



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

Comparación de tres procedimientos para la identificación rápida de microorganismos causantes de bacteriemias. Evaluación de su eficacia y aplicabilidad en el laboratorio de microbiología

Oriol Martín-Pujol, Tomas Tosco-Nuñez* e Isabel de Miguel-Martinez

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 5 de marzo de 2018

Aceptado el 1 de junio de 2018

On-line el 30 de julio de 2018

Palabras clave:

Hemocultivos

Bacteriemia

Identificación

Métodos rápidos

MALDI-TOF

R E S U M E N

Introducción: Evaluamos tres procedimientos de identificación rápida de microorganismos a partir de hemocultivos positivos.

Métodos: Aplicamos dos métodos basados en la extracción directa desde el frasco de hemocultivo: Sepsityper® (Bruker Daltonics) (ST) y un método casero con saponina (MCS), y un tercer método basado en un subcultivo con incubación corta (SIC). Se comparan las identificaciones por espectrometría de masas *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight* (EM-MALDI-TOF) aplicando los criterios de interpretación del fabricante y los puntos de corte corregidos (PCC).

Resultados: Aplicando los criterios del fabricante se identificaron a nivel de especie el 65,8%, el 45,8% y el 57,4% con ST, MCS y SIC, respectivamente. Aplicando los PCC, estos resultados fueron del 92,3%, del 80,6%, y del 85,2%, respectivamente. La identificación con ST fue significativamente mejor que el MCS. ST y SIC no mostraron diferencias significativas, excepto en levaduras.

Conclusiones: ST y SIC obtienen buenas tasas de identificación y pueden integrarse fácilmente en cualquier laboratorio.

© 2018 Elsevier España, S.L.U.

y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Comparison of three procedures for the rapid identification of bacteraemia-causing microorganisms. Evaluation of their effectiveness and applicability to microbiology laboratories

A B S T R A C T

Introduction: Three procedures for rapid identification of microorganisms in positive blood cultures were evaluated.

Methods: We performed two methods based on direct extraction from a blood culture: Sepsityper® (Bruker Daltonics) (ST) and a non-commercial saponin method (MCS), and another method consisting of a short incubation subculture (SIC). Identification values obtained by spectrometry *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight* (EM MALDI-TOF) were compared by applying the manufacturer's interpretation criteria and corrected cut-off points.

Results: According to the manufacturer, 65.8%, 45.8% and 57.4% of microorganisms were identified at the species level by using ST, MCS and SIC, respectively. When applying corrected cut-off points, the values increased to 92.3%, 80.6% and 85.2%, respectively. ST offered significantly better results than MCS, and no significant differences were found between ST and SIC, except for with respect to yeast.

Conclusions: Better identification rates were obtained by using ST and SIC, which are easily applicable in any laboratory.

© 2018 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Keywords:

Blood cultures

Bacteraemia

Identification

Rapid methods

MALDI-TOF

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: tomastn@hotmail.com (T. Tosco-Nuñez).

Introducción

Instaurar una terapia antibiótica empírica efectiva supone mejorar el pronóstico de los pacientes y reducir el tiempo de hospitalización y los costes sanitarios asociados¹.

Köck et al.² encontraron que los clínicos cambiaban los tratamientos empíricos al 20% de los pacientes después de conocer la identificación de la especie, frente al 8% cuando solo tenían los resultados de la microscopía. En base a datos como estos, se han desarrollado nuevos métodos basados en identificaciones mediante espectrometría de masas tipo *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight* (MALDI-TOF) a partir de botellas de hemocultivo positivas, tanto de forma directa utilizando técnicas de extracción comerciales o caseras³⁻¹⁰, como indirecta a partir de subcultivos de incubación corta¹¹⁻¹⁴. En cuanto a la interpretación de las puntuaciones obtenidas por MALDI-TOF, Kohlmann et al.¹¹ publicaron unos puntos de corte corregidos (PCC) basados en si los microorganismos eran grampositivos o no.

El primer objetivo de este estudio fue valorar la eficacia de tres procedimientos para la identificación rápida de microorganismos a partir de hemocultivo positivo y su aplicabilidad en la rutina del laboratorio. El segundo objetivo fue comparar las puntuaciones obtenidas por MALDI-TOF aplicando los criterios de interpretación del fabricante y los propuestos por Kohlmann et al., para evaluar cómo afectan en la identificación final de los microorganismos.

Material y métodos

Se presenta un estudio observacional comparativo realizado entre 2014 y 2016 que evalúa tres métodos para la identificación rápida de patógenos a partir de hemocultivos positivos.

Se consideró una botella por paciente y episodio de bacteriemia. Se empleó el sistema BacT/ALERT (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Los frascos positivos se procesaron siguiendo los protocolos habituales. Tras 24 h de incubación, los microorganismos aislados fueron identificados por MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) y por pruebas bioquímicas automatizadas (MicroScan WalkAway, Beckman Coulter, EE.UU.). En el caso de *Streptococcus pneumoniae* y estreptococos del grupo *viridans*, las identificaciones se confirmaron mediante sensibilidad a la optoquina y solubilidad en bilis. Se excluyeron los hemocultivos positivos en los que la tinción de Gram revelaba una etiología polimicrobiana.

De la primera botella positiva de cada paciente estudiado se obtuvieron tres alícuotas para evaluar los procedimientos siguientes:

- 1) Sepsityper[®] Kit (ST) (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Se procesa 1 ml del hemocultivo según las especificaciones del fabricante y se realiza la extracción etanol/fórmico. Posteriormente, se deposita 1 µl del sobrenadante en una placa metálica.
- 2) Método casero con saponina (MCS). Basado en la modificación del protocolo de Martiny et al.⁵. Se extrae 1 ml del frasco de hemocultivo, se añaden 500 µl de una solución de saponina al 5% y tras agitación con vórtex (10 s), se deja reposar 5 min a temperatura ambiente. Se realizan dos lavados con agua miliQ. Posteriormente se procede a la extracción etanol/ácido fórmico y se deposita 1 µl del sobrenadante en una placa metálica.
- 3) Subcultivo de incubación corta (SIC). Se inoculan 10 gotas (≈ 500 µl) del hemocultivo en un medio de agar chocolate (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) y se incuba en estufa a 37 °C, 5% CO₂ durante 3,5 h. Tras este tiempo, con un asa estéril, se realizan varios arrastres sobre la zona de inoculación y se añade a la placa metálica. A continuación, se realiza una extracción directa en placa con ácido fórmico ≥ 96%.

Identificación mediante MALDI-TOF

Sobre los inóculos de la placa, se añadió 1 µl de solución matriz (ácido α-ciano-4-hidroxicinámico) y se dejó secar a temperatura ambiente. A continuación, se introdujo la placa en el sistema MALDI-TOF. Se utilizó el calibrador *Bacterial Test Standard*, y para el análisis de cada muestra, el espectrómetro de masas Microflex LT y el software Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania).

Los criterios de interpretación del fabricante establecen los valores ≥ 2,3 como alta probabilidad de identificación, entre 2 y 2,2 como probable identificación a nivel de especie, entre 1,7 y 1,9 como probable identificación a nivel de género, y los valores < 1,7 se interpretan como poco fiables. Los PCC publicados por Kohlmann et al.¹¹ consideran identificaciones correctas a nivel de género y especie aquellas con una puntuación ≥ 1,5 para microorganismos grampositivos y ≥ 1,7 para el resto de microorganismos. Además, como criterio adicional, las tres primeras opciones de identificación deben ser idénticas o, en su defecto, que las dos primeras sean idénticas con una diferencia mayor de 0,3 con la tercera. Puntuaciones diferentes a lo anterior se consideran poco fiables. Las identificaciones directas propuestas por MALDI-TOF que no se correspondieron con las definitivas del subcultivo tradicional se consideraron incorrectas.

Análisis estadístico

Se empleó la prueba t de Student con una distribución binomial para la comparación entre los métodos utilizados. Se analizaron el total de identificaciones correctas y poco fiables/incorrectas para cada método y también se realizó un análisis por subgrupos (microorganismos grampositivos, gramnegativos y levaduras).

Resultados

Se analizaron 155 frascos de hemocultivo (90 aerobios y 65 anaerobios): 89 (57,4%) aislamientos de microorganismos grampositivos, 53 (34,2%) gramnegativos y 13 (8,4%) levaduras. Se identificaron 33 especies diferentes. Los resultados globales por microorganismo y método, aplicando los PCC¹¹, se presentan en la [tabla 1](#). En la [tabla 2](#) se indican los resultados de cada método, según el criterio de interpretación.

Todas las identificaciones obtenidas siguiendo los tres métodos estudiados coincidieron con la identificación del subcultivo tradicional, excepto en dos cepas identificadas inicialmente como estreptococos del grupo *viridans*, que, tras pruebas manuales, se identificaron finalmente como *Streptococcus pneumoniae*.

El ST obtuvo resultados significativamente mejores ($p < 0,05$) respecto al MCS en la identificación de los microorganismos. El ST y el SIC no mostraron diferencias significativas ni para gramnegativos ($p = 0,094$) ni para grampositivos ($p = 0,234$); solo en el análisis de levaduras se obtuvo una $p < 0,05$ a favor de ST. Por último, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) tanto en la identificación de gramnegativos como en la de grampositivos tras comparar el MCS y el SIC, obteniéndose los mejores resultados con este último.

Discusión

Analizamos la eficacia de tres métodos para la identificación rápida de microorganismos a partir de hemocultivos positivos. Los métodos con mejores resultados a nivel de especie, aplicando los criterios del fabricante, fueron el ST (65,8%) y el SIC (57,4%). Solo presentaban diferencias significativas en la identificación de levaduras, siendo mejor cuando se utilizaba el método comercial. El MCS obtuvo resultados significativamente inferiores (45,8%) comparados con los demás métodos.

Tabla 1

Resultados de identificación por MALDI-TOF desglosados por microorganismo y métodos empleados. Los resultados se interpretaron con los criterios de Kohlmann

ID tras subcultivo tradicional	N total	Sepsityper®		Método casero con saponina		Subcultivo de incubación corta	
		ID correcta (especie)	IDPF/No ID	ID correcta (especie)	IDPF/No ID	ID correcta (especie)	IDPF/No ID
Bacterias gramnegativas	53	51 (96,2%)	2 (3,8%)	46 (86,8%)	7 (13,2%)	49 (92,5%)	4 (7,5%)
Enterobacterias	38	38 (100%)		36 (94,7%)	2 (5,3%)	36 (94,7%)	2 (5,3%)
<i>Citrobacter freundii</i>	1	1		1		1	
<i>Escherichia coli</i>	21	21		20	1	19	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	6		5	1	6	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1		1		1	
<i>Morganella morganii</i>	2	2		2		2	
<i>Proteus mirabilis</i>	4	4		4		4	
<i>Salmonella</i> sp.	1	1		1		1	
<i>Serratia marcescens</i>	2	2		2		2	
No fermentadores	13	13 (100%)		10 (76,9%)	3 (23,1%)	12 (92,3%)	1 (7,7%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	12		10		12	
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	1	1			1		1
Otros	2		2		2	1	1
<i>Haemophilus influenzae</i>	1		1		1	1	
<i>Helicobacter cinaedi</i>	1		1		1		1
Bacterias grampositivas	89	84 (94,4%)	5 (5,6%)	77 (86,5%)	12 (13,5%)	82 (92,1%)	7 (7,9%)
Cocos grampositivos	87	83 (95,4%)	4 (4,6%)	77 (88,5%)	10 (11,5%)	82 (94,3%)	5 (5,7%)
Staphylococcus spp.	56	56 (100%)		55 (98,2%)	1 (1,8%)	55 (98,2%)	1 (1,8%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	16		16		16	
Coagulasa negativa	40	40		39	1	39	1
<i>Staphylococcus capitis</i>	3	2		2		2	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	23	23		23		23	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	1		1		1	
<i>Staphylococcus hominis</i>	12	12		11	1	11	1
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1	1		1		1	
Enterococcus spp.	16	16 (100%)		12 (75%)	4 (25%)	16 (100%)	
<i>Enterococcus faecalis</i>	8	8		8		8	
<i>Enterococcus faecium</i>	8	8		4	4	8	
Streptococcus spp.	15	11 (73,3%)	4 (26,7%)	10 (66,7%)	5 (33,3%)	11 (73,3%)	4 (26,7%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	2		2		2	
<i>Streptococcus anginosus</i>	1	1			1	1	
<i>Streptococcus canis</i>	1	1		1		1	
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	2	2		1	1	2	
<i>Streptococcus mitis</i>	1	1		1		1	
<i>Streptococcus oralis</i>	2	2		1	1	2	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6	2	4	4	2	2	4
Bacilos grampositivos	2	1	1		2		2
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1		1		1		1
<i>Propionibacterium acnes</i>	1	1			1		1
Levaduras	13	8 (61,5%)	5 (38,5%)	2 (15,4%)	11 (84,6%)	1 (7,7%)	12 (92,3%)
<i>Candida albicans</i>	3	1	2		3	1	2
<i>Candida glabrata</i>	1		1		1		1
<i>Candida parapsilosis</i>	8	6	2	2	6		8
<i>Candida tropicalis</i>	1	1			1		1
Total aislamientos	155	143 (92,3%)	12 (7,7%)	125 (80,6%)	30 (19,4%)	132 (85,2%)	23 (14,8%)

ID: identificación; IDPF/No ID: identificación poco fiable/no identificación.

Aplicando los PCC¹¹, los porcentajes de identificación correcta a nivel de especie se incrementaron: ST (92,3%), SIC (85,2%) y MCS (80,6%), lo que confirma que los puntos de corte del fabricante se podrían modificar sin perder especificidad^{12,15}.

Los resultados para ST son similares a los ya publicados, en los que las identificaciones correctas a nivel de especie, aplicando criterios del fabricante, oscilan entre el 59,5 y el 82,8%³⁻⁶. Con respecto al SIC, nuestros resultados son similares a los existentes en la literatura^{11,13,14}. En cuanto al MCS, las modificaciones del protocolo de Martiny et al.⁵ permiten obtener mejores resultados cuando se aplican los PCC¹¹.

Para la identificación de bacterias gramnegativas a nivel de especie aplicando PCC¹¹, tanto el ST como el SIC mostraron resultados excelentes (96,2 y 92,5%, respectivamente). El MCS, aunque fue estadísticamente inferior ($p < 0,05$) para la identificación global de bacterias gramnegativas, en el caso de enterobacterias resultó comparable con los demás métodos.

También se obtuvieron resultados óptimos para bacterias grampositivas aplicando PCC¹¹ con ST (94,4%) y con SIC (92,1%), siendo superiores las identificaciones de estafilococos y enterococos en

comparación con las de estreptococos. Es relativamente habitual no poder discriminar entre *Streptococcus pneumoniae* y estreptococos del grupo *viridans* debido a la similitud entre sus espectros proteicos. Hay que destacar que todas las cepas de *Staphylococcus aureus* fueron identificadas correctamente por los tres métodos y que ningún estafilococo coagulasa negativa fue identificado erróneamente como *S. aureus*.

Los porcentajes de identificación correcta de las levaduras fueron inferiores al resto, siendo el ST (61,5% aplicando PCC¹¹) estadísticamente superior a los otros métodos.

En cuanto a la aplicabilidad de estas técnicas en el laboratorio, el ST es rápido (20 min) pero conlleva un tiempo superior de procesamiento técnico y mayor coste económico. Sin embargo, con el SIC el resultado se obtiene más tarde (3,5 h) pero necesita menor procesamiento técnico y es más económico, por lo que puede integrarse fácilmente en la rutina del laboratorio.

Por tanto, como ST y SIC tienen tasas de identificación comparables, a excepción de las levaduras, ambas técnicas podrían combinarse según la hora de positivización de los hemocultivos y la logística del laboratorio, de tal forma que se mantendría

Tabla 2Resultados obtenidos por Sepsityper[®], el método casero con saponina y el subcultivo de incubación corta, en función del criterio de interpretación aplicado a las puntuaciones obtenidas mediante EM MALDI-TOF

Microorganismos aislados	N	Sepsityper [®]			Método casero con saponina			Subcultivo de incubación corta		
		ID correcta (género) Fabricante	ID correcta (especie) Fabricante	ID correcta (especie) PCC	ID correcta (género) Fabricante	ID correcta (especie) Fabricante	ID correcta (especie) PCC	ID correcta (género) Fabricante	ID correcta (especie) Fabricante	ID correcta (especie) PCC
<i>Bacilos gramnegativos</i>	53	51 (96,2%)	47 (88,7%)	51 (96,2%)	47 (88,7%)	32 (60,4%)	46 (86,8%)	49 (92,4%)	43 (81,1%)	49 (92,5%)
Enterobacterias	38	28 (73,7%)	27 (71,1%)	38 (100%)	36 (94,7%)	27 (71,1%)	36 (94,7%)	36 (94,7%)	33 (86,8%)	36 (94,7%)
No fermentadores	13	13 (100%)	10 (76,9%)	13 (100%)	11 (84,6%)	5 (38,5%)	10 (76,9%)	12 (92,3%)	9 (69,2%)	12 (92,3%)
Otros	2	0	0	0	0	0	0	1	1	1
<i>Cocos grampositivos</i>	87	82 (94,2%)	54 (62,1%)	83 (95,4%)	64 (73,6%)	39 (44,8%)	77 (88,5%)	79 (90,8%)	46 (52,9%)	82 (92,1%)
Estafilococos	56	56 (100%)	34 (60,7%)	56 (100%)	46 (82,1%)	31 (55,4%)	55 (98,2%)	55 (98,2%)	27 (48,2%)	55 (98,2%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	16	15	16	16	13	16	16	16	16
SCN	40	40	19	40	40	18	39	39	11	39
Enterococos	16	15 (93,8%)	12 (75,0%)	16 (100%)	11 (68,7%)	8 (50,0%)	12 (75%)	15 (93,7%)	13 (81,3%)	16 (100%)
Estreptococos	15	11 (73,3%)	8 (53,3%)	11 (73,3%)	7 (46,7%)	0	10 (66,7%)	9 (60,0%)	6 (40,0%)	11 (73,3%)
<i>Bacilos grampositivos</i>	2	1 (50%)	0	1 (50%)	0	0	0	0	0	0
Levaduras	13	8 (61,5%)	1 (7,7%)	8 (61,5%)	2 (15,4%)	0	2 (15,4%)	1 (7,7%)	0	1 (7,7%)
Total aislamientos	155	142 (91,6%)	102 (65,8%)	143 (92,3%)	113 (72,9%)	71 (45,8%)	125 (80,6%)	129 (83,2%)	89 (57,4%)	132 (85,2%)

ID: identificación; PCC: puntos de corte corregidos.

una información clínica continua con un uso sostenible de los recursos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Delpont 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**:1181–6.
2. Köck R, Wüllenweber J, Horn D, Lanckohr C, Becker K, Idelevich EA. Implementation of short incubation MALDI-TOF MS identification from positive blood cultures in routine diagnostics and effects on empiric antimicrobial therapy. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2017;**6**:12.
3. Kok J, Thomas LC, Olma T, Chen SCA, Iredell JR. Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization Sepsityper™ and time of flight mass spectrometry. *PLoS One.* 2011;**6**:2–8.
4. Loonen AJM, Jansz AR, Stalpers J, Wolffs PFG, van den Brule AJC. An evaluation of three processing methods and the effect of reduced culture times for faster direct identification of pathogens from BacT/ALERT blood cultures by MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;**31**:1575–83.
5. Martiny D, Dediste A, Vandenberg O, Vandenberg O. Comparison of an in-house method and the commercial Sepsityper™ kit for bacterial identification directly from positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;**31**:2269–81.
6. Buchan BW, Riebe KM, Ledebner NA. Comparison of the MALDI biotyper system using Sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* 2012;**50**:346–52.
7. Meex C, Neuville F, Descy J, Huynen P, Hayette MP, de Mol P, et al. Direct identification of bacteria from BacT/ALERT anaerobic positive blood cultures by MALDI-TOF MS: MALDI Sepsityper kit versus an in-house saponin method for bacterial extraction. *J Med Microbiol.* 2012;**61**:1511–6.
8. Yonetani S, Ohnishi H, Ohkusu K, Matsumoto T, Watanabe T. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method. *Int J Infect Dis.* 2016;**52**:37–42.
9. Tanner H, Evans JT, Gossain S, Hussain A. Evaluation of three sample preparation methods for the direct identification of bacteria in positive blood cultures by MALDI-TOF. *BMC Res Notes.* 2017;**10**:48.
10. Chien J-Y, Lee T-F, Du S-H, Teng S-H, Liao C-H, Sheng W-H, et al. Applicability of an in-house saponin-based extraction method in Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry system for identification of bacterial and fungal species in positively flagged blood cultures. *Front Microbiol.* 2016;**7**:1432.
11. Kohlmann R, Hoffmann A, Geis G, Gatermann S. MALDI-TOF mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid pathogen identification from positive blood cultures. *Int J Med Microbiol.* 2015;**305**:469–79.
12. Bhatti MM, Boonlayangoor S, Beavis KG, Tesic V. Rapid identification of positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry using prewarmed agar plates. *J Clin Microbiol.* 2014;**52**:4334–8.
13. Idelevich EA, Schüle I, Grünastel B, Wüllenweber J, Peters G, Becker K. Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. *Clin Microbiol Infect.* 2014;**20**:1001–6.
14. Ballesterro-Téllez M, Recacha E, de Cueto M, Pascual A. Identificación y determinación de sensibilidad a antibióticos de aislados de hemocultivos a partir de subcultivos de corta incubación. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017;**35**:582–5.
15. Hoyos-Mallecot Y, Miranda-Casas C, Cabrera-Alvargonzalez JJ, Gómez-Camarasa C, Pérez-Ramírez MD, Navarro-Marí JM. Identificación bacteriana directamente del hemocultivo mediante una técnica rápida de espectrometría de masas *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time-of-Flight.* *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;**31**:152–5.