Access 13 December 2019] Available at: https://www.xunta.gal/dog/Publicados/2017/20170215/AnuncioCA01-100217-0004_es.html
 14. Falagas ME, Tansarli GS, Ikawa K, Vardakas KZ. Clinical outcomes with extended or continuous versus short-term intravenous infusion of carbapenems and piperacillin/tazobactam: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2013;56(2):272–82. doi: 10.1093/cid/cis857.
 15. Dulhunty JM, Roberts JA, Davis JS, Webb SA, Bellomo R, Gomersall C, et al. Continuous infusion of beta-lactam antibiotics in severe sepsis: a multicenter double-blind, randomized controlled trial. *Clin Infect Dis*. 2013;56(2):236–44. doi: 10.1093/cid/cis856.
 16. Lewis PO, Jones A, Amodei RJ, Youssef D. Continuous Infusion Ampicillin for the Outpatient Management of Enterococcal Endocarditis: A Case Report and Literature Review. *Journal of Pharmacy Practice*. 2020;33(3):392–394. doi:10.1177/0897190018804964
 17. Gil-Navarro, MV, Lopez-Cortes, LE, Luque-Marquez, R, Galvez-Acebal, J, de Alarcon-Gonzalez, A. Outpatient parenteral antimicrobial therapy in *Enterococcus faecalis* infective endocarditis. *J Clin Pharm Ther*. 2018; 43: 220– 223. doi: 10.1111/jcpt.12635
 18. Parsonson F, Legg A, Halford M, McCarthy K. Contemporaneous management of ampicillin infusions in the outpatient setting through the use of therapeutic drug monitoring. *International J Antimicrob Agents*. 2020; 55: 105975. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105975.
 19. USP 797 Guidebook to pharmaceutical compounding sterile preparations. In USP Pharmacists Pharmacopeia 2008–2009. 2nd ed. Bethesda MD. American Society of Health-System Pharmacists 2008
 20. Manning L, Wright C, Ingram PR, Whitmore TJ, Heath CH, Manson I, et al. Continuous infusions of meropenem in ambulatory care: clinical efficacy, safety and stability. *PLoS One*. 2014;9(7):e102023. doi: 10.1371/journal.pone.0102023. eCollection 2014
 21. González-Ramallo VJ, Mirón-Rubio M, Mujal A, Estrada O, Forné C, Aragón B, et al. Costs of outpatient parenteral antimicrobial therapy (OPAT) administered by Hospital at Home units in Spain. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;50(1):114–118. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.02.017..
 22. Chapman AL, Dixon S, Andrews D, Lillie PJ, Bazaz R, Patchett JD. Clinical Efficacy and cost-effectiveness of outpatient parenteral antibiotic therapy (OPAT): a UK perspective. *Clinical Efficacy and cost-effectiveness of outpatient parenteral antibiotic therapy (OPAT): a UK perspective*. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64:1316:2464. doi: 10.1093/jac/dkp343.
 23. Hitchcock J, Jepson AP, Main J, Wickens HJ. Establishment of an outpatient and home parenteral antimicrobial therapy service at a London teaching hospital: a case series. *J Antimicrobial Chemother*. 2009; 64:630–464. doi: 10.1093/jac/dkp212.
 24. Mirón-Rubio M, González-Ramallo V, Estrada-Cuxart O, Sanroma-Mendizábal P, Segado-Soriano A, Mujal-Martínez A, et al. Intravenous antimicrobial therapy in the hospital-at-home setting: data from the Spanish Outpatient Parenteral Antimicrobial Therapy Registry. *Future Microbiol*. 2016; 11(3):375–90. doi: 10.2217/fmb.15.141.
 25. MacKenzie M, Rae N, Nathwani D. Outcomes from global adult outpatient parenteral antimicrobial therapy programmes: a review of the last decade. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;43(1):7–16. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.09.006..
 26. Barr DA, Semple L, Seaton RA. Outpatient parenteral antimicrobial therapy (OPAT) in a teaching hospital-based practice: a retrospective cohort study describing experience and evolution over 10 years. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39(5):407–13. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.01.016.
 27. Voumard R, Gardiol C, André P, Arensdorff L, Cochet C, Boillat-Blanco N, et al. Efficacy and safety of continuous infusions with elastomeric pumps for outpatient parenteral antimicrobial therapy (OPAT): an observational study. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(9):2540–2545. doi: 10.1093/jac/dky224.

Cristina García-Salguero¹
Esther Culebras²
Adela Álvarez-Buylla¹
Iciar Rodríguez-Avial¹
Alberto Delgado-Iribarren²

Utilidad de MALDI-TOF y REP-PCR frente a PFGE para el estudio epidemiológico de *Acinetobacter baumannii*

¹Servicio de Microbiología Hospital Universitario Clínico San Carlos, IdISCC e IML, Madrid.

²Servicio de Microbiología Hospital Universitario Clínico San Carlos, IdISCC, IML y Universidad Complutense, Madrid.

Article history

Article history: Received 24 November 2020; Revision Requested: 4 December 2020; Revision Received: 15 February 2021; Accepted: 15 February 2021; Published: 8 April 2021

RESUMEN

Objetivo. Evaluar la capacidad de MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted Laser Desorption-Ionization Time Of Flight*) y rep-PCR para discriminar diferentes clones de *Acinetobacter baumannii*.

Material y métodos. Se incluyeron en el estudio 21 aislados de *A. baumannii* con diferentes características epidemiológicas y fenotípicas. Todas las muestras se analizaron en paralelo por MALDI-TOF MS y rep-PCR y los espectros obtenidos se compararon entre ellos y con los resultados obtenidos mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE). Se consideró que los aislados con una similitud igual o superior al 87% formaban parte del mismo grupo clonal.

Resultados. El análisis de los 21 aislados incluidos en el estudio, dio lugar a 9 grupos clonales en PFGE, 3 grupos en MALDI-TOF MS y 7 grupos en el análisis mediante rep-PCR. Los aislados que formaban los diferentes grupos por las 3 técnicas utilizadas eran totalmente diferentes, por lo que se puede concluir que no hay equivalencia entre los resultados obtenidos con los tres métodos de tipado utilizados.

Conclusiones. A pesar de su simplicidad ni MALDI-TOF MS ni rep-PCR pueden sustituir en este momento al PFGE para el estudio epidemiológico de *A. baumannii*.

Palabras clave: *A. baumannii*, carbapenemasa, epidemiología, MALDI-TOF MS y rep-PCR.

Usefulness of MALDI-TOF and REP-PCR against PFGE for the epidemiological study of *Acinetobacter baumannii*

ABSTRACT

Objective. To evaluate the ability of MALDI-TOF MS and rep-PCR to discriminate *Acinetobacter baumannii* clones.

Material and methods. A total of 21 strains of *A. baumannii* with different epidemiological and phenotypic characteristics were included in the study. All isolates were analyzed in parallel by MALDI-TOF MS and rep-PCR and the spectra obtained were compared with each other and with the results obtained by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Isolates with a similarity equal to or greater than 87% were considered to be part of the same clonal group.

Results. The analysis of the 21 isolates included in the study, resulted in 8 clonal groups using PFGE, 3 groups by MALDI-TOF MS and 7 groups by rep-PCR analysis. The isolates that formed the different groups by the 3 techniques used were totally different, so it can be concluded that there is no equivalence between the results obtained with the three typing methods used.

Conclusions Despite its simplicity, neither MALDI-TOF MS nor rep-PCR can at this time replace PFGE for the epidemiological study of *A. baumannii*.

Key-words: *A. baumannii*, carbapenemase, epidemiology, MALDI-TOF MS and rep-PCR.

INTRODUCCIÓN

La infección nosocomial es uno de los principales problemas sanitarios en todo el mundo y supone una causa importante de morbi-mortalidad, aumento de los días de ingreso y por tanto de los costes. Afecta al 5-10% de los pacientes ingresados y un porcentaje elevado de las mismas es evitable [1,2].

Correspondencia:
Cristina García Salguero
Servicio de Microbiología Hospital Universitario Clínico San Carlos.
Calle Profesor Martín Lagos s/n, 28040, Madrid
E-mail: crigarsal@gmail.com

Todos los patógenos pueden estar implicados en las infecciones nosocomiales, sin embargo los problemas más graves se circunscriben a un número reducido de especies. Entre estos patógenos nosocomiales, *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos merece especial atención por su capacidad de propagación y escaso arsenal terapéutico disponible para su tratamiento. Por ello, el 27 de Febrero de 2017, la OMS publicó una lista de patógenos prioritarios para promover el desarrollo I+D de nuevos antibióticos en la que ha situado a *A. baumannii* resistente a carbapenémicos como prioridad 1, crítica [3].

El método más eficaz para la prevención y el correcto manejo de la infección nosocomial pasa por el diseño, desarrollo y validación de las técnicas microbiológicas para la detección precoz de los patógenos nosocomiales y el tipado de las cepas implicadas con objeto de determinar su relación epidemiológica [4].

La electroforesis en campo pulsado (PFGE) es considerada actualmente el "gold standard" para la tipificación bacteriana. Esta técnica permite separar fragmentos de ADN de elevado peso molecular incluidos en un gel de agarosa mediante la alternancia de un campo eléctrico entre diferentes pares de electrodos. Esta y otras técnicas de las que se dispone actualmente, aunque útiles, son muy laboriosas. Por ello, el desarrollo de métodos simples y eficaces que permitan agilizar estos procesos es prioritario.

La espectrometría de masas MALDI-TOF MS, se ha utilizado durante años en el campo de la química, pero no ha sido hasta mediados de los años 70 cuando se ha empezado a introducir en la microbiología. En la actualidad se emplea en un número creciente de laboratorios en España para la identificación bacteriana. El número de especies bacterianas que pueden identificarse es cada vez más amplio. Actualmente es posible distinguir entre *A. baumannii* y las diferentes especies que constituyen el complejo *A. baumannii*-*A. calcoaceticus*, las cuales pueden estar también implicadas en infección nosocomial. La distinción de las especies es muy importante ya que el perfil de resistencias es muy diferente entre unas y otras.

Aunque la aplicación mencionada es la más extendida del sistema, la espectrometría de masas MALDI-TOF MS tiene otras posibles aplicaciones en el campo de la microbiología entre las que cabe destacar: la detección de resistencia a antibióticos y la tipificación molecular [4].

En este sentido, la rapidez con la que la espectrometría de masas es capaz de analizar los aislados bacterianos hace que, a priori, aparezca como una herramienta interesante en este último campo. La aplicación de esta técnica en los estudios de tipado se basa en el uso de un algoritmo que determina la relación existente entre determinaciones individuales de cada aislado. Los distintos espectros se representan en forma de dendograma donde la distancia entre los distintos brazos está directamente relacionada con la similitud entre los espectros y, por tanto, la similitud entre los aislados. Esta aplicación está en fase de desarrollo y el número de estudios al respecto sigue aumentando.

Otro método de tipificación molecular muy utilizado en los brotes es la rep-PCR. Esta técnica utiliza cebadores que hibri-

dan con secuencias específicas de ADN repetitivas (secuencias rep), de función desconocida, que se encuentran dispersas por el genoma de muchas bacterias. Existen 3 tipos de familias de secuencias rep: las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP), las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (secuencias ERIC), y las secuencias o elementos BOX. Las secuencias REP son las más utilizadas [5].

En este estudio se ha analizado la utilidad del MALDI-TOF MS y de la rep-PCR para el tipado de *A. baumannii* utilizando como técnica de referencia el PFGE.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron en el estudio 21 aislados de *A. baumannii* de la colección del Hospital Clínico San Carlos (HCSC) con distintas características epidemiológicas (tabla 1) y todas ellas portadoras de diferentes carbapenemasas (tabla 2).

Tabla 1 Características epidemiológicas de los aislados.

	Edad	Sexo	Servicio	Tipo de muestra
A115	40	H	UCI	BAS
A127	64	H	MIN	ESP
A130	60	H	UCI	BAS
A59	73	H	ONC	ESP
A75	81	H	COT	LCOR
A112	78	H	HEM	ESP
A116	51	H	HEM	OR
A19	83	M	END	E
A35	80	M	COT	HQ
A44	87	M	COT	LCOR
A74	55	H	MIN	F
A6	41	H	UCI	BAS
A43	81	H	HEM	ESP
A45	71	H	UCI	BAS
A80	87	H	CG	BAS
A33	64	H	UCI	LBA
A62	61	H	MIN	BAS
A101	79	M	UCI	BAS
A126	84	H	GER	HC
A129	84	H	GER	OR
A11	40	M	COT	HQ

Unidad de cuidados intensivos (UCI), Medicina interna (MIN), Oncología (ONC), Cirugía ortopédica y traumatología (COT), Hematología (HEM), Endocrino (END), Cirugía general (CG), Geriatria (GER);Broncoaspirado (BAS), Espudo (ESP), Líquido corporal (LCOR), Orina (OR), Escara (E), Herida quirúrgica (HQ), Fístula (F), Lavado broncoalveolar (LBA), Hemocultivo (HC).

Tabla 2 Características de los aislados incluidos en el estudio.			
Cepa	CMI a imipenem (mg/L)	CMI a meropenem (mg/L)	Enzima
A115	32	8	OXA-201+ISAba1
A127	64	8	OXA-201+ISAba1
A130	32	8	OXA-201+ISAba1
A59	512	128	OXA-65+ISAba1
A75	512	125	OXA-65+ISAba1
A112	256	256	OXA-65+ISAba1
A116	256	256	OXA-65+ISAba1
A19	1	0,25	OXA-65+ISAba1
A35	1	1	OXA-65+ISAba1
A44	1	1	OXA-65+ISAba1
A74	2	2	OXA-65+ISAba1
A6	32	8	OXA-71, OXA-58
A43	32	8	OXA-71, OXA-58
A45	64	4	OXA-71, OXA-58
A80	32	4	OXA-71, OXA-58,
A33	512	256	OXA-66, OXA-24, OXA58
A62	512	256	OXA-64/132, OXA-24
A101	256	256	OXA-64, OXA-24
A126	256	512	OXA-66, OXA-24
A129	64	8	OXA-66, OXA-24
A11	1	0,25	OXA-180

Los aislados se caracterizaron inicialmente mediante PFGE. Se prepararon bloques de agarosa que incluían el ADN bacteriano sin fragmentar. Para ello se partió de una suspensión bacteriana de 10^9 UFC/ml en tampón de resuspensión (Tris 100 mM, EDTA 100mM pH 8.0) que se mezcló con un volumen de agarosa *low melting* al 2% (Low Melt Agrose. BioRad. Catalog 161-3112) en 1% SDS en TE (Tris 10mM EDTA, 1mM pH 7.5) en proporción 1:1. Posteriormente se incubó a 55°C en tampón de lisis (Tris50 mM, EDTA 50 mM pH 8, 1% sarcosil) con proteinasa K (0,1 mg/ml) durante 16 horas con agitación. A continuación, se realizaron 5 lavados de 30 minutos con TE y finalmente se incubó 30 minutos a 25°C en tampón con BSA (100 µg/ml). Transcurrido este tiempo se incorporó la enzima ApaI 15-(20 U de enz/100µl de buffer) durante 16 horas a 25°C. Finalmente, se cargaron los bloques en un gel de agarosa megabase al 1% (BioRad Laboratories, Hercules, CA) 161-3110 en TBE 0, 5X y se realizó la electroforesis en un CHEF-DR III (BioRad Laboratories, Hercules, CA) bajo las siguientes condiciones.

El proceso se llevó a cabo en un CHEF-DR III (BioRad Laboratories, Hercules, CA) siguiendo las siguientes condiciones [6, 7]:

- 21 horas
- Pulsos de 5 a 35 segundos en rampa lineal
- Voltaje 6V/cm o 200V

La visualización de los geles se realizó bajo luz ultravioleta y el análisis informático de los perfiles clonales se realizó con el programa FQquest (BioRad Laboratories, Hercules, CA) utilizando el índice de correlación de Dice. Los resultados se interpretaron según los criterios descritos por Seifert *et al.* [6], todos los aislados cuya similitud en el patrón de bandas fue mayor o igual al 87% se consideraron el mismo clon.

Para el análisis por MALDI-TOF MS se extrajeron las proteínas de cada aislado con etanol-ácido fórmico siguiendo los protocolos de Bruker, y por cada uno se obtuvieron 24 espectros independientes de manera automática. Se calibraron externamente utilizando BTS y posteriormente se analizaron con el software FlexAnalysis v3,3 (Bruker Daltonics). El programa MALDI Biotyper3 (Bruker Daltonics), se utilizó para generar el dendograma utilizando la configuración predeterminada del programa el cual asigna mediante un algoritmo propio los diferentes grupos o cluster en función de niveles de distancia

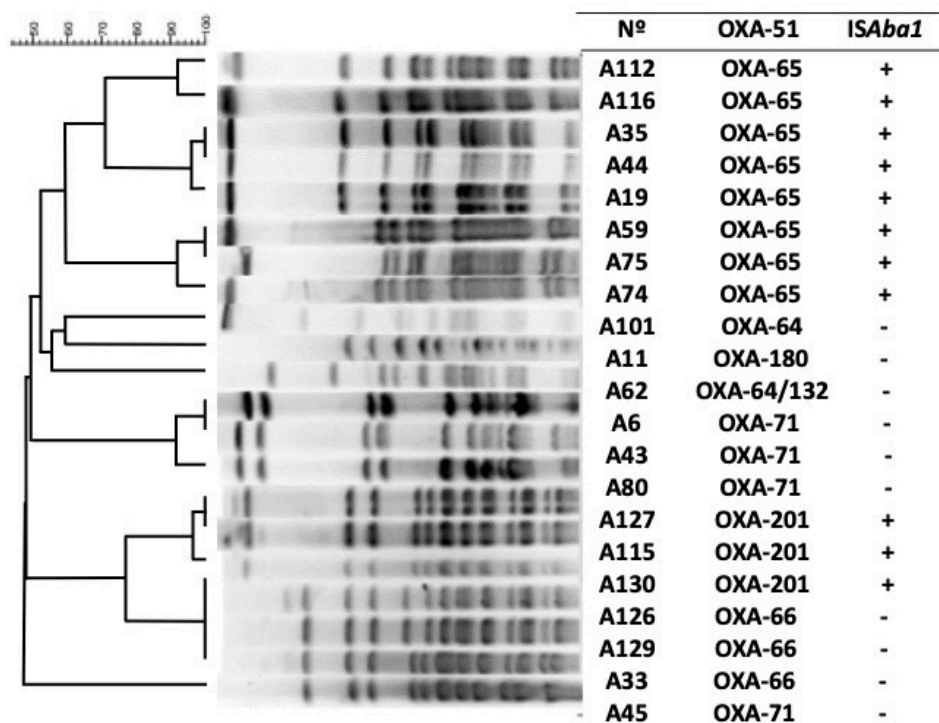


Figura 1 Dendrograma obtenido mediante PFGE con 21 cepas de *A. baumannii*.

arbitraria de los espectros. No se han utilizado puntos de corte porque el programa ya hace sus propios ajustes.

El análisis mediante rep-PCR se realizó a partir de DNA extraído de los diferentes aislados. La extracción se llevó a cabo en un extractor automático NucliSENSeasyMAG (BioMérieux, Marcy L'Etoile, Francia) utilizando como volumen de partida 500 µl de una suspensión bacteriana en suero salino, ajustada a turbidez 3 en la escala de McFarland y el volumen de elución fue 25 µl. Tras la extracción de los ácidos nucleicos se determinó la concentración y pureza del DNA en un Nanodrop a 260 nm (Nanodrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA). El DNA extraído se amplificó mediante rep-PCR utilizando el kit DiversiLab (BioMérieux, Ginebra, Suiza) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para el análisis de los productos de PCR, se utilizó un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies) en el que los fragmentos amplificados se separaron electroforéticamente y detectados mediante el uso de un Labchip con microfluidos.

Los resultados se analizaron utilizando el Software DiversiLab (versión 3.4) que utiliza el índice de correlación de Pearson para calcular similitudes entre las muestras analizadas. Para la interpretación de los resultados obtenidos se llevó a cabo la construcción de dendrogramas y el análisis de los diferentes grupos obtenidos.

RESULTADOS

El análisis cluster es una técnica estadística multivariante que busca agrupar tratando de lograr la máxima homogeneidad dentro de cada grupo y la mayor diferencia entre los grupos.

El análisis mediante PFGE dio como resultado 9 grupos clonales (Figura 1). Los aislados fueron recogidos de diferentes servicios del hospital. Dentro del mismo grupo, todos los aislados que lo forman tienen la misma enzima OXA-51.

El dendrograma MALDI-TOF MS (figura 2A) que se obtiene con el programa de análisis incluido en el sistema, permite diferenciar 2 grupos principales que se identifican con colores diferentes (azul y rojo en este caso) y en los que estarían incluidos 20 de los 21 aislados del estudio; un aislado (A80) quedaría sin agrupar, presentándose como perfil único. Dentro de los dos cluster principales se pueden observar agrupaciones con una elevada homología, cercana al 100%, como A115, A44, A62, A33 y A59, o A11 y A130. A129 muestra una similitud cercana al 95% con los aislados del grupo mencionado (A115, A44...) mientras que A74 lo muestra con los aislados de la segunda agrupación (A11 y A130). El resto de aislados del estudio presenta una menor homología.

En el dendrograma obtenido mediante rep-PCR (figura 2B), se obtuvieron 7 grupos clonales utilizando el mismo punto de

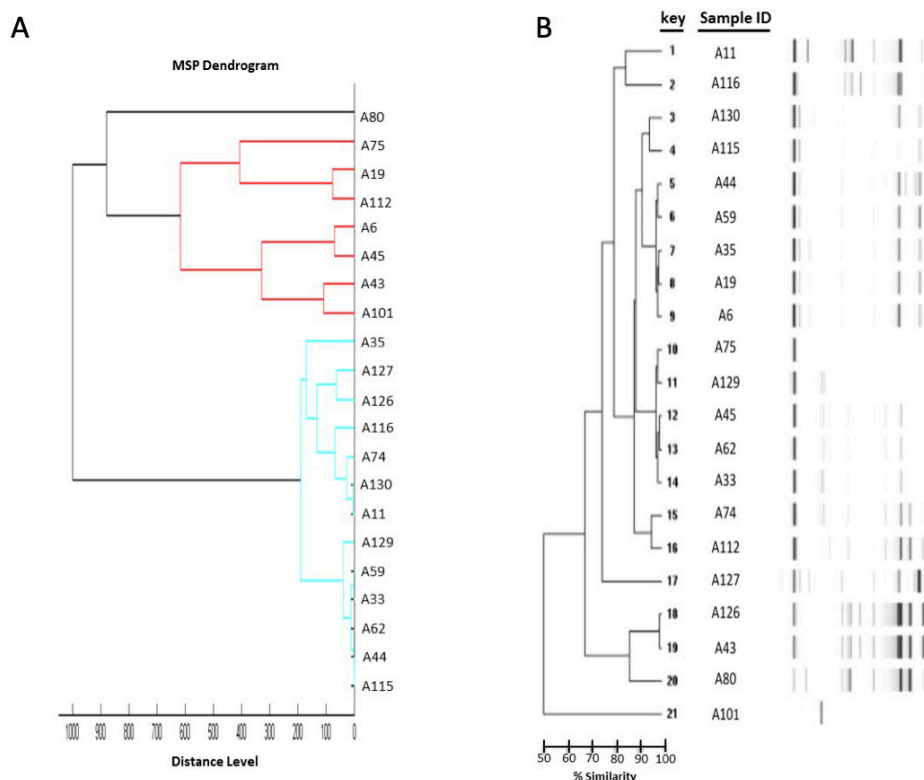


Figura 2 Dendogramas obtenidos con los 21 aislados del estudio mediante rep-PCR (1A) y realizado con Maldi Biotyper 3 (1B).

corte que en PFGE (87%). Si se utilizan puntos de corte similares a los de otros autores [8], el número se eleva hasta los 11 grupos.

La comparación inicial de los resultados del análisis llevado a cabo con las tres técnicas revela muy poca correlación entre sí, si bien, se puede observar como los aislados A129, A62 y A33 aparecen dentro del mismo cluster en las tres técnicas probadas. Los otros aislados que por PFGE aparecen dentro del mismo grupo (A126 y A101) quedan muy alejados (tienen poca homología) por rep-PCR mientras que por MALDI-TOF MS uno de ellos (A126) sí aparecería dentro del mismo grupo pero no así el A101.

Comparando rep-PCR y PFGE se puede ver que los aislados A130 y A115, al igual que A19, A35 y A44, aparecen en las mismas agrupaciones por ambas técnicas.

La comparación de MALDI-TOF MS y rep-PCR, además de los puntos ya señalados, muestran el aislado A80 como un perfil único.

DISCUSIÓN

A. baumannii es un microorganismo frecuentemente implicado en infección nosocomial. Es un patógeno ubicuo y, en

el ambiente hospitalario, se ha aislado en todo tipo de superficies además de colonizando la piel de pacientes y personal sanitario. Su resistencia a la desecación y la evasión de la inmunidad del huésped facilitan su supervivencia y transmisión [9].

En nuestro hospital se han identificado diferentes clones que principalmente colonizan unidades de cuidados intensivos, lo que supone un problema ya que son éstas las zonas donde se encuentran los pacientes más susceptibles.

Actualmente la identificación de estos clones requiere técnicas como el PFGE, que es considerado el método "gold standard" para la tipificación bacteriana, pero supone un proceso largo, un coste elevado y precisa personal entrenado para realizarlo [4]. De este modo, estas técnicas no son una opción asequible para la mayoría de laboratorios.

Un sistema de tipificación ideal debe ser fácil, rápido, con un poder discriminatorio elevado, alta reproducibilidad, bajo coste y con resultados comparables entre diferentes hospitales [8].

MALDI-TOF MS y rep-PCR son, a priori, dos técnicas que reúnen estas condiciones y que, por tanto, podrían ser de gran utilidad para el control y manejo de brotes si se comprueba que presentan una capacidad discriminatoria adecuada. Por este motivo, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar ambas

técnicas con 21 aislados clínicos utilizando como referencia los grupos obtenidos con la electroforesis en campo pulsado.

Los trabajos publicados hasta la fecha no son concluyentes con ninguna de las dos técnicas. En el caso de MALDI-TOF MS la literatura actual muestra tanto resultados positivos para la tipificación de varias especies (*Salmonella*, *Listeria*...) [10] como fracasos en la obtención de una resolución satisfactoria. Los estudios fallidos muestran una mayor heterogeneidad en comparación con el genotipado [4, 10]. En este estudio, los datos del MALDI-TOF MS estarían en concordancia con los estudios menos favorables ya que el número de perfiles obtenidos es menor que el que muestra la electroforesis en campo pulsado. Además, los grupos obtenidos por ambos métodos son dispares.

Sucede algo similar al analizar los datos de rep-PCR. Las publicaciones sobre el uso de rep-PCR como herramienta para el estudio de perfiles genéticos en comparación con PFGE indican poca correlación entre ambas técnicas [8]. Sin embargo cuando se emplean programas específicos de análisis de datos como BioNumerics la concordancia con la electroforesis en campo pulsado aumenta de manera significativa [11]. Cuando el agrupamiento de aislados se realiza en función de genes de resistencia a carbapenémicos los datos que se obtienen también son prometedores [12, 13]. En nuestro caso, no se ha obtenido buena correlación, si bien es cierto que no se han utilizado programas específicos de análisis de datos.

En general, los datos previos obtenidos por otros autores [14] con MALDI-TOF MS y *A. baumannii* son concordantes con lo obtenido en este trabajo. Aunque inicialmente [15] los resultados eran prometedores, estudios posteriores [14] indican la falta de sensibilidad para la distinción de grupos clonales de *A. baumannii* y la necesidad de estandarización del método en distintos laboratorios.

En este estudio no se encontró correlación entre MALDI-TOF MS y PFGE. Los resultados rep-PCR y PFGE tampoco fueron concordantes ni la comparación entre MALDI-TOF MS y rep-PCR.

Una posible causa para la escasa correlación encontrada entre los resultados de MALDI-TOF MS y PFGE podría ser que cada método mide propiedades celulares completamente diferentes [4]. Esto sin embargo no puede aplicarse a la falta de concordancia entre PFGE y rep-PCR ya que en ambas técnicas se miden características del material genético, si bien cada una de ellas tiene dianas diferentes (PFGE genoma completo del microorganismo; rep-PCR secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas).

Parece claro que la estandarización de los métodos es fundamental para la obtención de resultados repetitivos y fiables. Varios estudios muestran la importancia de realizar un control riguroso en el tipo y la concentración de la matriz, el procedimiento de preparación de la muestra, la mezcla de matriz y solvente, la concentración de ácido agregado a la matriz y el medio de crecimiento. Se ha visto que todos estos parámetros influyeron en el perfil espectral [10]. Todos estos factores se tuvieron en cuenta a la hora de llevar a cabo estos ensayos, por

lo que presuntamente, no deberían haber influido en los datos obtenidos.

El conjunto de los resultados parece indicar que, aunque tanto el MALDI-TOF MS como la rep-PCR son herramientas sencillas y atractivas para el análisis de tipificación molecular, se requieren más estudios para poder estandarizar condiciones y establecer protocolos de interpretación que permitan su inclusión de manera fiable en los laboratorios de microbiología.

FINANCIACIÓN

Los autores declaran no haber recibido financiación para la realización de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Motbainor H, Bereded F, Mulu W. Multi-drug resistance of blood stream, urinary tract and surgical site nosocomial infections of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* among patients hospitalized at Felegehiwot referral hospital, Northwest Ethiopia: a cross-sectional study. *BMC infectious diseases* 2020; 20(1): 92. doi:10.1186/s12879-020-4811-8
2. Ahmed Khan H, Kanwal Baig F, Mehboob R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pac J Trop Biomed* 2017; 7(5): 478-482
3. WHO [Online]: <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
4. Spinali S, Van Belkum A, V. Goering R, Girard V, Welker M, Van Nuenen M, et al. Microbial Typing by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry: Do We Need Guidance for Data Interpretation? *J Clin Microbiol.* 2015; 53(3): 760-765.
5. Fernández Cuenca F, López Cerero L, Pascual Hernández A. Molecular typing methods for infection monitoring and control. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013; 31(Sup1): 20-5. doi: 10.1016/S0213-005X(13)70110-1.
6. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, Tanny van der Reijden, Beppie van Strijen, Danuta Stefanik et al. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(9): 4328-4335. doi: 10.1128/JCM.43.9.4328-4335.2005.
7. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, P A Mickelsen, B E Murray, D H Persing et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(9): 2233-2239.
8. Babouee B, Frei R, Schultheiss E, Widmer A. F, y Goldenberger D. Comparison of the DiversiLab Repetitive Element PCR System with spa Typing and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Clonal

- Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(4): 1549–1555. doi: 10.1128/JCM.02254-10.
9. Wong D, Nielsen T, Bonomo R, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. *Clin Microbiol Rev.* 2017; 30(1): 409–447. doi: 10.1128/CMR.00058-16.
 10. Murray P. R. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16(11): 1626–30. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03364.x.
 11. Healy M, Huong J, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S, et al. Microbial DNA Typing by Automated Repetitive-Sequence-Based PCR. *J Clin Microbiol* 2005; 43(1): 199–207. doi: 10.1128/JCM.43.1.199-207.2005.
 12. Pasanen T, Kostela S, Mero S, Tarkka E, Tissari P, Vaara M, et al. Rapid Molecular Characterization of *Acinetobacter baumannii* Clones with rep-PCR and Evaluation of Carbapenemase Genes by New Multiplex PCR in Hospital District of Helsinki and Uusimaa. *PLoS One.* 2014; 9(1): e85854
 13. Zhong-Qiang Y, Ding-Xia S, Jing-Rong C, Rong C, Xing W, Li-Ping L, et al. Susceptibility patterns and molecular epidemiology of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from three military hospitals in China. *International Journal of Antimicrobial Agents*, ISSN: 0924-8579, Vol: 35, Issue: 3, Page: 269–273
 14. Mencacci A, Monari C, Leli C, Merlini L, De Carolis E, Vella A, et al. Typing of nosocomial outbreaks of *Acinetobacter baumannii* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 603–6.
 15. Sousa C, Botelho J, Grosso F, Silva L, Lopes J, Peixe L. Unsuitability of MALDI-TOF MS to discriminate *Acinetobacter baumannii* clones under routine experimental conditions. *Front Microbiol.* 2015; 6: 481

Alejandro de Arriba-
Fernández^{1,2}
Manuel Jesús Molina-
Cabrillana¹
Lluís Serra Majem^{1,2}

Evaluación de la adherencia a la higiene de manos en profesionales sanitarios en un hospital de tercer nivel en relación con la pandemia de SARS-CoV-2

¹Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

²Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil. Servicio de Medicina Preventiva

Article history

Received: 9 December 2020; Revision Requested: 20 January 2021; Revision Received: 18 February 2021; Accepted: 22 February 2021; Published: 7 April 2021

RESUMEN

Introducción. Una correcta higiene de manos es la principal medida en la prevención y control de la infección asociada a la asistencia sanitaria. Se describe como ha influido el periodo pandémico del año 2020 en la evolución del grado de cumplimiento de las prácticas de higiene de manos en los profesionales sanitarios del Hospital Universitario Insular de Gran Canaria con respecto a años anteriores.

Métodos. Estudio descriptivo transversal de observación directa sobre el cumplimiento de los cinco momentos de higiene de manos en el periodo 2018-2020. La adherencia se describió con la distribución de frecuencias de los diferentes momentos en los que estaba indicada.

Resultados. La adherencia total ha aumentado del 42,5% en 2018, al 47,6% en 2019 y al 59,2% en 2020 ($p < 0,05$). La adherencia total fue mayor en los momentos después del contacto con el paciente (67%) que en los momentos anteriores al contacto (48%). El área con mayor adherencia fue diálisis (83%). Se distingue una mayor adherencia en áreas abiertas que en áreas de hospitalización (65% vs 56%). Se determinó una mayor adherencia en facultativos (73%) y enfermeras (74%), que en auxiliares de enfermería (50%) ($p < 0,05$).

Conclusiones. En el año 2020 se observó un aumento de la adherencia a la higiene de manos respecto a los años previos. Se determinó un porcentaje mayor de adherencia en facultativos y personal de enfermería que en auxiliares de enfermería. Consideramos que la actual pandemia del SARS-CoV-2 ha jugado un papel relevante en este aumento en la adherencia.

Palabras clave. Higiene de manos, profesionales sanitarios, observación, adherencia.

Correspondencia:
Alejandro de Arriba-Fernández
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Paseo Blas Cabrera Felipe "Físico", 310, CP: 35016.
Las Palmas Gran Canaria.
Telf. 928459441. Fax. 928459797
E-mail: alejandrodearribafdez@gmail.com

Evolution of adherence to hand hygiene in health care professionals in a third-level hospital in relation to the SARS-CoV-2 pandemic

ABSTRACT

Introduction. Proper hand hygiene is the main measure in the prevention and control of infection associated with healthcare. It describes how the pandemic period of 2020 has influenced the evolution of the degree of compliance with hand hygiene practices in health professionals at the Hospital Universitario Insular de Gran Canaria with respect to previous years.

Methods. Descriptive cross-sectional study of direct observation on compliance with the five moments of hand hygiene in the 2018-2020 period. Adherence is described with the frequency distribution of the different moments in which it was indicated.

Results. Total adherence has increased from 42.5% in 2018, to 47.6% in 2019, and 59.2% in 2020 ($p < 0.05$). Total adherence was greater in the moments after contact with the patient (67%) than in the moments before contact (48%). The area with the highest adherence was dialysis (83%). There is a greater adherence in open areas than in hospitalization areas (65% vs 56%). Higher adherence was determined in physicians (73%) and nurses (74%), than in nursing assistants (50%) ($p < 0.05$).

Conclusions. In 2020 there was an increase in adherence to hand hygiene compared to previous years. A higher percentage of adherence was determined in physicians and nurses than in nursing assistants. We consider that the current SARS-CoV-2 pandemic has played a relevant role in this increase in adherence.

Keywords. Hand hygiene, health professionals, observation, adherence.

INTRODUCCIÓN

Los virus respiratorios, entre los cuales se encuentra el nuevo coronavirus de 2019 (SARS-CoV-2), pueden transferirse desde las superficies ambientales contaminadas a las membranas mucosas faciales de una persona susceptible de infección a través del contacto con las manos u otros fómites [1].

Estos virus tienen un impacto significativo en la salud de los profesionales sanitarios. Durante el brote de SARS-CoV de 2003, los trabajadores sanitarios representaron el 20% de los casos en todo el mundo [2].

La higiene de manos (HM), es decir, cualquier medida adoptada para la limpieza de las manos mediante fricción con un preparado de base alcohólica o lavado con agua y jabón, está ampliamente aceptada como la piedra angular del control de las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria (IRAS) en el entorno hospitalario [3-5]. Es conocido que la mayoría de IRAS son transmitidas por contacto directo, especialmente por las manos de los profesionales de la salud [6, 7], así como que la adherencia a la HM por parte de aquellos es deficiente, siendo varias las barreras identificadas: irritación producida por los productos y/o la técnica de higiene, inaccesibilidad a los productos, prioridad en atender al paciente antes que en la antisepsia, uso de guantes en vez de antisepsia, olvido, desconocimiento de las recomendaciones, falta de tiempo, alta carga asistencial o falta de información respecto al impacto de la higiene en el control de las IRAS [6,8].

Estas infecciones tienen consecuencias graves, entre las que se incluyen un impacto económico considerable, estancias hospitalarias más largas, un aumento de la resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos, y un significativo número de muertes [6, 7].

La medición de la adherencia a la HM por parte de los profesionales es una práctica recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el contexto de la estrategia de mejora multimodal y debe ir acompañada de *feedback* a los profesionales para que tenga su mayor impacto [6].

El Servicio Canario de la Salud, con el fin de incrementar la seguridad de la atención sanitaria, está desarrollando políticas globales de seguridad de pacientes. Mejorar la adherencia a las recomendaciones de la HM por parte de los profesionales es una de las líneas estratégicas prioritarias.

En este marco, en nuestro centro se está trabajando de forma activa en la mejora de la HM, siguiendo las directrices de organismos internacionales [6, 7].

Desde el Servicio de Medicina Preventiva del Hospital Universitario Insular de Gran Canaria (HUIGC) llevamos a cabo un programa para la vigilancia y el control de las IRAS en el que se incluyen actividades relacionadas con la promoción de la HM entre el personal sanitario desde el año 2007 [8, 9].

Es nuestro objetivo determinar si ha habido diferencias en el grado de adherencia a las prácticas de HM en el periodo pandémico del año 2020 en los profesionales sanitarios del HUIGC con respecto a los años anteriores 2018 y 2019.

MÉTODOS

Diseño del estudio. Estudio descriptivo transversal de observación directa sobre el cumplimiento de los cinco momentos de HM en el periodo 2018-2020.

Población y lugar de estudio. El centro es el HUIGC, hospital de tercer nivel que cuenta con 471 camas, 3.000 trabajadores y que sirve a una población de referencia de unos 401.122 habitantes.

Recogida de datos. La medición de la adherencia a la HM se realiza mediante observación directa de los profesionales sanitarios durante su trabajo diario en periodos de observación de 40 minutos, siguiendo la metodología en la que se evalúan los 5 momentos de HM propuesta por la OMS, a saber: "1. Antes del contacto con el paciente, 2. Antes de realizar una tarea aséptica, 3. Después del riesgo de exposiciones a fluidos corporales, 4. Después del contacto con el paciente, y 5. Después del contacto con el entorno del paciente". Posteriormente en el análisis de los resultados los 5 momentos se aunaron en "antes" (momentos 1 y 2) cuyo objetivo es proteger al paciente y "después" (momentos 3, 4 y 5) cuyo objetivo es proteger al profesional sanitario y evitar la propagación de microorganismos en las instalaciones sanitarias [6].

Se llevó a cabo por parte de los profesionales del Servicio de Medicina Preventiva, especialmente formados para la realización de esa actividad, los cuales registraban la existencia de una oportunidad de higiene, si se llevaba a cabo la higiene y la categoría profesional del personal implicado.

No se valoró el uso de guantes ni la adecuación de la técnica de la higiene (duración, tiempo de higiene, frotación en toda la superficie de las manos). Tampoco se monitorizó de forma rutinaria el consumo de productos de base alcohólica en este periodo.

No se comunicó a los profesionales sanitarios que iban a ser observados, pues esta práctica era coincidente con la visita regular a estas áreas por otros motivos (vigilancia de la infección nosocomial, toma de muestras ambientales, inspecciones de higiene, etc.). En las áreas de hospitalización se observó la adherencia a la HM desde fuera de la habitación en los casos en los que fue posible o bien desde dentro sin hacer referencia a la HM, se dijo al personal que la finalidad de la visita se relacionaba con políticas de calidad y seguridad del paciente. En ningún caso las observaciones interfirieron con la atención de los pacientes.

Variables. Se definió como contacto directo todo procedimiento que implicara la relación directa de la mano del trabajador sanitario con ropa, piel y/o mucosas de un paciente y el contacto con el área se refiere a aquella situación en la que las manos del trabajador están en contacto con objetos inertes y superficies en el entorno inmediato del paciente.

La oportunidad de HM se refiere a toda aquella situación en la que esté indicado realizar HM, sea cual sea la técnica recomendada (lavado rutinario, antiséptico, quirúrgico o uso de productos de base alcohólica).

La variable resultado cumplimiento con la HM, se definió como la realización por parte de los profesionales de lavado rutinario con agua y jabón o la antisepsia con productos de base alcohólica [6, 7].

Otras variables consideradas fueron categoría profesional (facultativos y médicos residentes, enfermeros y auxiliares de enfermería), momento del contacto (antes o después) y área del hospital (áreas abiertas y áreas de hospitalización).

Las áreas asistenciales en las que se realiza observación se dividen en dos grupos:

Unidades Abiertas: aquellas en las que es fácil observar la actuación de los profesionales sin interferir en su actividad: Urgencias, Servicio de Medicina Intensiva (adultos), Hospital de Día, Diálisis, Reanimación-Despertar y Radiología.

Áreas de hospitalización: aquellas en las que existen habitaciones individuales o compartidas en las que la observación directa es más difícil.

Se tiene en cuenta cada oportunidad de HM identificada por el observador y se registra si se cumple con la HM, ya sea con agua y jabón o con productos de base alcohólica (PBA).

El porcentaje de adherencia se calcula como el número de acciones de HM (con agua y jabón o con PBA) multiplicado por 100 y dividiendo por el total de oportunidades identificadas. En el caso de las acciones de HM identificadas, se calcula el porcentaje del total de oportunidades que corresponden al uso de PBA (n° de acciones de HM con PBA $\times 100/n^\circ$ total oportunidades observadas).

Análisis estadístico. Se realizó un análisis descriptivo de los resultados utilizando medidas de frecuencia y porcentajes para las variables categóricas. El análisis para las variables cuantitativas se llevo a cabo mediante la prueba de la χ^2 , utilizando la razón de verosimilitud (Likelihood Ratio) cuando fue necesario. El nivel de significación estadística utilizado fue el 5%

($p < 0,05$), que equivale a una confianza del 95%. El tratamiento estadístico de los datos se ha realizado mediante la aplicación estadística Statistical Package for the Social Sciences, v 24 y Microsoft® Excel (2010).

RESULTADOS

Se han observado un total de 4.560 oportunidades, de las cuales 741 (16,25%) corresponden al año 2020 (246 en áreas abiertas y 495 en plantas de hospitalización).

En cuanto a la valoración de las tasas de adherencia en el año 2020 es de 59,2%, muy superior a la de 2019 (47,6%) y 2018 (42,5%) ($p < 0,05$), sobre todo destacando la baja adherencia en los momentos antes del contacto con el paciente (48,1%) frente a después (67,3%) ($p < 0,05$).

El uso de PBA aumentó en los tres colectivos profesionales durante el periodo estudiado, pasando a nivel global del 32,1% en 2018 y 42,9% en 2019, al 54,6% en el año 2020 ($p < 0,05$). Destaca el aumento en PBA observado en el área de diálisis que aumentó en más de un 30% con respecto a años previos.

Los datos por categoría profesional, estratificados según los momentos antes o después de contactar con el paciente se muestran en la tabla 1. Destaca una adecuada adherencia en el colectivo de facultativos (72,0%), mejor que los datos de 2019 (62,1%) y 2018 (32,2%) ($p < 0,05$). Por otro lado, en el colectivo de enfermería se alcanzó una adecuada adherencia hasta en un 74% tras el contacto con el paciente. Las cifras más bajas de adherencia se observaron en el colectivo de auxiliares de enfermería, solo un 32% realizaron HM antes del contacto con el paciente.

La tabla 2 representa la adherencia global en cada área asistencial (abierta vs hospitalización) y el porcentaje de ocasiones en que se hace HM usando PBA.

Tabla 1 Adherencia por categoría y tipo de áreas del Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, según momentos antes y después del contacto.

	2020			2019			2018		
	Antes	Después	TOTAL	Antes	Después	TOTAL	Antes	Después	TOTAL
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Total	329 (48,1)	412 (67,3)	741 (59,2)	295 (36,9)	428 (54,9)	723 (47,6)	1512 (27,3)	1902 (54,6)	3414 (42,5)
Por Categoría									
Enfermería	167 (52)	186 (73,5)	353 (63,9)	157 (60,6)	189 (57,7)	346 (50,6)	681 (37,7)	883 (66,6)	1564 (54,0)
Auxiliares	72 (31,6)	113 (50,4)	185 (43,2)	80 (27,5)	140 (40,7)	220 (35,9)	396 (15,7)	551 (47,2)	947 (34,0)
Facultativos	76 (57,5)	98 (72,6)	174 (66,3)	48 (39,6)	84 (75)	132 (62,1)	336 (21,7)	368 (41,8)	704 (32,2)
Por Tipo de Área									
Áreas abiertas	102 (59,6)	146 (68,8)	248 (64,6)	82 (48,8)	134 (55,2)	216 (32,1)	748 (32,1)	1033 (60,1)	1781 (48,3)
Hospitalización	227 (85,1)	266 (66,4)	493 (56,1)	213 (32,4)	294 (54,8)	507 (45,4)	764 (22,6)	869 (48,0)	1633 (36,1)

N: número de observaciones; %: tasa de adherencia

Tabla 2 Adherencia global y uso de PBA por áreas asistenciales

	Enero-diciembre, 2020			Enero-diciembre, 2019			Enero-diciembre, 2018		
	Nº oportunidades	% Adherencia	% Uso PBA	Nº oportunidades	% Adherencia	% Uso PBA	Nº oportunidades	% Adherencia	% Uso PBA
S. Medicina Intensiva	45	60	60	66	62,1	57,6	391	51,4	39,9
Hospital de Día	29	20	20	32	28,1	28,1	154	9,7	3,2
Despertar/REA	50	78,8	63,8	34	47,1	47,1	114	53,5	34,2
Urgencias	28	53,6	50	10	50	50	226	24,3	20,8
Diálisis	39	83	44,2	30	70	6,7	324	77,2	13,9
Radiología	55	77,2	74,7	32	62,5	46,9	266	44,4	39,5
Total Áreas abiertas	246	64,8	55,3	204	52,8	39,8	1475	48,3	30,9
Áreas hospitalización HUIGC	495	56,3	54	507	45,4	45,4	1633	36,1	33,4
Total HUIGC	741	59,2	54,6	711	47,6	42,9	3108	42,5	32,1

PBA: productos de base alcohólica, HUIGC: Hospital Universitario Insular de Gran Canaria; % Uso PBA: Se calcula como el número de veces que se usa PBA x 100 / total de oportunidades observadas de HM

Respecto a la frecuencia de higiene por áreas, tanto las áreas abiertas como las de hospitalización mostraron un incremento global respecto a años previos. El área con mayor adherencia fue diálisis (83%), seguido de la unidad de despertar y reanimación (78,8) y radiología (77,2%) ($p < 0,05$). En la unidad de despertar y reanimación destaca que el incremento respecto a años previos fue de aproximadamente un 25%. Por otro lado, llama la atención el descenso observado en la frecuencia en la adherencia a la HM de un 8% en el hospital de día.

DISCUSIÓN

Se observó una mejora en las prácticas de HM en el último año entre los profesionales sanitarios de nuestro hospital, suponemos que el aumento en la adherencia está asociado con la pandemia de COVID-19. Los datos sugieren que los trabajadores parecen haber adaptado su adherencia a la HM debido a la necesidad de prevenir infecciones causadas específicamente por el virus SARS-CoV-2. Se ha descubierto que el miedo a infectarse a sí mismo o a su familia se asocia con una mejor adherencia entre los profesionales sanitarios [10] e impulsa el obediencia de las recomendaciones de salud pública [11].

Otros estudios realizados durante el periodo pandémico también muestran un aumento en la adherencia a las recomendaciones de HM entre los profesionales sanitarios, es el caso del área de obstetricia de dos hospitales universitarios alemanes en los que la adherencia a las recomendaciones de HM aumentó del 47% antes de la pandemia de SARS-CoV-2 al 95% [12].

El índice de cumplimiento de HM varía en todo el mundo, indicando numerosos estudios internacionales que se encuentra por debajo del 50% [6, 13, 14, 15]. En España, se han publicado varios artículos sobre el cumplimiento de la HM en hospi-

tales de distintas comunidades autónomas donde los datos de adherencia se encuentran alrededor del 40%, aunque varían [16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23]. La adhesión evaluada en nuestro estudio en el periodo pandémico 2020 superó la aportada por Rodríguez-Villar (44,3%) en 2018 [16] y Sánchez-Paya en 2007 (30%) [22] y fue similar a la aportada por Arredondo-Provecho en 2019 (57,8%) [17].

Mientras que en el primer año de estudio (2018), de los profesionales sanitarios que realizaban HM, el 24,5% lo hacía con agua y jabón, en el último periodo estudiado (2020) había descendido al 7,8%, aumentando el uso de las soluciones hidroalcohólicas, que utilizaron de forma global el 54,6% de los profesionales. Esto puede explicarse por la mayor eficacia, menor irritabilidad en las manos, la facilidad de uso y la disponibilidad de los PBA [6].

Se distinguió una mayor adherencia en las denominadas áreas abiertas. Probablemente, la gravedad de los pacientes sobre los que se realizaron las actividades asistenciales observadas (ingreso en UCI, sales de reanimación, diálisis, etc.) que, por precisar mayor monitorización y procedimientos, dada su inestabilidad y dependencia del cuidado de enfermería, haya influido en la mayor adhesión global registrada. Por otro lado, en el área de urgencias existía la incertidumbre de si los pacientes eran positivos al virus del SARS-CoV-2. Por el contrario, en las áreas de hospitalización los pacientes que estaban ingresados contaban con prueba de diagnóstico de infección activa para el SARS-CoV-2. En el hospital de día no se atendió a pacientes COVID-19 positivos lo cual fue percibido como una falsa sensación de seguridad.

Respecto a la categoría profesional, numerosos estudios han observado que el personal de enfermería es el grupo que mejor cumple con la práctica de la HM [19, 24, 25]; sin embargo, nuestros datos señalan que son los médicos los que con

mayor frecuencia cumplieron con la adherencia a la HM en el último año. Llama la atención que en el 2019 la adherencia en los facultativos ya era superior a la del personal de enfermería, como en el 2020, y se duplicó respecto al 2018. Por tanto, no podemos considerar que la pandemia del SARS-CoV-2 haya producido un aumento significativo en la adherencia total a la HM en los facultativos, salvo en los momentos "antes del contacto con el paciente" en los que se observó un ligero aumento.

Por otro lado, la adherencia entre el colectivo de auxiliares de enfermería se consideró baja. Esto puede obedecer a que este colectivo tiene una percepción de riesgo menos elevada en la propagación de agentes infecciosos a través de las manos, posiblemente debido a una menor formación en HM durante sus programas formativos comparado con el resto.

Según nuestro estudio, la práctica de la HM se realiza más con fines de autoprotección que de protección al paciente, porque las indicaciones que más se cumplen son las de «después del contacto con el paciente», consideradas por la OMS como de autoprotección [6]. Esto es un hallazgo común en publicaciones sobre este ámbito [16, 17, 22]. Esta actitud de protegerse podría explicarse porque los profesionales perciben el riesgo potencial de infección una vez que han entrado en contacto con un paciente y no se perciben como una posible fuente de infección para el paciente [25, 26].

Nuestro estudio pone de manifiesto que aún existe un gran margen de mejora en la práctica de la HM. Resulta preocupante el bajo cumplimiento de la HM, máxime en estos momentos de actualidad de pandemia de SARS-CoV2, pues existen evidencias de intervenciones y recomendaciones relevantes para frenar o reducir la propagación de virus respiratorios a través de una correcta HM [4]. Ello lo confirma el reciente estudio de Virani et al [5], que demuestra que la rutina de la HM es muy eficaz en los protocolos contra el SARS-CoV2.

Nuestro estudio presenta las limitaciones inherentes a un estudio transversal. Además, se ha realizado en un solo centro hospitalario. Igualmente, factores de confusión no considerados pueden haber estado presentes. A pesar de que las observaciones sobre el cumplimiento de la HM fueron tan enmascaradas como fue posible, no se puede descartar la presencia de un sesgo producido por el efecto Hawthorne, (cambio del comportamiento inducido por la presencia de observadores), que sobreestime la frecuencia.

Como conclusión de este estudio se observó un aumento de la adherencia a la HM en el periodo pandémico del año 2020 respecto a los años previos. Por otra parte, la solución hidroalcohólica fue el antiséptico más usado para la HM y se determinó un porcentaje mayor de adherencia en facultativos y enfermeras que en auxiliares de enfermería.

Consideramos que, a pesar de su enorme importancia en la prevención de la transmisión de enfermedades, la práctica correcta de la HM no ha sido suficientemente estudiada y que los programas de HM podrían ayudar a frenar la propagación de los virus respiratorios, entre ellos, el SARS-CoV-2. La pandemia de COVID-19 ha sido una oportunidad para impulsar el

programa de HM en el HUIGC. La investigación debería centrarse en cómo mantener una alta adherencia a la HM después de la pandemia de COVID-19. Consideramos necesario un estudio en el periodo pos pandémico para ver si realmente los efectos observados en este estudio se debieron a la irrupción del SARS-CoV-2.

AGRADECIMIENTOS

Queremos dar las gracias a todo el equipo de médicos, enfermeras y residentes del Servicio de Medicina Preventiva del HUIGC por su implicación, apoyo y participación en la recogida de datos, sin los cuales este trabajo no hubiera sido posible.

FINANCIACIÓN

Los autores declaran que no han recibido financiación para la realización de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Phan LT, Maita D, Mortiz DC, Bleasdale SC, Jones RM. Environmental contact and self-contact patterns of healthcare workers: Implications for infection prevention and control. *Clin Infect Dis*. 2019;69(Supplement 3): S178–S184. doi:10.1093/cid/ciz558
2. Sepkowitz KA, Eisenberg L. Occupational deaths among healthcare workers. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(7):1003–1008. doi: 10.3201/eid1107.041038
3. Ministerio de Sanidad. Documento técnico. Medidas higiénicas para la prevención de contagios del COVID-19. Madrid: Ministerio de Sanidad; 2020.
4. Lotfinejad N, Peters A, Pittet D. Hand hygiene and the novel coronavirus pandemic: the role of healthcare workers. *J Hosp Infect* 2020; 105:776–7. doi: 10.1016/j.jhin.2020.03.017
5. Virani N, Roshan R, Rafique Z, Feroz A. Rigorous hand hygiene practices among health care workers reduce hospital-associated infections during the COVID-19 pandemic. *J Prim Care Community Health*. 2020;11. doi: 10.1177/2150132720943331
6. World Health Organization. WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care: First Global Patient Safety Challenge Clean Care is Safer Care. 2009.
7. Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings: Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *MMWR* 2002;51 (No. RR-16): [31–45] [acceso en noviembre de 2020]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5116a1.htm>
8. Molina-Cabrillana J, Dorta-Hung ME, Otero Sanz L, Henández Vera JR, Martín-Rodríguez MM et al. Influencia del material pro-

- mocional sobre higiene de manos en la cultura de seguridad de un hospital de tercer nivel. *Rev Calid Asist*. 2016;31(S): 55-61. doi: 10.1016/j.cali.2016.01.002
9. Molina-Cabrillana J, Álvarez-León EE, Quori A, García-de Carlos P, López-Carrión I, Bolaños-Rivero M et al. Impacto de la mejora de la higiene de las manos sobre las infecciones hospitalarias. *Rev Calid Asist*. 2010;25(4):215-222. doi: 10.1016/j.cali.2010.02.002
 10. Houghton, C., Meskeel, P., Delaney, H., Smalle, M., Glenton, C., Booth, A., Biesty, L.M. (2020). Barriers and facilitators to healthcare workers' adherence with infection prevention and control (IPC) guidelines for respiratory infectious diseases: A rapid qualitative evidence synthesis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 4, CD013582. doi: 10.1002/14651858.CD013582
 11. Harper, C.A., Satchell, L.P., Fido, D., & Latzman, R.D. (2020). Functional fear predicts public health compliance in the COVID-19 pandemic. *International Journal of Mental Health and Addiction*, 1-14. doi: 10.1007/s11469-020-00281-5
 12. Derksen C, Keller FM, Lippke S. Obstetric healthcare workers' adherence to hand hygiene recommendations during the COVID-19 pandemic: Observations and social-cognitive determinants. *Appl Psychol Health Well Being* 2020;doi:10.1111/aphw.12240
 13. Albright J, White B, Pedersen D, Carlson P, Yost L, Littau C. Use patterns and frequency of hand hygiene in healthcare facilities: Analysis of electronic surveillance data. *Am J Infect Control*. 2018;46: 1104-9. doi: 10.1016/j.ajic.2018.04.205
 14. Bin Ibrahim MA, Chow C, Poh BF, Ang B, Chow A. Differences in psychosocial determinants of hand hygiene between health care professional groups: Insights from a mixed-methods analysis. *Am J Infect Control*. 2018; 46:253-60. doi: 10.1016/j.ajic.2017.09.014
 15. Pan A, Domenighini F, Signorini L, Assini R, Catenazzi P, Lorenzotti S, et al. Adherence to hand hygiene in an Italian long-term care facility. *Am J Infect Control*. 2008;36(7):495-7. doi: 10.1016/j.ajic.2007.10.017
 16. Rodríguez-Villar D, Del-Moral-Luque JA, San-Román-Montero J, Gil-de-Miguel Á, Rodríguez-Caravaca G, Durán-Poveda M. Adherencia a la higiene de manos con soluciones hidroalcohólicas en estudiantes de medicina. Estudio descriptivo transversal. *Rev Esp Quimioter*. 2019;32(3):232-7. PMID: 30950257
 17. Arredondo-Provecho AB, Horcajo-Díaz E, Cerrillo-González I, Morato-Cerro VM, Pérez-Ortiz M, Rodríguez-Caravaca G. Evolución de la adherencia a la higiene de manos en un hospital de la Comunidad de Madrid. *Revista Española de Salud Pública* 2020;94(1): e1-e12. ID: mdl-32694500
 18. Mestre G, Berbel C, Tortajada P, Alarcia M, Coca R, Gallemlé G et al. "The 3/3 strategy": a successful multifaceted hospital wide hand hygiene intervention based on WHO and continuous quality improvement methodology. *PLoS One*. 2012;7(10): e47200. doi: 10.1371/journal.pone.0047200
 19. Fariñas-Alvarez C, Portal-María T, Flor-Morales V, Aja-Herrero A, Fabo-Navarro M, Lanza-Marín S et al. Estrategia multimodal para la mejora de la adherencia a la higiene de manos en un hospital universitario. *Rev Calid Asist*. 2017;32(1):50-56. doi: 10.1016/j.cali.2016.06.011
 20. Fuentes-Ferrer ME, Peláez-Ros B, Andrade-Lobato R, del Prado-González N, Cano-Escudero S, Fereres-Castiel J. Efectividad de una intervención para la mejora del cumplimiento en la higiene de manos en un hospital de tercer nivel. *Rev Calid Asist*. 2012;27(1):3-10. doi:10.1016/j.cali.2011.07.009
 21. Villegas-Arenas OA, Gómez J, Uriel López J, Román RN, Villa JE, Botero J, et al. Medición de la adherencia al lavado de manos, según los cinco momentos de la OMS. *Duazary: Rev Int Cienc Salud [Internet]*. 2017;14(2): 169-78. doi:10.21676/2389783X.1967
 22. Sánchez-Payá J, Galicia-García MD, Gracia-Rodríguez RM, García-González C, Fuster-Pérez M, López-Fresneña N et al. Grado de cumplimiento y determinantes de las recomendaciones sobre la higiene de manos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25(6):369-75. doi: 10.1157/13106961
 23. Dierssen-Sotos T, Robles-García M, Valbuena-Moya S. Lavado de manos: experiencias de dos comunidades autónomas. *Med Clin Monogr*. 2008;131(3):60-3. doi: 10.1016/S0210-5705(09)71003-9
 24. Pittet D. Hand hygiene and patient care: Pursuing the Semmelweis legacy. *Lancet Infect Dis*. 2001;9-20. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70295-6
 25. Martín-Madrado C, Salinero-Fort MA, Cañada-Dorado A, Carrillo-De Santa-Pau E, Soto-Díaz S, Abánades-Herranz JC. Evaluación del cumplimiento de higiene de las manos en un área de Atención Primaria de Madrid. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(1): 32-5. doi: 10.1016/j.eimc.2010.03.009
 26. Jang JH, Wu S, Kirzner D, Moore C, Youssef G, Tong A, et al. Focus group study of hand hygiene practice among healthcare workers in a teaching hospital in Toronto, Canada. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010; 31:144-50. doi: 10.1086/649792

Kinda Altali Alhames^{1*}
Francisco Javier Martín-
Sánchez^{2,3*}
Pedro Ruiz-Artacho^{4,5}
Francisco Javier Ayuso²
Victoria Trenchs⁶
Mikel Martínez Ortiz de
Zarate⁷
Carmen Navarro⁸
Manuel Fuentes Ferrer⁹
Cristina Fernández⁹
Juan González del Castillo^{2,3}
Andrés Bodas^{1,3}

Diagnostic accuracy of combining C-Reactive protein and Alvarado Score among 2-to-20-year-old patients with acute appendicitis suspected presenting to Emergency Departments

¹Pediatric Department, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain.

²Emergency Department, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain.

³Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

⁴Internal Medicine Department, Clínica Universidad de Navarra, Madrid. Interdisciplinar Teragnosis and Radiosomics Research Group (INTRA-Madrid), Universidad de Navarra, Madrid, Spain.

⁵CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

⁶Emergency Department, Hospital Universitario Sant Joan de Deu, Barcelona, Spain.

⁷Emergency Department, Hospital Universitario de Basurto, Bilbao, Spain.

⁸Emergency Department, Hospital Universitario Virgen de la Macarena, Sevilla, Spain.

⁹Preventive Medicine Department. Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain.

Article history

Received: 9 January 2021; Revision Requested: 27 January 2021; Revision Received: 30 January 2021; Accepted: 4 February 2021; Published: 30 April 2021

ABSTRACT

Objective. Main objective was whether the combination of C-Reactive Protein (CRP) and Alvarado Score (AS) increase the diagnosis accuracy of AS among 2-to-20-year-old patients with suspected acute appendicitis presenting to Emergency Departments.

Materials and methods. This is a secondary analysis of prospective cohort study consecutively including all patients from 2 to 20 years of age attended for suspected acute appendicitis in 4 Spanish Emergency Departments during 6-month period. We collected demographic, clinical, analytic and radiographic, and surgical data. AS categories were retrospectively calculated as low (0-4 points), intermediate (5-6 points) or high (7-10 points). The cut-off levels were >0.5 mg/dl for CRP. The outcome was diagnosis of acute appendicitis within 14 days of the index visit.

Results. A total of 331 patients with suspected of acute appendicitis (mean age 11.8 (SD 3.8) years; 52.9% males) were recruited. According to AS, 108 (32.6%) were at low risk, 76 at (23.0%) intermediate risk and 147 (44.4%) at high risk of acute appendicitis. One hundred and sixteen (35.0%) cases had confirmed histopathological diagnosis of acute appendicitis. The AUCs of ROC were 0.76 (0.70-0.81) for AS and 0.79 (95% CI 0.75-0.84) for CRP-AS being the difference statistically signifi-

cant ($p=0.003$). The CRP for diagnosis acute appendicitis in low risk AS group had negative predictive value of 95.8% (95%CI 87.3-98.9) and likelihood ratio negative of 0.4 (95%CI 0.2-1.0).

Conclusions. CRP-AS has shown to increase the diagnostic accuracy of AS for acute appendicitis. This approach may be useful to rule out the diagnosis of acute appendicitis in paediatric patients attended for abdominal pain suggestive of acute appendicitis.

Key words: c-reactive protein; acute appendicitis; biomarkers; emergency medicine.

Precisión diagnóstica de la combinación de la proteína C reactiva y la puntuación de Alvarado en pacientes de 2 a 20 años con sospecha de apendicitis aguda durante su atención en los servicios de urgencias

RESUMEN

Objetivo. El objetivo principal fue conocer si la combinación de la proteína C reactiva (PCR) y la escala de Alvarado (AS) aumenta la precisión de ésta última en el diagnóstico de apendicitis aguda en pacientes de 2 a 20 años que son evaluados en los servicios de urgencias hospitalarios con esta sospecha clínica.

Materiales y métodos. Se trata de un análisis secundario de un estudio de cohorte prospectivo que incluyó de forma consecutiva a todos los pacientes de 2 a 20 años atendidos por sospecha de apendicitis aguda en 4 servicios de urgencias hospitalarios españoles durante un periodo de 6 meses. Recopilamos datos demográficos, clínicos, analíticos, radiográficos

Corresponding Author:
Francisco Javier Martín-Sánchez.
Emergency Department. Hospital Clínico San Carlos.
Calle Profesor Martín-Lagos s/n, 28040 Madrid.
Telephone: (34) 91.330.37.50
FAX: (34) 91.330.35.69
Email: fjms@hotmail.com

*Both authors have equally contributed to this study

y quirúrgicos. Las categorías de AS se calcularon retrospectivamente como bajas (0-4 puntos), intermedias (5-6 puntos) o altas (7-10 puntos). Los niveles de corte fueron $>0,5$ mg/dl para PCR. El resultado fue el diagnóstico de apendicitis aguda dentro de los 14 días posteriores a la visita índice.

Resultados. Se reclutaron 331 pacientes con sospecha de apendicitis aguda (edad media 11,8 (DE 3,8) años; 52,9% varones). Según AS, 108 (32,6%) tenían bajo riesgo, 76 (23,0%) riesgo intermedio y 147 (44,4%) alto riesgo de apendicitis aguda. Ciento dieciséis (35,0%) casos habían confirmado el diagnóstico histopatológico de apendicitis aguda. Las AUC de ROC fueron 0,76 (0,70-0,81) para AS y 0,79 (IC del 95%: 0,75-0,84) para PCR-AS, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p=0,003$). La PCR para el diagnóstico de apendicitis aguda en el grupo de AS de bajo riesgo tuvo un valor predictivo negativo del 95,8% (IC 95% 87,3-98,9) y una razón de verosimilitud negativa de 0,4 (IC 95% 0,2-1,0).

Conclusiones. Se ha demostrado que la combinación de PCR-AS aumenta la precisión diagnóstica del AS para apendicitis aguda. Este enfoque puede ser útil para descartar el diagnóstico de apendicitis aguda en pacientes pediátricos atendidos por dolor abdominal sugestivo de apendicitis aguda.

Palabras clave: Proteína C-reactiva, apendicitis aguda, biomarcadores, urgencias

INTRODUCCION

Abdominal pain is one of the main reasons for presenting to Emergency Departments (EDs) [1]. Acute appendicitis (AA) is the most common surgical emergency in childhood and one of the main differential diagnoses to consider in paediatric patients and adolescents [2,3].

Despite of advances in the diagnosis and surgical treatment of AA, the diagnosis still remains difficult, especially in paediatric populations [4], being a clinical challenge even for experienced emergency physicians [5]. The clinical history and physical examination may be less useful compared to adults because children are more frequently associated with atypical clinical manifestations [6]. Differential diagnosis of an AA is extensive, and many clinical conditions can mimic AA [5]. The delay in the diagnosis increases morbidity and mortality, whereas false positive diagnosis of AA leads to unnecessary surgery. In this sense, the studies show a frequency of perforation between 17 and 33% and a percentage of negative laparotomy between 3 and 54% [2].

Different clinical scores have been developed to help physicians to improve the accuracy of the diagnosis of AA, reducing the time needed for diagnosis and the number of inappropriate imaging tests and appendectomies [7]. The Alvarado score (AS) is the most frequently score used in clinical practice [8]. The AS considers symptoms, signs, and laboratory, which are leukocytosis and neutrophilia (Table 1). Some studies have shown that diagnostic accuracy of AS is not sufficient to establish the presume diagnosis or rule out, especially in children, and this can lead to delays in the diagnosis increasing the risk

of appendicitis perforations [7,8].

The C-reactive protein (CRP) is a protein synthesized from hepatocytes that increases within 4-6 hours after acute tissue injury and peaking at 36-48 hours. One hand, it has been reported that CRP used solely or in combination with white blood cell (WBC) could be effective in the discrimination between acute and complicated appendicitis [9]. On the other hand, there is little evidence and the results are contradictory among paediatric patients and adolescents [10,11]. Despite this, some authors recommend evaluating routinely CRP level, WBC and Neutrophil percentage (NP) among patients with initial diagnosis of appendicitis [12,13].

Considering all previously written, further evidence is necessary to confirm the role of CRP in conjunction with AA in the diagnosis of acute appendicitis among paediatric patients and adolescents. In this sense, the main objective was to determine whether the combination of CRP and AS increase the diagnosis accuracy of AS among 2-to-20-year-old patients with acute appendicitis suspected presenting to EDs. The secondary objectives were to study the diagnostic accuracy of the CRP level in the different categories of AS in this group of patients and to compare the diagnostic capacity of CRP level with WBC and NP.

MATERIAL AND METHODS

Study design and setting. We performed a secondary analysis of observational prospective cohort study that consecutively included children and adolescents attended for abdominal pain suspected of AA in 4 Spanish ED (Hospital Clínico San Carlos of Madrid, Hospital de Basurto of Bilbao, Hospital Virgen de la Macarena of Sevilla and Hospital Sant Joan de Déu of Barcelona) from June to December 2014. The study was approved by the Ethical Committee of the reference centre and was carried out according to the principles of Good Clinical Practice. Informed consent was obtained from the adolescents and from the parents of the children included in the study.

Population. All patients from 2 to 20 years of age with abdominal pain suspected of AA of less than 72 hours of evolution were consecutively included in the study. The exclusion criteria were: patients with a radiological test of the abdomen prior to attending the ED, pregnancy, history of appendectomy, inflammatory disease or active cancer, abdominal trauma, surgery or invasive abdominal procedure within the previous 7 days, use of systemic steroids in the last 14 days, receipt of any other immunosuppressive treatment or chemotherapy within the previous 29 days and participation in an investigation study in the previous 30 days.

Study protocol. The patients were assessed by the attending physician following the standard protocol of usual clinical practice, that is, collecting the clinical history and performing a physical examination and routine laboratory tests and, if necessary, an imaging test, ultrasonography and/or computerized tomography, and evaluation by a surgeon on duty. The laboratory and imaging tests and interconsultation

with an on-duty surgeon were requested as per the criteria of the attending physician, independently of the participation in the study. In patients undergoing appendectomy, the diagnosis of AA was made from the surgical piece by a specialist in anatomopathology. All the patients discharged directly without surgery were evaluated at 14 days to know whether they had received medical care and had a clinical and/or histopathological report compatible with AA.

Variables. The investigators of each centre collected the following data on a standardized form: demographic (age and gender), clinical (symptoms, signs and time of evolution), analytical (WBC, NP and CRP) and radiological (abdominal ultrasonography and/or computerized tomography) and, if necessary, surgical and histopathological data. The forms were reviewed by the coordinating investigator of each centre. The patients were retrospectively classified according to the AS as low (0-4 points), intermediate (5-6 points) or high (7-10 points) risk of AA. The cut-off levels were $> 0,5$ mg/dl for CRP, $\geq 10 \times 10^9$ /L for WBC and $\geq 75\%$ for NP. The final diagnosis of AA was based on the report of the histopathological study of the resected appendix in patients who had undergone appendectomy, or via a telephone call at 2 weeks of follow up to know if they had been histologically diagnosed. AA was histologically demonstrated by mucosal neutrophil infiltration of the appendix with or without local peritonitis.

Statistical analysis. Categorical variables are expressed as numbers and percentages and the quantitative variables are expressed as means and standard deviations or medians and interquartile ranges if the distribution was not normal (this was tested using Kolmogorov-Smirnov test). Categorical variables were compared with the Pearson chi-square test or Fisher test and quantitative variables using the Student's-t test (or the Mann-Whitney U test if the distribution was not normal). Logistic regression was used to combine CRP and AS in the diagnosis of acute appendicitis. The values of sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV), positive likelihood ratio (LHR+) and negative likelihood ratio (LHR-) were calculated for CRP and CRP stratified by AS. To determine the discriminatory capacities of the CRP, leukocytosis, neutrophilia, AS and combination of AS and CRP to diagnose acute appendicitis the areas under the curve (AUC) of receiver-operating characteristic (ROC) curves were calculated. The AUC of ROC were compared by DeLong test. We considered differences to be statistically significant if the p value was less than 0.05 (two-tail), and 95% CI of AUC ROC excluded 0.5. Statistical analyses were performed using SPSS 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) STATA 14.0 statistical package (StataCorp. 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX: StataCorp LP).

RESULTS

Patient characteristics. We included 331 patients with suspected of AA. The mean age was 11.8 (SD 3.8) years and 175 (52.9%) were males. Table 2 shows the characteristics of the patients included in the study. The median time of clinical

Table 1	Alvarado Score for Appendicitis Diagnosis
Manifestations	Value
Signs	
Right Lower Quadrant Tenderness	2
Elevated Temperature (37.3°C or 99.1°F)	1
Rebound Tenderness	1
Symptoms	
Migration of Pain to the Right Lower Quadrant	1
Anorexia	1
Nausea or Vomiting	1
Laboratory Values	
Leukocytosis $> 10,000$ mm ³	2
Leukocyte Left Shift	1

Risk of acute appendicitis: low (0-4 points), intermediate (5-6 points) or high (7-10 points)

course was 24 (IQR 9-48) hours. According to AS, 108 (32.6%) were at low risk, 76 at (23.0%) intermediate risk and 147 (44.4%) at high risk of AA. At least one imaging test was performed in 189 (57.1%): 172 (52.0%) ultrasonographies, 6 (1.8%) CTs and both in 11 (3.3%) cases. Appendectomy was carried out during the index visit in 118 (35.6%) patients, 109 (94.0) of whom had a histopathological diagnosis of AA. At the end of the 2-week follow-up, 116 (35.0%) had confirmed histopathological diagnosis of AA.

Table 2 shows the characteristics of the sample and the univariate analysis based on the presence or not of appendicitis. Statistically significant differences were observed in the age, gender, time of evolution, associated symptoms and physical examination, WBC, NP, CRP levels, the risk categories according to the AS, and the performance of exploratory surgery.

Primary data analysis. The figure 1 shows the diagnosis capacity of combination CRP and AS, and AS. The AUCs of ROC were 0.76 (0.70-0.81) for AS and 0.79 (95% CI 0.75-0.84) for CRP-AS being the difference statistically significant ($p=0.003$).

Secondary data analysis. The table 3 shows the characteristic of CRP test along and stratified between three AS groups. Six (5.2%) out of 116 patients with AA were classified as low risk AS and CRP ≤ 0.5 mg/dl. The CRP for diagnosis AA in low risk AS group had NPV of 95.8% (95% CI 87.3-98.9) and LHR- of 0.4 (95% CI 0.2-1.0). A negative CRP result reduced the probability of AA from 8.8% to 5.2% in this low risk AS group. Regarding the comparison between diagnostic accuracy of CRP level with WBC and NP, no statistically significant differences were found.

DISCUSSION

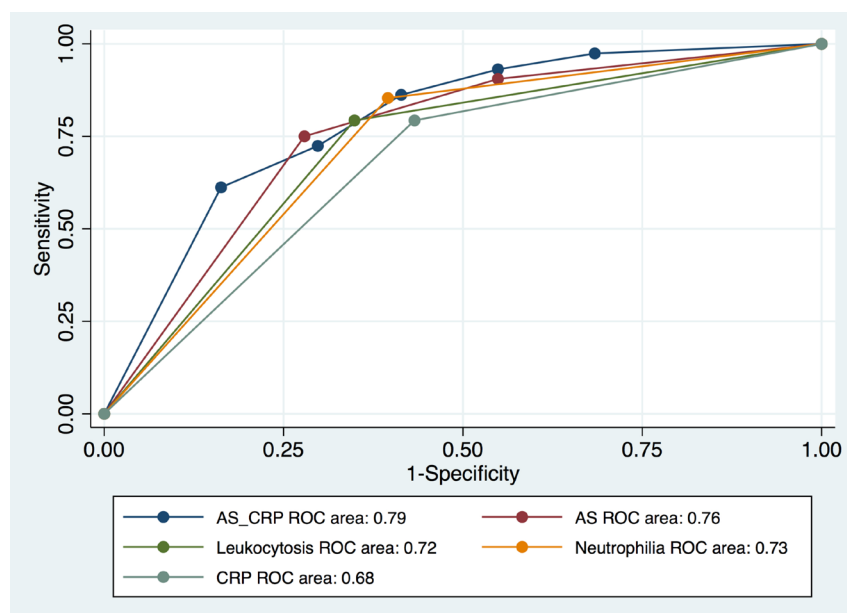
Table 2 Characteristics of the patients included in the study based on the diagnosis of appendicitis.				
	All Patients (n=331)	Appendicitis (n=116)	No Appendicitis (n=215)	p
Demographic data				
Age (years); [mean (SD)]	11.8 (3.8)	11.1 (3.7)	12.2 (3.8)	0.013
Male; [n (%)]	175 (52.9)	74 (63.8)	101 (47.0)	0.003
Clinical data				
Time since symptom onset (hours); [n (%)]				<0.001
0-12	88 (26.6)	19 (16.4)	69 (32.1)	
12-24	63 (19.0)	30 (25.9)	33 (15.3)	
24-48	92 (27.8)	42 (36.2)	50 (23.3)	
48 or more	88 (26.6)	25 (21.6)	63 (29.3)	
Associated Symptoms; [n (%)]				
Periumbilical pain with migration to LRQ	286 (86.4)	104 (89.7)	182 (84.7)	0.205
Anorexia	110 (33.2)	53 (45.7)	57 (26.5)	<0.001
Nausea	165 (49.8)	69 (59.5)	96 (44.7)	0.100
Vomiting	139 (42.0)	65 (56.0)	74 (34.4)	<0.001
Physical Examination; [n (%)]				
Fever (37.8°C)	35 (10.6)	15 (12.9)	20 (9.3)	0.306
LRQ Tenderness	290 (87.6)	109 (94.0)	181 (84.2)	0.010
Rebound tenderness	190 (57.4)	84 (72.9)	106 (49.3)	<0.001
Percussion tenderness	200 (60.4)	87 (75.0)	113 (52.6)	<0.001
Rigidity	98 (29.6)	52 (44.8)	46 (21.4)	<0.001
Rovsing sign	53 (16.0)	26 (22.4)	27 (12.6)	0.020
Laboratory data				
White blood cell count (ml/mm ³); [mean (SD)]	11.7 (6.0)	14.5 (4.7)	10.2 (6.2)	<0.001
Neutrophile (ml/mm ³)	8.5 (4.9)	11.4 (4.7)	6.9 (4.2)	<0.001
C-reactive protein (mg/L); [median (IQR)]	0.83 (0.29-4.08)	3.02 (0.61-6.57)	0.30 (0.19-1.96)	<0.001
Alvarado Score; [n (%)]				
Low-risk	108 (32.6)	11 (9.5)	97 (45.1)	<0.001
Intermediate-risk	76 (23.0)	18 (15.5)	58 (27.0)	
High-risk	147 (44.4)	87 (75.0)	60 (25.9)	
Imaging data				
US; [n (%)]	172 (52.0)	58 (50.0)	114 (53.0)	0.599
CT; [n (%)]	6 (1.8)	3 (2.6)	3 (1.4)	0.438
US and CT; [n (%)]	11 (3.3)	5 (4.3)	6 (2.8)	0.462
No imaging; [n (%)]	189 (57.1)	66 (56.9)	123 (57.2)	0.956
Treatment data				
Surgery; [n (%)]	118 (35.6)	109 (94.0)	9 (4.2)	<0.001

SD: standard deviation; LRQ: lower right quadrant; IQR: interquartile range; US: ultrasound; CT: computerized tomography

Table 3 Diagnosis characteristic of Alvarado Score and C-Reactive Protein test and C-Reactive Protein stratified between three Alvarado Score groups.

	Se (95% CI)	Sp (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)	LHR+ (95% CI)	LHR- (95% CI)	AUC (95% CI)
Alvarado score threshold ≥ 5 (low vs intermediate-high)	90.5 (83.3-94.9)	45.1 (38.4-52.0)	47.1 (40.4-53.8)	89.8 (82.1-94.6)	1.7 (1.4-1.9)	0.2 (0.1-0.4)	0.68 (0.62-0.74)
Alvarado score threshold ≥ 7 (low-intermediate vs high)	75.0 (65.9-82.4)	72.1 (65.5-77.9)	59.2 (50.8-67.1)	84.2 (78.0-89.0)	2.7 (2.1-3.4)	0.35 (0.25-0.48)	0.73 (0.68-0.79)
CRP (Cut-off 0.5 mg/dl)	79.3% (70.6-86.1)	56.7 (49.8-63.4)	49.7 (42.3-57.1)	83.6 (76.3-89.0)	1.8 (1.5-2.2)	0.4 (0.3-0.5)	0.68 (0.62-0.74)
CRP stratified by Alvarado score							
Low risk							
CRP (Cut-off 0.5 mg/dl)	72.7% (39.3-92.7)	70.1% (59.8-78.8)	21.6% (10.4-38.7)	95.8% (87.3-98.9)	2.4 (1.5-3.9)	0.4 (0.2-1.0)	0.71 (0.55-0.87)
Intermediate risk							
CRP (Cut-off 0.5 mg/dl)	72.2% (46.5-89.3)	50.0% (36.7-63.3)	31.0% (18.1-47.2)	85.3% (68.2-94.5)	1.4 (1.0-2.1)	0.6 (0.3-1.2)	0.61 (0.46-0.76)
High risk							
CRP (Cut-off 0.5 mg/dl)	81.6% (71.6-88.8)	41.7% (29.3-55.1)	67.0% (57.1-75.6)	61.0% (44.5-75.4)	1.4 (1.1-1.8)	0.4 (0.3-0.8)	0.62 (0.52-0.71)

Se: Sensibility; Sp: Specificity; PPV: Positive predictive value; NPV: Negative predictive value; LHR+: Likelihood ratio positive; LHR-: Likelihood ratio negative; AUC: area under curve (ROC). CRP: C-reactive protein.



	AUC	95% CI	p
AS-CRP	0.79	0.75-0.84	<0.001
AS	0.76	0.70-0.81	<0.001
Leukocytosis	0.72	0.67-0.78	<0.001
Neutrophilia	0.73	0.67-0.79	<0.001
CRP	0.68	0.62-0.74	<0.001

*AS: Alvarado score; CRP: C-reactive protein; Area under curve (AUC) ROC. Test De Long: AS-CRP vs. AS p=0.033; CRP vs. Leukocytosis p=0.220; CRP vs. Neutrophilia p=0.138

Figure 1 Comparisons between Area under curve (AUC) ROC of leukocytosis, neutrophilia, C-reactive protein (CRP), Alvarado Score (AS) and the combination of CRP and AS for the diagnosis of acute appendicitis.

Table 4 Estimated probability of acute appendicitis according to the risk categories of Alvarado Score and positive C-reactive protein.

Alvarado score	Probability of AA (%)	CRP (mg/dl)	Probability of AA (%)
Low risk	8.8	≤ 0.5	5.2
		> 0.5	15.7
Intermediate risk	27.6	≤ 0.5	15.2
		> 0.5	37.7
High risk	58.2	≤ 0.5	36.9
		> 0.5	66.4
TOTAL	35.0	≤ 0.5	16.4
		> 0.5	49.7

AA: acute appendicitis; CRP: C-reactive protein

The present study shows that the combination of AS and CRP is a useful diagnostic tool to rule out the diagnosis of AA in patients from 2 to 20 years of age attended for abdominal pain suggestive of AA. This strategy showed an improvement in the diagnostic accuracy of the AS used alone.

These findings increase the evidence about the limited diagnosis accuracy of AS to be used in clinical practice as a unique strategy for surgery decision making among paediatrics patients with suspected AA [14-17]. Although the utility of inflammatory markers is still controversial in children, the combination of AS and CRP improved the diagnostic capacity compared with the AS alone [17]. This strategy was especially helpful in low risk AS category.

The CRP, WBC and NP have been the serum markers more studies [18]. Our data confirm that these biomarkers have poor test characteristics alone [17,19]. Regarding the CRP, previous studies have been focused on the diagnosis of AA or differential diagnosis between early and advanced AA [17]. In this sense, a higher cut-off (>3mg/dl) of CRP than our study (>0.5mg/dl) was used [20]. Our strategy was opposed, to increase the negative predictive value of the low-risk AS category, adding the CRP. In fact, the estimated probability of AA varied from 15.7% to 5.2% depending on CRP value in low-risk AS category.

The combination of AS, which includes WBC and NP, allowed identifying a low-risk subgroup of paediatric patients in which more conservative management may be applied with imaging examinations (avoiding or delaying) or final destination (hospital observation or close follow-up if discharged). We agree with other authors that the intent of the model is not to establish the diagnosis of AA, if not to reduce the level of uncertainty [21].

A recent study carried on 402 patients with 8.5+/-3 (range 3 to 13.8) years admitted for suspected AA showed a negative predictive value of 79.7% for AS + CRP and 78.3% for AS + CRP + US, using a cut-off point of 0.6 mg/dL for CRP, among

low-risk AS category [22]. Other recent study with 200 patients, observed more controversial results regarding to accuracy of these clinical scores [23]. In our research, a lower cut-off point (≤0.5mg/dl) showed a negative predictive value of 95.8% (87.3%-98.9%) in low-risk AS category despite the time since symptom onset was lower in our cohort. Another study conducted in adults with suspected of AA, showed a negative predictive value of 86% for CRP (cut-off 0.5 mg/dl) in low-risk AS category [24].

Other scoring systems have included the CRP such as Appendicitis Inflammatory Response Score (AIR Score) [25] and INFURG-SEMES score [26]. A recent study that compared AIR Score with AS showed an improvement of the diagnostic capacity and a higher NPV (95% vs 90% in low-risk vs intermediate-high risk groups) [25]. Thus, panels of biomarkers, such as APPY 1 Test that also includes CRP, are being researched to rule out the AA in EDs [27].

The present study presents several limitations. First, those inherent in the design of the study. Second, the time of course of AA could have modified the findings of the study. In this sense, the sample size was limited to do stratified analyses based on the time of sample obtainment for the CRP at arrival to ED concerning the onset of the symptomatology. Third, this was an observational study and, thus, we cannot demonstrate that the addition of CRP to AS reduces the number of imaging tests, unnecessary surgical procedures, the times of hospital stay or the associated costs. The fourth limitation is a possible detection bias in the AA on the index visit. To avoid this, we used a 2-week follow-up for patients discharged without surgery to confirm they were correct classification. Finally, we did not evaluate interobserver agreement in the AS calculation because this is a validated model.

In conclusion, the CRP is a biomarker extensively available in EDs. The combination of CRP and AS has shown to increase the diagnostic accuracy of AS for AA. This approach may be useful to rule out the diagnosis of AA in patients from 2 to

20 years of age attended for abdominal pain suggestive of AA.

FUNDING

This study had financial support from Infectious Disease Group of Spanish Emergency Medicine Society (SEMES).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest

REFERENCES

- Hastings RS, Powers RD. Abdominal pain in the ED: a 35 year retrospective. *Am J Emerg Med*. 2011;29(7):711-6. DOI: 10.1016/j.ajem.2010.01.045
- Tseng YC, Lee MS, Chang YJ, Wu HP. Acute abdomen in pediatric patients admitted to the pediatric emergency department. *Pediatr Neonatol*. 2008;49:126-34. DOI: 10.1016/S1875-9572(08)60027-3
- Martínez Ortiz de Zárate M, González Del Castillo J, Julián Jiménez A, Piñera Salmerón P, Llopis Roca F, Guardiola Tey JM, et al. Epidemiology of infections treated in hospital emergency departments and changes since 12 years earlier: the INFURG study of the Spanish Society of Emergency Medicine (SEMES). *Emergencias*. 2013;25:368-78.
- Bliss D, McKee J, Cho D, Krishnaswami S, Zallen G, Harrison M et al. Discordance of the pediatric surgeon's intraoperative assessment of pediatric appendicitis with the pathologists report. *J Pediatr Surg* 2010; 45: 1398- 1403. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2010.02.048
- Rothrock SG, Pagane J. Acute appendicitis in children: emergency department diagnosis and management. *Ann Emerg Med*. 2000;36:39-51. DOI: 10.1067/mem.2000.105658
- Becker T, Kharbanda A, Bachur R. Atypical clinical features of pediatric appendicitis. *Acad Emerg Med*. 2007;14:124-9. DOI: 10.1197/j.aem.2006.08.009
- Fujii T, Tanaka A, Katami H, Shimono R. Usefulness of the pediatric appendicitis score for assessing the severity of acute appendicitis in children. *Pediatr Int*. 2020;62(1):70-73. DOI: 10.1111/ped.14032
- Ohle R, O'Reilly F, O'Brien KK, Fahey T, Dimitrov BD. The Alvarado score for predicting acute appendicitis: a systematic review. *BMC Med*. 2011 28;9:139. doi: 10.1186/1741-7015-9-139. DOI: 10.1186/1741-7015-9-139
- Buyukbese Sarsu S, Sarac F. Diagnostic Value of White Blood Cell and C-Reactive Protein in Pediatric Appendicitis. *Biomed Res Int*. 2016;2016:6508619. DOI: 10.1155/2016/6508619
- Zouari M, Jallouli M, Louati H, Kchaou R, Chtourou R, Kotti A, et al. Predictive value of C-reactive protein, ultrasound and Alvarado score in acute appendicitis: a prospective pediatric cohort. *Am J Emerg Med*. 2016;34:189-92. DOI: 10.1016/j.ajem.2015.10.004
- Old O. C-Reactive protein estimation does not improve accuracy in the diagnosis of acute appendicitis in pediatric patients. *Int J Surg*. 2011;9(5):440. DOI: 10.1016/j.ijsu.2008.11.001
- Xharra S, Gashi-Luci L, Xharra K, Veselaj F, Bicaj B, Sada F, et al. Correlation of serum C-reactive protein, white blood count and neutrophil percentage with histopathology findings in acute appendicitis. *World J Emerg Surg*. 2012;7(1):27. doi: 10.1186/1749-7922-7-27. DOI: 10.1186/1749-7922-7-27.
- Shogilev DJ, Duus N, Odom SR, Shapiro NI. Diagnosing appendicitis: evidence-based review of the diagnostic approach in 2014. *West J Emerg Med*. 2014;15(7):859-71. DOI: 10.5811/westjem.2014.9.21568
- Heineman J. Towards evidence based emergency medicine: Best BETs from the Manchester Royal Infirmary. BET 1: An evaluation of the Alvarado score as a diagnostic tool for appendicitis in children. *Emerg Med J*. 2012;29:1013-4. DOI: 10.1136/emmermed-2012-202054.2
- Ebell MH, Shinholser J. What are the most clinically useful cutoffs for the Alvarado and Pediatric Appendicitis Scores? A systematic review. *Ann Emerg Med*. 2014;64:365-372. DOI: 10.1016/j.annemergmed.2014.02.025
- Ohle R, O'Reilly F, O'Brien KK, Fahey T, Dimitrov BD. The Alvarado score for predicting acute appendicitis: a systematic review. *BMC Med*. 2011;9:139. DOI: 10.1186/1741-7015-9-139
- Benabbas R, Hanna M, Shah J, Sinert R. Diagnostic Accuracy of History, Physical Examination, Laboratory Tests, and Point-of-care Ultrasound for Pediatric Acute Appendicitis in the Emergency Department: A Systematic Review and Meta-analysis. *Acad Emerg Med*. 2017;24(5):523-551. DOI: 10.1111/acem.13181
- Yu CW, Juan LI, Wu MH, Shen CJ, Wu JY, Lee CC. Systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of procalcitonin, C-reactive protein and white blood cell count for suspected acute appendicitis. *Br J Surg*. 2013;100:322-9. DOI: 10.1002/bjs.9008
- Schellekens DH, Hulsewé KW, van Acker BA, van Bijnen AA, de Jaegere TM, Sastrowijoto SH et al. Evaluation of the diagnostic accuracy of plasma markers for early diagnosis in patients suspected for acute appendicitis. *Acad Emerg Med*. 2013;20(7):703-10. DOI: 10.1111/acem.12160
- Kwan KY, Nager AL. Diagnosing pediatric appendicitis: usefulness of laboratory markers. *Am. J. Emerg. Med* 2010; 28(9): 1009-1015. PMID: 20825931
- Brito-Brito PR, García-Tesouro E, Fernández-Gutiérrez DA, García-Hernández AM, Fernández-Gutiérrez R, Burillo-Putze G. Validation of an uncertainty of illness scale adapted to use with Spanish emergency department patients and their accompanying relatives or friends. *Emergencias*. 2018;30:105-14. PMID: 29547233
- Zouari M, Jallouli M, Louati H, Kchaou R, Chtourou R, Kotti A et al. Predictive value of C-reactive protein, ultrasound and Alvarado score in acute appendicitis: a prospective pediatric cohort. *Am J Emerg Med*. 2016;34(2):189-92. DOI: 10.1016/j.ajem.2015.10.004
- Farahbakhsh F, Torabi M, Mirzaee M. A comparative study on the diagnostic validity of three scoring systems in the diagnosis of acute appendicitis in emergency centres. *Afr J Emerg Med*. 2020;10(3):132-135. DOI: 10.1016/j.afjem.2020.04.009
- Thirumallai S, Wijesuriya SR, Mitchell A, Delriviere L. Predictive val-

ue of C-reactive protein with Alvarado score in acute appendicitis. ANZ J Surg. 2014;84(5):335-6. DOI: 10.1111/ans.12408

25. Andersson M, Andersson RE. The appendicitis inflammatory response score: a tool for the diagnosis of acute appendicitis that outperforms the Alvarado score. World J Surg. 2008;32:1843-1849. DOI: 10.1007/s00268-008-9649-y
26. Altali K, Ruiz-Artacho P, Trenchs V, Martínez Ortiz de Zárate M, Navarro C, Fernández C, et al. Hospital emergency room diagnosis of acute appendicitis in patients aged 2 to 20 years: the INFURG-SEMES score from the emergency infections study of the Spanish Society of Emergency Medicine. Emergencias. 2017;29:231-6. PMID: 28825277
27. González Del Castillo J, Ayuso FJ, Trenchs V, Martínez Ortiz de Zárate M, Navarro C, Altali K, et al. Diagnostic accuracy of the APPY1 Test in patients aged 2-20 years with suspected acute appendicitis presenting to emergency departments. Emerg Med J. 2016;33(12):853-859. DOI: 10.1136/emermed-2015-205259

Rafael Cantón^{1,2}
Elena Loza¹
Ricardo M. Arcay³
Emilia Cercenado⁴
Francisco Javier Castillo⁵
Ramón Cisterna⁶
Lidia Gálvez-Benítez⁷
Fernando González Romo⁸
Alicia Hernández-Cabezas⁹
Jesús Rodríguez-Lozano¹⁰
Ana Isabel Suárez-
Barrenechea¹¹
Fe Tubau¹²
Jazmín Díaz-Regañón¹³
Diego López-Mendoza¹³
and the SMART-Spain
Working Group

Antimicrobial activity of ceftolozane-tazobactam against *Enterobacteriales* and *Pseudomonas aeruginosa* recovered during the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program in Spain (2016-2018)

¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain.

²Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Madrid, Spain.

³Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Espases e Instituto de Investigación Sanitaria Islas Baleares (IDIS-BA), Mallorca, Spain.

⁴Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain. Centro de Investigación en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, Spain.

⁵Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza. IIS Aragón, Spain.

⁶Servicio de Microbiología Clínica y Control de Infección, Hospital Basurto. Facultad de Medicina UPV/EHU, Bilbao;

⁷Servicio de Microbiología. Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva. Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain.

⁸Servicio de Microbiología Clínica, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain.

⁹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain.

¹⁰Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla e Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain.

¹¹Servicio de Microbiología. Unidad de Gestión Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla, Spain.

¹²Servicio de Microbiología Hospital Universitario Bellvitge e Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL), Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

¹³Departamento Médico MSD España, Madrid, Spain.

Article history

Received: 24 January 2021; Accepted: 17 February 2021; Published: 1 March 2021

ABSTRACT

Objective. To analyse the susceptibility to ceftolozane-tazobactam and comparators in *Enterobacteriales* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from intraabdominal (IAI), urinary (UTI), respiratory (RTI) and bloodstream infection (BSI) in the SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends) study.

Methods. The susceptibility of 5,351 isolates collected in 11 Spanish hospitals (2016-2018) were analysed (EUCAST-2020 criteria) by broth microdilution and were phenotypically studied for the presence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL). Ceftolozane-tazobactam and/or carbapenem resistant isolates were genetically characterized for ESBL and carbapenemases.

Results. *Escherichia coli* was the most frequent pathogen (49.3% IAI, 54.9% UTI, 16.7% RTI and 50% BSI), followed by *Klebsiella pneumoniae* (11.9%, 19.1%, 13.1% and 15.4%, respectively). *P. aeruginosa* was isolated in 9.3%, 5.6%, 32% and

9%, respectively. The frequency of isolates with ESBLs (2016-2017) was: 30.5% *K. pneumoniae*, 8.6% *E. coli*, 2.3% *Klebsiella oxytoca* and 0.7% *Proteus mirabilis*. Ceftolozane-tazobactam was very active against non-ESBL (99.3% susceptible) and ESBL (95.2%) producing *E. coli* being less active against *K. pneumoniae* (98% and 43.1%, respectively) isolates. CTX-M-15 was the most prevalent ESBL in *E. coli* (27.5%) and *K. pneumoniae* (51.9%) frequently associated with OXA-48-like carbapenemase. Overall, 93% of *P. aeruginosa* isolates were susceptible to ceftolozane-tazobactam, preserving this activity (>75%) in isolates resistant to other beta-lactams except in those resistant to meropenem or ceftazidime-avibactam. GES-5, PER-1, VIM-1/2 were the most prevalent enzymes in isolates resistant to ceftolozane-tazobactam.

Conclusions. Ceftolozane-tazobactam showed high activity rates against isolates recovered in the SMART study although it was affected in *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* isolates with ESBL and/or carbapenemases.

Key words: Ceftolozane-tazobactam, *Enterobacteriales*, *Pseudomonas aeruginosa*, surveillance study.

Correspondence:
Rafael Cantón
Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid.
Carretera de Colmenar Km 9,1. 28034-Madrid. Spain.
Phone: 91 336 83 30
E-mail: rafael.canton@salud.madrid.org

Actividad antimicrobiana de ceftolozano-tazobactam en *Enterobacterales* y *Pseudomonas aeruginosa* en el programa de vigilancia SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends) en España (2016-2018)

RESUMEN

Objetivo. Analizar la sensibilidad a ceftolozano-tazobactam y antimicrobianos comparadores en *Enterobacterales* y *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de infecciones intraabdominales (IIA), urinarias (ITU) y respiratorias (ITR) y bacteriemias del estudio SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends).

Métodos. Se analizó (EUCAST-2020) la sensibilidad de 5.351 aislados recogidos en 11 hospitales españoles (2016-2018) mediante microdilución en caldo y se estudió fenotípicamente la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). En aislados resistentes a ceftolozano-tazobactam y/o carbapenémicos se caracterizaron las BLEE y carbapenemasas.

Resultados. *Escherichia coli* fue el patógeno más frecuente (49,3% IIA, 54,9% ITU, 16,7% ITR y 50% bacteriemia), seguido de *Klebsiella pneumoniae* (11,9%, 19,1%, 13,1% y 15,4%, respectivamente). *P. aeruginosa* se aisló en el 9,3%, 5,6%, 32% y 9%, respectivamente. La frecuencia de aislados con BLEE (2016-2017) fue: 30,5% *K. pneumoniae*, 8,6% *E. coli*, 2,3% *Klebsiella oxytoca* y 0,7% *Proteus mirabilis*. Ceftolozano-tazobactam fue muy activo en *E. coli* no productor (sensibilidad 99,3%) y productor de BLEE (95,2%) y menos activo en *K. pneumoniae* (98% y 43,1%, respectivamente). CTX-M-15 fue la BLEE más prevalente en *E. coli* (27,5%) y *K. pneumoniae* (51,9%) frecuentemente asociada con OXA-48-like. Un 93% de los aislados de *P. aeruginosa* fueron sensibles a ceftolozano-tazobactam, que mantuvo su actividad (>75%) en aislados resistentes a otros betalactámicos excepto en los resistentes a meropenem o ceftazidima-avibactam. GES-5, PER-1, VIM-1/2 fueron las enzimas más prevalentes en aislados resistentes a ceftolozano-tazobactam.

Conclusiones. Ceftolozano-tazobactam mostró elevada sensibilidad frente a los aislados del estudio SMART, aunque disminuyó en *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* con BLEE y/o carbapenemasas.

Palabras clave: Ceftolozano-tazobactam, *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa*, estudio de vigilancia.

INTRODUCTION

Over the last years health authorities and professionals have alerted of the worrisome increase of antimicrobial resistance as well as its consequences in term of sanitary costs, management of the patients and mortality [1-3]. Different documents, including, among others, the Global Action Plan on Antimicrobial Resistance from the World Health Organization (WHO) [4], the Interagency Coordination Group

on Antimicrobial Resistance of the United Nations [5] and the European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance from the European Commission [6], have delineated the strategies to address this problem. All of them agree not only to establish or to improve antimicrobial stewardship programs, hygiene, sanitation and infection control practices, to reduce the antimicrobial use and to increase the research on new antimicrobial drugs but also to intensify our efforts on surveillance. Surveillance programs are delineated to monitor antimicrobial use and resistance trends, to detect the emergence of new resistance mechanisms, to measure the impact of the introduction of new drugs into the antimicrobial armamentarium and to better use these compounds empirically.

The Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) is a world-wide surveillance program created in 2002 to monitor trends of antimicrobial susceptibility of aerobic and facultative Gram-negative bacilli from intra-abdominal infections (IAIs) with special attention on ertapenem and extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) producing *Enterobacterales* [7]. The objectives were expanded to include isolates recovered from urinary tract infections (UTIs) in 2009, lower respiratory tract infections (RTI) in 2015 and bloodstream infections (BSI) in 2018. Moreover, it is now also focused on carbapenem resistance and carbapenemases in *Enterobacterales* and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and to monitor newly approved antimicrobial agents, including ceftolozane-tazobactam and imipenem-relebactam [8,9].

Spain has participated in the SMART program since its initiation and several publications have summarized resistance in *Enterobacterales* and trends in ESBL producers [10-14]. In this article we present data on the activity of ceftolozane-tazobactam, a new beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combination [15], in comparison with other antimicrobial drugs used in IAI, UTI, RTI, and BSI in SMART isolates recovered in the 2016-2018 period in Spain.

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms and participating centres. Consecutive unselected aerobic and facultative Gram-negative bacilli were obtained from 2016 to 2018 in 11 participating Spanish Hospitals (2016: Clínico de San Carlos, Madrid; Virgen Macarena, Seville; Marqués de Valdecilla, Santander; Basurto, Bilbao; Clínico Lozano Blesa, Zaragoza; 2016 to 2018: Ramón y Cajal, Madrid; Bellvitge, Barcelona; Gregorio Marañón, Madrid; La Fe, Valencia; Virgen del Rocío, Seville; and Son Espases, Palma de Mallorca). Each site collected up to the indicated number of isolates (one isolate per species and patient to avoid duplicates): 100 from IAI, 100 from RTI and 50 from UTI in 2016; 75 from IAI, 100 from RTI, and 75 from UTI in 2017; and 50 from IAI, 100 from RTI, 50 from UTI and 50 from blood in 2018.

Peritoneal fluid (23%) was the most frequent intra-abdominal sample followed by gall bladder (20%) samples.

Almost 100% of the samples were from urine in patients with UTI. Regarding RTI, sputum (26%) was the most frequent sample. Isolates were identified at the species level in each hospital and sent to a central laboratory [IHMA (International Health Management Associates, Inc., Schaumburg, IL, USA)] to confirm the identification and determine the susceptibility to ceftolozane-tazobactam and comparator antimicrobial agents. All the results were included in a centralized database. Patient's age was also included. Moreover, following the standard criteria of the *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), the organisms were also rated as associated with a community-acquired infection (isolates obtained within 48 h after hospitalization) or with a nosocomial-infection (isolates obtained after 48 h of hospital stay) [16].

Antimicrobial susceptibility and interpretive criteria. Broth microdilution following the standard ISO recommendations was performed at the central laboratory (IHMA) using MicroScan microdilution panels (Beckman, West Sacramento, CA, USA). The antimicrobials and range of concentrations (mg/L) tested were: piperacillin-tazobactam (2/4-64/4), ceftriaxone (1-8), ceftazidime (1-16), cefepime (1-16), ceftolozane-tazobactam (0.125/4-1/4), ceftazidime-avibactam (0.125/4-0.5/4), aztreonam (1-16), imipenem (0.125-4), meropenem (0.125-0.5), ertapenem (0.06-4), amikacin (4-16), colistin (1-2), ciprofloxacin (0.25-2) and levofloxacin (0.5-4). Susceptibility to amoxicillin-clavulanic acid (2/2-256/2) was performed with a MIC gradient strip (Etest®, bioMérieux, Lyon, France). *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (positive control for ESBL) and *P. aeruginosa* ATCC 27853 were used as quality control strains. All MIC results were interpreted using EUCAST recommendations [17]. When isolates were categorized as "I" (formerly "intermediate" and now indicating "susceptible, increased exposure"), the percentage of "I" isolates were collated with "S" isolates ("susceptible, standard dose") and presented as susceptible.

Phenotypic and molecular characterization of ESBL and carbapenemases. Production of ESBL in 2016 and 2017 was phenotypically inferred in *E. coli*, *Klebsiella* spp. and *Proteus mirabilis* following CLSI criteria [19]. In 2018, ESBLs were not phenotypically investigated. Additionally, the presence of ESBL and carbapenemase genes were characterized molecularly in all *E. coli* and *Klebsiella* spp. isolates that were non-susceptible to ertapenem (MIC >0.5 mg/L) and/or ceftolozane-tazobactam (MIC >2/4 mg/L) as well as in approximately 50% of isolates susceptible to ertapenem, imipenem and/or ceftolozane-tazobactam that were non-susceptible to one or more of the following antibiotics: ceftriaxone (MIC >1 mg/L), cefepime (MIC >2 mg/L), ceftazidime (MIC >4 mg/L), and aztreonam (MIC >4 mg/L). These criteria were slightly modified in 2017 and 2018 and ESBL and carbapenemase characterization was restricted to isolates from these species non-susceptible to ertapenem (MIC >0.5 mg/L), imipenem (MIC >1 mg/L) and/or imipenem-relebactam (MIC >1/4 mg/L) and/or ceftolozane-tazobactam (MIC >2/4 mg/L). In *P. aeruginosa* isolates, ESBL and carbapenemase genes were characterized in isolates

non-susceptible to ceftolozane-tazobactam (MIC >4/4 mg/L) and/or imipenem (MIC >2 mg/L) and/or imipenem-relebactam (MIC >2/4 mg/L) (data of imipenem-relebactam not shown).

Screening of the resistance genes was performed as described previously by multiplex PCR and sequencing and include the following β -lactamase genes: class A ESBLs (TEM, SHV, CTX-M, VEB, PER, and GES); class C plasmid AmpC (ACC, ACT, CMY, DHA, FOX, MIR, MOX), and carbapenemases [KPC, GES (class A), NDM, IMP, VIM GIM, SPM (class B, MBLs), OXA-48-like (*Enterobacterales* only) and OXA-24-like (*P. aeruginosa* only) (class D)] [19,20]. Rates of carbapenemase-positive isolates were calculated based on data available for molecularly characterized isolates.

Statistical analysis. Comparison of different frequencies were performed using the chi-squared test (χ^2) taking $P < 0.05$ as statistically significant.

RESULTS

Bacterial distribution. Over the three-year period (2016-2018), a total of 5,351 isolates were collected in the Spanish participating centers in the SMART study. Breakdown by type of infection is shown for 5,334 in table S1 (supplementary material) as 0.3% of the isolates were excluded in this analysis but not in the susceptibility and molecular studies as their specimen source was not provided. *Enterobacterales* (n=4,151) constituted 77.8% of the total isolates, with *E. coli* in this group being the most frequently isolated microorganism (48.8%), followed by *Klebsiella* spp. (26.4%). The other Gram-negative bacilli (1,183, 22.2%) were mostly non-fermenters, being *P. aeruginosa* the most frequent (77.9%) followed by *Stenotrophomonas maltophilia* (12.4%). As expected, relevant differences regarding the infection site were observed, being *E. coli* isolates more relevant in UTI (54.9%) than in other infection sites (range 16.7-50.0%) and *P. aeruginosa* isolates in RTI (32.0%) than in the others (range 5.6-9.3%).

Antimicrobial activity and phenotypic ESBL production in *Enterobacterales*. Table 1 shows the susceptibility profile of different antimicrobials tested against the most common *Enterobacterales* species. Overall, ceftolozane-tazobactam susceptibility (isolates categorized as S plus I) ranged from 79.4% to 100%. Of note, susceptibility was higher for ceftolozane-tazobactam than for piperacillin-tazobactam (range 72.7-99.5%) or amoxicillin-clavulanate (range 66.5-85.5%) and similar or slightly inferior than that of ceftazidime-avibactam (97.7-100.0%). Antibiotics for which all different frequent species demonstrated susceptibilities higher than 90% were colistin, amikacin, imipenem and meropenem (Table 1).

In the 2016 and 2017 years, the presence of ESBLs was studied phenotypically in 2,298 *Enterobacterales* (1,447 *E. coli*, 704 *Klebsiella* spp. and 147 *Proteus mirabilis*), of which 303 (13.1%) presented this phenotype. Figure S1 (supplementary material) shows the distribution of ESBL producers, also including information by infection site. The highest frequency was found in *K. pneumoniae* (30.5%, 174/571), followed by

E. coli (8.6%, 125/1447) and *Klebsiella oxytoca* (2.3%, 3/130), being irrelevant in *P. mirabilis* (0.7%, 1/147). The percentage of ESBL-producing *K. pneumoniae* was higher in UTI (32.7%, 67/205) than in the other locations. In *E. coli* the highest rate was present in RTI (12.2%, 29/237).

Overall, ESBL production was significantly associated with nosocomial infections when compared with those acquired in the community in isolates with this information for *K. pneumoniae* (33.7%, 142/421 vs. 21.3%, 32/150, $P=0.004$) but not for *E. coli* (9.7%, 74/690 vs. 7.5%, 51/678, $P=0.144$). Moreover, an increase of ESBL production was observed both in *K. pneumoniae* (<30 years: 21.9%, 9/41; 30–60 years: 25.4%, 43/169; >60 years: 51.0%, 122/361. $P<0.001$) and *E. coli* (<30 years: 4.2%, 7/171; 30–60 years: 7.3%, 29/425; >60 years: 11.6%, 89/850. $P=0.07$) with the increasing of age in patients.

The activity of ceftolozane-tazobactam and other antimicrobials against *E. coli* and *K. pneumoniae* non-ESBL and ESBL producers recovered in 2016 and 2017 is shown in Figure S2 (supplementary material). Figure 1 shows ceftolozane-tazobactam MIC distribution of these organisms. This combination was very active in both *E. coli* non-ESBL (99.3% susceptible) and ESBL (95.2% susceptible) producers. The activity of ceftolozane-tazobactam was similar or close to that of carbapenems, amikacin, and colistin. On the contrary, the presence of ESBL in *K. pneumoniae* was associated with a reduction in the activity of ceftolozane-tazobactam (98% vs. 43.1% susceptible); nevertheless, it was less affected than piperacillin-tazobactam (90.2% vs. 25.9% susceptible) or amoxicillin-clavulanate (84.1 vs. 25.1% susceptible). As expected, the presence of ESBL dramatically affected the activity of extended spectrum cephalosporins and was associated with a decreased susceptibility of ciprofloxacin both in *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates (Figure S2).

Table 2 analyses the activity of ceftolozane-tazobactam in *E. coli* and *K. pneumoniae* non-ESBL and ESBL producers that are resistant to different antibiotics. In *E. coli*, ceftolozane-tazobactam was active against more than 80% of isolates that were resistant to amoxicillin-clavulanate, piperacillin-tazobactam, meropenem or ciprofloxacin both in non-ESBL and ESBL producers. This activity was lower in ESBL-producing *K. pneumoniae* isolates that were resistant to these antimicrobial agents. Resistance to meropenem in these isolates denotes coproduction of carbapenemases in which ceftolozane-tazobactam is not active and all of them were categorized as resistant.

Antimicrobial activity in *P. aeruginosa*. The antibiotic susceptibility profile of *P. aeruginosa* is shown in Table 3. The behaviour of ceftolozane-tazobactam was excellent; only 7.0% of the 925 isolates studied were resistant to this antibiotic. Regarding the percentage of susceptible isolates (S+I), the most active antimicrobials were colistin (99.3%), followed by amikacin (94.6%), ceftazidime-avibactam (94.0%) and ceftolozane-tazobactam (93.0%). The least active compounds were the fluoroquinolones with susceptible figures of 63.5% for ciprofloxacin and 56.0% for levofloxacin. The activity of ceftolozane-tazobactam was not compromised by infection site with 93.1%, 93.0%, 92.9% and 92.6% of the IAI, UTI, RTI and BSI isolates susceptible to this antibiotic. Overall MIC distribution for this antibiotic can be observed in figure 2.

Table 4 shows the activity of ceftolozane-tazobactam in *P. aeruginosa* isolates resistant to different beta-lactams, including multidrug resistant ones. The activity of ceftolozane-tazobactam ranged from 75.4% to 80.8%, except for isolates that were resistant either alone or combined to meropenem and ceftazidime-avibactam, denoting the potential involvement of carbapenemase associated resistance mechanisms [21].

Table 1 Activity of different antimicrobial agents against most common *Enterobacterales* species collected in Spain in the SMART study (2016–2018)

Microorganisms	Percentage of susceptible (S+I) ^a isolates														
	AMC (≤8/4)	PTZ (≤16/4)	CTX (≤2)	CAZ (≤4)	FEP (≤4)	ATM (≤4)	CTZ (≤2/4)	CZA (≤8/4)	IMP (≤4)	MEM (≤8)	ETP (≤0.5)	CIP (≤0.5)	LVX (≤1)	AMK (≤8)	COL (≤2)
<i>Escherichia coli</i>	79.4	92.6	89.9	91.4	92.7	90.3	99.2	100.0	100.0	100.0	99.2	67.7	68.5	98.4	99.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	66.5	72.7	67.6	71.1	71.9	71.6	83.7	100.0	97.1	97.6	85.6	65.0	70.2	99.0	94.9
<i>Klebsiella oxytoca</i>	83.0	89.4	97.7	97.2	97.8	91.1	97.2	97.8	99.4	99.4	98.3	95.5	96.1	100.0	100.0
<i>Proteus mirabilis</i>	85.5	99.5	96.6	99.1	100.0	100.0	99.1	100.0	98.6	100.0	100.0	59.2	64.2	99.1	-- ^b
<i>Enterobacter cloacae</i>	-- ^b	78.8	70.8	75.5	89.2	78.4	81.3	95.7	97.5	97.9	85.1	86.3	87.1	100.0	90.9
<i>Citrobacter freundii</i>	-- ^b	77.9	66.1	67.6	97.1	73.5	79.4	100.0	97.1	97.1	97.1	92.6	91.2	100.0	100.0
<i>Morganella morganii</i>	-- ^b	98.9	83.1	86.8	97.8	96.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	63.7	75.8	100.0	-- ^b
<i>Serratia marcescens</i>	-- ^b	95.9	92.1	98.8	98.8	98.8	97.6	97.7	95.9	99.4	97.1	91.8	93.5	98.8	-- ^b

^aS = susceptible, standard dose, I = susceptible, increased exposure, EUCAST criteria except AMC in which CLSI criteria were considered; ^bThis species is considered intrinsically resistant to this antimicrobial; AMC: amoxicillin-clavulanic acid, PTZ: piperacillin-tazobactam, CTX: cefotaxime, CAZ: ceftazidime, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, CTZ: ceftolozane-tazobactam, CZA: ceftazidime-avibactam, IMP: imipenem, MEM: meropenem, ETP: ertapenem, CIP: ciprofloxacin, LVX: levofloxacin, AMK: amikacin, COL: colistin

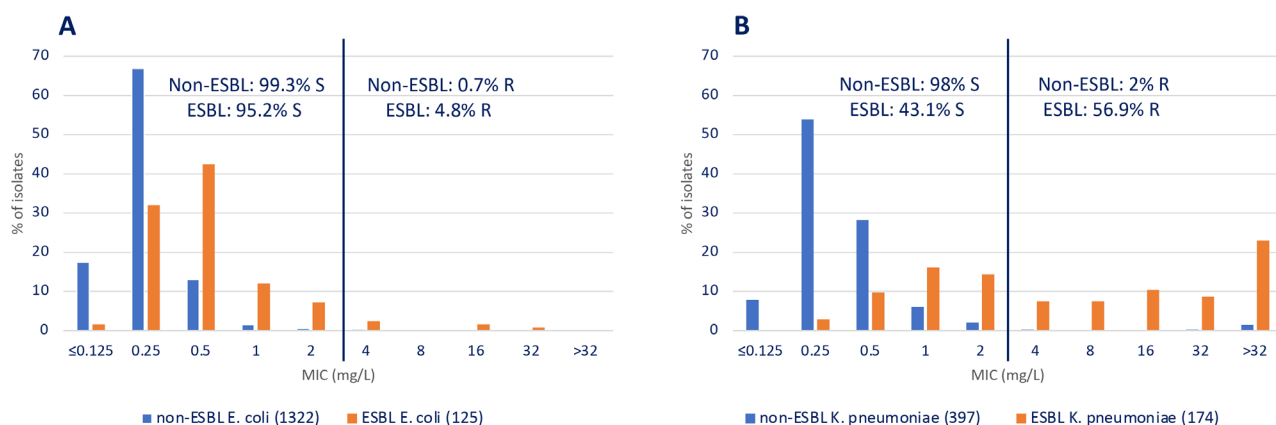


Figure 1 MIC distribution of ceftolozane–tazobactam in non-ESBL and ESBL producing *Escherichia coli* (A) and *Klebsiella pneumoniae* (B) isolates recovered in Spain in the SMART study (2016 and 2017). Ceftolozane–tazobactam susceptibility was calculated using EUCAST-2020 breakpoints [18]. Breakpoints are indicated with a line.

Table 2 Activity of ceftolozane–tazobactam in non-ESBL and ESBL producing <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates resistant to amoxicillin/clavulanate (AMC), piperacillin/tazobactam (P/T), meropenem (MER) and ciprofloxacin (CIP) in the SMART study (2016 and 2017) in Spain.					
Microorganisms	ESBL (No.)	Antimicrobial	No. (% of resistant isolates)	Ceftolozane–tazobactam	
				Susceptible No. (%)	Resistant No. (%)
<i>Escherichia coli</i>	Negative (318) ^a	AMC ^a	52 (16.3)	50 (96.1)	2 (3.9)
	Positive (29) ^a		16 (55.1)	14 (87.5)	2 (12.5)
	Negative (1322)	P/T	85 (6.4)	78 (91.7)	7 (8.3)
	Positive (125)		23 (18.4)	19 (82.6)	4 (17.4)
	Negative (1322)	MER	0 (0)	--	--
	Positive (125)		0 (0)	--	--
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negative (1322)	CIP	331 (25)	325 (98.2)	6 (1.8)
	Positive (125)		110 (88)	106 (96.4)	4 (3.6)
	Negative (62) ^a	AMC ^a	5 (8.0)	5 (100)	0 (0)
	Positive (19) ^a		9 (47.3)	3 (33.3)	6 (66.6)
	Negative (397)	P/T	39 (9.8)	31 (79.5)	8 (20.5)
	Positive (174)		129 (74.1)	32 (24.8)	97 (75.2)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negative (397)	MER	5 (1.2)	0 (0)	5 (100)
	Positive (174)		11 (6.3)	0 (0)	11 (100)
	Negative (397)	CIP	48 (12.0)	41 (85.4)	7 (14.6)
	Positive (174)		164 (94.2)	69 (42.1)	95 (57.9)

^aAMC: data are only from 2017

Table 3 Activity of different antimicrobials against *Pseudomonas aeruginosa* collected in Spain in the SMART study (2016-2018)

Antimicrobial	No. of isolates tested	Range	MIC50	MIC90	S (susceptible, standard dose)	I (susceptible, increased exposure)	R (resistant)
Piperacillin-tazobactam	925	≤2/4 - >64/4	8/4	>64/4	--	66.8	33.2
Ceftazidime	925	≤1 - >32	4	>32	--	71.8	28.2
Cefepime	925	≤1 - >32	4	32	--	72.3	27.7
Ceftolozane-tazobactam	925	≤0.12/4 - >32/4	1/4	4/4	93.0	--	7.0
Ceftazidime-avibactam ^a	217	≤0.12/4 - >32/4	2/4	8/4	94.0	--	6.0
Aztreonam	925	≤1 - >16	8	>16	--	79.7	20.3
Imipenem	925	≤0.12 - >32	1	16	--	75.5	24.5
Meropenem	925	≤0.12 - >32	0.5	16	74.7	14.0%	11.3
Tobramycin ^a	217	≤0.5 - >8	≤0.5	>8	77.4	--	22.6
Amikacin	925	≤4 - >32	≤4	8	94.6	--	5.4
Ciprofloxacin	925	≤0.25 - >2	≤0.25	>2	--	63.5	36.5
Levofloxacin	925	≤0.5 - >4	≤1	>4	--	56.0	44.0
Colistin	925	≤1 - >4	≤1	≤1	99.3	--	0.7

^aData are only for 2018

Molecular characterization of ESBLs and carbapenemases. Molecular studies for ESBLs and carbapenemases were performed in 80 *E. coli*, 160 *K. pneumoniae* and 267 *P. aeruginosa* isolates (Table S2 and S3 supplementary material). In *E. coli*, CTX-M-15 (27.5%, 22/80), either alone or with another enzyme, including carbapenemases, was the most prevalent ESBL, followed by CTX-M-27 (8.7%, 7/80), SHV-12 (7.5%, 6/80), and CTX-M-14 (6.2%, 5/80). The most prevalent carbapenemase in this species was OXA-48-like (11.2%, 9/80) mainly present in ceftolozane-tazobactam susceptible isolates. Highly resistant isolates (MIC >8/4 mg/L) frequently presented combinations of different enzymes being two of them a VIM-1 and a KPC-type carbapenemase. To note that one ceftolozane-tazobactam susceptible *E. coli* isolate (CMI=0.25/4 mg/L) presented a KPC-3 enzyme.

In *K. pneumoniae*, the situation was more complex than in *E. coli* (Table S2). The most prevalent ESBL was also CTX-M-15 (51.9%, 83/160), in most cases associated with OXA-48-like (n=61). SHV-12 was also prevalent (18.1%, 29/160), also associated with OXA-48-like (n=15). Ceftolozane-tazobactam resistant isolates normally presented with 2 or 3 enzymes. KPC-3 and metallo-beta-lactamases (VIM-1 or NDM-1) were only present in highly resistant ceftolozane-tazobactam resistant isolates (MIC >8/4 mg/L).

Finally, in *P. aeruginosa* isolates (Table S3), PER-1 (0.7%, 2/267) and GES-5 (0.7%, 2/267) enzymes were scarcely found. Metallo-beta-lactamases (VIM-1, VIM-2, VIM-20 and IMP-13) were present in 8.6% (23/267) of the isolates. KPC were not found, but one isolate had a CTX-M-2 ESBL.

DISCUSSION

Surveillance studies have been highlighted as an important tool to address the problem of antimicrobial resistance both at local and global levels [4-6,22]. The SMART study had monitored the activity of ertapenem in IAI since 2002 but now it is also including ceftolozane-tazobactam susceptibility, expanding the focus to UTI, RTI and BSI [8]. In this publication we present, for the first time in the SMART program, specific data of ceftolozane-tazobactam susceptibility in isolates recovered in Spain from 2016 to 2018. Other publications of this international surveillance program have evaluated the activity of this antibiotic in isolates recovered from Asia Pacific region, including Taiwan [23,24], Brazil [25] and the US [8,9,26]. To note, we analysed the Spanish data using the new EUCAST criteria for ceftolozane-tazobactam published in 2020 (*Enterobacterales*, susceptible ≤2/4 mg/L and resistant >2/4 mg/L; *P. aeruginosa*, susceptible ≤4/4 mg/L and resistant >4/4 mg/L) [17].

E. coli and *K. pneumoniae* susceptibility to ceftolozane-tazobactam in Spain (99.2% and 83.7%, respectively) was slightly higher than that in Taiwan (96.5% and 80.7%, respectively) [24] and the US (94.0% and 78.3% respectively [26]. In Europe, the activity of ceftolozane-tazobactam has been also monitored in UTI and IAI in the PACTS surveillance study (Program to Assess Ceftolozane/Tazobactam Susceptibility) but had used the previous EUCAST breakpoint for *Enterobacterales* [27]. Nevertheless, whole MIC distributions were presented in this publication allowing comparison with our results. In the PACTS study ceftolozane-tazobactam susceptibility was slightly lower

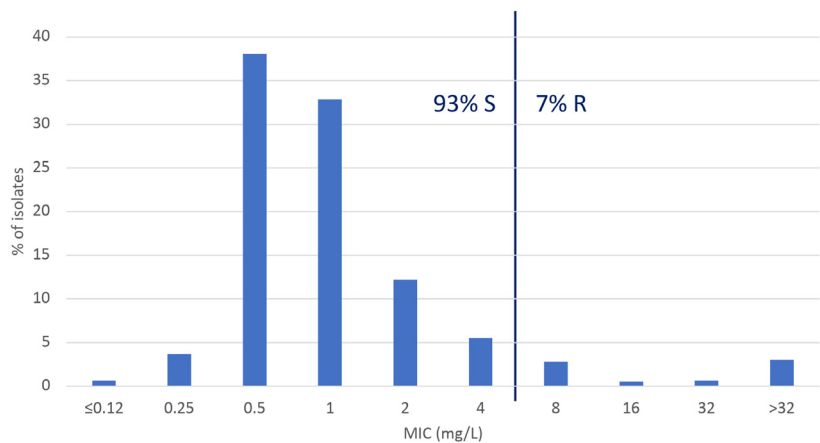


Figure 2 MIC distribution of ceftolozane-tazobactam in *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered in Spain in the SMART study (2016-2018). Ceftolozane-tazobactam susceptibility was calculated using EUCAST-2020 breakpoints [18]. Breakpoints are indicated with a line.

Table 4	Ceftolozane-tazobactam activity in <i>P. aeruginosa</i> isolates resistant to different antimicrobials, including multidrug resistant ones.		
Antimicrobial resistance	No. of isolates	No. of resistant isolates (%)	No. of ceftolozane susceptible isolates (%)
Piperacillin-tazobactam	925	307 (33.2)	248 (80.8)
Ceftazidime	925	261 (28.2)	199 (76.3)
Cefepime	925	256 (27.7)	193 (75.4)
Imipenem	925	227 (24.5)	174 (76.7)
Meropenem	925	105 (11.3)	58 (55.3)
Ceftazidime-avibactam ^a	217	13 (5.9)	4 (30.8)
Piperacillin-tazobactam, ceftazidime	925	243 (26.2)	187 (77.0)
Imipenem, meropenem	925	99 (10.7)	55 (55.5)
Piperacillin-tazobactam, ceftazidime, meropenem	925	75 (8.1)	33 (44.0)
Piperacillin-tazobactam, ceftazidime, imipenem, meropenem	925	72 (7.7)	33 (45.9)
Piperacillin-tazobactam, ceftazidime, imipenem, meropenem, ceftazidime-avibactam	217	9 (4.1)	2 (22.3)

^aData are only for 2018

(98.8% *E. coli* and 82.1% *K. pneumoniae*) than that obtained in the analysis of the SMART Spain database. We also performed the SUPERIOR study in Spain in which we evaluated the activity of ceftolozane-tazobactam in isolates recovered from UTI and IAI in ICU patients. Reanalysing the SUPERIOR data using 2020 EUCAST criteria, the susceptibility to this antibiotic was 96.2% in *E. coli* and 72.6% in *Klebsiella* spp. [28].

The SMART study also monitors ESBL trends and, more recently, carbapenemases. We confirm in the present analysis an increase in the prevalence of ESBLs in Spain in *K. pneumoniae* and maintenance in *E. coli* when compared with previous

SMART analyses [13,14], with CTX-Ms being the most important ESBLs. Regarding carbapenemases, their presence in *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates was also relevant, particularly in *K. pneumoniae* isolates. OXA-48-like was the most prevalent carbapenemases in *E. coli* (11.2%, 9/80) and *K. pneumoniae* (55%, 88/160) isolates, followed by metallo-beta-lactamases (1.2%, 1/80 and 4.4%, 7/160, respectively) and KPCs (1.2%, 1/80 and 3.1%, 5/160, respectively). This situation is also reflected in other studies performed in Spain in which carbapenemases have been characterized [29-31].

In our study, the reduction of ceftolozane-tazobactam

susceptibility was small in ESBL-producing *E. coli* isolates (95.3% susceptible) but was higher in ESBL-producing *K. pneumoniae* (43.1% susceptible) (Figures S1, S2 and 1). This fact in the latter species might be related to the coproduction of carbapenemases in ESBL producers, a frequent situation in molecularly characterized isolates with ceftolozane-tazobactam MICs >2/4 mg/L (74.2%, 92/124 isolates) and it was also reflected in the SUPERIOR study [32]. Coproduction of both type of enzymes was less prevalent in *E. coli* (23.5%, 4/17 isolates). Interestingly, the activity of ceftolozane-tazobactam was less affected than that of amoxicillin-clavulanate and piperacillin-tazobactam in ESBL producers (Figure S1). In fact, more than 80% of ESBL-producing *E. coli* isolates that were resistant to amoxicillin-clavulanate or piperacillin-tazobactam were susceptible to ceftolozane-tazobactam. This figure was nearly 25% in ESBL-producing *K. pneumoniae* isolates (Table 3). In other *Enterobacterales* species, ceftolozane-tazobactam presented susceptibility percentages higher than 97%, unlike *E. cloacae* and *C. freundii*. Reduction of ceftolozane-tazobactam activity in these AmpC producers has been also highlighted in other studies [27,28].

For *P. aeruginosa* isolates, colistin (99.3%) and amikacin (94.6%) were the most active agents tested with similar susceptibility values of ceftazidime-avibactam (94%) and ceftolozane-tazobactam (93%). Values for ceftolozane-tazobactam were similar in the SMART study in the US (94.7%) but slightly lower in the PACTS (91.7%) and SUPERIOR (91.3%) surveillance studies [8,27,28]. Interestingly, the activity of ceftolozane-tazobactam was higher than 75% in isolates resistant to other anti-pseudomonal agents such as piperacillin-tazobactam, ceftazidime, cefepime and imipenem and was only compromised (range of susceptible isolates 22.3%-55.3%) when isolates were resistant to meropenem or ceftazidime-avibactam (alone or simultaneously affected with other antimicrobials). This could be associated with the presence of GES, PER or metallo-beta-lactamase enzymes, a fact previously identified in this microorganism [21,33,34]. Nevertheless, other resistance mechanisms including amino acid replacements in chromosomal AmpC might be present as recently demonstrated in a Spanish multicentre study [35].

Despite the fact that our study has some limitations such as not addressing clonality, discontinuation of ESBL phenotypic detection in the SMART study in 2018 or the use of different criteria in different years over the study period to select isolates for molecular characterization of ESBLs and carbapenemases, it has valuable information on *Enterobacterales* and *P. aeruginosa* susceptibility to ceftolozane-tazobactam and other antimicrobial agents recovered from different infections in Spain. Ceftolozane-tazobactam showed high susceptibility rates against all microorganisms tested but was affected in *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* isolates with ESBL and/or carbapenemases.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank MSD, Spain and IHMA (International Health Management Associates, S.A., Schaumburg, Illinois, U.S.) for

providing access to the database of the SMART epidemiological surveillance study and molecular data.

The SMART Spain working group is represented by the following investigators who have participated in the study: E. Loza, M. García-Castillo, P. Ruiz-Garbajosa, and R. Cantón (Hospital Universitario Ramón y Cajal-IRYCIS, Madrid); R.M. Arcay, X. Mulet and A. Oliver (Hospital Universitario Son Espases, Mallorca); E. Cercenado (Hospital Universitario Gregorio Marañón, Madrid); F.J. Castillo and C. Seral (Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza); R. Figueroa and R. Cisterna (Hospital Basurto, Bilbao); L. Gálvez-Benítez, I. Pupo-Ledo and A. Rodríguez-Villodres (Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla); F. González Romo and A. Delgado Iribarren (Hospital Clínico San Carlos, Madrid); A. Hernández-Cabezas, M. Bosch Alepuz and J.L. López-Hontangas (Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia); J. Rodríguez-Lozano and J. Calvo (Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander); A.I. Suárez-Barrenechea and A. Pascual (Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla); F. Tubau, D. Berbel-Palau and M.A. Domínguez (Hospital Universitari Bellvitge-IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Barcelona).

FUNDING

SMART surveillance program is sponsored by MSD. Writing of this manuscript has been performed through a contract of services between MSD Spain and Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain.

CONFLICTS OF INTEREST

RC and EC have collaborated in educational meetings sponsored by MSD, Spain and Pfizer. He has also research grants from MSD. JDR and DLM are employees of MSD, Spain. All other authors declare that they have no conflicts of interest regarding this publication.

REFERENCES

1. Friedman ND, Temkin E, Carmeli Y. The negative impact of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22:416–22. doi: 10.1016/j.cmi.2015.12.002.
2. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis*. 2019; 19:56–66. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30605-4.
3. Cantón R, Huarte R, Morata L, Trillo-Mata JL, Muñoz R, González J, et al. Determining the burden of infectious diseases caused by carbapenem-resistant gram-negative bacteria in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2020; S0213-005X(20)30191-9. doi: 10.1016/j.eimc.2020.04.009.

4. World Health Organization Global. Action Plan on Antimicrobial Resistance. 2015. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>
5. Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance. No time to wait: securing the future from drug-resistant infections. Report of the Secretary-General of the United Nations. April 2019. (<https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/final-report/en/>)
6. European Commission. A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR). 2017 (https://ec.europa.eu/health/amr/action_eu_en)
7. Paterson DL, Rossi F, Baquero F, Hsueh PR, Woods GL, Satishchandran V, et al. In vitro susceptibilities of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: the 2003 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *J Antimicrob Chemother.* 2005; 55:965-73. doi: 10.1093/jac/dki117.
8. Lob SH, Hoban DJ, Young K, Motyl MR, Sahm DF. Activity of ceftolozane-tazobactam and Comparators against *Pseudomonas aeruginosa* from patients in different risk strata -- SMART United States 2016-2017. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019. pii: S2213-7165(19)30183-3. doi: 10.1016/j.jgar.2019.07.017.
9. Karlowsky JA, Lob SH, Raddatz J, DePestel DD, Young K, Motyl MR, et al. In vitro activity of imipenem/relebactam and ceftolozane/tazobactam against clinical isolates of Gram-negative bacilli with difficult-to-treat resistance and multidrug-resistant phenotypes - SMART United States 2015-2017. *Clin Infect Dis.* 2020 Apr 3; ciaa381. doi: 10.1093/cid/ciaa381.
10. Baquero F, Cercenado E, Cisterna R, de la Rosa M, García-Rodríguez JA, Gobernado M, et al. Patrones de sensibilidad a antimicrobianos de Enterobacteriaceae causantes de infecciones intraabdominales en España: resultados del estudio SMART 2003. *Rev Esp Quimioter.* 2006; 19:51-9. PMID: 16688292.
11. Guembe M, Cercenado E, Alcalá L, Marín M, Insa R, Bouza E. Evolution of antimicrobial susceptibility patterns of aerobic and facultative gram-negative bacilli causing intra-abdominal infections: results from the SMART studies 2003-2007. *Rev Esp Quimioter* 2008; 21:166-73. PMID: 18792817.
12. Cantón R, Loza E, Aznar J, Calvo J, Cercenado E, Cisterna R, et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms from intraabdominal infections and evolution of isolates with extended spectrum β -lactamases in the SMART study in Spain (2002-2010). *Rev Esp Quimioter.* 2011; 24:223-32. PMID: 22173194.
13. Cantón R, Loza E, Aznar J, Barrón-Adúriz R, Calvo J, Castillo FJ, et al. Antimicrobial susceptibility trends and evolution of isolates with extended spectrum β -lactamases among Gram-negative organisms recovered during the SMART study in Spain (2011-2015). *Rev Esp Quimioter* 2018; 31:136-45. PMID: 29532655.
14. Cantón R, Loza E, Aznar J, Castillo FJ, Cercenado E, Fraile-Ribot PA, et al. Monitoring the antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms involved in intraabdominal and urinary tract infections recovered during the SMART study (Spain, 2016 and 2017). *Rev Esp Quimioter* 2019; 32:145-55. PMID: 30761824.
15. Giacobbe DR, Bassetti M, De Rosa FG, Del Bono V, Grossi PA, Menichetti F, et al. Ceftolozane/tazobactam: place in therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2018; 16:307-20. doi: 10.1080/14787210.2018.1447381.
16. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control.* 2008; 36:309-32. doi: 10.1016/j.ajic.2008.03.002.
17. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S26. Wayne, PA: CLSI, 2016.
19. Lob SH, Kazmierczak KM, Badal RE, Hackel MA, Bouchillon SK, Biedenbach DJ, et al. Trends in susceptibility of *Escherichia coli* from intra-abdominal infections to ertapenem and comparators in the United States according to data from the SMART program, 2009 to 2013. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59:3606-10. doi: 10.1128/AAC.05186-14.
20. Karlowsky JA, Lob SH, Kazmierczak KM, Hawser SP, Magnet S, Young K, et al. In vitro activity of imipenem/relebactam against Gram-negative ESKAPE pathogens isolated in 17 European countries: 2015 SMART surveillance programme. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73:1872-9. doi: 10.1093/jac/dky107.
21. Hernández-García M, García-Castillo M, García-Fernández S, Melo-Cristino J, Pinto MF, Gonçalves E, et al. Distinct epidemiology and resistance mechanisms affecting ceftolozane/tazobactam in *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from ICU patients in Spain and Portugal depicted by WGS. *J Antimicrob Chemother.* 2021; 76:370-9. doi: 10.1093/jac/dkaa430.
22. Cantón R, Morosini MI. Surveillance studies on antimicrobial susceptibility, from international to local studies. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2020; 38:147-149. English, Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2020.02.012.
23. Kuo SC, Liu CE, Lu PL, Chen YS, Lu MC, Ko WC, et al. Activity of ceftolozane-tazobactam against Gram-negative pathogens isolated from lower respiratory tract infections in the Asia-Pacific region: SMART 2015-2016. *Int J Antimicrob Agents.* 2020; 55:105883. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105883.
24. Jean SS, Lu MC, Shi ZY, Tseng SH, Wu TS, Lu PL, et al. In vitro activity of ceftazidime-avibactam, ceftolozane-tazobactam, and other comparable agents against clinically important Gram-negative bacilli: results from the 2017 Surveillance of Multicenter Antimicrobial Resistance in Taiwan (SMART). *Infect Drug Resist.* 2018; 11:1983-92. doi: 10.2147/IDR.S175679.
25. Beirão EM, Rodrigues SDS, Andrade TK, Serra FB, Paula MDN, Polis TJB, et al. Activity of ceftolozane-tazobactam and comparators against gram-negative bacilli: Results from the study for monitoring antimicrobial resistance trends (SMART - Brazil; 2016-2017). *Braz J Infect Dis.* 2020; 24:310-321. doi: 10.1016/j.bjid.2020.05.010.
26. Karlowsky JA, Kazmierczak KM, Young K, Motyl MR, Sahm DF. In vitro activity of ceftolozane/tazobactam against phenotypically

- defined extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-positive isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from hospitalized patients (SMART 2016). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020; 96(4):114925. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.114925.
27. Pfaller MA, Bassetti M, Duncan LR, Castanheira M. Ceftolozane/tazobactam activity against drug-resistant Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* causing urinary tract and intraabdominal infections in Europe: report from an antimicrobial surveillance programme (2012-15). *J Antimicrob Chemother*. 2017; 72:1386-95. doi: 10.1093/jac/dkx009.
 28. García-Fernández S, García-Castillo M, Bou G, Calvo J, Cercenado E, Delgado M, et al. Activity of ceftolozane/tazobactam against *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacterales* isolates recovered from intensive care unit patients in Spain: The SUPERIOR multicentre study. *Int J Antimicrob Agents*. 2019; 53:682-88. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.02.004.
 29. Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis*. 2017; 17:153-63. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30257-2.
 30. García-Castillo M, García-Fernández S, Gómez-Gil R, Pitart C, Oviaño M, Gracia-Ahufinger I, et al. Activity of ceftazidime-avibactam against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from urine specimens obtained during the infection-carbapenem resistance evaluation surveillance trial (iCREST) in Spain. *Int J Antimicrob Agents*. 2018; 51:511-5. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.01.011.
 31. Hernández-García M, Pérez-Viso B, Turrientes C, Díaz-Agero C, López-Fresneña N, Bonten M, et al. Characterization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from colonized patients in a university hospital in Madrid, Spain, during the R-GNOSIS project depicts increased clonal diversity over time with maintenance of high-risk clones. *J Antimicrob Chemother*. 2018; 73:3039-43. doi: 10.1093/jac/dky284.
 32. Hernández-García M, García-Fernández S, García-Castillo M, Bou G, Cercenado E, Delgado-Valverde M, et al. WGS characterization of MDR *Enterobacterales* with different ceftolozane/tazobactam susceptibility profiles during the SUPERIOR surveillance study in Spain. *JAC Antimicrob Resist* 2020; 2(4), December 20. dlaa084. doi:10.1093/jacamr/dlaa084.
 33. Del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Cabot G, Rivera A, Benito N, Segura C, et al. Genomics and susceptibility profiles of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(11). pii: e01589-17. doi: 10.1128/AAC.01589-17.
 34. Ortiz de la Rosa JM, Nordmann P, Poirel L. ESBLs and resistance to ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam combinations in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2019; 74:1934-9. doi: 10.1093/jac/dkz149.
 35. Del Barrio-Tofiño E, Zamorano L, Cortes-Lara S, López-Causapé C, Sánchez-Diener I, Cabot G, et al. Spanish nationwide survey on *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance mechanisms and epidemiology. *J Antimicrob Chemother*. 2019; 74:1825-35. doi: 10.1093/jac/dkz147.

Estela Moreno-García^{*1}
Verónica Rico^{*1}
Laia Albiach¹
Daiana Agüero¹
Juan Ambrosioni¹
Marta Bodro¹
Celia Cardozo¹
Mariana Chumbita¹
Lorena De la Mora¹
Nicole García-Pouton¹
Carolina García-Vidal¹
Ana González-Cordón¹
Marta Hernández-Meneses¹
Alexy Inciarte¹
Montse Laguno¹
Lorna Leal¹
Laura Linares¹
Irene Macaya¹
Fernanda Meira¹
Josep Mensa¹
Antonio Moreno¹
Laura Morata¹
Pedro Puerta-Alcalde¹
Jhon Rojas¹
Montse Solá¹
Berta Torres¹
Manuel Torres¹
Adrià Tomé¹
Montse Tuset²
Pedro Castro³
Sara Fernández³
Josep Maria Nicolás³
Alex Almuedo-Riera⁴
Jose Muñoz⁴
Mariana Fernandez-Pittol⁵
Maria Angeles Marcos⁵
Dolors Soy²
José Antonio Martínez¹
Felipe García¹
Alex Soriano¹

Tocilizumab reduces the risk of ICU admission and mortality in patients with SARS-CoV-2 infection

¹Department of Infectious Diseases, Hospital Clínic-Universitat de Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain.

²Department of Pharmacology, Hospital Clínic-Universitat de Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain.

³Medical Intensive Care Unit, Hospital Clínic-Universitat de Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain.

⁴Department of International Health, ISGlobal, Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clínic-Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

⁵Department of Microbiology, Hospital Clínic-Universitat de Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain.

Article history

Received: 6 March 2021; Accepted: 20 March 2021; Published: 7 April 2021

ABSTRACT

Objectives. In some patients the immune response triggered by SARS-CoV-2 is unbalanced, presenting an acute respiratory distress syndrome which in many cases requires intensive care unit (ICU) admission. The limitation of ICU beds has been one of the major burdens in the management around the world; therefore, clinical strategies to avoid ICU admission are needed. We aimed to describe the influence of tocilizumab

on the need of transfer to ICU or death in non-critically ill patients.

Material and methods. A retrospective study of 171 patients with SARS-CoV-2 infection that did not qualify as requiring transfer to ICU during the first 24h after admission to a conventional ward, were included. The criteria to receive tocilizumab was radiological impairment, oxygen demand or an increasing of inflammatory parameters, however, the ultimate decision was left to the attending physician judgement. The primary outcome was the need of ICU admission or death whichever came first.

Results. A total of 77 patients received tocilizumab and 94 did not. The tocilizumab group had less ICU admissions (10.3% vs. 27.6%, $P=0.005$) and need of invasive ventilation (0 vs 13.8%, $P=0.001$). In the multivariable analysis, tocilizumab

Alex Soriano, M.D. Ph.D.
Department of Infectious Diseases, Hospital Clínic of Barcelona.
Carrer de Villarroel 170, 08036, Barcelona, Spain
Phone +34 932 275 400; ext.2887
E-mail: asoriano@clinic.cat

* Both authors contributed equally to this manuscript.

remained as a protective variable (OR: 0.03, CI 95%: 0.007-0.1, $P=0.0001$) of ICU admission or death.

Conclusions. Tocilizumab in early stages of the inflammatory flare could reduce an important number of ICU admissions and mechanical ventilation. The mortality rate of 10.3% among patients receiving tocilizumab appears to be lower than other reports. This is a non-randomized study and the results should be interpreted with caution.

Keywords: COVID-19, tocilizumab, intensive care unit

Tocilizumab reduce el riesgo de ingreso en UCI y la mortalidad en pacientes con infección por SARS-CoV-2

RESUMEN

Objetivos. La respuesta inmune en algunos pacientes con infección por SARS-CoV-2 se encuentra desequilibrada desencadenando un síndrome de distrés respiratorio agudo que en muchos casos requiere ingreso en la unidad de cuidados intensivos (UCI). El número limitado de camas de UCI ha sido uno de los mayores retos del manejo a nivel mundial; siendo fundamental, por tanto, el desarrollo de estrategias clínicas que eviten el ingreso en UCI. Nuestro objetivo fue describir la influencia del tratamiento con tocilizumab en la necesidad de traslado a UCI o muerte en pacientes no críticos.

Material y métodos. Estudio retrospectivo que incluyó 71 pacientes con infección por SARS-CoV-2 ingresados en planta convencional que no presentaron criterios de traslado a UCI durante las primeras 24h posteriores al ingreso. Los criterios para la administración de tocilizumab fueron el deterioro radiológico, el aumento de la necesidad de oxigenoterapia o el incremento de los parámetros inflamatorios, sin embargo, la decisión final fue tomada por el médico tratante. El resultado primario fue la necesidad de ingreso en UCI o muerte, según lo que ocurriera primero.

Resultados. 77 pacientes recibieron tocilizumab y 94 no. El grupo de tocilizumab tuvo menos ingresos en UCI (10,3% frente a 27,6%, $P=0,005$) y menor necesidad de ventilación invasiva (0 frente a 13,8%, $P=0,001$). En el análisis multivariante, tocilizumab permaneció como variable protectora (OR: 0,03, IC 95%: 0,007-0,1, $P=0,0001$) de ingreso en UCI o muerte.

Conclusiones. El tratamiento con tocilizumab en estadios precoces de la respuesta inflamatoria podría reducir un número importante de ingresos en UCI y la necesidad de ventilación mecánica. La tasa de mortalidad del 10,3% entre los pacientes que reciben tocilizumab parece ser más baja que en otras series publicadas. No obstante, se trata de un estudio no aleatorizado por lo que los resultados deben interpretarse con cautela.

Palabras clave: COVID-19, tocilizumab, unidad de cuidados intensivos.

INTRODUCTION

Infection by Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) emerged in December 2019 in Wuhan and rapidly spread around the world.

SARS-CoV-2 pneumonia evolves in 2 different phases, the first one is characterized by a high viral replication and classical symptoms of a respiratory virus infection, including fever, malaise, myalgia, and cough [1]. About 80% of the patients control the infection within a week but 15-20% of them develop a severe respiratory failure fulfilling the definition of acute respiratory distress syndrome (ARDS) with many requiring intensive care management [2]. The blood tests reveal lymphopenia, and high levels of C-reactive protein (CRP), ferritin, and D-dimer values [1], all related with the activity of different cytokines (IL-1beta, IL-2, IL-6, IL-8, IL-17, IFN-gamma or TNF-alpha) [3]. Therefore, the main therapeutic objective during the first days of treatment is to stop the viral replication while afterwards blocking the tissue damage induced by the cytokine storm is paramount [4].

In agreement with the immunopathogenesis, it has been proposed to treat patients during the inflammatory flare with IL-6 inhibitors [5,6]. The first description included 21 patients admitted to a Chinese hospital who received tocilizumab, a recombinant humanized anti-IL-6 receptor monoclonal antibody. In a few days, symptoms improved remarkably, 75% had lowered their oxygen intake and no patient died [7]. From that communication, a meta-analysis of observational studies including 9850 patients showed a significant reduction in mortality among patients receiving tocilizumab (aRR 0.77; 95%CI 0.63-0.95) [8]. However, a meta-analysis of clinical trials including 1310 patients did not support this finding [9]. Potential explanations for this discrepancy are the low number of patients with low mortality rate included in these trials, or the fact that the majority of the studies evaluated mortality at 28 days but the observed reduction in the risk of ICU admission or mechanical ventilation observed as secondary endpoints in some clinical trials [10,11] probably will impact in later mortality. More recently, a not peer-reviewed publication of preliminary results of RECOVERY trial showed a significant reduction in the mortality rate and in the need of mechanical ventilation [12].

The main objective of the present article is to describe our experience during pandemic with tocilizumab in non-critically ill patients and its impact on the prognosis, defined as eventual need of transfer to the ICU or death.

MATERIAL AND METHODS

From February 19th to April 16th patients with respiratory symptoms and radiological evidence of pneumonia (uni or bilateral interstitial infiltrates) and those with respiratory symptoms without pneumonia but with co-morbidity (hypertension, diabetes mellitus, cancer, chronic liver diseases, chronic obstructive pulmonary disease or immunosuppression) were admitted to Hospital Clinic of Barcelona in the context of SARS-CoV-2 pandemic. Definitive diagnostic was established by a positive polymerase chain reaction (PCR) from a nasopharyngeal swab during the first two weeks of pandemic but once the prevalence of positive tests was >70%, the diagnosis was based on clinical criteria. Clinical criteria for defining a case of

SARS-CoV-2 were the presence of respiratory symptoms with uni or bilateral interstitial infiltrate in the chest-X ray without evidence of other potential causes (e.g. heart failure). During the study period, 171 patients that did not qualify as requiring transfer to the ICU during the first 24h after admission to a conventional hospital ward, were included.

For ARDS, the Berlin definition [13] was applied. When PaO_2 was not available, $\text{SpO}_2/\text{FiO}_2 \leq 315$ suggested ARDS (including in non-ventilated patients) [14].

The standard protocol included antiviral treatment that consisted of lopinavir/ritonavir 400/100 mg BID for 7-14 days plus hydroxychloroquine 400 mg/12h on the first day, followed by 200 mg/12h for the next 4 days. From the 18th of March onwards, azithromycin 500 mg the first day and 250 mg/24h for 4 additional days was added to the regimen. In addition, a clinical trial with remdesivir was enrolling patients in our institution during the study period. All patients with risk factors for thrombosis received prophylactic doses of low molecular weight heparin [15]. Intravenous methylprednisolone was recommended for patients with disease progression to ARDS. The local protocol suggested the use of tocilizumab for patients with pneumonia, progressive respiratory failure (increasing fraction of inspired oxygen) and $\text{CRP} \geq 8$ mg/dL or ferritin ≥ 800 ng/mL or lymphocyte count < 800 cells/mm³. The dose was 400 mg/24h iv for patients with ≤ 75 kg and 600 mg/24h iv for those with > 75 kg with the possibility to repeat the dose every 12h up to 3 doses in case of only partial response. However, due to the lack of evidence to support its efficacy, the ultimate decision about using tocilizumab was left to the judgement of the attending physician.

Patients with severe comorbidity and a life expectancy < 6 months were considered no tributary of advanced life support (ALS). The outcome variable was a composite of the need of ICU admission or death whichever came first. The last revision of medical charts was April 26th.

The Institutional Ethics Committee of the Hospital Clínic of Barcelona approved the study and due to the nature of retrospective chart review, waived the need for informed consent from individual patients (Comité Ètic d'Investigació Clínica; HCB/2020/0273).

Statistical analysis. Categorical variables were described using the absolute number and percentage and continuous variables using the mean and standard deviation (SD). Categorical variables were compared using a Chi-squared test or Fisher exact test when necessary, and means by using the Student-t test. For multivariable analysis, variables with a P -value ≤ 0.2 in the univariable analysis were subjected to further selection by using a backward logistic regression procedure. Interactions between variables were explored. In order to reduce the effect of selection bias, we estimate the propensity score (PS) to receive tocilizumab as the predicted probability from a logistic regression model using tocilizumab as the dependent variable. The PS was included in the multivariable analysis of the main outcome. The calibration of the model was assessed

by means of the Hosmer-Lemeshow goodness-of-fit test. Statistical significance was defined as a two-tailed P value < 0.05 . The analysis was performed in SPSS version 23 (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTS

The cohort included 171 patients, of whom 77 received tocilizumab while staying in a conventional ward and 94 did not, with a mean (SD) age of 61.5 (12.4) and 61.4 (16) years, respectively. The proportion of males and the main comorbidities were similar between both groups (Table 1). Patients in the tocilizumab group had more frequently fever, pneumonia (interstitial infiltrate) and at day 1 they needed more often oxygen therapy. C-reactive protein levels were significantly higher in the tocilizumab group (9.7 mg/dL vs. 7.5 mg/dL, $P=0.04$) but other biological parameters were similar in both groups. During patients' stay in a conventional ward, corticosteroid therapy was more frequently administered in the tocilizumab group (50.6% vs. 27.7%, $P=0.002$). A total of 26 patients were not candidates to ALS, 10 (12.9%) in the tocilizumab group and 16 (17%) among controls. The mean (SD) time from symptoms onset to hospital admission in tocilizumab group was 6.5 (3.3) days while it was 5 (6.5) days in the control group.

The outcome of both groups, with all patients discharged alive or dead, showed that patients in the tocilizumab group had significantly less ICU admissions (10.3% vs. 27.6%, $P=0.005$) and less need of invasive ventilation (0 vs 13.8%, $P=0.001$). The univariable analysis of our composite outcome (ICU admission or death whichever came first) showed that comorbidities (hypertension, heart diseases and lymphoma), the need of oxygen at day 1, a $\text{CRP} > 16$ mg/dL and the development of cardiovascular, renal or respiratory (ARDS, invasive ventilation) complications were significantly associated with the primary outcome. In contrast, tocilizumab was the only one protective variable (Table 2). In the multivariable analysis, including the PS estimate to receive tocilizumab as a potential confounder, tocilizumab remained as a strong protective variable (OR: 0.03, CI 95%: 0.007-0.1, $P=0.0001$) of ICU admission or death (Table 3).

DISCUSSION

Monoclonal antibodies directed against key inflammatory cytokines represent a class of potential adjunctive therapies for SARS-CoV-2 infected patients. The rationale for their use is that the underlying pathophysiology of significant lung damage is caused by a cytokine storm being IL-6 one of the main drivers. Therefore, monoclonal antibodies against IL-6 or its receptor could theoretically improve clinical outcomes mainly by reducing the need of ICU admission and consequently the associated mortality. Tocilizumab, a monoclonal antibody IL-6 receptor antagonist, was administered to 77 patients admitted to a conventional ward in our hospital and the outcome was compared with 94 patients also admitted in a conventional ward during the same period of time that did not

Table 1	Characteristics and outcome of patients that received or did not received tocilizumab in a conventional ward.		
Variables	Tocilizumab group (N=77)	Control group (N=94)	P - value
Mean (SD) age in years	61.5 (12.4)	61.4 (16.0)	0.957
Age > 62 years old (%)	40 (52)	52 (55.3)	0.660
Male (%)	53 (68.8)	59 (62.7)	0.406
Comorbidities (%)			
Hypertension	35 (45.4)	43 (45.7)	0.960
Heart diseases	12 (15.5)	21 (22.3)	0.265
Chronic respiratory disease	8 (10.3)	12 (12.7)	0.630
Diabetes Mellitus	12 (15.6)	14 (15)	0.900
Mean (SD) days from symptoms onset to admission	6.5 (3.3)	5 (6.5)	0.061
Initial characteristics (%)			
Fever	86 (98.7)	80 (85)	0.002
Dyspnea	33 (43)	47 (50)	0.352
Cough	64 (83)	70 (74.5)	0.172
Normal chest x-ray at admission	3 (4)	14 (15)	0.017
Need of oxygen therapy at day 1	56 (72.7)	50 (53.8)	0.011
Positive PCR from a nasal swab	68 (88.3)	82 (87.2)	0.831
Laboratory at admission mean (SD)			
D-dimer (ng/mL) ^a	918.6 (1354.8)	1503.9 (2175.4)	0.100
Lymphocytes count (cell/mm ³)	878.9 (452.8)	910.1 (534.6)	0.686
C-Reactive protein (mg/dL) ^b	9.7 (7.4)	7.5 (5.7)	0.044
Serum ferritin (ng/dL) ^c	867.8 (871)	904.1 (809.9)	0.842
ARDS at any given time (%)	24 (31.1)	26 (27.6)	0.616
Treatments received (%)			
Antiviral agents ^d	77 (100)	91(96.8)	0.164
Steroid prior ICU admission	39 (50.6)	26 (27.7)	0.002
Not candidate to ALS (%)	10 (12.9)	16 (17)	0.465
Mean (SD) days of follow up	11.2 (6.2)	14.7 (10.6)	0.027
Outcomes (%)			
Need of ICU	8 (10.3)	26 (27.6)	0.005
Need of no invasive MV	3 (3.9)	1 (1)	0.198
Need of invasive MV	-	13 (13.8)	0.001
Extubation	-	9 (9.6)	-
Discharge from ICU	5 (6.5)	21 (22.3)	-
Hospital discharged	69 (89.6)	77 (81.91)	0.156
Still in the hospital	0 (0)	0 (0)	-
Mortality (%)			
Global mortality	8 (10.3)	17 (18)	0.156
Mortality in:			
Not candidates to ALS	6 (60)	12 (75)	0.420
Candidates to ALS	2 (3)	5 (6.4)	0.337

PCR, polymerase chain reaction. ARDS, adult distress respiratory syndrome. ICU, intensive care unit. ALS, advanced life support. MV, mechanical ventilation.

^aMeasured in 110 patients; ^bMeasured in 168 patients; ^cMeasured in 86 patients; ^dSee material and methods for antivirals used in our protocol.

Table 2	Variables associated with ICU admission and/or death whichever came first.		
Variables	No ICU admission and/or death, N=121	ICU admission or death, N=50	P - value
Age >62 years (%)	57 (47)	35 (70)	0.006
Male sex (%)	77 (63.6)	35(70)	0.426
Mean (SD) follow-up, days	12 (8.347)	16.6 (9.858)	0.006
Comorbidities (%)	98 (81)	48 (96)	0.012
Hypertension	49 (40.5)	29 (58)	0.037
Diabetes Mellitus	20 (16.5)	6 (12)	0.453
Heart diseases	17 (14)	16 (32)	0.007
Chronic respiratory disease	11 (9)	9 (18)	0.099
Neoplasia	11(9)	6(12)	0.580
Dyslipemia	8 (6.6)	6 (12)	0.356
Lymphoma	2 (1.7)	5 (10)	0.012
Solid organ transplantation	5 (4)	3 (6)	0.693
Human Immunodeficiency Virus	1(0.8)	-	1
Mean (SD) days from symptoms onset to admission	5.98 (6.124)	4.86 (3.084)	0.223
Initial characteristics (%)			
Fever	112(92.6)	44 (88)	0.337
Dyspnoea	59 (48.8)	21 (42)	0.420
Cough	98 (81)	36 (72)	0.222
Normal chest x-ray at admission	12 (10)	5 (10)	0.987
Need of oxygen therapy at day 1	68 (56.7)	38 (76)	0.018
Positive PCR from nasal swab	105 (86.8)	45 (90)	0.559
Laboratory at admission (%)			
Lymphocytes count <700 cell/mm ³ ^a	36 (29.8)	18 (36)	0.424
C-Reactive protein >9 mg/dL ^b	39 (32.5)	20 (41.7)	0.261
C-Reactive protein >16 mg/dL ^b	23 (19)	25 (50)	0.0001
Treatments received (%)			
Antiviral agents ^c	118 (97.5)	50 (100)	0.261
Steroids prior ICU admission	44 (36.4)	21 (42)	0.490
Tocilizumab	65 (53.7)	12 (24)	<0.0001
Complications (%)			
Cardiovascular	5 (4)	13 (7.6)	0.012
ARDS in the conventional ward	14 (11.6)	30 (60)	0.0001
Acute Kidney Injury	3 (1.8)	12 (24)	0.0001
Invasive ventilation	-	13 (26)	0.0001
Not candidate to ALS	8 (6.6)	18 (36)	0.0001

PCR, polymerase chain reaction. ICU, intensive care unit. ADRS, adult distress respiratory syndrome. ALS, advanced life support.

^aMeasured in 110 patients; ^bMeasured in 168 patients; ^cSee material and methods section for antivirals used in our protocol.

receive tocilizumab. Although this study was not randomized, the characteristics of both groups did not differ in terms of demographics and comorbidities. Moreover, the tocilizumab group had more severe infection (pneumonia, need of oxygen

at day 1 or higher CRP). Furthermore, all the patients were evaluated during the same period of time so the same criteria for being transferred to the ICU was applied. After adjusting for potential confounders, including the PS for receiving to-

Table 3 Variables significantly associated with the risk of being admitted in the ICU and/or death in the multivariable analysis.

Variables ^a	Adjusted odd ratio (95% CI)	P - value
Lymphoma	16.7 (1.7-157.3)	0.01
Heart disease	2.9 (0.9-9.4)	0.07
Need of oxygen at day 1	3.4 (1.1-10.5)	0.03
ARDS prior to ICU admission	50.7 (10.4-245.7)	0.0001
Not candidate to ALS	3.8 (1.2-11.7)	0.01
Tocilizumab	0.03 (0.007-0.1)	0.0001

ARDS, Adult respiratory distress syndrome. ICU, intensive care unit. ALS, advanced life support.

^a Variables included in the analysis: age > 62 years, chronic respiratory disease, hypertension heart disease, lymphoma, C-reactive protein >16 mg/dL, need of oxygen at day 1, cardiovascular complications, ARDS in the conventional ward, not candidate to ALS, tocilizumab administration, propensity score to receive tocilizumab. Acute kidney injury and invasive ventilation were complications that occurred after being admitted in the ICU, therefore, they were not included for the main outcome analysis since this include the need of being admitted in the ICU.

cilizumab, the multivariable analysis revealed that tocilizumab was an independent factor associated with a reduction in the need of ICU admission and death. The need of ICU in the tocilizumab group was almost 3 times lower (10.3% vs. 27.6%) than in controls and it was lower than the one reported in Wuhan hospitals (26%) [1,16] or more recently in New York (14%) [17]. The availability of ICU beds is critical for the management of patients that develop a severe ARDS in few hours, therefore, reducing the need of ICU beds using tocilizumab impacted directly not only on the outcome of patients that received the treatment but also of those that not receiving tocilizumab or arriving too late in a critically ill condition had more chances of being admitted in the ICU. In line with this, the mortality of our cohort, including patients not candidates to ALS, was 14.2% which seems lower than that showed in previous reports, regularly >20% [1,16,17].

Although from the beginning of the pandemic tocilizumab was recommended in the general protocol, the heterogeneity of its prescription could be explained by the lack of clinical randomized trials supporting its usefulness.

Our results suggest that tocilizumab should be administered in early phases of the inflammatory flare. It is reasonable to hypothesize that other strategies directed to inhibit other specific inflammatory pathways (including IL-1 with anakinra or INF-gamma with JAK inhibitors), or a broad-spectrum inhibition with steroids with or without therapeutic strategies to reduce the pro-coagulant status, could be also effective [18-20]. On the other hand, although in non-severe cases after one week from symptoms onset the viral viability is significantly reduced, there is data supporting the continuous viral replication in severe cases [21] that could be the trigger for the inflammatory flare and

its maintenance. Accordingly, we consider that antiviral agents should be associated with immunomodulators.

In conclusion, our findings support that the administration of tocilizumab in the early stages of the inflammatory flare, particularly before the need of ICU admission, is more convenient and could potentially avoid an important number of ICU admissions and mechanical ventilation use. Consequently, the mortality rate of 10.3% among patients receiving tocilizumab appears to be lower than that described by others in previously published series. However, this is a non-randomized study and, therefore, the results should be interpreted with caution.

ACKNOWLEDGEMENTS

Hospital Clinic of Barcelona COVID-19 Research Group:

Infectious Diseases' Research Group:

Blanco JL, Mallolas J, Martínez E, Martínez M, Miró JM, Moreno A, and all the staff members.

Medical Intensive Care Unit:

Adrian Téllez, and all the staff members.

Department of International Health:

Daniel Camprubi Ferrer, Maria Teresa de Alba, Marc Fernandez, Elisabet Ferrer, Berta Grau, Helena Marti, Magdalena Muelas, Maria Jesus Pinazo, Natalia Rodríguez, Montserrat Roldan, Carme Subira, Isabel Vera, Nana Williams, Alex Almuedo-Riera, Jose Muñoz, and all the staff members.

Department of Internal Medicine:

Aldea A, Camafort M, Calvo J, Capdevila A, Cardellach F, Carbonell I, Coloma E, Foncillas A, Estruch R, Feliu M, Fernández-Solá J, Fuertes I, Gabara C, Grafia I, Ladino A, López-Alfaro R, López-Soto A, Masanés F, Matas A, Navarro M, Marco-Hernández J, Miguel L, Milisenda J, Moreno P, Naval J, Nicolás D, Oberoi H, Padrosa J, Prieto-González S, Pellicé M, Ribot J, Rodríguez-Núñez O, Sacanella E, Seguí F, Sierra C, Ugarte A, Ventosa H, Zamora-Martínez C, and all the staff members.

Department of Microbiology:

Almela M, Alvarez M, Bosch J, Casals C, Costa J, Cuesta G, Fidalgo B, González J, Hurtado JC, Marco F, Martínez M, Mosquera M, Narvaez S, Pitart C, Rubio E, Vergara A, Valls ME, Vila J, Zboromyrska Y and all the staff members.

Department of Pharmacy:

López E, and all the staff members.

Department of Autoimmune diseases:

Espigol G, Espinosa G and all the staff members.

FUNDING

None to declare

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest

REFERENCES

- Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020 Mar 28;395(10229):1054–1062. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
- Grasselli G, Zangrillo A, Zanella A, Antonelli M, Cabrini L, Castelli A, et al. Baseline Characteristics and Outcomes of 1591 Patients Infected With SARS-CoV-2 Admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. *JAMA*. 2020. Apr 28;323(16):1574–1581. DOI:10.1001/jama.2020.5394.
- McGonagle D, Sharif K, O'Regan A, Bridgewood C. The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. *Autoimmun Rev*. 2020 Jun;19(6):102537. DOI: 10.1016/j.autrev.2020.102537.
- Siddiqi HK, Mehra MR. COVID-19 Illness in Native and Immunosuppressed States: A Clinical-Therapeutic Staging Proposal. *J Heart Lung Transplant*. 2020 May;39(5):405–407. DOI: 10.1016/j.healun.2020.03.012.
- Zhang C, Wu Z, Li JW, Zhao H, Wang GQ. Cytokine release syndrome (CRS) of severe COVID-19 and Interleukin-6 receptor (IL-6R) antagonist Tocilizumab may be the key to reduce the mortality. *Int J Antimicrob Agents*. 2020 May;55(5):105954. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105954.
- Moore JB, June CH. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science*. 2020. May 1;368(6490):473–474 (Epub ahead of print). DOI: 10.1126/science.abb8925.
- Xu X, Han M, Li T, Sun W, Wang D, Fu B, et al. Effective Treatment of Severe COVID-19 Patients with Tocilizumab. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020. May 19;117(20):10970–10975 (Epub ahead of print). PMID: 32350134.
- Tleyjeh IM, Kashour Z, Damlaj M, Riaz M, Tlayjeh H, Altannir M, et al. Efficacy and safety of tocilizumab in COVID-19 patients: A living systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*. 2020; 27: 215–227. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.10.036.
- Huang YT, Chao CM, Lai CC. The impact of tocilizumab on the mortality of patients with COVID-19. *Clin Infect Dis*. 2020 Nov 17:ciaa1738. DOI: 10.1093/cid/ciaa1738. Available at: <https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciaa1738/5985678>.
- Roche's phase III EMPACTA study showed Actemra/RoActemra reduced the likelihood of needing mechanical ventilation in hospitalised patients with COVID-19 associated pneumonia. Available at: <https://www.roche.com/media/releases/med-cor-2020-09-18.htm>.
- Roche provides an update on the phase III COVACTA trial of Actemra/RoActemra in hospitalised patients with severe COVID-19 associated pneumonia. Available at: <https://www.roche.com/investors/updates/inv-update-2020-07-29.htm>.
- RECOVERY Collaborative Group, Horby PW, Pessoa-Amorim G, Peto L, Brightling CE, Sarkar R, et al. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): preliminary results of a randomised, controlled, open-label, platform trial. *medRxiv preprint*. <https://doi.org/10.1101/2021.02.11.21249258>.
- ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*. 2012 Jun 20;307(23):2526–33. DOI: 10.1001/jama.2012.5669.
- Rice TW, Wheeler AP, Bernard GR, Hayden DL, Schoenfeld DA, Ware LB. Comparison of the SpO2/FiO2 ratio and the PaO2/FiO2 ratio in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest*. 2007;132(2):410–417. DOI:10.1378/chest.07-0617.
- Bikdeli B, Madhavan MV, Jimenez D, Chuich T, Dreyfus I, Driggin E, et al. COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-up. *J Am Coll Cardiol*. 2020. Jun 16;75(23):2950–2973. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.04.031. Epub 2020 Apr 17.
- Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, et al. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med*. 2020 Jul 1;180(7):934–943. DOI: 10.1001/jamainternmed.2020.0994. Erratum in: *JAMA Intern Med*. 2020 Jul 1;180(7):1031.
- Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, Crawford JM, McGinn T, Davidson KW, et al. Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *JAMA*. 2020 May 26;323(20):2052–2059. doi: 10.1001/jama.2020.6775. Erratum in: *JAMA*. 2020 May 26;323(20):2098. PMID: 32320003; PMCID: PMC7177629. DOI: 10.1001/jama.2020.6775.
- Grein J, Ohmagari N, Shin D, Diaz G, Asperges E, Castagna A, et al. Compassionate Use of Remdesivir for Patients with Severe Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 Jun 11;382(24):2327–2336. DOI: 10.1056/NEJMoa2007016.
- Cavalli G, De Luca G, Campochiaro C, Della-Torre E, Ripa M, Canetti D, et al. Interleukin-1 blockade with high-dose anakinra in patients with COVID-19, acute respiratory distress syndrome, and hyperinflammation: a retrospective cohort study. *Lancet Rheumatol*. 2020 Jun;2(6):e325–e331. DOI: 10.1016/S2665-9913(20)30127-2.
- Ingraham NE, Lotfi-Emran S, Thielen BK, Techar K, Morris RS, Holtan SG, et al. Immunomodulation in COVID-19. *Lancet Respir Med*. 2020 Jun;8(6):544–546. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30226-5.
- Van Kampen JJA, Van de Vijver DAMC, Fraaij PLA, Haagmans BL, Lamers MM, Okba N, et al. Duration and key determinants of infectious virus shedding in hospitalized patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Nat Commun*. 2021 Jan 11;12(1):267. DOI: 10.1038/s41467-020-20568-4.

Helena Gil-Campesino¹
Laura Sante¹
Enrique Callejas Castro²
María Lecuona¹

Introduction of a complementary screening system for the detection of sexually transmitted infections in patients with sterile pyuria

¹Department of Microbiology and Infection Control, University Hospital of the Canary Islands, Santa Cruz de Tenerife, Spain.

²University of La Laguna, San Cristóbal de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, Spain.

Article history

Received: 28 November 2020; Revision Requested: 7 January 2021; Revision Received: 17 January 2021; Accepted: 1 February 2021; Published: 5 April 2021

ABSTRACT

Objective. The aim of the study was to evaluate a complementary screening system for the detection of sexually transmitted infections in patients with sterile pyuria.

Material and methods. A prospective study was conducted using Real-time multiplex qPCR in 300 consecutive urine samples with data on sterile pyuria. STI prevalence and patient epidemiological data were analyzed.

Results. A total of 29 positive cases (9.67%) were found: 16 *Chlamydia trachomatis*, 5 *Mycoplasma genitalium*, 5 *Trichomonas vaginalis* and 3 co-infections. The group with sexually transmitted infections was mainly composed of women (65.5%), of which one third was pregnant.

Conclusion. This study presents an effective screening system for the detection of sexually transmitted infections that can be integrated into the laboratories' work routine.

Introducción de un sistema de cribado complementario para la detección de infecciones de transmisión sexual en pacientes con piuria estéril

RESUMEN

Objetivo. El objetivo del estudio fue evaluar un sistema de cribado complementario para la búsqueda de infecciones de transmisión sexual en pacientes con piuria estéril.

Material y métodos. Se realizó un estudio prospectivo mediante qPCR multiplex a tiempo real en 300 orinas consecutivas de las que se les solicitaba cultivo con datos de piuria

estéril. Se analizó la prevalencia de ITS y los datos epidemiológicos de los pacientes.

Resultados. Se encontraron un total de 29 casos positivos (9,67%): 16 *Chlamydia trachomatis*, 5 *Mycoplasma genitalium*, 5 *Trichomonas vaginalis* y 3 coinfecciones. El grupo con resultado positivo estaba formado mayoritariamente por mujeres (65,5%), de las cuales un tercio estaban embarazadas.

Conclusiones. Este estudio presenta un sistema de cribado efectivo para la detección de infecciones de transmisión sexual y se puede integrar de forma complementaria en la rutina de los laboratorios.

INTRODUCTION

Sexually transmitted infections (STIs) are one of the most common public health problems [currently in existence] due to their high prevalence, morbidity and medium-and long-term sequelae. According to the World Health Organization, there are an estimated 357 million new STIs every year among people aged 15-49 years [1,2]. These infections cause serious diseases (e.g., vaginitis, cervicitis, proctitis), chronic and severe complications (e.g., pelvic inflammatory disease, ectopic pregnancies, neonatal death) and increase the risk of HIV transmission [3].

Although STIs screening is usually carried out through anamnesis in primary healthcare and infectious diseases centers, the implementation of complementary screening methods integrated into the routine of hospitals remains a challenge. An active search system could be developed in microbiology departments through the detection of sterile pyuria, as this alteration is sometimes caused by STIs [4-6]. Sterile pyuria is defined as the presence of >10 leukocytes per field in urine in the absence of a demonstrable urinary tract infection (UTI), as determined by means of aerobic laboratory techniques (on a 5% sheep-blood agar plate and MacConkey agar plate), discarding the use of previous antibiotics [4]. This system would

Correspondence:
Helena Gil-Campesino
Department of Microbiology and Infection Control, University Hospital of the Canary Islands.
Ctra. del Rosario, 115, 38010 Santa Cruz de Tenerife, Spain.
E-mail: hgilcam@gobiernodecanarias.org

be applied to the urine of patients who have been collected by routine checks (e.g. pregnant) or patients with possible urinary tract infection (UTI) in which sterile pyuria is detected and no UTI is demonstrated in which no STI is suspected by the clinician, since the differential diagnosis between UTI and STIs can often be difficult given the similarity in the clinic and because both share abnormalities in the urinalysis [7,8].

This complementary screening can help improve diagnosis and reduce the use of inappropriate antibiotic treatments that have significant negative effects (e.g. development of microbial resistance, adverse reactions, secondary infections) [9]. An analysis of the profile of those patients who present a positive result could help to develop recommendations on the application of such screenings, as very few studies can be found on the incidence of STIs in patients with sterile pyuria [4,10,11].

The objectives of the present study were: 1) to study the incidence of STIs in patients with sterile pyuria using real-time multiplex qPCR; 2) to compare the epidemiological variables and urine parameters of patients with positive and negative results and 3) to determine whether the midstream urine samples used for bacteriological culture are valid for the detection of STI-producing microorganisms.

MATERIAL AND METHODS

A prospective study was conducted between August and November 2019 at the Complejo Hospitalario Universitario de Canarias. The patients came from primary healthcare centers and/or the emergency department. The inclusion criteria were: 1) Aged 18-55 years; 2) negative urine culture and leukocyte-esterase positive (SediMAX®, 77 Elektronika); 3) not having received recent antibiotic treatment.

Real-time qPCR (Anyplex™ IISTI-7 detection, Seegene) was performed in urines with sterile pyuria that met the inclusion criteria. If qPCR was not performed on the same day, the urine was frozen at -80 ° C. The presence of the following microorganisms was analyzed: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma genitalium*. The qPCR also detected the presence of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* but, because these microorganisms can colonize the genital tract, they were not included in the study. When a positive result was obtained, it was recommended to send a new sample (genital exudate or first voided urine) before starting antibiotic treatment as well as serological screening for other STIs.

For the third goal of the study, in those patients who also provided a sample of genital exudate or the first 20-30mL of the urine stream, this same qPCR was performed and compared with the results of the midstream urine samples used for bacteriological culture.

The following epidemiological data were collected: sex, age, pregnancy, previous history of other STIs (HCV, HBV, HIV and / or syphilis) and urine parameters: leukocytes, nitrites and red blood cells.

To study the incidence of STIs, an analysis was carried out with descriptive statistics. To compare epidemiological variables and urine parameters, contingency analysis (chi-square statistic test) was performed for categorical variables and *Student's t*-test for quantitative variables. Finally, to determine whether the midstream urine was valid for the detection of STI-producing microorganisms, the concordance between the samples sent in parallel was analyzed by studying the Cohen kappa coefficient. The IBM SPSS V22 program was used for data analysis.

Table 1 Comparison of patient groups of epidemiological data and urine parameters with positive qPCR result vs negative result (N = 300).				
Variable	Group		t / χ^2	p
	Positive (29) % / Av. (SD)	Negative (271) % / Av. (SD)		
Sex (Female)	65.5%	95.9%	37.25	<0.001
Age	29.93 (10.34)	33.92 (9.66)	2.10	0.037
Pregnant (yes)	28.8%	42.1%	1.49	0.222
Nitrites (positive)	0.7%	3.4%	1.94	0.16
Red blood cells (positive)	23.6%	20.7%	0.13	0.72
Leukocytes			9.61	0.008
Low	41.4% ^a	67.9% ^a		
Medium	27.6%	19.2%		
High	31.0% ^a	12.9% ^a		

^aSignificant corrected typified residuals (-1.96 < r_z < 1.96).

RESULTS

A total of 8,453 urines received for urine culture showed sediment, of which 11% (927) had sterile pyuria. Of these, 300 met the inclusion criteria. The sample consisted mostly of women (93%) with a mean age of 33.9 ± 9.66 years, of whom one third were pregnant (29.75%). With regard to the urinary parameters analyzed of the 300 samples included in the study, a total of 1% of urine with positive nitrates and 23.33% with positive red blood cells were obtained. 65.3% had a low white blood cell level (<20 WBC/HPF), 20% had a medium level (20–60) and 14.7% had a high level (>60).

qPCR was positive in 29 patients (9.67% of the samples), of which 16 had *C. trachomatis* (5.33%), 5 *M. genitalium* (1.66%), 5 *T. vaginalis* (1.66%). In addition, 1 patient presented *C. trachomatis* co-infection with *N. gonorrhoeae* (0.33%), other with *T. vaginalis* (0.33%) and other with *M. genitalium* (0.33%).

With respect to the comparison between patients diagnosed with STIs and those for which qPCR was negative, patients with a positive result for any of the microorganisms studied were characterized by having a lower mean age and being found within a lower percentage of women and pregnant women (Table 1), besides there being a higher percentage of high leukocytes compared to patients with negative result ($r_z = 2.6$). In addition, a lower percentage of low leukocytes was recorded in patients with a positive result compared to those with a negative result ($r_z = -2.9$).

None of the positive patients had a history of other STIs (HIV, HBV, HCV and or syphilis) and only 16 patients (55.2%) had been requested for testing in the in the year prior to the study.

Finally, for the third goal of the study, a total of 35 double samples (12 of the first void specimen and 23 of genital exudate) were analyzed and compared. A very good concordance ($k = 0.8$) was obtained, with 33 concordant results (12 of them with positive result) and 2 discordant results. Of the 2 discordant results, *M. genitalium* was detected in vaginal and endocervical exudate with a threshold cycle >34 not being detected in the midstream urine samples.

DISCUSSION

In our study, we obtained an important percentage of patients who benefited from a second diagnosis to rule out STIs. Many studies have demonstrated the cost-effectiveness benefits of implementing screening systems for STIs [5,12], in which the costs of a late or erroneous diagnosis exceed those derived from screening.

Screening of urine samples optimizes diagnosis, especially based on age and gender. The results obtained are consistent with what has been described in the scientific literature, where young women [4,9,13] and men are noted due to the high prevalence of STIs and pregnant women due to the risk they pose to pregnancy and fetus [10,14]. The difference in leuko-

cyte levels is evidence that this variable is relevant for defining the profile of target patients.

In the use of midstream samples for detection of STIs, we obtained a high level of agreement between the different samples, which reinforces the sensitivity of the test for the diagnosis of STIs, without replacing the genital exudate or the first 20–30 mL of the urine stream as samples of choice, but as a complementary study.

The main limitation of this study was the small sample size of positive results, which makes a more detailed exploration of the patient's profile difficult. In addition, we do not have complete clinical history data that would allow exploring symptoms as an explanatory variable in future studies. It would also be necessary to expand the sample size in order to establish the true efficacy of the midstream samples of urine in the diagnosis of STIs by qPCR.

Finally, some recommendations can be made to improve future implementation of this screening system. First, it should be applied mainly to the profiles that have been identified as a selected-indicated population. Second, it should be developed a cost-benefit analysis to promote the scaling-up of its use.

In conclusion, this study presents a useful screening system for the detection of STIs that could be integrated in a complementary way into the routine of microbiology laboratories based on the age and sex range of patients.

FUNDING

This work has been funded by Werfen SLU. for the implementation of qPCRs. The supporting source had no involvement in the design of the study, the preparation of the data or manuscript or the decision to submit for publication.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest

REFERENCES

1. Delgado S, García-Garrote F, Padilla B, Rodríguez Gómez JM, Romero B. Diagnóstico microbiológico de la infección bacteriana asociada al parto y al puerperio. 54. Padilla B (coordinator). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editors). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2015.
2. UpToDate. (2019). Retrieved from https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-chlamydia-trachomatis-infections?search=chlamydia%20trachomatis&source=search_result&selectedTitle=2~141&usage_type=default&display_rank=2.
3. Recommendations for the laboratory-based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. MMWR Recomm Rep 2014;63(RR-02):1–19.

4. Wise GJ, Schlegel PN. Sterile pyuria. *N Engl J Med*. 2015;372(11):1048-1054. doi:10.1056/NEJMra1410052.
5. Goonewardene S, Persad R. Sterile pyuria: a forgotten entity. *Ther Adv Urol*. 2015;7(5):295-298. doi:10.1177/1756287215592570.
6. Pallawela S, Sonnex C, Burdett J, Cooper D, Nethercott K, Thomas C et al. Testing for 'threads' and leucocyte esterase in first-void urine to exclude the diagnosis of non-specific urethritis in asymptomatic men. *Sex Health*. 2014;11(3):283-4. doi: 10.1071/SH13190.
7. Ronald RA. Urinary tract infections in adults. En: Tan JS, editor. *Experts guide to the management of common infectious diseases*. US: American College of Physicians, 2002;229-50
8. PhilaTomas ME, Getman D, Donskey CJ, et al. Over diagnosis of urinary tract infection and under diagnosis of sexually transmitted infection in adult women presenting to an emergency department. *J Clin Microbiol* 2015;53(8):2686-92. doi: 10.1128/JCM.00670-15
9. Shipman SB, Risinger CR, Evans CM, Gilbertson CD, Hogan DE. High Prevalence of Sterile Pyuria in the Setting of Sexually Transmitted Infection in Women Presenting to an Emergency Department. *West J Emerg Med*. 2018;19(2):282-286. doi:10.5811/west-jem.2017.12.35605.
10. Nassar FA, Abu-Elamreen FH, Shubair ME, Sharif FA. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma hominis*, *genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* by polymerase chain reaction in patients with sterile pyuria. *Adv Med Sci*. 2008;53(1):80-86. doi:10.2478/v10039-008-0020-1.
11. Zboromyrska Y, de Cueto López M, Alonso-Tarrés C, Sánchez-Hellín V. 2019. 14b. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. Zboromyrska Y (coordinator). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editors). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2019.
12. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Dis Mon*. 2003;49(2):53-70. DOI:10.1067/mda.2003.7.
13. Jones S, Barker S, Athan E, Graves S. The tip of the iceberg: opportunistic screening for *Chlamydia trachomatis* in asymptomatic patients attending a young people's health clinic reveals a high prevalence — a pilot study. *Sex Health*. 2004;1(2):115-9. doi: 10.1071/sh03007.
14. Wynn, A, Bristow C C, Cristillo AD, et al. Sexually transmitted infections in pregnancy and reproductive health: Proceedings of the STAR sexually transmitted infection clinical trial group programmatic meeting. *Sex Transm Dis*. 2020;47(1):5-11. doi: 10.1097/OLQ.0000000000001075

Elisa Álvarez Artero¹
Amaia Campo Núñez¹
Moisés García Bravo²
Inmaculada García García³
Moncef Belhassen García⁴
Javier Pardo Lledías⁵

Utilidad del hemocultivo en la infección del tracto urinario con fiebre en el anciano

¹Servicio de Medicina Interna. Hospital Río Carrión. Complejo Asistencial de Palencia (CAUPA). Palencia, España.

²Servicio de Microbiología. Hospital Río Carrión. Complejo Asistencial de Palencia (CAUPA). Palencia, España.

³Servicio de Microbiología. CAUSA. Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL). Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS), Universidad de Salamanca. España.

⁴Servicio de Medicina Interna. Sección de Enfermedades Infecciosas. CAUSA. Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL). Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS), Universidad de Salamanca. España.

⁵Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL). Santander, Cantabria. España.

Article history

Received: 31 December 2020; Revision Requested: 27 January 2021; Revision Received: 31 January 2021; Accepted: 18 February 2021; Published: 15 April 2021

RESUMEN

Introducción. Las infecciones del tracto urinario constituyen una de las infecciones de la comunidad más frecuentes. El diagnóstico de infección urinaria en el anciano es complejo por su presentación y clínica. El objetivo del artículo es evaluar la utilidad de los hemocultivos en la infección urinaria febril del anciano ingresado, sus factores de riesgo, causas de discordancia entre urocultivo y hemocultivo, utilidad de biomarcadores y la mortalidad.

Material y métodos. Estudio observacional de pacientes ingresados mayores de 65 años, con diagnóstico de infección urinaria.

Resultados. 216 episodios con infección urinaria y hemocultivos realizados, 70 (32,4%) casos con bacteriemia. *Escherichia coli* 50 (71,4%) y *Proteus* spp. 6 (8,5%) fueron los aislamientos en hemocultivos más frecuentes. Sólo shock séptico se asoció a mayor frecuencia de bacteriemia (OR=2,93, IC 95: 1,0-8,5; p=0,04). En 26 (12%) casos los hemocultivos fueron discordantes (aislamiento diferente del urocultivo). La mortalidad global fue del 9,1%, sin asociación con la presencia de bacteriemia (p>0,05).

Conclusiones. Un tercio de los ancianos ingresados por infección urinaria febril presentan hemocultivos positivos. La detección de bacteriemia no se asoció con mortalidad. La detección de hemocultivos discordantes es frecuente especialmente en pacientes en tratamiento antibiótico o ingreso reciente.

Palabras clave: Infección del tracto urinario; anciano; tratamiento empírico; guía; Infección del tracto urinario asociada al catéter, tratamiento empírico adecuado.

Utility of the blood culture in infection of the urinary tract with fever in the elderly

ABSTRACT

Introduction. Urinary tract infections are one of the most common community infections. The diagnosis of urinary infections in the elderly is complex because of its presentation and clinic. The aim of this article is to evaluate the usefulness of blood cultures in febrile urinary tract infection in elderly patients, risk factors, causes of discordance between urine and blood cultures, usefulness of biomarkers and mortality.

Material and methods: Observational study of patients admitted over 65 years old, with urinary infections.

Results. A total of 216 episodes with urinary infections and blood cultures performed. 70 (32,4%) cases with bacteremia. The most frequently detected isolates in blood cultures were: *Escherichia coli* 50 (71,4%) and *Proteus* spp. 6 (8,5%). Only septic shock was associated with a higher frequency of bacteraemia (OR=2,93, IC 95: 1,0-8,5; p=0,04). In 26 of the blood cultures a different isolation of the urine culture was detected. Overall mortality was 9.1%, with no association with the presence of bacteremia (p>0.05).

Conclusions: One third of elderly people hospitalized by tract urinary infection had bacteremia. Their detection was not associated with overall mortality. Disagreement between blood and urine cultures in febrile is frequent, especially in patients with recent antibiotic treatment or recently hospitalized.

Key words: Tract urinary infection; elderly; empiric treatment; guideline; catheter-associated urinary tract infection, appropriate empirical treatment.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones del tracto urinario (ITUs) constituyen una de las infecciones de la comunidad más frecuentes [1,2]. El

Correspondence:
Moncef Belhassen García
Servicio de Medicina Interna. Sección de Enfermedades Infecciosas.
CAUSA. IBSAL. CIETUS, Universidad de Salamanca.
Paseo San Vicente 58-182, 37007, Salamanca, España.
E-mail: mbelhassen@hotmail.com.

diagnóstico requiere en contexto clínico la detección de un uropatógeno en orina [3].

Los ancianos, son un grupo de riesgo para infección urinaria y casi de forma universal presentan criterios de ITU complicada [4]. La mortalidad por esta infección de los pacientes ancianos hospitalizados es en algunas series mayor del 10% [5,6].

El diagnóstico de ITU es en este colectivo especialmente complejo pues con frecuencia son pacientes que presentan bacteriuria asintomática. Además, la presentación con clínica cistítica es poco habitual y debutan frecuentemente con fiebre en forma de pielonefritis con criterios asociados de sepsis.

En esta presentación el hemocultivo (HC) es una de las herramientas diagnósticas más usadas, aunque su utilidad puede depender de la población y ámbito de estudio [7]. Con indicaciones poco consensuadas, son en ocasiones motivo de controversia dado el mayor tiempo de obtención respecto a otras pruebas, los recursos invertidos en ellos y su falta de resultados inmediatos [8]. El objetivo del artículo es evaluar la utilidad de los hemocultivos en la infección urinaria febril del anciano ingresado, los factores de riesgo de bacteriemia, las causas de discordancia entre hemocultivos y urocultivos, la adecuación de biomarcadores (proteína C reactiva y procalcitonina) y la mortalidad.

METODOLOGIA

Población en Estudio. Estudio prospectivo observacional realizado en cuatro hospitales (Hospital Río Carrión y Hospital San Telmo del Complejo Asistencial de Palencia y Hospital Virgen de la Vega y Hospital Martínez Anido del Complejo Asistencial de Salamanca) entre los años 2013 y 2015. Se excluyeron los casos de bacteriuria asintomática [9]. Los criterios clínicos considerados para el diagnóstico de ITU febril fueron presentación de síndrome urinario infeccioso cístico (disuria, polaquiuria, nicturia) o datos de pielonefritis con dolor en fosa renal espontáneo y/o un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) (temperatura axilar $>38^{\circ}\text{C}$ o $<35^{\circ}\text{C}$, frecuencia cardíaca >100 latidos por minuto, frecuencia respiratoria >32 rpm, leucocitosis $>12.000/\text{mm}^3$ ó leucopenia <4000 mm^3). Considerando sepsis grave el fallo de al menos un órgano o hipotensión remontable con fluidos, y shock séptico se definió como el cuadro de sepsis que precisó vasopresores para mantener una cifra tensional media ≥ 65 mmHg a pesar de fluidoterapia [10]. Los criterios de inclusión de un episodio de ITU son: i) pacientes ingresados en servicios de Medicina interna con más de 65 años, ii) manifestaciones clínicas compatibles, iii) criterios microbiológicos de ITU: aislamiento de un uropatógeno en urocultivo (UC) y/o en HC (en este caso siempre con sistemático de orina con esterasas positivos y/o nitritos positivos) y iv). Tener realizada una tanda de dos hemocultivos (4 botellas: 2 de aerobios y 2 de anaerobios), dos extracciones consecutivas en puntos diferentes, cultivando en medio aerobio y anaerobio.

Procedimientos microbiológicos y de laboratorio. Los hemocultivos se llevaron a cabo con sistema de automatizado

BACTEC 9240 blood-culture system (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, MD). El antibiograma se realizó mediante métodos de microdilución y la susceptibilidad o resistencia y fueron acordes al European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST 2015). Se consideró aislamientos discordantes al aislamiento en HC diferente al UC, por diverso microorganismo ó negatividad de alguno. Se determinaron los niveles plasmáticos de proteína C reactiva (PCR) y procalcitonina (PCT) en el momento del ingreso del paciente. Los valores de PCR se determinaron mediante un ensayo inmunturbidimétrico (CRPLX, 0-439) en el analizador COBAS INTEGRA 400 (Roche, Alemania). Las concentraciones plasmáticas de PCT se determinaron mediante un ensayo con tecnología TRACE (Time Resolved Amplified Cryptate Emisión) en el analizador Kryptor PCT (Brahms, Alemania). Los valores dados por la casa comercial para PCR y PCT respectivamente fueron 3 mg/L y 0,5 ng/mL.

Análisis estadístico. Los resultados obtenidos se expresaron como la media \pm desviación estándar (DE) y el porcentaje. Los factores de riesgo se expresaron como odds ratios (OR) con intervalos de confianza (IC) del 95%. Se realizaron estudios inferenciales utilizando pruebas paramétricas (χ^2 , t student) y no paramétricas (McNemar) para los casos en que la aplicación de χ^2 no era posible. Se realizaron curvas de características operativas para el receptor (ROC) para evaluar y comparar la validez de los biomarcadores PCR y PCT. El análisis de los datos se realizó utilizando "IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp." (Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales).

Aprobación ética. Este trabajo fue realizado de acuerdo con las normas éticas establecidas en la Declaración de Helsinki revisada en 2013. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos (CEIm) del CAUSA, con el código asignado PI78/06/2018. Todos los datos clínicos y epidemiológicos fueron anonimizados.

RESULTADOS

Entre 349 episodios pertenecientes a 330 pacientes con ITU ingresados en medicina interna, se seleccionaron 216 episodios (207 pacientes) con fiebre y al menos dos hemocultivos realizados. Los datos recogidos para las distintas variables que caracterizan a la población de estudio se muestran en la Tabla 1. En 70 (32,4%) casos se aisló al menos un uropatógeno en hemocultivos. Los aislamientos más frecuentemente detectados fueron: *Escherichia coli* 50 (71,4%), *Proteus* spp. 6 (8,5%) casos y *Klebsiella* spp. 5 (7,1%). En dos casos se detectó sincrónicamente dos uropatógenos (*Proteus* spp./*Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus* spp./*E. coli*). No se encontraron casos de bacteriemia por *Enterococcus* spp.

Los factores de riesgo asociados a bacteriemia en la población en estudio (Tabla 2) fueron la presentación como shock séptico, presentación con dolor lumbar y la infección por *E. coli*. Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) no se asoció a mayor frecuencia de bacteriemias.

Tabla 1	Características principales de los pacientes incluidos	
Características principales (n= 216)	Bacteriémicos n=70 (%)	No bacteriémicos n=139 (%)
Edad (x±DE)	81±9	82±12
Mujer	32 (46,4)	78 (53,4)
Comunidad	34 (48,6)	63 (43,4)
Cuidados sanitarios	36 (51,4)	82 (58,9)
Nosocomial	20 (28,6)	36 (24,8)
Residencia	16 (22,9)	46 (31,7)
Patología/Antecedentes		
Diabetes Mellitus	29 (41,4)	54 (37,2)
Sonda urinaria permanente	34 (48,6)	94 (64,4)
Inmunosupresión	6 (8,6)	20 (13,7)
Uropatía estructural	36 (51,4)	76 (52,1)
Antibiótico 6 meses previos	28 (44,4)	72 (55)
Ingreso 3 meses previos	22 (35,5)	41 (65,1)
ITU previa	29 (44,6)	72 (71,3)
Deterioro cognitivo	20 (34,5)	79 (55,2)
Presentación clínica		
SRIS	42 (60)	86 (58,9)
Sepsis grave	17 (24,3)	24 (16,4)
Shock séptico	9 (12,9)	6 (4,1)
Dolor lumbar	10 (14,3)	4 (2,7)
Cistitis	22 (31,4)	32 (21,9)
Síndrome confusional	25 (35,7)	63 (71,6)
Otros	0	6 (4,1)
Mortalidad intrahospitalaria	7 (10)	19 (13)
Etiología		
<i>E. coli</i>	50 (71,4)	73 (52,5)
<i>Proteus</i> spp.	6 (8,6)	10 (6,8)
<i>Klebsiella</i> spp.	5 (7,1)	18 (12,9)
<i>Serratia</i> spp.	2 (2,9)	0
<i>Morganella morganii</i>	2 (2,9)	2 (1,4)
<i>Enterococcus</i> spp.	0	8 (5,7)
Otros	5 (7,1)	18 (12,9)

La PCT resultó mejor predictor de bacteriemia que la PCR o que la cifra absoluta de leucocitos [Área bajo la curva (ABC) ROC 0,79 vs 0,63 vs 0,42, $p<0,001$]. Para un valor de corte dado por la casa de 0,5 ng/mL, los cocientes de probabilidades positivo y negativo fueron 2,27 y 0,37, y los valores predictivos positivos y negativos fueron 0,65 y 0,85, respectivamente (para una probabilidad pre-prueba en nuestra población de 0,32).

En 26 (12%) de los 216 hemocultivos fueron discordantes. En 23 (88,4%) casos las discordancias fueron por negatividad en el urocultivo y en 3 (11,6%) por la detección de otro uropatógeno diferente no detectado en UC. Los factores asociados a discordancia fueron el ingreso en los 3 meses previos (OR=2,7, IC95: 1,266-6,123; $p=0,02$) y el uso de antibiótico previo al ingreso (OR=3,7, IC95: 1,487- 9,335; $P=0,008$).

Tabla 2 Factores de riesgo asociados a la bacteriemia en la ITU del anciano.		
Factores riesgo	OR (IC95%)	p
Deterioro cognitivo	0,55 (0,30-0,98)	0,043
Antibiótico 6 meses previos	0,53 (0,29-0,95)	0,035
Sonda urinaria permanente	0,63 (0,3-1,03)	0,06
Shock séptico	2,93 (1,0-8,5)	0,04
Presentación como dolor lumbar	5,9 (1,785- 19,608)	0,002
<i>E. coli</i>	2,8 (1,5-5,3)	p<0,001

La mortalidad global fue 12%, no detectando asociación entre la detección de bacteriemia y mortalidad ($p>0,05$). Los factores asociados fueron shock séptico (OR=8,4, IC95: 1,4-44; $p<0,03$) y filtrado glomerular <30 ml/min/1,74m² (OR=2,6, IC95: 1,112-6,485; $p=0,03$). La ITU bacteriémica por *E. coli* y *Klebsiella* BLEE presentó mayor mortalidad vs no BLEE (OR=5,2, IC95: 1,052-26,197; $p=0,03$).

DISCUSIÓN

En el documento de consenso sobre el manejo de ITU de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) se aborda la utilidad de la realización de hemocultivos desaconsejándose en la pielonefritis no complicada (recomendación E-II), y simultáneamente recomendándose en pacientes con infección complicada o en pacientes con sepsis (recomendación B-II) [3]. En nuestro trabajo de ITU en anciano hasta un tercio de los pacientes con hemocultivos realizados fueron positivos, lo que concuerda con otras series publicadas 15-42% [5]. Encontramos al igual que lo presentado por otros autores que, aunque la etiología de ITU es variada, *E. coli* fue el responsable de la mayor parte de los casos de infección bacteriémica [5,11]. Por el contrario, la infección por *Enterococcus* spp. (causa frecuente de ITU complicada) no fue responsable de ningún caso de bacteriemia. Este hallazgo también ha sido referido por otros autores [5]. En nuestra serie no encontramos que la producción de BLEE en *E. coli* o *Klebsiella* spp. se asociara a un riesgo de bacteriemia.

Otro de los objetivos de nuestro trabajo fue evaluar los factores de mayor riesgo de bacteriemia en esta infección. Así la presencia de dolor lumbar o shock séptico presentaba mayores tasas de bacteriemia. Este dato difiere con lo detectado en otros trabajos [5]. Encontramos también *E. coli* responsable de tres cuartas partes de los casos con bacteriémicos, siendo este aislamiento un factor de riesgo para bacteriemia. Este hecho ha sido resaltado en otros trabajos de ITU [5]. Por otra parte, detectamos una tendencia de menor bacteriemia en infección asociada a catéter urinario permanente. Este dato también es reseñado por otros autores [12] y puede explicarse por la mayor frecuencia de uropatógenos diferentes de *E. coli* con menor capacidad invasiva.

Se evaluaron varios biomarcadores como predictores de bacteriemia en la ITU del anciano. Los biomarcadores ideales son aquellos con mayor sensibilidad, especificidad y valor predictivo negativo, ya que nos garantizan una correcta decisión clínica. La PCT en casos de sepsis grave/shock séptico presenta una mayor precisión que la PCR o que la leucocitosis. [8, 13-16]. Es posible que sea el biomarcador con mejor capacidad diagnóstica y pronóstica en la actualidad.

En nuestro trabajo el mejor biomarcador fue la procalcitonina con ABC próximo a 0,8. Estos resultados están alejados de los presentados por Julián-Jimenez *et al.* (ABC 0,99) [13] y están en la línea a los referidos por otros autores [14,15]. Sin embargo, con un cociente de probabilidad negativo de 0,37, creemos no se puede considerar útil la PCT en la exclusión de una infección bacteriémica. En situaciones con menor probabilidad pre-prueba es posible que la procalcitonina tenga mejor valor predictivo negativo en la exclusión de una infección bacteriémica.

Estudiamos asociación mortalidad global y bacteriemia, y al igual que otros estudios similares en población anciana no detectamos diferencias entre los pacientes con y sin hemocultivos positivos [5,12].

Otra de las utilidades potenciales del hemocultivo pudiera ser el diagnóstico de infecciones por uropatógenos infrecuentes como *Staphylococcus* spp. o *Candida* spp. y otros. En estos casos se exige el aislamiento simultáneo en urocultivo y hemocultivo como indicación de tratamiento. En nuestro trabajo detectamos menos de un 1% de ITU de esta causa, lo que establece la escasa utilidad del hemocultivo en esta indicación.

Otro aspecto a reseñar en nuestro trabajo fueron los resultados discordantes entre el urocultivo y los hemocultivos. En nuestro estudio en población anciana, las discordancias encontradas fueron superiores al 11%. Estas discordancias son mayores que las presentadas en mujeres jóvenes con pielonefritis cercanas al 2% [17], y similares a las presentadas e ITU complicadas [18]. Al igual que lo demostrado en otras series uno de los factores más frecuentes asociado a la discordancia fue el tratamiento antibiótico previo.

Finalmente, creemos que en la clínica asistencial el diagnóstico de ITU febril en ancianos con múltiples comorbilidades es siempre complicado. La frecuente ausencia de clínica cistítica, sumado con la presencia casi constante de bacteriuria hace siempre pensar en este origen. Así, la detección en hemocultivo de microorganismos no habituales como uropatógeno, puede ayudar enormemente en el establecimiento de otros diagnósticos alternativos.

Este estudio tiene ciertas limitaciones. La primera limitación a la hora de recogida de datos puesto que provienen de hospitales diferentes, aunque se siguió un protocolo, hubo pérdida de algún dato. Por otro lado, se recogen episodios de ITU en mismos pacientes, lo que puede llevar a un sesgo si mismas variables se repiten en esos mismos pacientes. Los patrones de resistencia pueden no ser extrapolables a otros hospitales puesto que son reflejo de la epidemiología local. Por último, es una muestra pequeña, lo que sesga los datos de mortalidad.

En la infección del tracto urinario del anciano que ingresa, la detección de bacteriemia es muy frecuente. La PCT resultó el bio-marcador más útil como predictor de bacteriemia, aunque un resultado negativo no permite excluirla en estos pacientes. La detección de bacteriemia no se asoció con mortalidad global.

FINANCIACIÓN

Los autores declaran no haber recibido financiación para la realización de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. Esparcia A, Artero A, Eiros JM, Balaguer M, Madrazo M, Alberola J, Nogueira JM. Influence of inadequate antimicrobial therapy on prognosis in elderly patients with severe urinary tract infections. *Eur J Intern Med*. 2014;25(6):523-7. doi: 10.1016/j.ejim.2014.04.009
2. L E Nicolle MD F. Urinary Tract Infections in the Elderly. *Clin Geriatr Med*. 2009; 25(3):423-36. doi:10.1016/j.cger.2009.04.005
3. De Cueto M, Aliaga L, Alós J-I, Canut A, Los-Arcos I, Martínez JA, et al. Executive summary of the diagnosis and treatment of urinary tract infection: Guidelines of the Spanish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC) *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017; 35(5):314-20. doi: 10.1016/j.eimc.2016.11.005.
4. Artero EÁ, Nuñez AC, Bravo MG, Calvo OC, García MB, Lledias JP, et al. Infección urinaria en el anciano. *Rev Clin Esp*. 2019; 219(4):189-93. doi:10.1016/j.rce.2018.10.009
5. Artero A, Esparcia A, Eiros JM, Madrazo M, Alberola J, Nogueira JM. Effect of Bacteremia in Elderly Patients With Urinary Tract Infection. *Am J Med Sci* 2016; 1-5. doi: 10.1016/j.amjms.2016.05.031
6. Chin BS, Kim MS, Han SH, Shin SY, Choi HK, Chae YT, et al. Risk factors of all-cause in-hospital mortality among Korean elderly bacteremic urinary tract infection (UTI) patients. *Arch Gerontol Geriatr*. 2011; e52:50-55. doi: 10.1016/j.archger.2010.05.011
7. Rodríguez Díaz JC, Guna Serrano R, Larrosa Escartín N, Marín Arriaza M. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. 2017. 62. Rodríguez Díaz JC (coordinador). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017.
8. Julián-Jiménez A, Candel González FJ, González del Castillo J. Utilidad de los biomarcadores para predecir bacteriemia en los pacientes con infección en urgencias. *Rev Esp Quimioter*. 2017; 30:245-56. PMID: 2827622
9. Zboromyrska Y, de Cueto López M, Alonso-Tarrés C, Sánchez-Hellín V. 2019. 14b. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. Zboromyrska Y (coordinadora). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2019.
10. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 23;315(8):801-10. doi:10.1001/jama.2016.0287
11. Hsu CY, Fang HC, Chou KJ, Chen CL, Lee PT, Chung HM. The clinical impact of bacteremia in complicated acute pyelonephritis. *Am J Med Sci*. 2006; 332(4):175-80. doi: 10.1097/00000441-200610000-00004.
12. Shimoni Z, Cohen R, Avdiaev R, Froom P. Treatment of febrile geriatric patients with suspected urinary tract infections in a hospital with high rates of ESBL producing bacteria: a cohort study. *BMJ Open*. 2016; 6:e013696. doi: 10.1136/bmjopen-2016-013696
13. Julián-Jiménez A, Candel-González FJ, González del Castillo J. Utilidad de los biomarcadores de inflamación e infección en los servicios de urgencias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014; 32(3): 177-90 doi: 10.1016/j.eimc.2013.01.005
14. van derStarre WE, Zunder SM, Vollaard AM, van Nieuwkoop C, Stalenhoef JE, Delfos NM, et al. Prognostic value of pro-adrenomedullin, procalcitonin and C-reactive protein in predicting outcome of febrile urinary tract infection. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20(10):1048-54. doi: 10.1111/1469-0691.12645.
15. Caffarini EM, DeMott J, Patel G, Lat I. Determining the Clinical Utility of an Absolute Procalcitonin Value for Predicting a Positive Culture Result. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 24;61(5):1303-6. doi: 10.1128/AAC.02007-16
16. Tudela P, Prat C, Lacoma A, Mòdol JM. Biomarcadores y sospecha de infección en los servicios de urgencias. *Med Clin (Barc)*. 2012; 139: 33-7. doi:10.1016/j.medcli.2011.09.018
17. Velasco M, Martínez JA, Moreno-Martínez A, Horcajada JP, Ruiz J, Barranco M, Almela M, Vila J, Mensa J. Blood cultures for women with uncomplicated acute pyelonephritis: are they necessary? *Clin Infect Dis*. 2003; 37(8):1127-30. doi: 10.1086/378291.
18. Spoorenberg V, Prins JM, Opmeer BC, de Reijke TM, Hulscher ME-JL, Geerlings SE. The additional value of blood cultures in patients with complicated urinary tract infections. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20(8):0476-9. doi: 10.1111/1469-0691.12491

Rocío Cebollada Sánchez
María José Lavilla Fernández
Ana Betrán Escartín
Diego Ortega Larrea
Luis Torres Sopena

Sepsis por *Pseudocitrobacter anthropi* en un paciente con infección del tracto urinario complicada

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario San Jorge, Huesca.

Article history

Received: 22 September 2020; Revision Requested: 23 November 2020; Revision Received: 13 February 2021; Accepted: 18 February 2021; Published: 8 April 2021

Estimador Editor: El género *Pseudocitrobacter* fue establecido en 2014 con dos especies: *Pseudocitrobacter faecalis* y *Pseudocitrobacter anthropi*, ambas aisladas de cuatro muestras fecales de pacientes hospitalizados en Pakistán [1]. Inicialmente las cepas fueron fenotípicamente identificadas como *Citrobacter* sp. Comparando el análisis de la secuencia génica de ARNr 16S, mostraban similitudes >97% con miembros de los géneros *Citrobacter*, *Kluyvera*, *Pantoea*, *Enterobacter* y *Raoultella* (mayor similitud con *Citrobacter koseri*) [1], pero siempre formando un cluster separado en los árboles filogenéticos. Análisis posteriores basados en secuencias multilocus, hibridación ADN-ADN y análisis de diferenciación genotípica permitieron proponer un nuevo género, *Pseudocitrobacter* [1]. Del mismo modo se pudo conocer que *P. anthropi* es un sinónimo heterotópico posterior a *P. faecalis*. No fue hasta 6 años después, en 2020, cuando se diferenció una tercera especie, *P. vendiensis*, en una muestra de un paciente danés [2].

P. anthropi es un bacilo gramnegativo corto (aprox. 2-3 µm de largo y 1 µm de ancho), anaerobio facultativo, móvil y que no produce hemólisis. En cuanto a sus características bioquímicas, es fermentador de la lactosa, glucosa, produce reducción de nitratos a nitritos y las reacciones de oxidasa, ureasa, indol y SH₂ son negativas. Es capaz de hidrolizar la esculina, la reacción de ONPG es positiva y la lisina descarboxilasa (LDC) y ornitina descarboxilasa (ODC) son débilmente positivas, no así la arginina descarboxilasa. Esta última característica bioquímica lo diferencia de las otras especies del género, así como porque es capaz de producir ácido a partir de la rafinosa pero no del D-manitol, justamente al revés de lo que ocurre con *P. faecalis* y *P. vendiensis* [1].

Presentamos el caso de una paciente de 77 años que

consultó en el hospital por cuadro de cólico renal izquierdo asociado a fiebre de 38°C. En Urgencias se realizó ecografía urinaria y TAC abdominal donde se observó litiasis de 8 mm en uréter lumbar izquierdo sin dilatación de vía urinaria. La paciente permaneció en observación y se extrajeron dos parejas de hemocultivos, pero su estado general empeoró y se decidió colocar un catéter doble J en uréter con salida de orina piúrica, que se remitió a Microbiología para cultivo convencional. Dada la mala evolución posterior, la paciente precisó ingreso en UCI en situación de shock séptico secundario a uropatía obstructiva por litiasis ureteral, donde fue tratada con piperacilina-tazobactam durante todo el ingreso, con buena evolución clínica y cefuroxima al alta durante cinco días más.

En el laboratorio de Microbiología, los hemocultivos se incubaron en el sistema automático BD BACTEC™ FX, según protocolo, detectándose crecimiento a las 10 horas aproximadamente. En el Gram directo de sangre del hemocultivo se apreciaban bacilos gramnegativos. Las botellas aerobias se subcultivaron en Agar Chocolate y Agar MacConkey y las anaerobias en Agar Sangre y Agar Brucella.

Tras 24 horas de incubación a 37°C se observó el crecimiento de colonias en todas las placas.

Mediante MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) VITEK MS (bioMérieux, Francia) se identificó a la bacteria como *P. faecalis*.

Paralelamente, la orina se sembró en Agar Sangre y fue incubada a 37°C, observándose a las 24 horas el crecimiento de un bacilo Gram negativo, en cantidad superior a 100.000 UFC/mL, e identificado igualmente mediante MALDI-TOF como *P. faecalis*.

Posteriormente, la cepa fue remitida al Laboratorio de Taxonomía Bacteriana del Centro Nacional de Microbiología (CNM) que la identificó como *P. anthropi*.

El estudio de sensibilidad *in vitro* se realizó mediante microdilución en placa (MicroScan®, Beckman) aplicando puntos de corte de EUCAST (European Committee on Antimicrobial

Correspondencia:
Rocío Cebollada Sánchez
Hospital General San Jorge. Servicio de Microbiología.
Avda. Martínez de Velasco, Nº 36
CP. 22004, Huesca
E-mail: mrcebollada@salud.aragon.es

Susceptibility Testing) para Enterobacterias. Ambos aislados, de sangre y orina, mostraban una CMI en la categoría de resistente para amoxicilina (>8 mg/L), amoxicilina-clavulánico (16 mg/L) y fosfomicina (>64 mg/L), siendo sensible a todas las cefalosporinas, piperacilina-tazobactam, aztreonam, carbapenems, aminoglucósidos, quinolonas y trimetropim-sulfametoxazol. Las pruebas fenotípicas realizadas para la detección de BLEE, AmpC y carbapenemasa (incluida NDM) resultaron negativas, lo que sugiere un patrón de resistencia a betalactámicos dentro del Grupo 2, similar al de *C. koseri*. La inusual resistencia presentada frente a fosfomicina, situación poco común en la familia *Enterobacteriaceae*, puede indicar una resistencia intrínseca frente a este antimicrobiano [3].

La discrepancia observada a nivel de especie entre nuestra identificación y la del CNM se debe a que *P. anthropi* no se encuentra en la base de datos que manejamos (MALDI-TOF VITEK MS versión V3). Las especies de *Pseudocitrobacter*, potencialmente presentes en la microbiota intestinal habitual, pueden ser causantes de infección urinaria y bacteriemia como otras enterobacterias. Serán necesarios más estudios sobre las características microbiológicas y de sensibilidad antimicrobiana de este género.

FINANCIACIÓN

Los autores declaran que no han recibido financiación para la realización de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

BIBLIOGRAFIA

1. Kämpfer P, Glaeser SP, Raza MW, Abbasi SA, Perry JD. *Pseudocitrobacter* gen. nov., a novel genus of the Enterobacteriaceae with two new species *Pseudocitrobacter faecalis* sp. nov., and *Pseudocitrobacter anthropi* sp. nov, isolated from fecal samples from hospitalized patients in Pakistan. Syst Appl Microbiol. 2014;37(1):17-22. DOI: 10.1016/j.syapm.2013.08.003
2. Kämpfer P, Fuglsang-Damgaard D, Overballe-Petersen S, Hasman H, Hammerum AM, Fuursted K, et al. Taxonomic reassessment of the genus *Pseudocitrobacter* using whole genome sequencing: *Pseudocitrobacter anthropi* is a later heterotypic synonym of *Pseudocitrobacter faecalis* and description of *Pseudocitrobacter vendiensis* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2020;70(2):1315-1320. DOI: 10.1099/ijsem.0.003918
3. Perry JD, Naqvi SH, Mirza IA, Alizai SA, Hussain A, Ghirardi S, et al. Prevalence of faecal carriage of Enterobacteriaceae with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. J Antimicrob Chemother. 2011;66(10):2288-2294. DOI: 10.1093/jac/dkr299

Inés Olaya García
Rodríguez¹
Laura Sante Fernández¹
Ana Madueño Alonso¹
María del Mar Alonso
Socas²
María Lecuona Fernández¹

Sospecha de artritis bacteriana en paciente VIH

¹Servicio de Microbiología y Control de la Infección. Hospital Universitario de Canarias. La Laguna. España

²Servicio de Infecciones. Hospital Universitario de Canarias. La Laguna. España

Article history

Article history: Received 31 October 2020; Revision Requested: 9 December 2020; Revision Received: 5 January 2021; Accepted: 11 January 2021; Published: 16 March 2021

Estimado Editor: las infecciones de transmisión sexual (ITS) son uno de los problemas más frecuentes y universales de Salud Pública. *Neisseria gonorrhoeae* es una de las causas más frecuentes de ITS de etiología bacteriana después de *Chlamydia trachomatis* [1]. En el año 2017 se notificaron en España, 8.722 casos de infección gonocócica (18,74 casos/100.000 habitantes) [2]. Generalmente, este patógeno puede producir uretritis, cervicitis y proctitis [3]. En ocasiones causan infecciones diseminadas, cuyo diagnóstico temprano es vital para evitar complicaciones, como la artritis, tenosinovitis, lesiones cutáneas por embolismos sépticos y muy raramente endocarditis y meningitis [3-5].

Presentamos el caso de un paciente varón de 34 años, diagnosticado de VIH cinco meses antes en tratamiento antirretroviral con Symtuza® (darunavir/cobicistat/emcitribina/tenofovir anafelamida) con una carga viral de 75 copias y CD4 318 células/mm³. Al momento del diagnóstico, se le hizo cribado de sífilis, pero no del resto de ITS. Acude al servicio de Urgencias por dolor y tumefacción en articulaciones de 10 días de evolución, que no mejora a pesar de tratamiento antiinflamatorio y le impide el movimiento. Refiere que fue hace una semana a su médico por molestias rectales de tipo hemorroidal, comenta no haber tenido fiebre ni clínica miccional. El paciente es derivado al Servicio de Infecciones y a la exploración, la muñeca y rodilla izquierda presentan un aumento de volumen y temperatura que dificulta la flexoextensión.

Se realiza artrocentesis y se solicitan diversas pruebas diagnósticas: bioquímica, hemocultivos, cultivo bacteriológico y de micobacterias en líquido sinovial además de estudio de ITS en orina, exudado rectal y líquido sinovial. La bioquímica

del líquido, con 74.236 leucocitos, 95% de células polimorfonucleares, es sugestiva de un proceso de oligoartritis séptica. Por lo que, se inicia tratamiento empírico con ceftriaxona 2 g por vía intravenosa cada 24 horas y cloxacilina 2 g por vía intravenosa cada 4 horas y se requiere lavado quirúrgico, remitiendo nuevas muestras intraquirúrgico.

Los hemocultivos fueron negativos. En la tinción de Gram del líquido sinovial, recogida pretratamiento antibiótico, se observan células polimorfonucleares y diplococos gramnegativos (Figura 1) que crece en Agar Chocolate y Thayer-Martin a las 48 horas de incubación (Figura 2). Se identifica como *N. gonorrhoeae* por MALDI-TOF (Biomérieux®). Se realiza el antibiograma siendo sensible a ceftriaxona (CMI ≤0,002 mg/L), cefixima (CMI ≤0,016 mg/L) y azitromicina (CMI 0,125 mg/L), según las normas de interpretación EUCAST (versión 9.0). La PCR múltiple de ITS (Seegene®, Werfen) es positiva para *N. gonorrhoeae* en exudado rectal y líquido sinovial y negativa en primera porción de la orina. El cultivo de las muestras intraquirúrgico, en las que ya había recibido una dosis de antibióticos, resultan negativos.

Ante estos resultados, se suspende el tratamiento con cloxacilina, dejando la ceftriaxona. El paciente evoluciona favorablemente y la inflamación de las articulaciones va disminuyendo y se pudo comenzar su movilización según tolerancia al dolor. Tras 12 días de tratamiento antibiótico intravenoso es dado de alta con cefixima 400 mg vía oral cada 12 horas durante 7 días.

La artritis gonocócica es una patología infrecuente en nuestro medio. Normalmente afecta a personas jóvenes, sanas, y sexualmente activas. Los signos de la infección diseminada incluyen poliartralgias migratorias, fiebre moderada y tenosinovitis. En determinados casos se presentan lesiones en la piel tipo pápula que evoluciona a lesiones vesiculares. Muchos de estos pacientes pueden presentar infecciones asintomáticas genitales, anales o faríngeas [5]. Se calcula que solo entre un 0,5-3% de todas las infecciones gonocócicas evolucionan

Correspondencia:
Inés Olaya García Rodríguez
Servicio de Microbiología y Control de la Infección. Hospital Universitario de Canarias.
Ctra Ofra s/n. 38320. La Cuesta. La Laguna. España
Tfno: 922679066.
Fax 922679078
E-mail: inesgarro@gmail.com

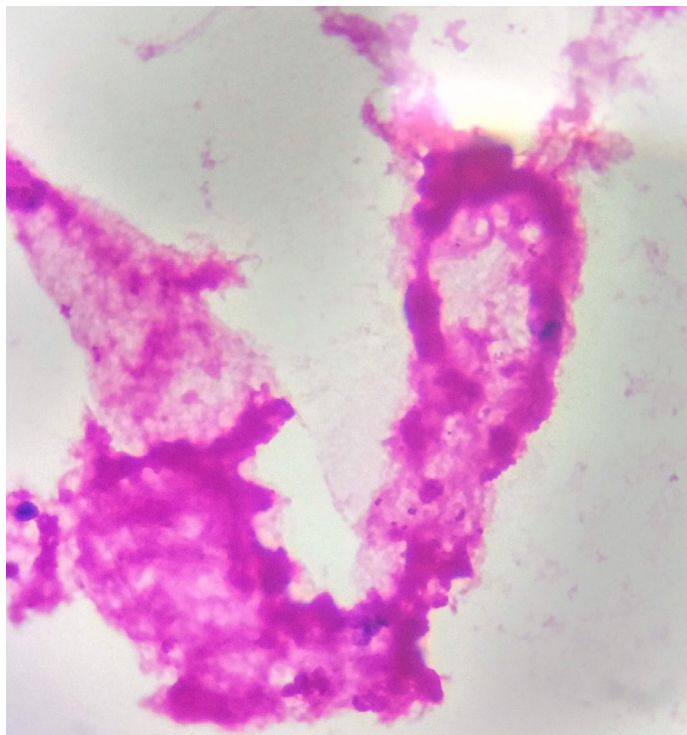


Figura 1 Imagen de muestra de líquido sinovial al microscopio. Se observan las células polimorfonucleares y diplococos gramnegativo.



Figura 2 Crecimiento de *Neisseria gonorrhoeae* en Agar Chocolate.

a una infección diseminada [6,7]. Generalmente, la artritis es monoarticular y predomina en las rodillas, los codos o las muñecas [3]. A pesar de que los síntomas son graves, con el tratamiento antibiótico adecuado y el drenaje de la articulación, el pronóstico de la artritis es favorable evitando que se pierda funcionalidad. Los hemocultivos no suelen positivizarse en estos casos de artritis gonocócica [8].

Aunque los casos descritos de artritis gonocócica en pacientes VIH no son abundantes, se estima que la prevalencia media de coinfección VIH *N. gonorrhoeae* está en torno a un 9.5% variando entre distintos países entre 2% en Suiza a 19% en Jamaica [9,10].

El efecto del VIH en la infección gonocócica no está muy claro. Se ha relacionado que al estar estos pacientes más inmunocomprometidos, tendrían más tendencia a desarrollar infecciones diseminadas por lo que debería tenerse en cuenta en el diagnóstico diferencial de las artritis sépticas [10].

Concluyendo, este caso destaca la importancia de descartar y tratar las ITS en pacientes con diagnóstico inicial de VIH, para evitar posibles complicaciones.

FINANCIACIÓN

Los autores declaran que no han recibido financiación para la realización de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales, 2018. [cited 24 April 2020]. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientomicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia24a.pdf>
1. 2. Unidad de vigilancia del VIH y conductas de riesgo. Vigilancia epidemiológica de las infecciones de transmisión sexual, 2017. Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III/Plan Nacional sobre el Sida, Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación, 2019. [cited 27 April 2020] Disponible en: https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/archivos%20A-Z/INFECCION%20GONOCOCICA/Vigilancia ITS_1995_2017_def.pdf
3. Barberá MJ, Serra-Pladevall J. Infección gonocócica: un problema aún sin resolver. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2019; 37(7):458-466. doi: 10.1016/j.eimc.2018.12.008.

4. Gassiep I, Gilpin B, Douglas J, Siebert D. Gonococcal prosthetic joint infection. *J Bone Jt Infect.* 2017; 2(3): 160–162. doi: 10.7150/jbji.20791.
5. Aguadero Acera V, Baena Ferrer IM, Fernández Pozuelo C, Sánchez Castañón J, Sánchez Rivas JL. Diagnóstico clínico y de laboratorio de la artritis gonocócica: a propósito de un caso. *Rev Lab Clin.* 2013; 6(1), 37–40. doi: 10.1016/j.labcli.2012.07.003.
6. García Arias M, Balsa A, Martín Mola E. Septic arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2011; 25(3):407–21. doi: 10.1016/j.berh.2011.02.001.
7. Le Berre JP, Samy J, Garrabé E, Imbert I, Magnin J, Lechevalier D. Arthritis without urethritis: remember gonococcus. *Rev Med Interne.* 2007;28(3):183–5. doi: 10.1016/j.revmed.2006.11.001
8. Vidaurrezaga, MM, Perlma DC. A case of purulent gonococcal arthritis. *IDCases.* 2019; 19, e00662. doi: 10.1016/j.idcr.2019.e00662.
9. Kalichman SC, Pellowski J, Turner C. Prevalence of sexually transmitted co-infections in people living with HIV/AIDS: systematic review with implications for using HIV treatments for prevention. *Sex Trasm Infec.* 2011; 87(3):183–90. doi: 10.1136/sti.2010.047514.
10. Maharaj R, Mody GM. The rarity of gonococcal arthritis in association with HIV infection. *J Infect Dev Ctries.* 2014; 8(9):1222–1227. doi: 10.3855/jidc.4450

Carlos Ruiz de Alegría Puig¹
María Macho Díaz²
Jesús Agüero Balbín¹
Jorge Calvo Montes¹

First case of *Arcobacter cryaerophilus* in paediatric age in Spain

¹Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Servicio de Microbiología, Spain

²Servicio de Pediatría, Atención Primaria, Servicio Cántabro de Salud, Santander, Spain.

Article history

Received: 16 November 2020; Revision Requested: 26 December 2020; Revision Received: 30 December 2020; Accepted: 4 February 2021; Published: 3 April 2021

Sir,

The genus *Arcobacter*, a producer of gastroenteritis in humans, is one of the so-called emerging clinical pathogens [1]. It is closely related to the genus *Campylobacter* and, as it, has been found to be related to the consumption of vegetables, shellfish, milk, water and meat, both beef and pork as well as poultry [2,3]. *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii* are the most related species to clinical pathology, although in the bibliography the most prevalent is *A. butzleri* [4]. In Spain *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, and *A. skirrowii* were detected with an overall prevalence close to 40% and were isolated from (73.3%) shellfish samples, (55%) chicken samples, (42.8%) fresh cow's milk samples, (10%) pork samples, and (5%) beef sample [5]. Molecular and proteomic methods implemented in clinical microbiology laboratories make it significantly easy to identify, which is also necessary by the greater resistance of the genus than *Campylobacter* to antibiotics [6]. The ignorance of the low susceptibility to ciprofloxacin, 51% of the *A. cryaerophilus* strains tested resistant compared with only 13% of *A. butzleri* [7], can make us underestimate the importance of this enteropathogen and fail in treatment in adults. Meanwhile from 25% to 50% of the strains of *Arcobacter* tested in different studies were resistant to macrolides [7,8], which is the usual treatment for diarrhea in Spain for children.

A 12-year-old male who goes to Primary Care consultation referring for two months, coinciding with the confinement derived from the pandemic by COVID-19, liquid bowel movements, in number of 3-4 per day, yellowish, without pathological products; refers to mild intermittent pain prior to emission, without nausea, vomiting or accompanying fever.

Family does not report any symptomatology in the rest of the cohabitants (parents and brother). The family coexists with a domestic cat in perfect condition; they also do not refer to suspicions of having consumed food or beverages suspected of contamination. It was decided to collect stool sample for coproculture and parasite study, and astringent diet and oral rehydration serum on demand is recommended.

From the microbiology laboratory, the negative examination for parasites and positive growth in *Campylobacter* medium (CCDA selective medium, Thermo Fisher Diagnostics, Hemel Hempstead, United Kingdom) was reported after two days under microaerophilia conditions at 37°C. The colonies were identified as *A. cryaerophilus* with a 99.9% confidence level by MALDI-TOF Vitek-MSTM (v3.2 SARAMIS MS-ID, BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) and confirmed by sequencing the 16S rRNA gene (BlastN; Accession number: NR 025905.1). Gradient strips (Etest) were used to determine susceptibility to antibiotics and resulted resistant to cefazolin, erythromycin, amoxicillin-clavulanic and ciprofloxacin. Intermediate for imipenem and sensitive to tetracycline, doxycycline and gentamicin. When reporting the results, given the persistence of the clinic, treatment with doxycycline 100 mg was indicated every 12 hours for 5 days. Four days after the start of treatment the patient clearly improves, by decreasing in the number of bowel movements and increasing in consistency, and on the 10th day of treatment they were completely normalized. Samples were collected for coproculture in the cohabitants and rectal smears in the pet, resulting in negative both coprocultures, parasite study as well as immunochromatography for enteropathogen viruses. In the pet, also, was not identify *A. cryaerophilus* in the rectal smears.

This clinical case serves to alert pediatricians and gastroenterologists to the appearance of this genus of emerging enteropathogens, in which the usual empirical treatment, such as the prescription of quinolones or macrolides, may have no effect, proposing the use of tetracyclines for the treatment of this infection. We would also advise microbiologists not to

Correspondence:
Carlos Ruiz de Alegría Puig
Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Servicio de Microbiología. Avda. Valdecilla s/n
CP: 39008 Santander, España.
Phone: +34 636322882
E-mail: carlosrdap@hotmail.com

incubate *Campylobacter* plates at 42°C but at 37°C, or better between 25 and 30°C since this type of enteropathogens are not thermophilic adapting in this way the protocols of clinical microbiology laboratories to the identification of this type of emerging enteropathogens. And finally, in the face of a case not related to the rural environment, it would remain to be determined the effect that COVID-19 confinement has had on food in Spain, as well as urging the institutions responsible for public health to take greater control measures on the food industries.

FUNDING

None to declare.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Ferreira S, Queiroz JA, Oleastro M, Domingues FC. Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter*: A review. *Crit Rev Microbiol*. 2016;42:364-83. doi: 10.3109/1040841X.2014.954523.
2. Shange N, Gouws P, Hoffman LC. *Campylobacter* and *Arcobacter* species in food-producing animals: prevalence at primary production and during slaughter. *World J Microbiol Biotechnol*. 2019;35:146. doi: 10.1007/s11274-019-2722-x.
3. Mottola A, Bonerba E, Figueras MJ, Pérez-Cataluña A, Marchetti P, Serraino A, et al. Occurrence of potentially pathogenic *arcobacters* in shellfish. *Food Microbiol*. 2016;57:23-7. doi: 10.1016/j.fm.2015.12.010.
4. Vandenberg O, Dediste A, Houf K, Ibekwem S, Souayah H, Cadranet S, et al. *Arcobacter* species in humans. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:1863-7. doi: 10.3201/eid1010.040241.
5. Nieva-Echevarria B, Martinez-Malaxetxebarria I, Girbau C, Alonso R, Fernández-Astorga A. Prevalence and genetic diversity of *Arcobacter* in food products in the north of Spain. *J Food Prot*. 2013;76:1447-50. doi: 10.4315/0362-028XJFP-13-014.
6. Ramees TP, Dhama K, Karthik K, Rathore RS, Kumar A, Saminathan M, et al. *Arcobacter*: an emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control - a comprehensive review. *Vet Q*. 2017;37:136-61. doi: 10.1080/01652176.2017.1323355.
7. Van den Abele AM, Vogelaers D, Vanlaere E, Houf K. Antimicrobial susceptibility testing of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from Belgian patients. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71:1241-4. doi: 10.1093/jac/dkv483.
8. Fera MT, Mauger TL, Giannone M, Gugliandolo C, La Camera E, Blandino G, et al. In vitro susceptibility of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* to different antimicrobial agents. *Int J Antimicrob Agents*. 2003;21:488-91. doi: 10.1016/s0924-8579(03)00004-9.

Ana Castellano-Martínez¹
Moisés Rodríguez-
González²Nefritis focal aguda bilateral por *Enterococcus faecalis* asociada a enfermedad de Kawasaki en un paciente pediátrico¹Sección de Nefrología pediátrica del Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz, España²Sección de Cardiología pediátrica del Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz, España

Article history

Received 19 November 2020; Revision Requested: 15 January 2021; Revision Received: 15 January 2021; Accepted: 25 January 2021; Published: 12 March 2021

Estimado Editor: la infección del tracto urinario (ITU) constituye una de las infecciones bacterianas más frecuentes en pediatría. Las ITUs de vías altas engloban diferentes entidades como pielonefritis aguda (PNA), nefronía lobar aguda, absceso renal o pionefrosis [1]. El diagnóstico diferencial de estas entidades con diferente manejo es muy importante. Presentamos un niño de 8 años sin antecedentes de interés que acude a urgencias pediátricas por fiebre, vómitos y dolor abdominal de 24 horas de evolución. En la exploración destaca dolor en hemiabdomen derecho sin peritonismo. Entre las pruebas complementarias se realiza sistemático de orina normal, analítica sanguínea con leucocitosis y neutrofilia (22.730/mm³, 85%), PCR 92.7 mg/l, PCT 19.72 ng/ml, hemocultivo y urocultivo negativos y ecografía abdominal normal. Persiste febril y con dolor abdominal sin detectarse foco durante 7 días a pesar de tratamiento con ceftriaxona, realizándose ecocardiografía donde se constatan aneurismas coronarios (Figura 1) y TAC abdominal (Figura 1) en el que se visualizan focos bilaterales de nefritis. Se cambia antibioterapia a amoxicilina-clavulánico activo frente a *Enterococcus*, y ante la sospecha de enfermedad de Kawasaki incompleto recibe inmunoglobulinas y aspirina, quedando afebril y siendo dado de alta, completando 4 semanas de antibioterapia ante los hallazgos compatibles con nefronía bilateral. Tras una semana sin tratamiento reingresa con misma presentación clínica y analítica con elevación de reactantes de fase aguda (RFA). En urocultivo se aísla *Enterococcus faecalis*, tratándose con ampicilina durante 3 semanas. Se amplía estudio con cistouretrografía miccional seriada en la que se constata reflujo vesicoureteral bilateral grado III (Figura 1), por lo que se corrige quirúrgicamente. Tras 9 meses, el paciente continúa asintomático y no precisa ningún tratamiento, presentando función renal normal, cicatriz renal izquierda en gammagrafía

renal (Figura 1) y normalización del patrón coronario.

La nefronía o nefritis focal bacteriana aguda (NFBA) consiste en una masa renal inflamatoria, representando sólo el 4% de los niños ingresados por ITU febril [2]. Puede afectar a uno o más lóbulos y su gravedad suele ser intermedia entre pielonefritis y absceso renal. Hasta la fecha sólo hay un caso reportado de nefronía bilateral como el nuestro, ya que la afectación renal suele ser unilateral [3]. Clínicamente cursa con mayor afectación del estado general y persistencia de la sintomatología, elevación de RFA y duración de la fiebre, así como mayor incidencia de cicatrices renales respecto a la PNA [4]. Su diagnóstico supone un reto porque hasta en un 25% el análisis de orina y urocultivo son negativos [5]. El origen hematógeno de la infección o la teoría de algunos autores de que la nefronía es una PNA localizada en el riñón y no comunicada con el sistema excretor podrían justificar que el análisis de orina de estos pacientes sea negativo, conllevando a un retraso diagnóstico [6]. En nuestro caso, el urocultivo del primer episodio se realizó tras 72 horas de antibioterapia dada la persistencia de la fiebre, ya que el análisis de orina al ingreso fue normal y se descartó ITU como foco de la fiebre. Las teorías expuestas previamente podrían explicar la negatividad del urocultivo, si bien consideramos imprescindible la comunicación del caso clínico a los microbiólogos para adecuar el procesamiento y análisis de la muestra. Además, nuestro paciente desarrolló EK con buena respuesta al tratamiento precoz, que pudo actuar como factor confusor respecto al origen y duración de la fiebre. En el segundo episodio el urocultivo fue positivo a *E. faecalis*. Frecuentemente este microorganismo causa infecciones nosocomiales, siendo factores predisponentes la hospitalización prolongada y tratamiento previo con cefalosporinas/aminoglucósidos, siendo también frecuente en pacientes con malformaciones nefrourológicas [7]. Nuestro paciente presentaba dichos factores de riesgo, por lo que desconocemos si *E. faecalis* fue responsable de los dos episodios o el segundo ingreso fue una infección nosocomial. Pensamos que lo más probable es que *E. faecalis* fuera el microorganismo causante en ambas ocasiones dada la

Correspondencia:
Ana Castellano-Martínez
Servicio de Pediatría y áreas específicas, Hospital Universitario Puerta del Mar, Avenida Ana de Viya 21, 11009, Cádiz, España,
Tfno.: 34 956002700.
E-mail: anacastellanomart@gmail.com

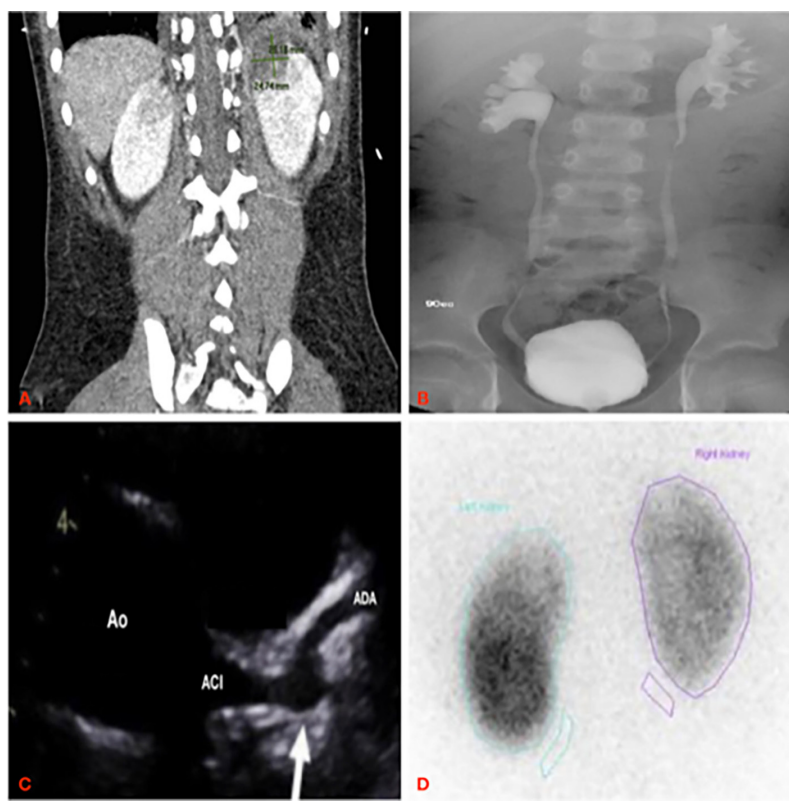


Figura 1

Pruebas de imagen realizadas en el paciente. Figura 1A. TAC abdominal sin contraste en el que se visualizan áreas de baja atenuación que afectan a la corteza renal de forma bilateral, destacando dos lesiones redondeadas en ambos polos renales superiores, siendo de mayor tamaño la del polo renal superior izquierdo de 2.5x2.4 cm aproximadamente. Figura 1B. CUMS en la que se visualiza uretra y vejiga de morfología normal y paso de contraste a la vía urinaria de forma bilateral hasta sistemas caliciales con ligero abombamiento, todo ello compatible con RVU grado III bilateral. Figura 1C. Ecocardiografía en la que se aprecia dilatación del sistema coronario izquierdo tanto a nivel de arteria coronaria izquierda como de arteria descendente anterior con un diámetro de hasta 5 mm, lo que corresponde a Z Score +3.1 según superficie corporal. Figura 1D. Gammagrafía renal con DMSA en la que se observa un defecto de captación en polo renal superior izquierdo compatible con afectación postpielonefritis sin afectación de la función relativa renal (FR RD 48.24% y RI 51.76%).

CUMS: cistouretrografía miccional seriada; RVU: reflujo vesicoureteral; DMSA: ácido dimercaptosuccínico; FR: función renal relativa; RD: riñón derecho; RI: riñón izquierdo.

similitud clínica de ambos episodios y la clara relación temporal con la suspensión del antibiótico del segundo. La ecografía abdominal presenta una sensibilidad baja para diagnosticar lesiones renales inflamatorias, siendo de elección TAC o resonancia [8]. Además, ante formas atípicas de ITU febriles recomendamos estudio para descartar malformaciones nefrourológicas predis-

ponentes, aunque no siempre existe patología subyacente. No existen recomendaciones claras respecto a la duración de la antibioterapia en casos de nefronía, sugiriéndose 2-3 semanas, siendo intravenoso al menos hasta 3 días tras la defervescencia [9]. Creemos que es importante conocer esta patología de difícil diagnóstico para poder realizar un tratamiento precoz adecua-

do y con ello evitar reingresos y nefropatía cicatricial. Asimismo, resaltamos la importancia de realizar ecocardiografía ante episodios febriles prolongados y persistencia de RFA elevados ya que puede ser el único criterio diagnóstico de enfermedad de Kawasaki [10], favoreciendo un tratamiento precoz que evite importantes secuelas coronarias.

FINANCIACIÓN

Los autores declaran que no han recibido financiación para la realización de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Erfidan G, Alaygut D, Soyaltın E, Başaran C, Çamlar SA, Mutlubaş F, et al. Urinary tract infection that a pediatric nephrologist must keep in mind: Answers. *Pediatr Nephrol*. 2020;35:795-7. doi: 10.1007/s00467-019-04438-w.
2. Bitsori M, Raissaki M, Maraki S, Galanakis E. Acute focal bacterial nephritis, pyonephrosis and renal abscess in children. *Pediatr Nephrol*. 2015;30:1987-93. doi: 10.1007/s00467-015-3141-3.
3. Kusama Y, Muraki K. Bilateral multifocal acute lobar nephronia caused by *Enterococcus faecalis*. *BMJ Case Rep*. 2018. doi: 10.1136/bcr-2018-224336.
4. Piñera C, Loyola F, Hernández P. Nephronia in pediatrics: part of the spectrum of upper urinary tract infections. Clinical cases and review of the literature. *Rev Chilena Infectol*. 2015;32:564-8. doi: 10.4067/S0716-10182015000600011.
5. Mizutani M, Hasegawa S, Matsushige T, Ohta N, Kittaka S, Hoshida M, et al. Distinctive inflammatory profile between acute focal bacterial nephritis and acute pyelonephritis in children. *Cytokine*. 2017;99:24-9. doi: 10.1016/j.cyt.2017.06.012.
6. Bibalo C, Apicella A, Guastalla V, Marzuillo P, Zennaro F, Tringali C, et al. Acute lobar nephritis in children: Not so easy to recognize and manage. *World J Clin Pediatr*. 2016 8;5:136-42. doi: 10.5409/wjcp.v5.i1.136.
7. Arredondo JL, Echeguren AM, Arzate P, Medina JH. Susceptibilidad antimicrobiana de *Enterococcus faecalis* y *faecium*. *Rev Latin Infect Pediatr*. 2018;31: 56-61.
8. Guella A, Khan A, Jarrah D. Acute Focal Bacterial Nephritis: Two Cases and Review of the Literature. *Can J Kidney Health Dis*. 2019;61-5. doi: 10.1177/2054358119884310.
9. Oka H, Nagamori T, Yamamoto S, Manabe H, Taketazu G, Mukai T, et al. Non-invasive discrimination of acute focal bacterial nephritis with pyelonephritis. *Pediatr Int*. 2019 ;61:777-780. doi: 10.1111/ped.13910.
10. McCrindle BW, Rowley AH, Newburger JW, Burns JC, Bolger AF, Gewitz M, et al; American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; and Council on Epidemiology and Prevention. Diagnosis, Treatment, and Long-Term Management of Kawasaki Disease: A Scientific Statement for Health Professionals From the American Heart Association. *Circulation*. 2017;13:e927-e999. doi: 10.1161/CIR.0000000000000484.

José Manuel Méndez-Legaza
Irene López-Ramos
Moisés García Bravo
Almudena Tinajas Puertas
María Antonia García Castro

Aislamiento de *Turicella otitidis* en el contexto de la infección ótica

Sección de Microbiología. Complejo Asistencial Universitario de Palencia.

Article history

Received: 28 November 2020; Revision Requested: 26 December 2020; Revision Received: 1 January 2021; Accepted: 25 January 2021; Published: 15 March 2021

Estimado Editor: *Turicella otitidis* es un bacilo grampositivo corineforme descrito desde hace más de veinte años [1], aislado principalmente en el canal auditivo externo. Inicialmente su identificación y diferenciación del resto de bacilos corineformes mediante pruebas bioquímicas en el laboratorio era compleja y lenta [2]. Sin embargo, la implementación de herramientas de diagnóstico microbiológico como el MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*) ha permitido la identificación rápida de patógenos anteriormente mal clasificados, lo que ha llevado a un aumento en la frecuencia de su detección. Por otra parte, la implicación de *T. otitidis* como patógeno en la otitis es aún controvertida. Desde su descripción en el contexto de un paciente pediátrico con otitis media aguda (OMA) [1], así como posteriores estudios de su prevalencia en el exudado del oído medio de niños con OMA [3–7], su papel como potencial otopatógeno sigue siendo objeto de debate.

Presentamos un estudio retrospectivo de los aislamientos de *T. otitidis* procedentes de muestras de exudado ótico recibidas en la Sección de Microbiología de nuestra institución en un periodo de 4 años [2016–2019]. Todas las muestras fueron obtenidas con hisopo del conducto auditivo externo en pacientes con diagnóstico de otitis. El diagnóstico microbiológico se realizó mediante cultivo convencional y la identificación microbiana mediante métodos fenotípicos (API Coryne) hasta el año 2017 y por MALDI-TOF a partir del 2018.

Del total de 1.089 muestras de exudado ótico procesadas en 811 pacientes, 559 (51,3%) fueron positivas. La distribución anual del número de muestras procesadas, muestras positivas, aislamientos de *T. otitidis*, porcentaje sobre el total de muestras positivas así como la incidencia acumulada por año quedan

reflejados en la Tabla 1. Para el estudio de las características clínico-epidemiológicas de los casos de otitis por *T. otitidis* se descartan tres casos en los que se aisló dicha bacteria, pero en cultivo polimicrobiano. Se aisló así *T. otitidis* en 19 muestras procedentes de 18 pacientes. La edad media fue 31,5 años [rango 2–81], el 38,9% eran pacientes pediátricos (0–14 años) y el 55,6% varones. Todos los pacientes presentaban otalgia, además de una pérdida auditiva en la mitad de los casos. A la exploración en la otoscopia se evidenció supuración en el 44,4% de los casos y en ninguno de ellos se evidenciaron complicaciones. En el 38,9% se había documentado microbiológicamente patología ótica de repetición.

La menor incidencia acumulada de otitis por *T. otitidis* encontrada en los dos primeros años del estudio probablemente se deba a la dificultad en la diferenciación de esta especie mediante el uso de pruebas bioquímicas [1–3]. La tendencia al alza observada en la incidencia en nuestra serie, aumentando en los cuatro años del estudio, se atribuye principalmente a la implantación de la espectrometría de masas en el año 2018, facilitando así su identificación. No obstante, el mejor conocimiento de la misma por parte de los microbiólogos también puede haber contribuido a que haya pasado de ser un hallazgo casual a ser buscado de manera activa a la hora de valorar su crecimiento, teniendo en cuenta que los medios empleados fueron los mismos en todos los años del estudio.

El infradiagnóstico de *T. otitidis* en casos de infección ótica recogido en la literatura pensamos que puede atribuirse además a la opinión, todavía muy extendida, de que los difteroides no merecen ser objeto de identificación a nivel de género y especie en el contexto clínico. En esta línea, aunque concretando sobre las muestras de pacientes con otitis externa, se encuentra una declaración de consenso de un grupo británico que afirma que los enterococos, difteroides y estafilococos coagulasa negativos aislados no deben notificarse hasta nivel de especie ni realizarse la determinación de sensibilidad a antibióticos [8]. A este respecto, opinamos que una identificación a nivel de

Correspondencia:
José Manuel Méndez Legaza
Sección de Microbiología. Complejo Asistencial Universitario de Palencia.
E-mail: josemlegaza@gmail.com

Tabla 1 Distribución anual de muestras procesadas y positivas de exudado ótico y aislamientos de *Turicella otitidis*.

	2016	2017	2018	2019	TOTAL
Muestras exudado ótico recibidas	260	292	327	210	1089
Muestras positivas	129	143	179	108	559
Aislamientos de <i>Turicella otitidis</i> (%)	2 (1.5%)	3 (2.1%)	8 (4.5%)	9 (8.3%)	22 (3.9%)
Incidencia acumulada por 100.000 hab	1.3	1.9	5.1	5.2	

género y especie bacterianos es necesaria en términos de importancia clínica, especialmente cuando la bacteria aislada se encuentra en cultivo puro.

Unido a la dificultad en su identificación, la implicación de *T. otitidis* en casos de otitis es aún controvertida. Nuestra experiencia en el estudio de las otitis por *T. otitidis* nos lleva a considerarlo patógeno ya que en los casos incluidos su aislamiento fue en cultivo puro y en pacientes con signos y síntomas de infección ótica. Es indudable que su presencia en el oído sano como integrante de la microbiota normal cuestiona su papel etiopatogénico, pero no es menos cierto que sólo ése no es motivo suficiente para descartarlo y sobre todo cuando intercurrentes inmunopatologías o alteraciones anatómicas que favorezcan el protagonismo de especies bacterianas que, en condiciones de salud, se considerasen meros colonizadores. No obstante, son necesarios estudios más amplios y con muestras recogidas por timpanocentesis para poder apoyar estos resultados.

La mayoría de las otitis medias no necesita ser tratada con antibióticos, pues buena parte se resuelve espontáneamente en una o dos semanas. Cuando existen criterios para tratar, se eligen antibióticos para cubrir neumococo y *H. influenzae* por ser los otopatógenos por excelencia. Suelen prescribirse tratamientos tópicos con ciprofloxacino o una asociación de neomicina, polimixina e hidrocortisona, considerando, según la gravedad del caso, la adición de tratamiento oral con amoxicilina-clavulánico, moxifloxacino o asociaciones de ciprofloxacino con clindamicina o metronidazol[9]. De los pacientes incluidos en el estudio, a más de la mitad se le pautó tratamiento empírico basado en ciprofloxacino tópico (seis pacientes), betalactámicos orales (tres amoxicilina, uno amoxicilina-clavulánico y uno cefuroxima) o combinación de ambos (un paciente con ciprofloxacino tópico más amoxicilina-clavulánico oral). Sólo uno de ellos recibió tratamiento dirigido con amoxicilina oral. Haciendo revisión de sus historiales clínicos, sólo un paciente volvió a acudir a su centro de salud con motivo de recidiva de la infección y en un caso que no fue tratado se volvió a aislar *T. otitidis*. Este hecho nos hace plantear si la ausencia de recidivas se debe a la efectividad de los tratamientos o bien a la baja virulencia de la bacteria, que haría que los episodios se resolvieran espontáneamente.

En definitiva, nuestra experiencia en el estudio de las otitis por *T. otitidis* nos lleva a considerarlo patógeno verdadero ya que se da en múltiples casos el aislamiento en cultivo puro con signos y síntomas de infección.

FINANCIACIÓN

Los autores declaran no haber recibido financiación para la realización de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Funke G, Stubbs S, Altwegg M, Carlotti A, Collins MD. *Turicella otitidis* gen. nov., sp. nov., a coryneform bacterium isolated from patients with otitis media. *Int J Syst Bacteriol*. 1994;44:270-3. doi:10.1099/00207713-44-2-270
2. Früh M, Graevenitz A von, Funke G. Use of second-line biochemical and susceptibility tests for the differential identification of coryneform bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*. 1998;4:332-8. doi:10.1111/j.1469-0691.1998.tb00068.x
3. Gomez-Garcés JL, Alhambra A, Alos JI, Barrera B, García G. Acute and chronic otitis media and *Turicella otitidis*: a controversial association. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10:854-7. doi:10.1111/j.1198-743X.2004.00965.x
4. Jeziorski E, Marchandin H, Jean-Pierre H, Guyon G, Ludwig C, Lalande M, et al. *Turicella otitidis* infection: otitis media complicated by mastoiditis. *Arch Pediatr*. 2009;16:243-7. doi:10.1016/j.arcped.2008.12.011
5. De Frutos M, López-Urrutia L, Aragón R, Vegas AM, Vázquez M, Eiros Bouza JM. *Turicella otitidis*, contributions to its role in the etiology of ear infections. *Rev Esp Quimioter*. 2018;31:278-81. PMID: 29696957
6. Correa Martínez L, González Velasco C, Gaona Álvarez CE, Sánchez Castañón J. External otitis due *Turicella otitidis*: two case reports. *Rev Esp Quimioter*. 2017;30:474-5. PMID: 29171744
7. Brinkrolf K, Schneider J, Knecht M, Rückert C, Tauch A. Draft

genome sequence of *Turicella otitidis* ATCC 51513, isolated from middle ear fluid from a child with otitis media. *J Bacteriol.* 2012;194:5968-9. doi:10.1128/JB.01412-12

8. Geyer M, Howell-Jones R, Cunningham R, McNulty C, Health Protection Agency GP Microbiology Laboratory Use Group. Consensus of microbiology reporting of ear swab results to primary care clinicians in patients with otitis externa. *Br J Biomed Sci.* 2011;68:174-80. doi:10.1080/09674845.2011.11730346
9. Mensa J, Soriano A, García Sánchez J, Marco F, Letang E, Llinares P, López Suñé E, Barberán J. Guía de terapéutica antimicrobiana 2020.

Carles Llor¹
Ana Moragas²
Carolina Bayona³
Josep M Cots⁴

Use of clinical vignettes to screen general practitioners who can participate in a clinical trial about stopping antibiotic treatment when this is no longer necessary

¹Health Centre Barcelona-2B (Via Roma), Spain

²Universitat Rovira i Virgili. Health Centre Jaume I, Tarragona, Spain

³Health Centre La Marina, Barcelona, Spain

⁴Universitat of Barcelona. Health Centre La Marina, Barcelona, Spain

Article history

Received: 1 January 2021; Revision Requested: 1 February 2021; Revision Received: 1 February 2021; Accepted: 12 February 2021; Published: 31 March 2021

Sir,

Most uncomplicated respiratory tract infections seen in primary care are caused by viruses. Despite being self-limited many patients with these episodes seek care in primary care offices. Inappropriate overuse of antibiotic therapy for these conditions is widespread, with Spain being one of the European countries with the highest consumption, and this overuse being more likely to result in greater spread to the community and individual antibiotic resistance and more adverse effects [1-3]. General practitioners (GP) have generally been told not to discontinue an antibiotic regimen once it has been initiated in order to prevent the patient from acquiring resistant organisms, but this has never been proven. The main objective of the STOP-AB study was to assess if the discontinuation of antibiotic therapy when a GP no longer considers it necessary has any impact on the number of days with severe symptoms. Homogeneity of the possible patients to be included in this trial is crucial and therefore the type of doctors participating in the trial should also be homogeneous, since not all GPs believe that stopping antibiotic therapy is fair and also because not all GPs who wish to participate in a trial such as this consider that antibiotics can be discontinued in the same types of infections. Therefore, we designed a vignette-based questionnaire corresponding to different respiratory tract infections in an attempt to evaluate the rate of agreement among the GPs approached.

A group of GPs from four different autonomous communities in Spain, who had been working for at least 15 years and were confident and comfortable with the strategy of stopping an already commenced antibiotic course filled out a questionnaire with nine vignettes corresponding to patients with different respiratory tract infections. These clinical scenarios were based on a previous study, but they were slightly modified for the present study [4].

The vignettes were differentiated into two different groups: 1. Cases in which antibiotics are clearly indicated: one case of persistent sinusitis (antibiotic indicated), a case of positive-confirmed streptococcal pharyngitis and a case of a radiologically-confirmed pneumonia; and 2. Cases in which antibiotics are not indicated, corresponding to cases of viral pharyngitis, viral rhinosinusitis including the common cold, uncomplicated acute bronchitis and influenza infection. The supplementary material describes the different vignettes used in this study. The study was approved by the Ethical Board of Fundació Jordi Gol i Gurina (reference number: 16/093).

Out of a total of 34 GPs invited to fill out this vignette-based questionnaire, two were excluded as they had been working for less than 15 years and another did not adequately complete the questionnaire. The mean age of the 31 GPs was 50.6 ± 5.3 years, with a mean of 24 ± 5.4 years of professional work, and 20 (64.5%) were men. The responses are shown in table 1. Only ten GPs (32.3%) responded appropriately to the nine vignettes and would have included the six patients with suspected viral infection in this randomised clinical trial. One doctor would have included seven patients in the trial, two more would have recruited six patients, albeit incorrectly, whereas the other 18 doctors would have recruited less than six patients.

Antibiotic prescribing varies across countries, across communities and across GPs in the same territory. This study was intended to evaluate the percentage of doctors comfortable and confident with the strategy of discontinuing an already initiated antibiotic course in an attempt to recruit homogeneous types of patients with self-limiting respiratory tract infections. The results showed that only one third of GPs gave correct responses and agreed on the types of infections with a likely viral origin, and would, therefore, be candidates to participate in this randomised clinical trial.

Clinical vignettes have a number of advantages for measuring the quality of care provided by doctors. Although it is

Correspondence:

Carles Llor
Health Centre Barcelona-2B (Via Roma), Spain
E-mail: carles.ller@gmail.com

Table 1	Responses given by the General practitioners (GP) participating in this study	
Clinical scenario	Antibiotics indicated?	Number of GPs who considered discontinuing antibiotic therapy as safe
1. Viral pharyngitis	No	28
2. Bacterial rhinosinusitis	Yes	3
3. Uncomplicated acute bronchitis	No	14
4. Streptococcal pharyngitis	Yes	0
5. Influenza infection	No	29
6. Viral rhinosinusitis	No	28
7. Pneumonia	Yes	1
8. Viral rhinosinusitis	No	22
9. Common cold	No	30

unclear whether vignette responses reflect actual clinical practice or merely doctor knowledge, some studies in clinical care have shown that they can reflect actual behaviour, including acute respiratory tract infections [4–6]. Patients included in a randomised clinical trial must be homogenous and the use of these vignettes has demonstrated the capacity to identify GPs who act similarly in terms of antibiotic prescribing for otherwise uncomplicated respiratory tract infections. We believe these vignettes could be used to quickly identify clinicians who are able to participate in randomised clinical trials on appropriate use of antibiotics in primary care.

FUNDING

The STOP-AB trial obtained a research grant from the Catalan Society of Family Medicine (Ajut a la recerca CAMFIC 2016).

CONFLICTS OF INTEREST

CL reports having received research grants from Abbott Diagnostics. The other authors report no conflicts.

REFERENCES

- Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, Elseviers M, ESAC Project Group. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet*. 2005;365(9459):579–587. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)17907-0.
- Costelloe C, Metcalfe C, Lovering A, Mant D, Hay AD. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2010;340:c2096. DOI: 10.1136/bmj.c2096.
- Shehab N, Lovegrove MC, Geller AI, Rose KO, Weidle NJ, Budnitz DS. US emergency department visits for outpatient adverse drug events, 2013–2014. *JAMA*. 2016;316(20):2115–2125. DOI: 10.1001/jama.2016.16201.
- Gidengil CA, Linder JA, Beach S, Setodji CM, Hunter G, Mehrotra A. Using clinical vignettes to assess quality of care for acute respiratory infections. *Inquiry*. 2016;53:0046958016636531. DOI: 10.1177/0046958016636531.
- Evans SC, Roberts MC, Keeley JW, Blossom JB, Amaro CM, Garcia AM, et al. Vignette methodologies for studying clinicians' decision-making: Validity, utility, and application in ICD-11 field studies. *Int J Clin Health Psychol*. 2015;15(2):160–170. DOI: 10.1016/j.ijchp.2014.12.001.
- Veloski J, Tai S, Evans AS, Nash DB. Clinical vignette-based surveys: a tool for assessing physician practice variation. *Am J Med Qual*. 2005;20(3):151–157. DOI: 10.1177/1062860605274520.