



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Evaluación de los nuevos ensayos basados en las técnicas de biología molecular y proteómica para el diagnóstico rápido de enfermedades infecciosas en muestra directa

Yuliya Zboromyrska

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Programa de Doctorat Medicina i Recerca Translacional
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut
Departament de Fonaments Clínics
Universitat de Barcelona

**Evaluación de los nuevos ensayos basados en las técnicas de
biología molecular y proteómica para el diagnóstico rápido de
enfermedades infecciosas en muestra directa**

Memoria de tesis doctoral para optar al título de Doctora por la
Universitat de Barcelona presentada por

Yuliya Zboromyrska

Departament de Fonaments Clínics
Universitat de Barcelona
Servei de Microbiologia, Hospital Clínic de Barcelona

Dirigida por

Dr. Jordi Vila Estapé

Departament de Fonaments Clínics
Universitat de Barcelona- Institut de Salut Global de Barcelona - Hospital Clínic de
Barcelona

Barcelona, Abril 2021



El Dr. JORDI VILA ESTAPÉ, Catedrático del Departamento de Fundamentos Clínicos de la Universidad de Barcelona, Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Clínic de Barcelona, Research Professor y Director de la Iniciativa de Resistencia a los antimicrobianos del Instituto de Salud Global de Barcelona (ISGlobal)

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado “Evaluación de los nuevos ensayos basados en las técnicas de biología molecular y proteómica para el diagnóstico rápido de enfermedades infecciosas en muestra directa”, presentado por Yuliya Zboromyrska, se ha realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínic de Barcelona bajo su dirección y cumple con todos los requisitos necesarios para su tramitación y posterior defensa ante el Tribunal correspondiente.

Barcelona, Abril 2021,

Dr. Jordi Vila Estapé
Director de la tesis doctoral

A todos mis seres queridos

TABLA DE CONTENIDOS

Tabla de contenidos

LISTADO DE ABREVIATURAS.....	7
LISTADO DE FIGURAS	8
LISTADO DE TABLAS	9
LISTADO DE ARTÍCULOS	10
I. INTRODUCCIÓN.....	12
1. Diagnóstico de bacteriemia.....	12
1.1. Generalidades	12
1.2 Focos y etiología.....	15
1.2.1 Bacteriemia relacionada con catéter (BRC)	16
1.3 Métodos diagnósticos	18
1.3.1 Hemocultivo	18
1.3.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	20
1.3.3 Otras técnicas de identificación y detección de resistencias aplicadas al hemocultivo positivo.....	23
1.3.4 Biología molecular en sangre directa.....	24
2. Diagnóstico de las infecciones del tracto urinario	27
2.1 Generalidades	27
2.2 Etiología.....	27
2.3 Métodos diagnósticos	28
2.3.1 Técnicas de cribado.....	28
2.3.2 Cultivo y estudio de la sensibilidad antibiótica	30
2.3.3 EM MALDI-TOF para la identificación directa y la detección de resistencias	30
2.3.4 Técnicas moleculares de identificación y de detección de resistencias a partir de muestra directa de orina.....	33
2.3.5 Otras técnicas de detección de resistencia aplicadas directamente a la orina	34
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	37
III. RESULTADOS	39

1. Identificación de patógenos causantes de bacteriemia mediante técnicas basadas en biología molecular a partir de la muestra directa de sangre	39
1.1 Artículo 1	39
1.2 Artículo 2	59
2. Identificación de patógenos causantes de ITU mediante EM MALDI-TOF a partir de la muestra directa de orina.....	69
2.1 Artículo 3	69
2.2 Artículo 4	77
2.3 Manuscrito 5	90
IV. DISCUSIÓN.....	108
V. CONCLUSIONES	123
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	126

LISTADO DE ABREVIATURAS

BLEE, β -lactamasas de espectro extendido

BRC, bacteriemia relacionada con catéter

CLED, *Cysteine lactose electrolyte deficient*

CMI, Concentración Mínima Inhibitoria

DNA, el ácido desoxirribonucleico

EM MALDI-TOF, la espectrometría de masas *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*

ICT, Inmunocromatografía

ITU, Infección del tracto urinario

LAMP, *loop mediated amplification*

MP, Magicplex™ Sepsis test

MR-CoNS, estafilococos coagulasa negativa meticilina resistentes

NGS, *next-generation sequencing*

PCR, *polymerase chain reaction*

RCEI, el razón incremental de coste-efectividad

SIRS, síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica

SOFA, *Sequential Organ Failure Assessment Score*

UCI, unidad de cuidados intensivos

UFC, unidades formadoras de colonias

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1 Escala de SOFA.....	14
Figura 2 Medidas de la primera hora (<i>hour-1 bundle</i>).....	15
Figura 3 Grafica que demuestra la correlación entre el tiempo del inicio de antibioticoterapia efectiva y supervivencia de pacientes con shock séptico	15
Figura 4 Focos más frecuentes de episodios de bacteriemia detectados en el Hospital Clínic en 2019.....	16
Figura 5 Especies de microorganismos más frecuentemente aislados en episodios de bacteriemia detectados en el Hospital Clínic en 2019	17
Figura 6 Las tres principales vías de colonización del catéter.....	18
Figura 7 Los principales sistemas de incubación y monitorización automatizada de hemocultivos disponibles en el mercado.....	19
Figura 8 Pasos de análisis de muestras mediante EM MALDI-TOF para la identificación de microorganismos.....	22
Figura 9 Diferencia en el tiempo para el resultado si se trabaja a partir de subcultivos versus caldo de hemocultivo directo	23
Figura 10 La comparación entre la muestra de sangre directa y de caldo de hemocultivo positivo para el diagnóstico de bacteriemia	26
Figura 11 Técnicas que pueden ser utilizadas para el diagnóstico microbiológico de bacteriemia a partir de muestra directa de sangre o cultivos, y los tiempos hasta el resultado	27
Figura 12 Principales agentes etiológicos aislados en urocultivo durante 2019 en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínic de Barcelona.....	29
Figura 13 Esquema de detección de cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) mediante EM MALDI-TOF	33
Figura 15 El fundamento de las técnicas colorimétricas.	35
Figura 16 Técnicas que pueden ser utilizadas para el diagnóstico microbiológico de ITU a partir de muestra directa o cultivo, y los tiempos hasta el resultado	36
Figura 14 En la parte izquierda se presentan los picos de meropenem intacto y sus sales correspondientes. En la parte derecha se presentan los picos de formas hidrolizadas de meropenem y sus sales correspondientes. (M, meropenem; H+, un protón; Na+, sodio; K+, potasio; Mh, meropenem hidrolizado	34

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Criterios SIRS.....	12
Tabla 2. Puntos de corte encontrados en distintos estudios para reducir la siembra de muestras de orina.....	29
Tabla 3. Condiciones utilizadas en algunos de los estudios donde se ha realizado la identificación directa mediante EM MALDI-TOF a partir de la muestra de orina.....	32

LISTADO DE ARTÍCULOS

Tesis en formato de compendio de artículos. La tesis consta de dos objetivos, cuatro artículos y un manuscrito.

Artículo 1: **Yuliya Zboromyrska**, Cristina De la Calle, Marcelo Soto, Laura Sampietro-Colom, Alex Soriano, Míriam José Alvarez-Martínez, Manel Almela, Francesc Marco, Ruth Arjona, Nazaret Cobos-Trigueros, Laura Morata, José Mensa, José Antonio Martínez, Aurea Mira, Jordi Vila. Rapid diagnosis of staphylococcal catheter-related bacteraemia in direct blood samples by real-time PCR. *PLoS One*. 2016 Aug 29;11(8): e0161684. doi: 10.1371/journal.pone.0161684. Factor de Impacto: 2.806 (2016) – Q1 (Scimago, Multidisciplinary); Q1 (Scimago, Medicine (Miscellaneous)). (Objetivo 1).

Artículo 2: **Yuliya Zboromyrska**, Catia Cillóniz, Nazaret Cobos-Trigueros, Manel Almela, Juan Carlos Hurtado, Andrea Vergara, Caterina Mata, Alex Soriano, Josep Mensa, Francesc Marco, Jordi Vila. Evaluation of the Magicplex™. Sepsis real-time test for the rapid diagnosis of bloodstream infections in adults. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 Mar 12;9: 56. doi: 10.3389/fcimb.2019.00056. Factor de Impacto: 4.123 (2019) – Q1 (Scimago, Infectious Diseases); Q1 (Scimago, Medicine (Miscellaneous)); Q1 (Scimago, Microbiology (Medical)); Q1 (Scimago, Microbiology (Q1)). (Objetivo 1).

Artículo 3: **Yuliya Zboromyrska**, Elisa Rubio, Izaskun Alejo, Andrea Vergara, Anna Mons, Irene Campo, Jordi Bosch, Francesc Marco, Jordi Vila. Development of a new protocol for rapid bacterial identification and susceptibility testing directly from urine samples. *Clin Microbiol Infect*. 2016 Jun; 22(6): 561.e1-6. doi: 10.1016/j.cmi.2016.01.025. Factor de Impacto: 5.292 (2016) – Q1 (Scimago, Infectious Diseases); Q1 (Scimago, Medicine (Miscellaneous)); Q1 (Scimago, Microbiology (Medical)). (Objetivo 2).

Artículo 4: **Yuliya Zboromyrska**, Jordi Bosch, Jesús Aramburu, Juan Cuadros, Carlos García-Riestra, Julia Guzmán-Puche, Carmen Liébana Martos, Elena Loza, María Muñoz-Algarra, Carlos Ruiz de Alegría, Victoria Sánchez-Hellín, Jordi Vila. A multicentre study investigating parameters which influence direct bacterial identification from urine. *PLoS One*. 2018 Dec 11;13(12): e0207822. doi: 10.1371/journal.pone.0207822. Factor de Impacto: 2.776 (2018) Q1 (Scimago, Multidisciplinary); Q1 (Scimago, Medicine (Miscellaneous)). (Objetivo 2).

Manuscrito 5: **Yuliya Zboromyrska**, Jordi Bosch, Verónica Rico, Cristina Pitart, Mariana José Fernández, Alex Soriano, Jordi Vila. Implementación del nuevo protocolo de identificación directa a partir de la orina en la rutina de diagnóstico microbiológico. (Objetivo 2).

INTRODUCCIÓN

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

1. Diagnóstico de bacteriemia

1.1. Generalidades

Se define bacteriemia como la presencia de microorganismos en el torrente sanguíneo. Es una complicación grave de la infección bacteriana de cualquier origen. En los casos extremos de infección grave puede aparecer sepsis. Aunque la bacteriemia y sepsis no son sinónimos ni siquiera las fases del mismo proceso infeccioso en todos los casos, muchas veces los pacientes con bacteriemia presentan signos de sepsis. En su lugar, la sospecha de sepsis conlleva el diagnóstico de posible bacteriemia y administración precoz de antibioticoterapia como veremos a continuación.

La definición de sepsis es compleja y ha sufrido varias modificaciones a lo largo de los años. En 1991 se definió la sepsis en adultos como una infección acompañada por dos o más criterios del síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). Esta respuesta puede ser generada tanto por causas infecciosas como no infecciosas. El principal problema era la sensibilidad y especificidad insuficientes de los criterios de SIRS (**Tabla 1**) [1]. En 2001 los criterios se revisaron por primera vez, ampliando los criterios diagnósticos para mejorar la sensibilidad, sin ofrecer alternativas debido a la falta de evidencia [2]. Aun así, la definición de sepsis permitió elaborar e implementar las guías de tratamiento de sepsis. También se incluían las nociones como sepsis grave (sepsis acompañada por disfunción orgánica) y shock séptico (hipotensión persistente a pesar de la correcta fluidoterapia).

Tabla 1. Criterios SIRS

SIRS (Síndrome de la Respuesta Inflamatoria Sistémica)
Dos o más de los siguientes criterios:
Temperatura de $>38^{\circ}\text{C}$ o $<36^{\circ}\text{C}$
Frecuencia cardíaca $>90/\text{min}$
Frecuencia respiratoria de $>20/\text{min}$ o $\text{PaCO}_2 <32 \text{ mm Hg}$ (4.3 kPa)
Recuento de leucocitos de $>12.000/\text{mm}^3$ o $<4.000/\text{mm}^3$ o $>10\%$ de cayados en el recuento diferencial

En 2016 se realiza la tercera revisión de los criterios de sepsis y se propone una nueva definición de sepsis como la disfunción orgánica causada por una respuesta anómala del huésped a la infección que supone una amenaza para la supervivencia (*life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection*) [3]. El cambio sustancial es el cambio de la respuesta inflamatoria a la disfunción orgánica, lo que implica los cambios a nivel diagnóstico. En primer lugar, se ha propuesto la escala de SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment Score*) para medir esta disfunción orgánica (**Figura 1**).

Introducción

System	Score				
	0	1	2	3	4
Respiration					
PaO ₂ /Fio ₂ , mm Hg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) with respiratory support	<100 (13.3) with respiratory support
Coagulation					
Platelets, ×10 ³ /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Liver					
Bilirubin, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (20)	1.2-1.9 (20-32)	2.0-5.9 (33-101)	6.0-11.9 (102-204)	>12.0 (204)
Cardiovascular					
	MAP ≥70 mm Hg	MAP <70 mm Hg	Dopamine <5 or dobutamine (any dose) ^b	Dopamine 5.1-15 or epinephrine ≤0.1 or norepinephrine ≤0.1 ^b	Dopamine >15 or epinephrine >0.1 or norepinephrine >0.1 ^b
Central nervous system					
Glasgow Coma Scale score ^c	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinine, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (110)	1.2-1.9 (110-170)	2.0-3.4 (171-299)	3.5-4.9 (300-440)	>5.0 (440)
Urine output, mL/d				<500	<200

Abbreviations: Fio₂, fraction of inspired oxygen; MAP, mean arterial pressure; PaO₂, partial pressure of oxygen.

^a Adapted from Vincent et al.²⁷

^b Catecholamine doses are given as μg/kg/min for at least 1 hour.

^c Glasgow Coma Scale scores range from 3-15; higher score indicates better neurological function.

Figura 1. Escala de SOFA. Adaptado de Singer 2016 [3].

Además, para facilitar la identificación de pacientes sépticos a pie de la cama se propone una escala alternativa, *quick* SOFA, que incluye solo parámetros clínicos: 1. Alteración del estado mental, 2. Frecuencia respiratoria de ≥ 20/min; 3. Presión arterial sistólica de ≤ 100 mm Hg.

Sepsis es una enfermedad que presenta altas tasas de morbi-mortalidad y como ya hemos visto, precisa una intervención médica urgente y adecuada. Cada año más de 30 millones de personas adultas desarrolla sepsis con mortalidad hospitalaria estimada de entre 17% y 26% [4]. Los pacientes con ≥ 2 puntos en la escala de SOFA tienen un riesgo de mortalidad de aproximadamente 10%, mientras que los pacientes con shock séptico lo tienen mayor de 40%. Estos números ilustran claramente porque los pacientes con sospecha de sepsis deben beneficiarse de diagnóstico y tratamiento precoz.

Pero, aunque hemos mejorado la identificación rápida de los pacientes con sospecha de sepsis, todavía quedan bastantes cuestiones sin resolver. Los criterios de disfunción orgánica tampoco son muy específicos para la infección, así que ésta última puede ser producida por causas no infecciosas. Actualmente no existe un biomarcador 100% fiable de sepsis. Por esta razón un diagnóstico microbiológico rápido que confirma la sospecha de causa infecciosa en el caso de sepsis sería de gran ayuda.

En 2018 se publicó la actualización de “*The Surviving Sepsis Campaign Bundle*”, donde las principales acciones a emprender en la primera hora desde la sospecha de sepsis incluyen recoger hemocultivos y administrar antibióticos de amplio espectro (**Figura 2**) [5].

Introducción

- Measure lactate level. Remeasure if initial lactate is >2 mmol/L.
- Obtain blood cultures prior to administration of antibiotics.
- Administer broad-spectrum antibiotics.
- Begin rapid administration of 30ml/kg crystalloid for hypotension or lactate ≥ 4 mmol/L.
- Apply vasopressors if patient is hypotensive during or after fluid resuscitation to maintain MAP ≥ 65 mm Hg.

**“Time zero” or “time of presentation” is defined as the time of triage in the Emergency Department or, if presenting from another care venue, from the earliest chart annotation consistent with all elements of sepsis (formerly severe sepsis) or septic shock ascertained through chart review.*

Figura 2. Medidas de la primera hora (“hour-1 bundle”). Adaptada de Levy 2018 [5].

En los últimos años se ha demostrado que la demora en iniciar el tratamiento antibiótico en los pacientes con shock séptico es el principal factor del que depende la supervivencia de estos pacientes [6-8].

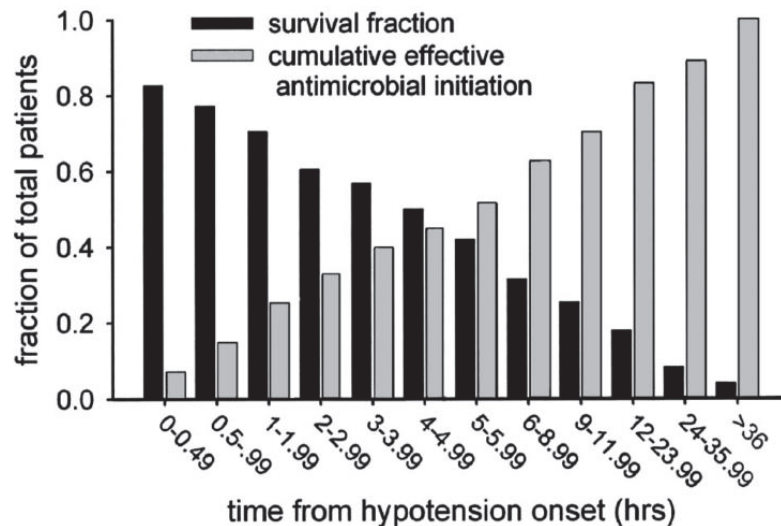


Figura 3. Grafica que demuestra la correlación entre el tiempo del inicio de antibioticoterapia efectiva y supervivencia de pacientes con shock séptico. Adaptada de Kumar 2006 [7].

Esta respuesta dependerá en gran medida de la sospecha diagnóstica correcta que permita instaurar el tratamiento antimicrobiano apropiado. En los últimos años, con el aumento importante de bacterias multirresistentes, el acertar con el tratamiento empírico correcto puede ser un reto importante [9-11]. Debido a ello, los clínicos optan por pautas empíricas de más amplio espectro para asegurar una cobertura adecuada de posibles agentes etiológicos con diversos mecanismos de resistencia. El uso de antibióticos de amplio espectro, a veces varios de ellos simultáneamente en pautas de tratamiento combinado, a pesar de ser necesario y totalmente justificado en el caso de los pacientes graves, puede tener sus efectos negativos, tales como la selección de bacterias resistentes, con el consiguiente impacto tanto a nivel local como global, o el aumento de los efectos adversos de dichos medicamentos en los pacientes tratados [12]. Para evitar el uso prolongado de los antibióticos de amplio espectro y

Introducción

ajustar cuanto antes el tratamiento, son necesarios los métodos de diagnóstico rápidos y fiables que permitan obtener una información clínicamente relevante en pocas horas.

1.2 Focos y etiología

La densidad bacteriana en sangre depende de las características del paciente y del foco de la infección. Habitualmente las bacteriemias en un paciente adulto se caracterizan por la presencia de tan solo 1-10 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL [13-15]. El foco de la infección es un determinante importante del inóculo bacteriano, siendo los focos intravasculares los que presentan las concentraciones más altas [16]. Otro problema que complica el diagnóstico es el carácter intermitente de bacteriemias, lo que obliga en ciertos casos recoger muestras seriadas para llegar al diagnóstico microbiológico.

Las bacteriemias pueden ser de origen comunitario o nosocomial. A su vez el foco de bacteriemia depende del órgano o sistema donde se desarrolla el proceso infeccioso (**Figura 4**).

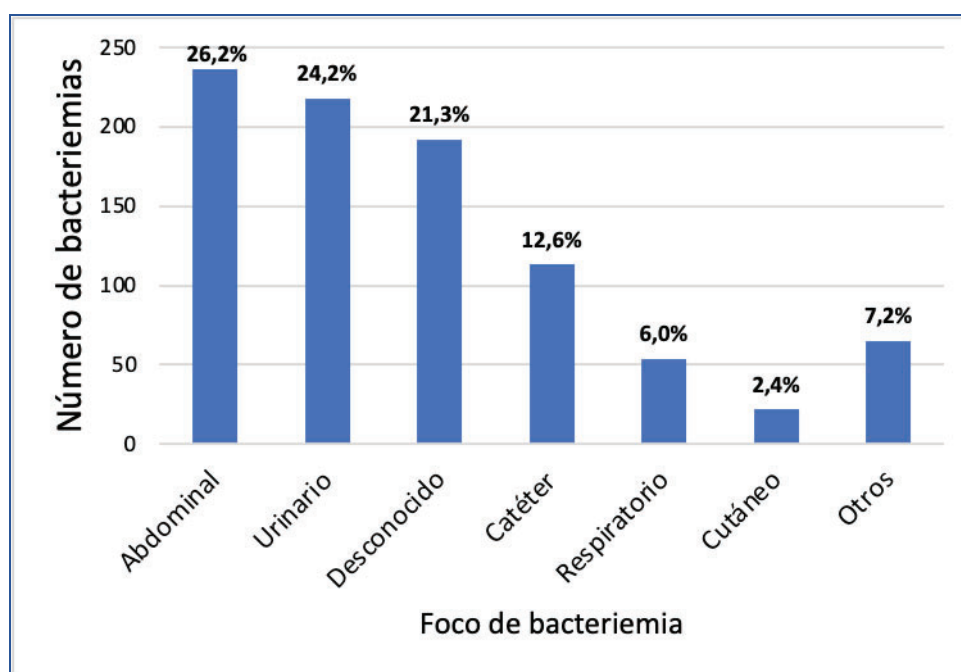


Figura 4. Focos más frecuentes de episodios de bacteriemia detectados en el Hospital Clínic en 2019.

La etiología de bacteriemia y sepsis depende de si se trata de bacteriemia comunitaria o nosocomial. Los principales microorganismos aislados en hemocultivo durante el año 2019 en nuestro centro se presentan en la **Figura 5**.

Introducción

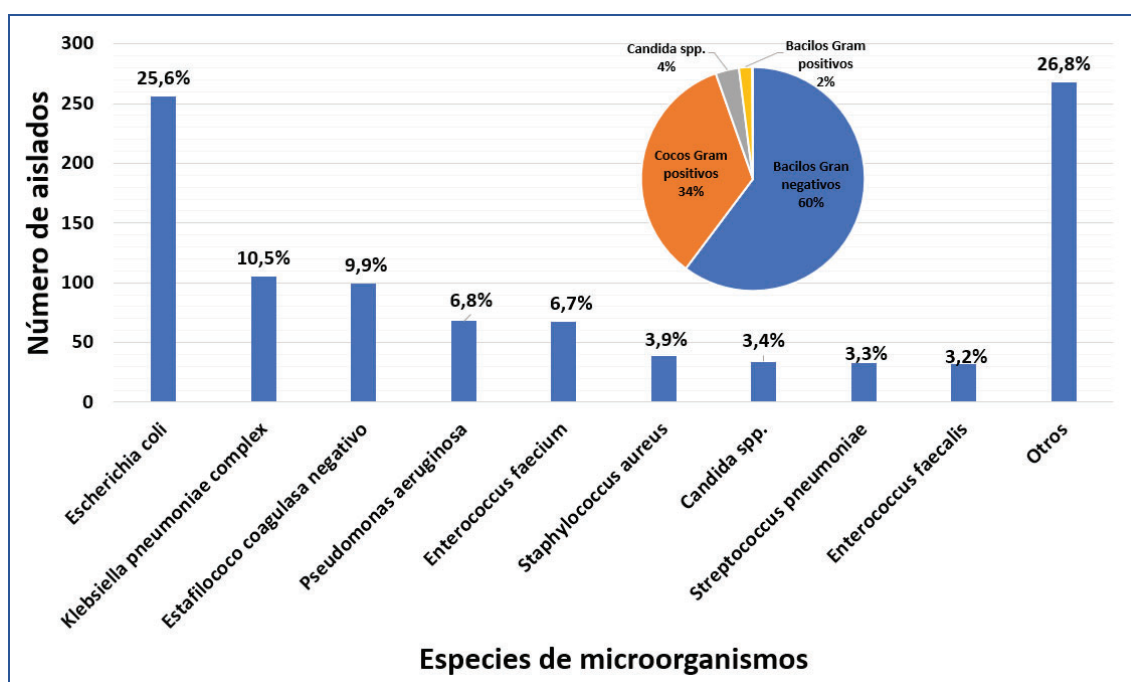


Figura 5. Especies de microorganismos más frecuentemente aislados en episodios de bacteriemia detectados en el Hospital Clínic en 2019.

1.2.1 Bacteriemia relacionada con catéter (BRC)

BRC es una de las principales causas de bacteriemia nosocomial. Según el Estudio de la Prevalencia de la Infección Nosocomial en España (EPINE) cerca de 70% de los pacientes admitidos en los hospitales llevará un catéter vascular en algún momento de su estancia [17]. La incidencia dependerá del tipo de catéter, del sitio de inserción, de la experiencia de la persona que lo coloca, de número de accesos, etc. Este tipo de infección tiene una alta morbi-mortalidad asociada, aumenta las estancias hospitalarias y los costes. Hay que sospechar BRC en el caso de pacientes con catéteres intravasculares si presentan fiebre, signos de sepsis y/o signos locales de infección, así como si se sospecha la infección metastásica (émbolos sépticos) [18]. La patogénesis de BRC incluye tres principales vías de acceso de los microorganismos al catéter: 1. Los microorganismos invaden el tracto percutáneo del catéter; 2. Los microorganismos colonizan la superficie externa y/o interna del catéter en el momento de su inserción o en los días posteriores; y 3. Los microorganismos llegan al catéter por vía hematológica desde otros focos de infección (**Figura 6**) [19]. Una vez colonizado el catéter, los microorganismos forman biopelículas y permiten la diseminación hematológica.

Introducción

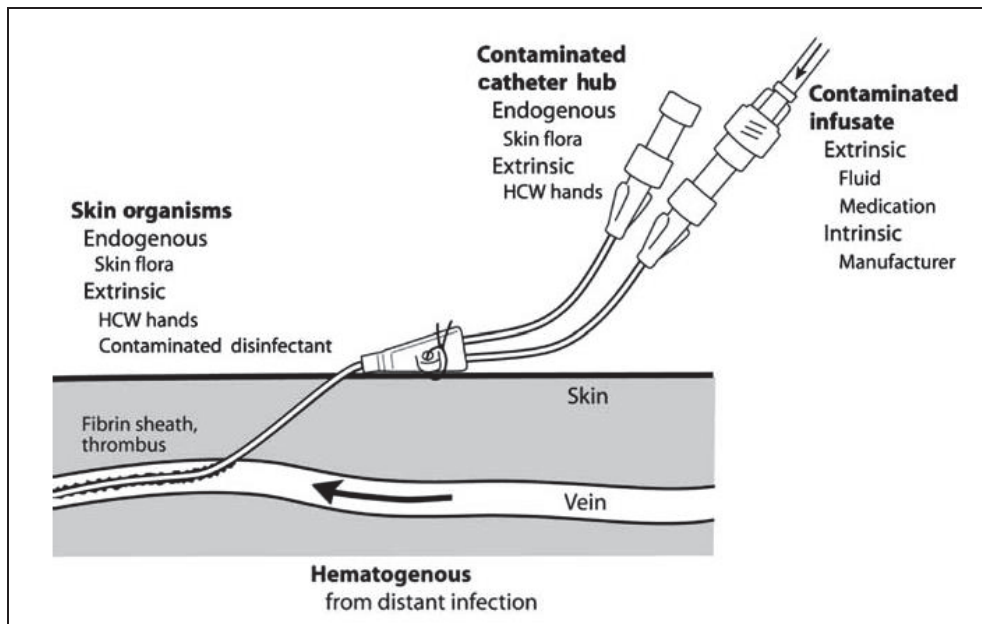


Figura 6. Las tres principales vías de colonización del catéter. Adaptado de Safdar 2004 [19].

Para el diagnóstico de BRC es necesario recoger dos parejas de hemocultivos: una a través del catéter y otra por venopunción periférica. Es muy importante la correcta asepsia de la piel antes de proceder a la recogida de hemocultivos, ya que muchos de los agentes etiológicos de BRC son también frecuentes contaminantes que provienen de la piel del paciente o del personal sanitario: estafilococos coagulasa-negativa, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* spp., etc. Varios estudios han demostrado buena sensibilidad (72%-96%) y especificidad (90%-95%), si se observa el tiempo de diferencia de positividad de ≥ 120 min entre los hemocultivos obtenidos a través del catéter y por venopunción [20-22]. Otras técnicas estudiadas para el diagnóstico de BRC en ausencia del cultivo de punta de catéter son el cepillado endoluminal del catéter y la tinción de sangre aspirada por el catéter (con naranja de acridina o Gram). La primera técnica presenta un riesgo importante de complicaciones, tales como riesgo de embolización y bacteriemia, aparte de ser técnicamente nada fácil de realizar [23, 24]. La tinción de la sangre extraída por el catéter ha demostrado buenos resultados, aunque no hay muchos estudios al respecto [25, 26]. Otras técnicas conservadoras incluyen: 1. Cultivos diferenciales cuantitativos, que prácticamente no se usan debido a que son muy laboriosos y el punto de corte de recuento diferencial tampoco está bien establecido; 2. Cultivo superficial semicuantitativo, cuando se cultiva el frotis de la piel que rodea el punto de inserción de catéter. Esta última técnica tiene una sensibilidad muy variable, pero es fácil de realizar. Cuando hay sospecha de BRC y se procede a retirar el catéter, hay que cultivarlo para confirmar el diagnóstico. El método más común es el cultivo semicuantitativo de Maki de la punta de catéter [27]. Para ello, los últimos 5 cm de catéter se hacen rodar por una placa de agar sangre que se incuba 24 – 48 h a 37°C. Los recuentos de ≥ 15 UFC se consideran indicativos de BRC.

Las técnicas moleculares rara vez se han usado para el diagnóstico de BRC. Probablemente es debido a su alto coste, complejidad en comparación con el diagnóstico clásico, necesidad de equipamiento especial y de personal entrenado. En los estudios publicados sobre el diagnóstico de BRC sobre todo se usan las técnicas de biología molecular a partir de

Introducción

hemocultivo positivo (GeneXpert o SeptiFast) [28, 29]. Hay muy pocos datos sobre el uso de técnicas moleculares aplicadas directamente a la sangre extraída a través del catéter [30, 31].

1.3 Métodos diagnósticos

1.3.1 Hemocultivo

Como ya hemos mencionado antes, los protocolos de manejo clínico de pacientes con sospecha de sepsis propuestos en 2012 y revisados en 2018 incluyen un paquete de medidas para ser aplicadas entre las primeras una y seis horas (*sepsis care bundles*), que incluyen dos medidas esenciales: cursar hemocultivos antes de empezar el tratamiento antibiótico y administrar los antibióticos de amplio espectro [5, 32]. El diagnóstico convencional de la bacteriemia se basa en hemocultivos. Actualmente los laboratorios disponen de los métodos automatizados de monitorización de hemocultivos que permiten la recuperación de gran mayoría de los patógenos, gracias a los medios de cultivo enriquecido y las condiciones de incubación más adecuadas. La monitorización continua permite la detección de los hemocultivos positivos basándose generalmente en la producción de CO₂ por los microorganismos en crecimiento. Los principales sistemas disponibles en el mercado están presentados en la **Figura 7**.

System (Manufacturer)	Main blood-culture media and characteristics	Positivity detection system
BD BACTEC (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, USA)	Standard aerobic and anaerobic broth media Media containing resin particles Media specifically designed for small blood volume inoculation Media containing a lysing agent to increase the recovery of organisms phagocytosed Media optimized for the growth of mycobacteria Specific algorithms for fastidious organisms (e.g. <i>Haemophilus</i> spp. and <i>Neisseria</i> spp.)	Fluorescent sensor of CO ₂ production
BacT/ALERT 3D (bioMérieux, Durham, NC, USA)	Plastic bottles Standard aerobic and anaerobic broth media Media containing activated charcoal particles ^a or resin Media specifically designed for small blood volume inoculation Media supplemented with Middlebrook 7H9 for microbacteria growth Enriched media	Colorimetric sensor of CO ₂ production
VersaTREK, (TREK Diagnostic Systems, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)	Standard aerobic and anaerobic broth media for samples from 0.1 to 10 mL, optimized to minimize the impact of antibiotics	Monitoring of redox variations

^aThe presence of charcoal particles prevent the use of the pellet for direct identification from positive blood culture using MALDI-TOF MS.

Figura 7. Los principales sistemas de incubación y monitorización automatizada de hemocultivos disponibles en el mercado. Adaptado de Opota 2015 [33].

Como ya se ha explicado antes, las bacteriemias pueden presentar un número de microorganismos muy bajo y además ser intermitentes. Por eso el rendimiento del hemocultivo depende en gran medida del volumen de la sangre cultivada, recomendándose la recogida de al menos 2 parejas de hemocultivos (cada uno incluye un frasco aerobio y uno anaerobio) e inocular entre 8-10 mL de sangre en cada uno, en el caso del paciente adulto [33, 34]. Para los pacientes pediátricos y los casos en los que no es posible obtener el volumen recomendado de la sangre, se utilizan los frascos pediátricos.

Las tasas de positividad de los hemocultivos dependen en gran medida de la alta sospecha de bacteriemia a la hora de ordenar la recogida de hemocultivos, del momento de recogida, del tratamiento antibiótico previo, del volumen y número de hemocultivos obtenidos, etc. Como se ha demostrado en alguno de los estudios, los factores más asociados con la positividad del hemocultivo han sido el diagnóstico clínico de bacteriemia o endocarditis y la no exposición a los antibióticos en las 72 h previas a la recogida de la muestra [35]. Como el tratamiento

Introducción

antibiótico previo es un factor que reduce de manera importante la recuperación de microorganismos, se han introducido los frascos de hemocultivo que contienen agentes quelantes de antibióticos. El porcentaje de recuperación es variable según el tipo de antibióticos recibidos por el paciente [36, 37]. En cuanto a número de hemocultivos, según algunos estudios, dos parejas de hemocultivos obtenidos durante 30 minutos permiten recuperar más de 80% de microorganismos causantes de bacteriemia. El tercer hemocultivo puede aumentar este porcentaje hasta el 95.7% [38]. En cambio, en el caso de endocarditis, el primer hemocultivo ya suele ser positivo debido a la naturaleza persistente de este tipo de bacteriemia. La sensibilidad estimada de hemocultivo para el diagnóstico de sepsis en ciertos grupos de pacientes no supera el 30-40% [39, 40]. Este hecho puede ser explicado por la presencia de microorganismos que no crecen en los medios de cultivo convencionales o por el tratamiento antibiótico previo o concomitante que afecta la viabilidad de los patógenos.

Una vez tenemos un hemocultivo positivo, el siguiente paso es realizar la tinción de Gram que, por una parte, permite confirmar la presencia de microorganismos en el caldo de cultivo y, por otra, proporciona una información rápida y clínicamente relevante que permite instaurar o ajustar las pautas de tratamiento empírico, dependiendo de si la tinción revela la presencia de microorganismos Gram-positivos o Gram-negativos, de la morfología tipo coco o bacilo, o la presencia de levaduras. Pero aparte de la tinción de Gram, otros parámetros de los hemocultivos pueden ser muy útiles. En primer lugar, el número de frascos positivos. Este dato es sobre todo importante en el caso de aislamiento de microorganismos que son frecuentes contaminantes, tales como estafilococos coagulasa-negativa o corinebacterias, pero que pueden tener valor en el caso de pacientes inmunodeprimidos o con dispositivos intravasculares. Por eso, es importante que el microbiólogo disponga de información acerca del método de obtención de la muestra (punción venosa periférica, catéter venoso central, catéter arterial, etc.). A parte del número de frascos, el tipo de frascos (aerobio o anaerobio) también puede tener un valor importante, especialmente si se trata de microorganismos aerobios o anaerobios estrictos e incluso de *Candida* spp. [34, 35]. Por último, el tiempo de positividad del hemocultivo ha demostrado su gran utilidad a la hora de predecir, junto con la información de la tinción de Gram, los posibles grupos de microorganismos [36]. El tiempo de positividad diferencial entre un hemocultivo obtenido por la punción periférica y otro a través del catéter es uno de los criterios del diagnóstico de la BRC [37, 38].

La contaminación de los hemocultivos es un problema importante que conduce a tratamientos antibióticos innecesarios, aumento de costes para el laboratorio y el hospital, y carga de trabajo adicional. El objetivo globalmente aceptado es que la tasa de hemocultivos contaminados debe ser inferior al 3% [39]. La fuente principal de contaminaciones son las bacterias presentes en la piel de los pacientes o del personal sanitario, si no se siguen estrictamente los protocolos de asepsia durante la recogida de hemocultivos. Así se ha visto que hasta un 60-80% de los estafilococos coagulasa negativos aislados de hemocultivos son contaminantes, mientras que estos hemocultivos pueden suponer hasta un 40% del total de hemocultivos positivos [40]. La misma tendencia se observa en el caso de *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. o *Cutibacterium* spp.

Pero a pesar de que el hemocultivo sigue siendo el estándar para el diagnóstico de la bacteriemia y la sepsis, su principal limitación es el tiempo que se necesita para que el

Introducción

microrganismo causante de la infección crezca primero en el caldo de cultivo y después en los subcultivos correspondientes en medios sólidos.

1.3.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF

La llegada de la espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*) ha revolucionado el laboratorio de microbiología clínica. Esta técnica de espectrometría de masas se ideó a principios del siglo XX, cuando el físico inglés J. J. Thompson construyó el primer prototipo de espectrómetro de masas. Durante muchos años el uso de este método se restringía al estudio de las sustancias termoestables y de bajo peso molecular. En los años 40, después de conseguir reducir notablemente el tamaño del instrumento, aparecieron los primeros espectrómetros de masas de uso comercial. En el año 1948 Cameron construyó el analizador tipo TOF (*Time of Flight*). Pero no fue hasta los años 80, cuando Tanaka inventó la técnica MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) que permitía analizar compuestos orgánicos sin su destrucción durante la fase de ionización. Actualmente es el método que se usa de rutina para la identificación de microorganismos a partir de cultivos positivos, principalmente. Se ha demostrado como una técnica altamente fiable, rápida y fácil de realizar que permite identificar la mayoría de los microorganismos relevantes [41].

Cualquier espectrómetro de masas tiene 3 elementos principales: la fuente de ionización, el analizador y el detector. En el caso del espectrómetro tipo MALDI-TOF, la fuente de ionización es un láser ultravioleta con longitud de onda de 337 nm, que produce la desorción y ionización de la muestra con la ayuda de una matriz orgánica. Para ello, la muestra analizada se mezcla con la matriz orgánica fotosensible, se deposita sobre una placa metálica y se deja secar al aire libre unos minutos. La placa de MALDI-TOF tiene 96 pocillos y, por lo tanto, permite estudiar 96 muestras distintas en un solo análisis. A continuación, la placa se introduce en el MALDI-TOF. El papel fundamental de la matriz es absorber y, después, transmitir la energía del láser a la muestra, facilitando su ionización. La matriz más utilizada en laboratorios de Microbiología es el ácido α -ciano-4-hidroxi-trans-cinámico (HCCA). El segundo elemento del MALDI-TOF es el analizador. Tras la ionización, los iones generados se aceleran mediante la aplicación de un campo eléctrico y pasan por un analizador. El analizador tipo TOF separa los iones procedentes de la muestra en relación con su ratio masa/carga (m/z). Esta ratio determina el tiempo que tarda un ion en alcanzar el detector (tiempo de vuelo). Como es de esperar los iones más pequeños vuelan más rápido y alcanzan primeros el detector, mientras que los de mayor masa tardan más. Hay que decir que la mayor parte de los iones que se forman tienen la carga de un protón (H^+). De esta manera, la ratio masa/carga en realidad equivale a la masa molecular de los iones generados. Finalmente, los iones impactan contra el detector, que recoge toda la información necesaria para generar un espectro de masas de cada compuesto analizado. El espectro obtenido es un gráfico que representa las masas de los diferentes iones generados a partir de la muestra analizada (**Figura 8**).

Introducción

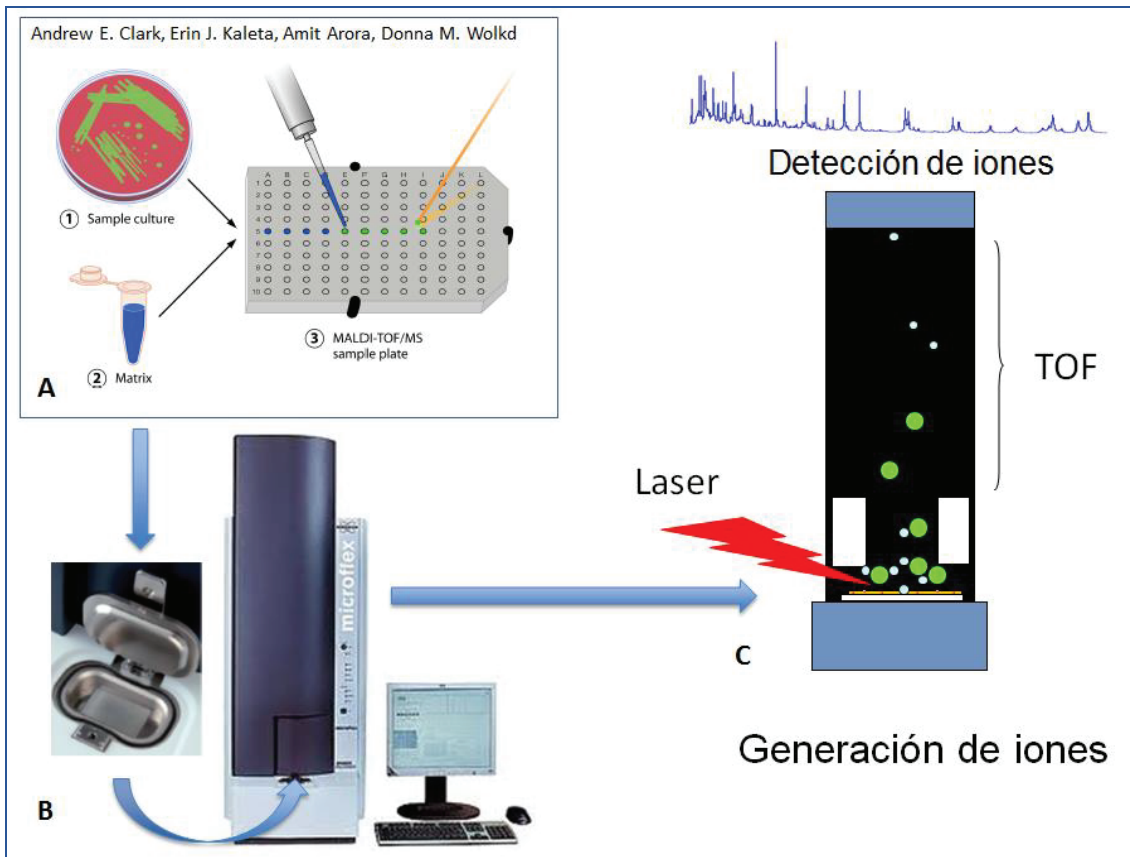


Figura 8. Pasos de análisis de muestras mediante EM MALDI-TOF para la identificación de microorganismos.

El método de identificación mediante EM MALDI-TOF se basa en análisis del espectro proteico generado por un microorganismo y la comparación de ese espectro con los perfiles proteicos existentes en la base de datos. Después del análisis, el software proporciona no sólo el resultado de la identificación sino también el grado de fiabilidad de dicha identificación. Para sistema MALDI-TOF de Bruker Daltonics existen tres principales niveles de fiabilidad: A, identificación fiable a nivel tanto de género como de especie (*score value* ≥ 2.000); B, identificación fiable a nivel de género (*score value* 1.700-2.000); C, identificación no fiable (*score value* < 1.700). El MALDI-TOF VITEK (bioMérieux) proporciona un porcentaje de fiabilidad de la identificación: la identificación es valorable si el valor es entre 60% y 99% y no valorable si es $< 60\%$.

La identificación de las bacterias a partir de colonias se puede realizar según dos protocolos: 1) análisis de células intactas, que consiste en depositar una pequeña cantidad de microorganismo sobre un pocillo de la placa, cubrirlo con la matriz, dejar secar e introducir en el instrumento; 2) análisis después de extracción de proteínas que incluye el tratamiento previo de la muestra con etanol, ácido fórmico y acetonitrilo. También existen protocolos específicos para el procesamiento de hongos, micobacterias, o partir de hemocultivos positivos [42-44].

Para acortar los tiempos necesarios para la identificación de microorganismos causantes de bacteriemia, se ha evaluado el uso de EM MALDI-TOF a partir del caldo de hemocultivo y también después de la incubación corta de subcultivos en los medios de cultivo sólidos. El método de identificación después de una corta incubación (2-5 h) en un medio sólido es

Introducción

básicamente el mismo método que se usa a partir de la colonia tras 18-24 horas de incubación. Se ha demostrado que se necesita menos tiempo para la identificación de las bacterias Gram-negativas en comparación con las Gram-positivas [45], siendo suficiente una incubación de tan solo 2 horas en el caso de bacilos Gram-negativos y de 5.9 horas para cocos Gram-positivos, para su identificación a nivel de especie [46]. Algunos autores han propuesto bajar el *cut-off* del valor (*score*) de EM MALDI-TOF que se considera válida para la identificación fiable (>1.700) cuando la identificación se lleva a cabo a partir de los cultivos tras una incubación corta [47].

La aplicación de EM MALDI-TOF directamente a partir del caldo de hemocultivo positivo permite ahorrar el tiempo de incubación, pero requiere un pretratamiento de la muestra para eliminar las células de sangre presentes en el caldo (**Figura 9**). Se estima que la concentración de bacterias en hemocultivo positivo es alrededor de $10^7 - 10^8$ UFC/mL, una densidad suficiente para aplicar la técnica.

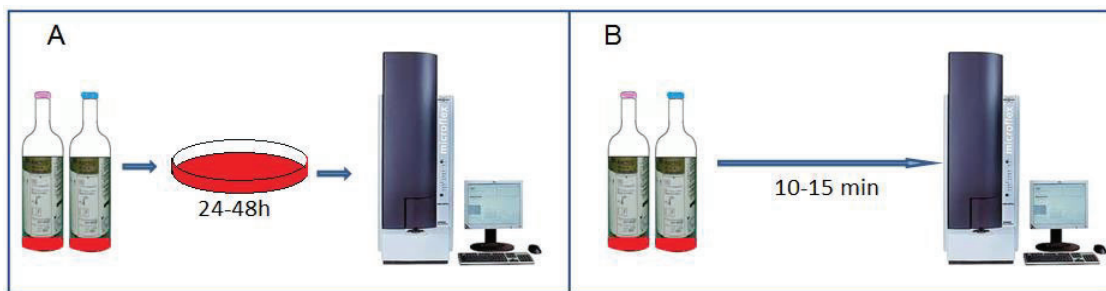


Figura 9. Diferencia en el tiempo para el resultado si se trabaja a partir de subcultivos *versus* caldo de hemocultivo directo.

Uno de los protocolos propuestos es la centrifugación diferencial de la muestra del caldo de hemocultivo positivo, que consiste en una primera centrifugación a alta velocidad para separar las células humanas; a continuación el sobrenadante se centrifuga a alta velocidad para obtener el sedimento bacteriano; el sedimento se lava con agua estéril para acabar de eliminar las sustancias que pueden interferir en el análisis y finalmente se realiza la identificación mediante EM MALDI-TOF sin o con la extracción previa de proteínas [48]. Un kit comercial, MALDI Sepsityper kit (Bruker Daltonics), se ha evaluado en múltiples estudios con buenos resultados [49]. No obstante, el coste del kit condiciona su uso en muchos laboratorios, que prefieren usar el método de doble centrifugación u otras técnicas caseras, como puede ser el uso de saponina para lisar las células humanas presentes en hemocultivo [50] o tubos con gel separador [51].

La identificación rápida de microorganismos causantes de bacteriemia y sepsis tiene un impacto directo sobre el manejo de paciente, permitiendo valorar mejor el aislamiento, ajustar el tratamiento o establecer el posible foco de la bacteriemia [52]. Asimismo, se ha demostrado que la identificación rápida de microorganismos contaminantes permite acortar el tratamiento antibiótico parenteral [53].

Una vez realizada la identificación del microorganismo y disponiendo del sedimento microbiano recuperado del caldo de hemocultivo positivo, este último puede ser usado para realizar el antibiograma con las técnicas de rutina disponibles en cada laboratorio (Microscan,

Introducción

Phoenix, Vitek2, tiras de gradiente, Sensititre, difusión con discos, etc.), sin esperar los subcultivos en los medios sólidos y adelantando el resultado de sensibilidad unas 18-24 horas.

1.3.3 Otras técnicas de identificación y detección de resistencias aplicadas al hemocultivo positivo

Aparte de la EM MALDI-TOF, en los últimos años se han introducido otras técnicas que permiten una identificación y detección de resistencias a partir de un hemocultivo positivo, sin esperar los subcultivos. Entre ellos hay métodos basados en PCR (*Polymerase Chain Reaction*), hibridación con sondas o *microarray*.

Un método ampliamente evaluado es Xpert MRSA/SA (Cepheid), test que permite en apenas una hora no sólo identificar *S. aureus*, sino detectar también los genes responsables de la resistencia a la metilicina [54] y de esta manera proporcionar una información de gran impacto clínico [55, 56]. Siendo un sistema integrado, requiere una mínima manipulación por parte del personal del laboratorio, lo que facilita su incorporación en la rutina. La principal limitación de esta técnica es que solo identifica un patógeno concreto. A diferencia, el ensayo de FilmArray (bioMérieux) permite identificar 23 microorganismos y tres mecanismos de resistencia [57, 58]. Aparte de ser un sistema integrado, igual que GeneXpert, FilmArray permite detectar las cinco especies de *Candida* más frecuentemente aisladas en muestras clínicas. La detección de especies de *Candida* es un valor añadido de la técnica, teniendo en cuenta la alta morbimortalidad de los pacientes que desarrollan candidemia y que EM MALDI-TOF obtiene resultados subóptimos en cuanto a la identificación de levaduras a partir de hemocultivo positivo [59]. Otro ensayo evaluado a partir de hemocultivo positivo en los últimos años es ePlex (GenMark Diagnostics, Carlsbad, CA). Esta técnica permite identificar a nivel de género y/o especie 20 bacterias Gram-positivas junto con cuatro marcadores de resistencia, 21 bacterias Gram-negativas junto con seis marcadores de resistencia y 16 hongos, con una sensibilidad del 97% para los microorganismos Gram-positivos y del 99% para los Gram-negativos [60]. Otro método diagnóstico evaluado en hemocultivo positivo está basado en hibridación con sondas (*Fluorescence in situ hybridization* (FISH)), donde se utilizan las sondas que hibridan en las correspondientes secuencias de ácidos nucleicos bacterianos y permiten la detección de ciertas especies de microorganismos en pocas horas con el uso de un microscopio de fluorescencia [61, 62]. Una técnica novedosa, Accelerate PhenoTest (Accelerate Diagnostics), basada en la combinación de la tecnología FISH para la identificación (en 90 minutos) y en el análisis morfo-cinético de crecimiento bacteriano en presencia de antibióticos para el antibiograma (7 horas de tiempo total para la identificación y el antibiograma), se ha evaluado a partir de hemocultivos positivos [63]. Esta técnica responde a los dos objetivos principales: la identificación directa sin esperar los subcultivos y el antibiograma que proporciona la concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada antibiótico testado. La principal limitación de Accelerate es el número de patógenos incluidos en el panel de identificación, aunque hay que decir que los microorganismos incluidos cubren más de 80% de etiologías de bacteriemias. A pesar de una clara utilidad de las técnicas descritas aplicadas a hemocultivo positivo, el alto coste limita muchas veces su implementación en los laboratorios de microbiología clínica, sobre todo si éstos disponen de un espectrómetro de masas. Actualmente, para los laboratorios que disponen de EM MALDI-TOF y trabajan 24 horas los siete días a la semana, el protocolo más eficiente consiste en realizar primero la identificación

Introducción

con EM MALDI-TOF y a continuación, dependiendo del resultado de la identificación, aplicar las técnicas rápidas de detección de resistencias disponibles en el laboratorio (PCR, LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*), microarrays, métodos colorimétricos, inmunocromatografía, etc.). Este enfoque tiene ventajas evidentes respecto a las técnicas moleculares aplicadas al hemocultivos positivo: el número de especies que se puede detectar no está limitado y es mucho más económico para los laboratorios [64]. Además, los paneles moleculares tienen una limitación en cuanto al número de muestras que se puede procesar simultáneamente.

1.3.4 Biología molecular en sangre directa

Todas técnicas descritas en los apartados anteriores suponen un tiempo de espera antes de ser aplicadas: el tiempo que tardará un hemocultivo para ser detectado como positivo. El impacto de acortar el tiempo de identificación y el antibiograma una vez se dispone de un hemocultivo positivo es importante, comparado con el procedimiento estándar basado en subcultivos. Además, la densidad elevada de los microorganismos en hemocultivo positivo permite usar las técnicas con un límite de detección elevado. Pero como se ha discutido antes, un paciente con sospecha de infección grave se beneficiaría del diagnóstico y tratamiento antimicrobiano apropiado en las primeras horas de su atención médica. Por esa razón, se han diseñado técnicas capaces de detectar los microorganismos directamente en la muestra de sangre. A pesar de que el número de las bacterias circulantes viables en un paciente adulto con bacteriemia puede ser muy bajo, se estima que el número de las copias de genoma (GC) que puede haber es 10^3 - 10^4 GC/mL (**Figura 10**) [65]. Este hecho puede ser una ventaja a la hora de aplicar los métodos de detección basados en la biología molecular, pero al mismo tiempo hay que tener en cuenta que dichas técnicas pueden detectar DNA (el ácido desoxirribonucleico) circulante que no siempre significa microorganismos viables.

Introducción

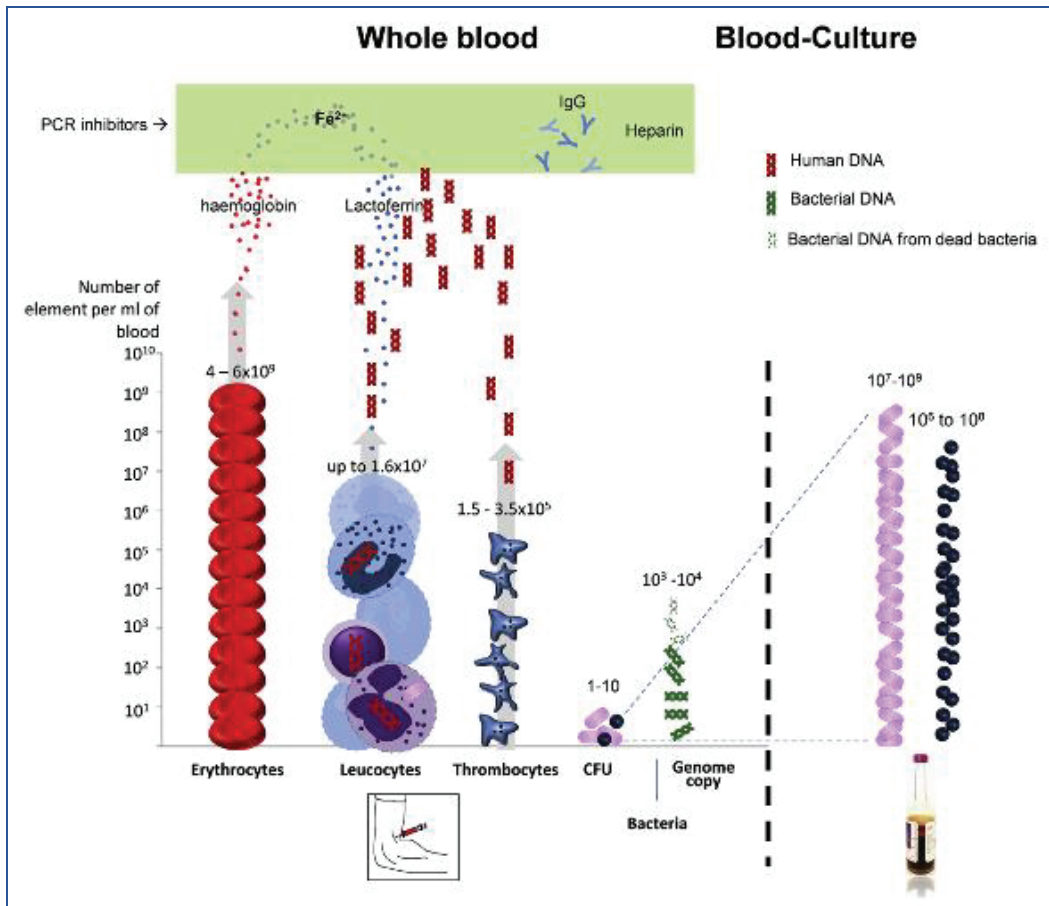


Figura 10. La comparación entre la muestra de sangre directa y de caldo de hemocultivo positivo para el diagnóstico de bacteriemia. Adaptado de Opota 2015 [66].

Entre las técnicas comercializadas está SeptiFast (Roche Diagnostic SL), basado en una PCR múltiple, que ofrece los resultados en cinco horas y permite identificar hasta 25 microorganismos y un mecanismo de resistencia (gen *mecA*, que codifica la PBP2a generando resistencia a meticilina). Este panel ha sido evaluado en distintas poblaciones de pacientes, incluidos los pacientes neutropénicos y de UCI [67] [68], pacientes inmunodeprimidos [69] y población pediátrica [70, 71], entre otras. Otro método disponible para el diagnóstico de sepsis es SepsiTtest (Molzym), que combina la amplificación de 16S y 18S rRNA genes con la secuenciación y por lo tanto es capaz de identificar más de 345 bacterias y hongos [72, 73]. Aunque el tiempo total de análisis se supone que es de seis horas, en la vida real disponer de la secuenciación a cualquier hora parece muy difícil de conseguir para la mayoría de los laboratorios. Otra técnica basada en la PCR propuesta para el diagnóstico a partir de sangre directa es MagicPlex Sepsis Test (Seegene) que permite detectar más de 90 microorganismos a nivel de género y 27 a nivel de especie además de tres genes de resistencia (*van A*, *vanB* y *mecA*) en seis horas. El ensayo se ha evaluado en varios estudios en la población adulta [74-76] y recientemente también en la población pediátrica [77]. El sistema VYOO (Analytik Jena) permite identificar 34 bacterias, seis hongos y cinco genes de resistencia en ocho horas [78, 79]. A diferencia de los métodos anteriores la detección de amplicones se basa en la tecnología *microarrays*. Una nueva estrategia en la detección de patógenos en sangre constituye la técnica basada en la combinación de la tecnología PCR y la espectrometría de masas de ionización mediante electroespray (PCR/ESI-MS). Esta técnica permite la identificación de 800

Introducción

microorganismos, incluyendo las muestras polimicrobianas, y ha demostrado la sensibilidad variable, cuando se compara con hemocultivos, pero bastante alta (de 90.5%) cuando se ha analizado respecto al criterio clínico de bacteriemia en pacientes de UCI (unidad de cuidados intensivos) [80, 81]. Actualmente este método está descatalogado. En los últimos años se ha comercializado un método novedoso de detección de levaduras en sangre directa basado en la resonancia magnética (el sistema T2Candida (T2 Biosystems)). Esta técnica permite la identificación de las cinco especies más frecuentes de *Candida* en tan solo 3-5 horas con unas sensibilidad y especificidad reportadas muy altas [82]. Recientemente se ha evaluado el ensayo T2Bacteria basado en la misma tecnología y que permite detectar las siguientes especies de microorganismos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecium* [83, 84].

Todas las técnicas descritas presentan la principal ventaja de acortar el tiempo del resultado microbiológico (**Figura 11**). No obstante, su sensibilidad y especificidad variables [85], así como la heterogeneidad de los estudios donde se evaluaron los paneles, no permite muchas veces llegar a las conclusiones claras acerca de su valor clínico y por lo tanto se requieren más estudios bien diseñados y controlados [86-88]. La complejidad de la detección de microorganismos a partir de la muestra de sangre directa se debe no sólo a la baja densidad de microorganismos, sino también a la presencia de múltiples sustancias inhibitoras de la PCR (hierro, inmunoglobulinas, DNA humano, etc.) y al volumen mucho más pequeño que se usa en la mayoría de las técnicas moleculares (hasta 1 mL) comparando con los hemocultivos (20-40 mL) [66, 89].

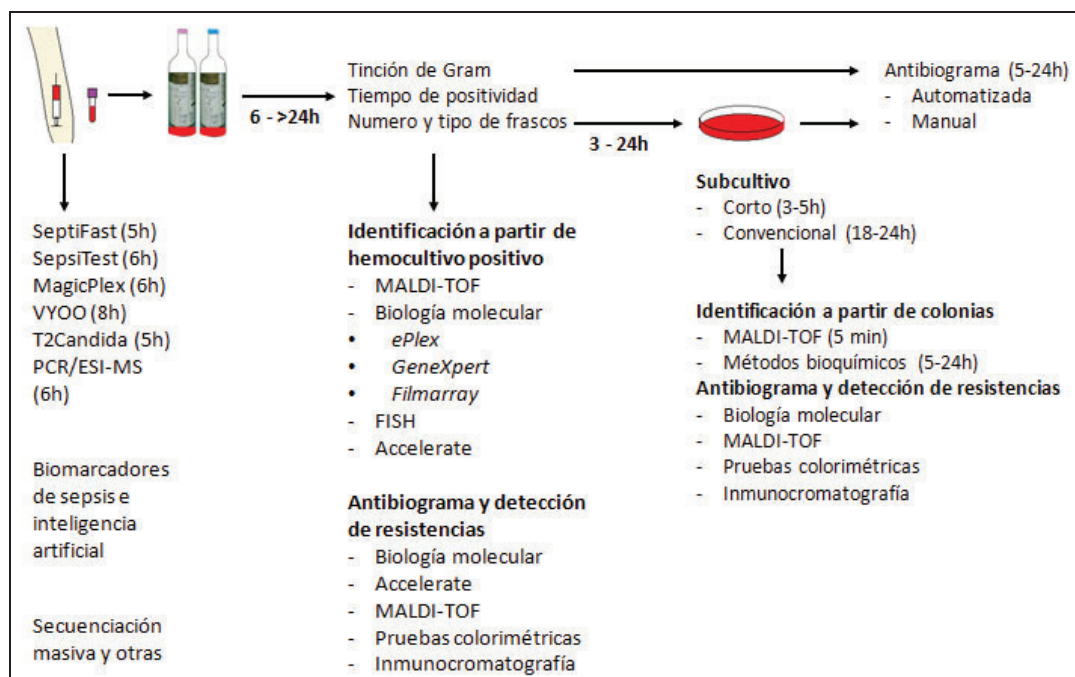


Figura 11. Técnicas que pueden ser utilizadas para el diagnóstico microbiológico de bacteriemia a partir de muestra directa de sangre o cultivos, y los tiempos hasta el resultado.

Introducción

2. Diagnóstico de las infecciones del tracto urinario

2.1 Generalidades

La infección del tracto urinario (ITU) es una de las más frecuentes tanto a nivel hospitalario como comunitario. Es importante destacar que la ITU es la primera causa de bacteriemia en atención primaria y la segunda de bacteriemia nosocomial. Es también uno de los principales focos de bacteriemia entre los pacientes atendidos en los servicios de urgencias hospitalarias [90]. Las ITUs se dividen en complicadas y no complicadas. Las no complicadas son las cistitis y las pielonefritis que afectan a las personas sanas, sin factores de riesgo y con el tracto urinario normal. Los principales factores de riesgo que determinan la ITU complicada son las alteraciones anatómicas y/o funcionales del tracto urinario, sondaje, instrumentación previa, estados de inmunosupresión y otras patologías de base.

2.2 Etiología

La etiología de la ITU depende de múltiples factores, tales como la edad, origen nosocomial o comunitario de la infección, presencia de sonda, ingresos y tratamientos antibióticos previos, etc. Aun así, el principal patógeno implicado en las ITUs es *Escherichia coli*, seguido por otros bacilos Gram-negativos, como *Klebsiella pneumoniae* o *Proteus mirabilis*. La creciente resistencia a los antibióticos entre este grupo de microorganismos hace evidente la necesidad de acelerar tanto la identificación como la detección de resistencias de los uropatógenos. Las bacterias Gram-positivas (*Enterococcus* spp., *Staphylococcus saprophyticus*, etc.) son menos frecuentes. *Staphylococcus aureus* y *Candida* spp. se aíslan sobre todo en el caso de infección hematógena. En los últimos años se han descrito más probables uropatógenos, cuyo papel en la ITU todavía se está discutiendo, tales como *Actinotignum schaalii*, *Aerococcus* spp., *Oligella* spp., entre otros. La particularidad de estos microorganismos es que no crecen en muchos de los medios que habitualmente se usan para urocultivo (CLED (*Cysteine lactose electrolyte deficient*), placas cromogénicas, etc.) y requieren los medios no selectivos, como el agar sangre. La aplicación de nuevas técnicas de diagnóstico permite detectar los microorganismos que no crecen bien en los medios habituales. Los principales microorganismos aislados en urocultivo durante el año 2019 en el Hospital Clínic se resumen en la **Figura 12**.

Teniendo en cuenta que el foco urinario es uno de los principales focos de bacteriemia y sepsis y que la densidad bacteriana en la orina suele ser alta, la identificación directa a partir de la muestra de orina tiene un elevado potencial para obtener el diagnóstico etiológico antes de que se positivice el hemocultivo en el caso de bacteriemias y sepsis del origen urinario.

Introducción

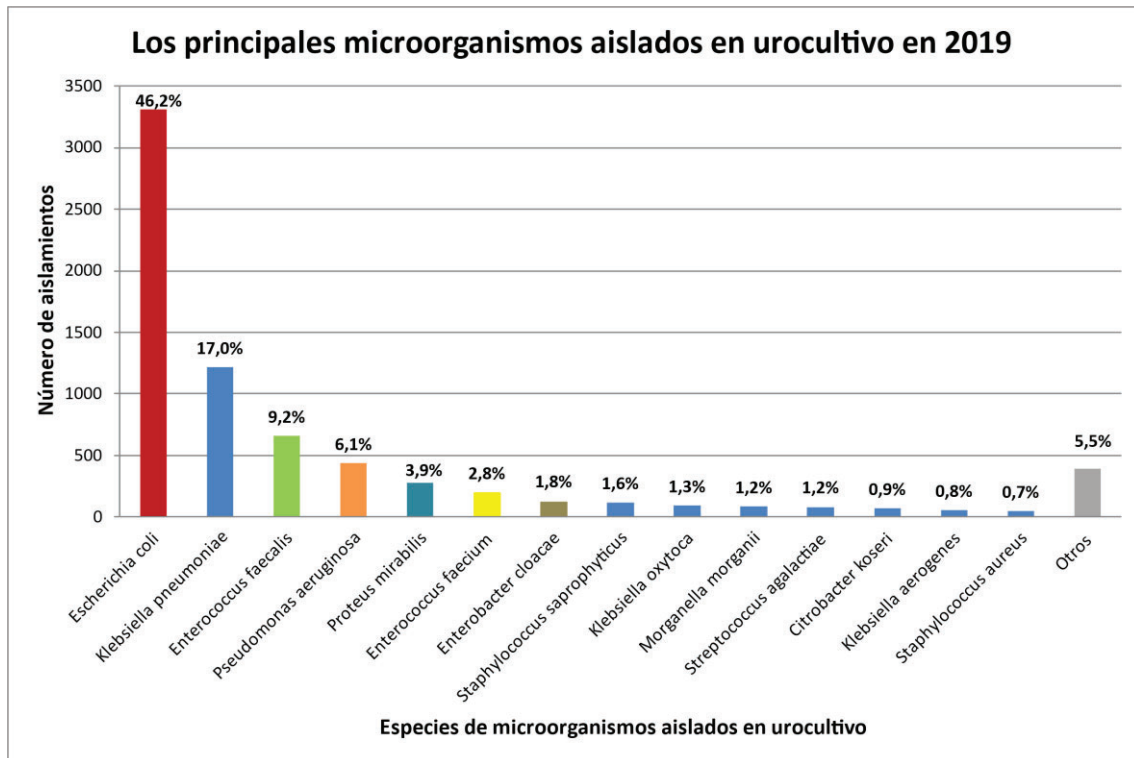


Figura 12. Principales agentes etiológicos aislados en urocultivo durante 2019 en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínic de Barcelona.

2.3 Métodos diagnósticos

2.3.1 Técnicas de cribado

El procesamiento de las muestras de orina empieza por el análisis de los parámetros que pueden ayudar tanto para valorar mejor los resultados del cultivo, como para optimizar la gestión de muestras en el laboratorio. Los principales parámetros de interés para el diagnóstico de ITU son nitritos, esterasa leucocitaria y hemoglobina. A su vez, el análisis del sedimento urinario permite valorar con mayor fiabilidad la presencia de leucocituria, hematuria, cilindros, etc. El sedimento urinario se realiza de manera manual, semiautomatizada o automatizada. En los últimos años el análisis de sedimento urinario mediante la citometría de flujo se ha usado ampliamente para cribar las muestras antes de realizar el cultivo, basándose en los recuentos de bacterias y leucocitos detectados (**Tabla 2**). Gracias a que la citometría es capaz de proporcionar el recuento de bacterias por microlitro, se pueden detectar aquellas muestras cuya densidad bacteriana permite aplicar las técnicas de diagnóstico rápido. Los nuevos *softwares* de citómetros incorporan avisos sobre la naturaleza de bacterias detectadas: bacilos vs. cocos o Gram-negativas vs. Gram-positivas.

Introducción

Tabla 2. Puntos de corte encontrados en distintos estudios para reducir la siembra de muestras de orina [91-97].

Estudio	Número de muestras	Mujeres (%); muestras hospitalarias (%)	Criterio(s) de positividad del cultivo	Punto(s) de corte de recuento de bacterias y leucocitos	Sensibilidad (%); reducción de siembra (%)
Pierretti <i>et al.</i> 2010	703	70%; 18,2%	$\geq 10^4$ UFC/mL	65 bacterias/ μ L y 100 leucocitos/ μ L	98%; 43%
Jolkonnen <i>et al.</i> 2010	1.094	64,7%	<i>Finnish national guidelines</i> (dependiendo de tipo de paciente y recogida de la muestra)	Global: 405 bacterias/ μ L y 16 leucos/ μ L Hombres adultos: 40 bacterias/ μ L y 17 leucocitos/ μ L Mujeres adultas: 630 bacterias/ μ L y 10 leucocitos/ μ L Niños (<16 años): 40 bacterias/ μ L y 17 leucocitos/ μ L	97% (global); 64,5% 96,8% (hombre); 72,1% 96% (mujer); 60,5% 97% (niños); 70,3%
Broeren <i>et al.</i> 2011	1.577	62%; 56,8%	1. No crecimiento 2. $\geq 10^4$ UFC/mL 3. $\geq 10^5$ UFC/mL	26 bacterias/ μ L con el criterio 1 39 bacterias/ μ L con el criterio 2 230 bacterias/ μ L con el criterio 3	95%; 20% (criterio 1) 95%; 28% (criterio 2) 95%; 52% (criterio 3)
Martín Gutierrez <i>et al.</i> 2015	346	43%; 0%	1. $\geq 10^4$ UFC/mL hombres 2. $\geq 10^5$ UFC/mL mujeres	≥ 200 bacterias/ μ L	99,1%; 60,2%
Íñigo M <i>et al.</i> 2016	1.934	60.8%; 51,2%	$\geq 10^2$ UFC/mL con clínica de ITU	460 bacterias/ μ L y 40 leucocitos/ μ L	98,1%; 57,2%
Geerts <i>et al.</i> 2016	7.322	56%; 40%	1. $\geq 10^5$ UFC/mL 2. Cualquier recuento siempre que el cultivo se valoró como positivo y	200 bacterias/ μ L con el criterio 1 200 bacterias/ μ L con el criterio 2 (mujer)	96,9%; 49% (criterio 1) 93,5%; 34% (criterio 2 mujer) 86,4%; 71%

Introducción

			se realizó antibiograma.	400 bacterias/ μ l con el criterio 2 (hombre)	(criterio 2 hombre)
Monsen <i>et al.</i> 2017	1.312	68,3%; 79,4%	<i>European Guidelines</i> (dependiendo de tipo de paciente y recogida de la muestra)	No hay un punto de corte fijo, sino que se ha usado LDA (Análisis discriminante lineal) para la combinación de bacterias y leucocitos	95%; 42%

2.3.2 Cultivo y estudio de la sensibilidad antibiótica

El cultivo de orina se realiza de manera cuantitativa mediante un asa calibrada (de 1 o 10 μ L). Los medios de cultivo que se utilizan habitualmente son agar CLED, agar sangre, agar Mac Conkey o medios cromogénicos. Las placas se incuban entre 18 h y 48 h a 35-37°C en aerobiosis o en una atmósfera con un 5 % de CO₂. Una vez se obtiene el crecimiento de un microorganismo en los medios de cultivo se procede a la identificación. La identificación se lleva a cabo mediante las técnicas basadas en las pruebas bioquímicas (manuales o automatizadas) o mediante espectrometría de masas tipo MALDI-TOF. Una vez identificado el microorganismo se realiza el estudio de sensibilidad. Las técnicas convencionales incluyen el método de difusión con disco (Kirby-Bauer) y sistemas automáticos de microdilución. El método de difusión con disco es más laborioso, requiere más tiempo para su realización y lectura y no permite obtener las CMI. Pero por otro lado es el método más flexible, que permite una rápida adaptación a los cambios en la interpretación de los puntos de corte o la introducción de nuevos antibióticos. Los paneles automatizados se leen y se interpretan automáticamente y sólo se necesita una revisión por parte de usuario. El proceso convencional de procesamiento de la orina, incluyendo el cultivo, la identificación y el estudio de sensibilidad requiere entre dos y tres días. Las técnicas que se van a discutir a continuación, aplicadas a la muestra directa permiten obtener los resultados microbiológicos relevantes el mismo día de la obtención de muestra.

2.3.3 EM MALDI-TOF para la identificación directa y la detección de resistencias

A. Identificación directa

La aplicación de la espectrometría de masas para la identificación de microorganismos directamente en la muestra clínica tiene unas limitaciones importantes: la densidad bacteriana en la muestra debe ser alta para permitir aplicar esta técnica que requiere $\geq 10^5$ células, se necesita un volumen suficiente de la muestra para recuperar los microorganismos; la muestra no puede ser muy densa o purulenta ya que no se podrá conseguir separar los microorganismos de las células humanas (principalmente leucocitos). La muestra de orina presenta una serie de ventajas en comparación con otro tipo de muestras clínicas: suele haber mucho volumen, la densidad bacteriana suele ser $\geq 10^4$ - 10^5 UFC/mL y muy rara vez son

Introducción

muestras espesas. Desde 2010 se publicaron una serie de trabajos que han demostrado que EM MALDI-TOF es un método fiable para la identificación directa [98-101]. En estos estudios previos se ha visto que el rendimiento y la fiabilidad de la identificación depende del inóculo de microorganismos presentes en la orina con una concordancia muy buena en el caso de las orinas con recuentos de $\geq 10^5$ UFC/mL en cultivo; el procesamiento de mayores volúmenes de orina para recuperar microorganismo proporciona mejores resultados; las técnicas de extracción de proteínas aplicadas al sedimento bacteriano aumentan las tasas de identificación fiable; se puede aplicar técnicas adicionales (filtración, tampones de lisis, etc.) para mejorar la recuperación de microorganismos.

Los primeros estudios se realizaron aplicando EM MALDI-TOF a las muestras positivas por cultivo, es decir de manera retrospectiva. Teniendo en cuenta que la orina es la muestra más común en el laboratorio de microbiología clínica y que la proporción de muestras negativas por cultivo suele ser elevada, para aplicar la identificación directa de manera prospectiva es necesario utilizar alguna técnica que permita identificar rápidamente las muestras con recuentos bacterianos altos. Una de las técnicas más comunes es la tinción de Gram. Se usa en el diagnóstico de ITU desde hace mucho tiempo y ha demostrado su utilidad especialmente en los pacientes con sepsis de origen urinario y en los niños de corta edad con valores predictivos positivos aceptables. Esta técnica se aplica a la orina sin centrifugar. En este caso, la observación de una o más bacterias por campo de 1000 aumentos se correlaciona bien con los recuentos de $\geq 10^5$ UFC/mL. Aparte de identificar las orinas con densidad bacteriana alta, permite observar la presencia de más de un morfotipo, lo que descartaría la aplicación de espectrometría de masas, ya que las muestras polimicrobianas son una de las limitaciones de la técnica. En uno de los estudios publicados se ha usado la tinción de Gram como método de cribado previo a la identificación directa [101]. La principal desventaja es que es un método laborioso cuando se trata de un gran número de muestras, como en el caso de las orinas. Además, la estimación de densidad de microorganismos es subjetiva y requiere tiempo. La citometría de flujo es un método que permite el procesamiento rápido, automatizado o semi-automatizado de muestras y que además proporciona los recuentos de microorganismos por microlitro. La buena concordancia con los resultados del cultivo convencional ha permitido usar esta técnica como cribado para sembrar o no las muestras, tal y como se ha explicado anteriormente. Los avisos sobre la morfología (bacilos o cocos) o naturaleza (Gram-positivos o Gram-negativos) son mucho más fiables en el caso de los bacilos Gram-negativos, que son uropatógenos más comunes en comparación con los cocos Gram-positivos. La combinación de citometría de flujo con EM MALDI-TOF puede ser una herramienta muy útil para unas muestras o pacientes seleccionados, acortando de manera significativa el tiempo de respuesta del laboratorio.

En la **Tabla 3** se resumen algunos de los trabajos publicados en la materia de la identificación directa a partir de las muestras de orina.

Introducción

Tabla 3. Condiciones utilizadas en algunos de los estudios donde se ha realizado la identificación directa mediante EM MALDI-TOF a partir de la muestra de orina [48, 98, 99, 101].

Estudio	Método de cribado	Volumen de orina	Extracción de proteínas previa identificación
Ferreira <i>et al.</i> 2010	Citometría de flujo	4 mL	Si, en el caso de no obtener ID fiable sin extracción
Wang <i>et al.</i> 2013	Citometría de flujo	1 mL	Si, extracción modificada
March Roselló <i>et al.</i> 2013	Citometría de flujo	5 mL	Si
Burillo <i>et al.</i> 2014	Tinción de Gram	15 mL	Si, en el caso de no obtener ID fiable sin extracción

B. Detección de resistencias

Aparte de la identificación, EM MALDI-TOF ha demostrado su utilidad como un método de detección de resistencias. Una de las técnicas más estudiadas consiste en observar la hidrólisis de antibiótico en presencia de una bacteria productora de la enzima correspondiente. El ensayo consiste en suspender el microorganismo en cuestión en una solución de antibiótico diana, incubar durante un tiempo determinado y posteriormente analizar los espectros de la parte sobrenadante (sin bacteria) donde está el antibiótico (**Figura 13**). Cada antibiótico genera unos picos específicos para su forma intacta e hidrolizada.

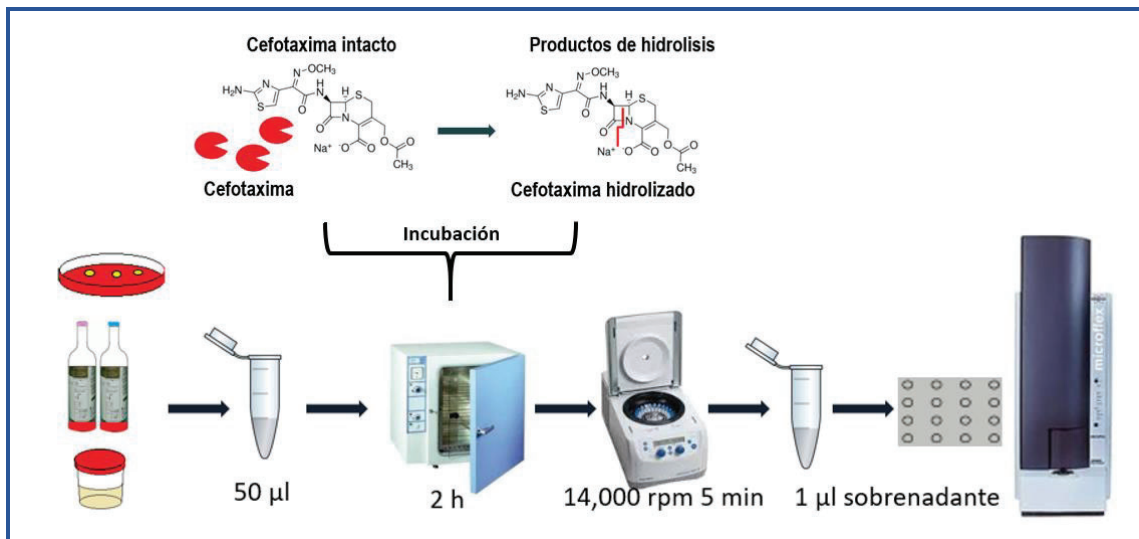


Figura 13. Esquema de detección de cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) mediante EM MALDI-TOF.

En los estudios que se han centrado en la detección de carbapenemasas se han probado distintos carbapenems y condiciones de ensayo [102-104]. Los picos de las distintas formas de antibiótico intacto e hidrolizado están bien descritos en la literatura. En la **Figura 14** se observa el ejemplo de picos que podemos encontrar en el caso de ensayo con meropenem.

Introducción

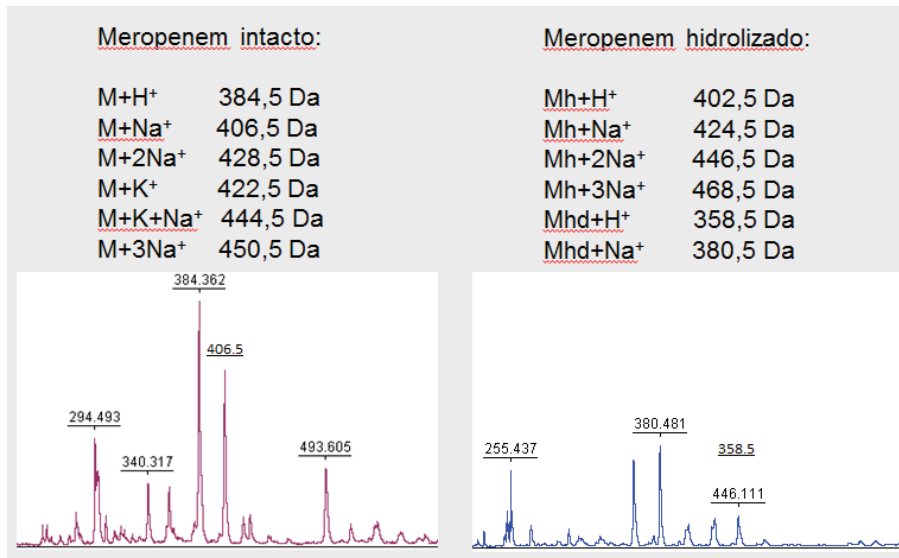


Figura 14. En la parte izquierda se presentan los picos de meropenem intacto y sus sales correspondientes. En la parte derecha se presentan los picos de formas hidrolizadas de meropenem y sus sales correspondientes. (M, meropenem; H⁺, un protón; Na⁺, sodio; K⁺, potasio; Mh, meropenem hidrolizado; Mhd, meropenem hidrolizado y descarboxilado).

En el caso de detección de carbapenemasas, se ha evaluado la técnica de EM MALDI-TOF tanto a partir de hemocultivos positivos como a partir de orina directa [105-107]. La detección de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) mediante EM MALDI-TOF también ha demostrado muy buen rendimiento, sobre todo para el grupo CTX-M, el de mayor prevalencia en nuestro medio [108, 109].

2.3.4 Técnicas moleculares de identificación y de detección de resistencias a partir de muestra directa de orina

En el caso de la muestra de orina la aplicación de las técnicas moleculares tiene muchas más limitaciones que en el caso de otro tipo de muestras. La gran variedad de especies que producen ITU y deberían ser identificadas, es una de las más importantes. La presencia de flora contaminante, la necesidad de cuantificación, el gran número de orinas que llegan a diario al laboratorio, los costes de las técnicas moleculares y la necesidad de equipamiento son otras limitaciones que condicionan su aplicación rutinaria. Aun así, hay estudios donde se evaluaron este tipo de técnicas para el diagnóstico de ITU [110]. Teniendo en cuenta que el patógeno más común es *E. coli*, algunos autores han diseñado y evaluado las técnicas de PCR (cualitativas o cuantitativa) para detectar este patógeno solo o con otros más frecuentes en ITU con resultados aceptables [111, 112]. Recientemente se han publicado trabajos donde se ha utilizado DNA NGS (*next-generation sequencing*) comparado con urocultivo convencional [113-115]. En cuanto a la detección de resistencias, la principal desventaja es que permiten detectar solo los mecanismos concretos que pretendemos buscar o que estén incluidos en un panel determinado. Algunas de estas técnicas han sido evaluadas en las muestras directas de orina con buenos resultados para un mecanismo en concreto [116, 117]. Faltan estudios clínicos para ver qué impacto tiene la aplicación de los métodos rápidos de detección de ciertas resistencias en la muestra directa de orina: cambios de tratamientos, impacto sobre la morbi-mortalidad, coste-eficiencia, etc.

Introducción

2.3.5 Otras técnicas de detección de resistencia aplicadas directamente a la orina

Técnicas colorimétricas

La mayoría de las técnicas colorimétricas comerciales o caseras se basan en el procedimiento descrito por Nordmann y Poirel: Carba NP test para la detección de carbapenemasas en bacilos Gran-negativos [118]. Más tarde los mismos autores han descrito una prueba semejante para la detección de BLEE: ESBL NDP test. La detección se basa en el cambio de pH que se produce en el caso de hidrólisis de antibiótico diana en presencia de una β -lactamasa, y se detecta mediante un indicador de color. Las técnicas de Carba NP y ESBL NDP usan como indicador el rojo fenol, que cambia de rojo a amarillo si baja el pH (Figura 15). Estas técnicas han sido evaluadas tanto a partir de colonias como a partir de hemocultivos positivo o incluso a partir de la muestra directa de orina [119-121].

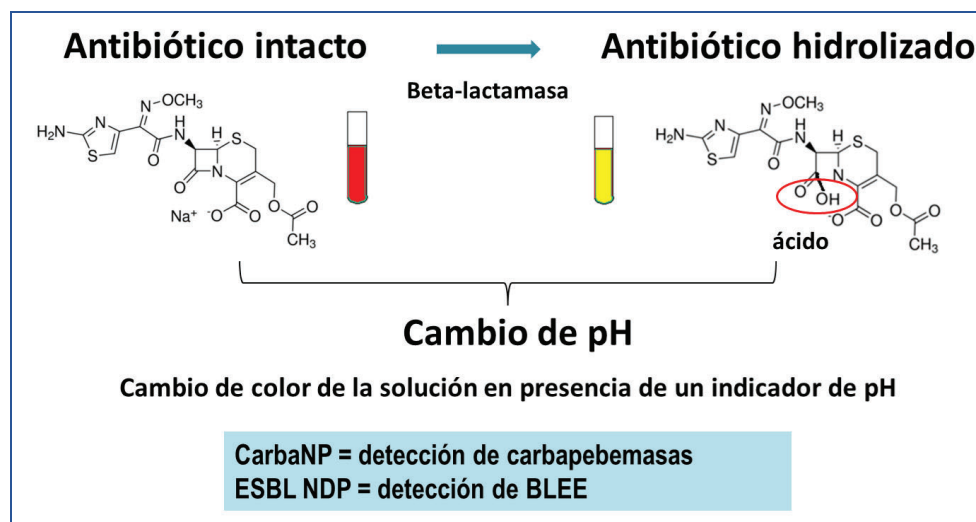


Figura 15. El fundamento de las técnicas colorimétricas.

Inmunocromatografía (lateral flow)

Los ensayos de inmunocromatografía (ICT) se basan en la detección de la reacción antígeno-anticuerpo sobre el papel de nitrocelulosa. Estos ensayos presentan varias ventajas en comparación con otras técnicas rápidas de detección de resistencias: 1. Presentan alta sensibilidad y especificidad, 2. Son fáciles de usar y no requieren de equipamiento ni material adicional aparte de los reactivos del kit, 3. Son de fácil lectura e interpretación, 4. Los resultados están disponibles en 15 minutos, 5. En el mercado existen ensayos que detectan simultáneamente varios mecanismos de resistencia, 6. Suelen ser más económicos que las técnicas moleculares y 7. Detectan la producción del enzima que mientras que los moleculares detectan el gen. Comercialmente están disponibles varias pruebas para la detección de carbapenemasas y BLEE. Estos ensayos están validados para trabajar a partir de colonias de microorganismos crecidos en diferentes medios de cultivo, aunque hay estudios que apuntan que pueden ser usados a partir de hemocultivo positivo. En cuanto a la detección de β -lactamasas a partir de muestras directas de orina, hay pocos datos disponibles hasta la fecha. En nuestro centro se ha evaluado el ensayo de NG-Test CTX-M grupo 1 y MULTI a partir de la orina directa, aplicando el mismo protocolo de preparación de muestra descrito en el apartado anterior para la identificación directa mediante EM MALDI-TOF. Aunque no hubo resultados

Introducción

falsos positivos, sí que se detectó algún resultado falso negativo, comparando con la detección fenotípica convencional, probablemente debido a la presencia de tipos de β -lactamasa no incluidos en el ensayo. En resumen, las técnicas basadas en la inmunocromatografía pueden ser muy útiles para la detección de BLEE y carbapenemasas en la muestra directa, si se toman en cuenta las limitaciones de cada una de ellas y también la epidemiología local.

En la **Figura 16** se resumen las técnicas que pueden ser aplicadas a la muestra directa de orina y de esta manera acortar el tiempo hasta el resultado.

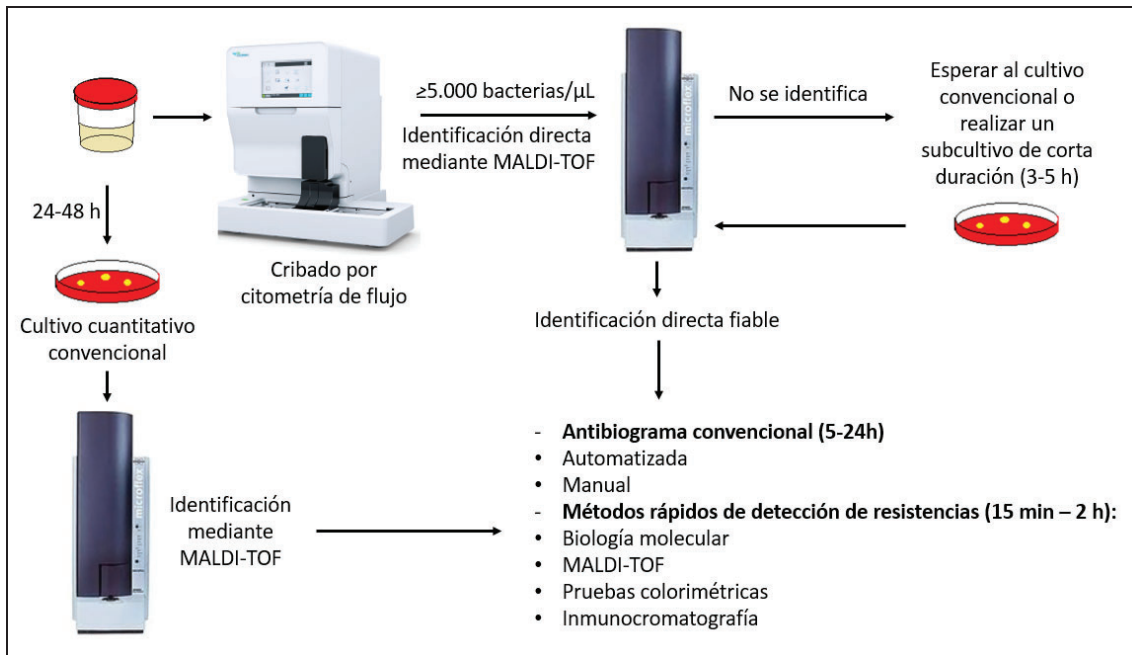


Figura 16. Técnicas que pueden ser utilizadas para el diagnóstico microbiológico de ITU a partir de muestra directa o cultivo, y los tiempos hasta el resultado.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis: En los últimos años la necesidad de un diagnóstico rápido en el ámbito de las enfermedades infecciosas se ha hecho muy evidente, debido principalmente a dos factores: 1. Los avances tecnológicos, sobre todo en el área de diagnóstico molecular y de proteómica; 2. Los estudios que han demostrado claramente que el correcto manejo y el adecuado tratamiento antimicrobiano de los pacientes graves durante las primeras horas tiene un impacto directo en la mortalidad y la supervivencia. Nuestra hipótesis consiste en que los nuevos métodos moleculares, disponibles comercialmente, así como la aplicación de la EM MALDI-TOF directamente a las muestras clínicas permiten acortar los tiempos de respuesta y pueden ser incorporados como técnicas complementarias al diagnóstico convencional en los laboratorios de microbiología clínica, produciendo un importante impacto clínico.

Objetivo general: Evaluar las técnicas de biología molecular y proteómica para la identificación de microorganismos a partir de muestras directas de sangre y orina, respectivamente.

Del objetivo general derivan cinco objetivos específicos, dependiendo del tipo de muestra a la que se aplican las técnicas de diagnóstico:

1. Identificación de patógenos causantes de bacteriemia mediante técnicas basadas en biología molecular a partir de la muestra directa de sangre

1.1 Evaluar la utilidad de GeneXpert MRSA/SA BC aplicado a la sangre directa extraída a través del catéter para el diagnóstico de bacteriemia estafilocócica relacionada con catéter. *Artículo 1.*

1.2 Evaluar la técnica MagicPlex para el diagnóstico de bacteriemia a partir de sangre directa. *Artículo 2.*

2. Identificación de patógenos causantes de ITU mediante EM MALDI-TOF a partir de la muestra directa de orina

2.1 Proponer y evaluar un protocolo de identificación directa a partir de la muestra de orina mediante EM MALDI-TOF. *Artículo 3*

2.2 Evaluar el protocolo propuesto para la identificación directa a partir de la muestra de orina mediante EM MALDI-TOF en un estudio multicéntrico. *Artículo 4*

2.3 Implementar el protocolo de identificación directa combinado con las técnicas rápidas de detección de BLEE y carbapenemasas en la rutina de diagnóstico de ITU en el Hospital Clínic y analizar su impacto clínico. *Manuscrito 5*

RESULTADOS

III. RESULTADOS

1. Identificación de patógenos causantes de bacteriemia mediante técnicas basadas en biología molecular a partir de la muestra directa de sangre

1.1 Artículo 1

Rapid Diagnosis of Staphylococcal Catheter-Related Bacteraemia in Direct Blood Samples by Real-Time PCR

Autores: **Yuliya Zboromyrska**, Cristina De la Calle, Marcelo Soto, Laura Sampietro-Colom, Alex Soriano, Míriam José Álvarez-Martínez, Manel Almela, Francesc Marco, Ruth Arjona, Nazaret Cobos-Trigueros, Laura Morata, José Mensa, José Antonio Martínez, Aurea Mira, Jordi Vila

Revista: PLoS One. 2016 Aug 29;11(8): e0161684. doi: 10.1371/journal.pone.0161684.

Factor de Impacto: 2.806 (2016) – Q1 (Scimago, Multidisciplinary); Q1 (Scimago, Medicine (Miscellaneous)). (Objetivo 1).

Objetivos

El objetivo del estudio ha sido estudiar la utilidad de un ensayo molecular para detectar bacteriemias estafilocócicas relacionadas con catéter y evaluar el coste-efectividad para su potencial implementación en el diagnóstico de rutina.

Métodos

Se han incluido prospectivamente 92 muestras de pacientes con sospecha de bacteriemia relacionada con catéter (BRC). De cada paciente se han obtenido dos parejas de hemocultivos (uno a través del catéter y otro mediante venopunción) y una muestra de sangre extraída a través del catéter (4 mL en un tubo con EDTA) para realizar la detección molecular, usando el ensayo GeneXpert MRSA/SA BC. Para el estudio de coste-efectividad se ha utilizado el árbol de decisiones como un modelo analítico determinístico. Las variables incluidas para el análisis han sido las siguientes: prevalencia de BRC causada por *Staphylococcus aureus* y estafilococos coagulasa negativos meticilina resistentes (MR-CoNS), sensibilidad y especificidad de GeneXpert, probabilidad de complicaciones hematógenas en el supuesto de retirada precoz del catéter *versus* no retirada a la espera de resultados de hemocultivos y probabilidad de muerte relacionada con BRC. Se ha calculado la razón incremental de coste-efectividad (RCEI) y, finalmente, se ha usado el método Monte Carlo para el análisis de sensibilidad probabilístico para determinar la robustez de los resultados.

Resultados

Se han detectado 16 BRC causadas por estafilococos en 92 pacientes con sospecha clínica de BRC. La prevalencia de BRC estafilocócica en nuestra población de estudio ha sido del 17,4%. GeneXpert ha detectado 14 de los 16 casos (87,5%), incluidas 4 bacteriemias por *S. aureus* meticilina sensible (MSSA) y 10 BRC por MR-CoNS. Dos resultados falsos negativos por GeneXpert correspondían a dos BRC causadas por MR-CoNS. Ningún paciente ha presentado

RESULTADOS

metástasis sépticas. Tampoco hubo mortalidad asociada a BRC en nuestra población. GeneXpert ha sido negativo en todos los casos con hemocultivos positivos para estafilococos coagulasa negativos que se consideraron contaminantes (n=14). GeneXpert ha sido positivo en 6 muestras con hemocultivo negativo. En cuatro de estos seis casos (66,7%), con resultado presuntamente falso positivo de GeneXpert, los pacientes habían recibido tratamiento antibiótico activo en las últimas 24 h. El tiempo hasta el resultado en el caso de GeneXpert ha sido de tan solo una hora desde la recepción de muestra en el laboratorio. La sensibilidad y especificidad de GeneXpert han sido de 87,5% (IC 95%: 60,4–97,8) y 92,1% (IC 95%: 83–96,7), respectivamente, comparando con el hemocultivo convencional. La sensibilidad para BRC causadas por *S. aureus* ha sido del 100%. En cuanto al análisis de coste-efectividad, el coste incremental de la utilización de GeneXpert ha sido de 31€ por paciente, mientras que RCEI de GeneXpert combinado con hemocultivos versus hemocultivos solos ha sido de 180€ por año de vida ganado.

Conclusiones

GeneXpert puede ser aplicado a la muestra directa de sangre extraída a través del catéter para detectar BRC causadas por *S. aureus* y MR-CoNS. El análisis con GeneXpert requiere tan solo una hora hasta obtener el resultado. Este método será coste-efectivo sobre todo en las áreas de alta prevalencia de BRC estafilocócica.

RESEARCH ARTICLE

Rapid Diagnosis of Staphylococcal Catheter-Related Bacteraemia in Direct Blood Samples by Real-Time PCR

Yuliya Zboromyrska¹✉, Cristina De la Calle²✉, Marcelo Soto³, Laura Sampietro-Colom³, Alex Soriano², Miriam José Alvarez-Martínez¹, Manel Almela¹, Francesc Marco^{1,4}, Ruth Arjona¹, Nazaret Cobos-Trigueros², Laura Morata², José Mensa², José Antonio Martínez², Aurea Mira⁵, Jordi Vila^{1,4*}

1 Department of Clinical Microbiology, Biomedical Diagnostic Centre (CDB), Hospital Clínic, School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Department of Infectious Diseases, Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **3** Health Technology Assessment Unit, Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **4** ISGlobal, Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **5** CDB, Hospital Clínic, School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

✉ These authors contributed equally to this work.

* jvila@clinic.ub.es



 OPEN ACCESS

Citation: Zboromyrska Y, De la Calle C, Soto M, Sampietro-Colom L, Soriano A, Alvarez-Martínez MJ, et al. (2016) Rapid Diagnosis of Staphylococcal Catheter-Related Bacteraemia in Direct Blood Samples by Real-Time PCR. PLoS ONE 11(8): e0161684. doi:10.1371/journal.pone.0161684

Editor: Alex Friedrich, University Medical Center Groningen, NETHERLANDS

Received: January 5, 2016

Accepted: August 10, 2016

Published: August 29, 2016

Copyright: © 2016 Zboromyrska et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was funded by Cepheid (Sunnyvale, CA; USA). This study was supported by grant 2014SGR0653 from the Departament de Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya, by the Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III, co-financed by European Regional Development Fund (ERDF) "A Way to Achieve Europe," the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015). The funders had no role in study

Abstract

Catheter-related bacteremia (CRB) is an important cause of morbidity and mortality among hospitalized patients, being staphylococci the main etiologic agents. The objective of this study was to assess the use of a PCR-based assay for detection of staphylococci directly from blood obtained through the catheter to diagnose CRB caused by these microorganisms and to perform a cost-effectiveness analysis. A total of 92 patients with suspected CRB were included in the study. Samples were obtained through the catheter. Paired blood cultures were processed by standard culture methods and 4 ml blood samples were processed by GeneXpert-MRSA assay for the detection of methicillin-susceptible (MSSA) or methicillin-resistant (MRSA) *Staphylococcus aureus*, and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MR-CoNS). Sixteen CRB caused by staphylococci were diagnosed among 92 suspected patients. GeneXpert detected 14 out of 16 cases (87.5%), including 4 MSSA and 10 MR-CoNS in approximately 1 hour after specimen receipt. The sensitivity and specificity of GeneXpert were 87.5% (CI 95%: 60.4–97.8) and 92.1% (CI 95%: 83–96.7), respectively, compared with standard culture methods. The sensitivity of GeneXpert for *S. aureus* was 100%. Regarding a cost-effectiveness analysis, the incremental cost of using GeneXpert was of 31.1€ per patient while the incremental cost-effectiveness ratio of GeneXpert compared with blood culture alones was about 180€ per life year gained. In conclusion, GeneXpert can be used directly with blood samples obtained through infected catheters to detect *S. aureus* and MR-CoNS in approximately 1h after sampling. In addition, it is cost-effective especially in areas with high prevalence of staphylococcal CRB.

design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We received fundings from Cepheid, however, this does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Competing Interests: We received funding from Cepheid, however, this does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Introduction

Catheter-related bloodstream infection (CRBSI) is an important cause of morbidity and mortality among hospitalized patients. Staphylococci are the main aetiological agents of CRBSI [1]. Bacteremia due to *Staphylococcus aureus* is a severe disease with a high risk of complications and a high mortality rate [2]. In addition, coagulase-negative staphylococci (CoNS) are also important aetiological agents of CRBSI [3]. Early adequate antibiotic treatment of staphylococcal bacteremia is associated with a better prognosis [4] and early removal of the catheter reduces the risk of developing haematogenous complications [5]. However, the conventional blood culture (BC) method usually requires more than 16 h for bacterial growth detection in the case of staphylococci [6]. To address this problem, several molecular assays have been developed in recent years for direct detection of pathogens in whole blood samples [7]. Although these assays provide results more rapidly, the low bacterial density in blood during bacteremia (1–10 CFU/mL) often results in low sensitivity [8, 9]. However, the intraluminal density of bacteria in CRBSI cases is high (>1,000 CFU/ml) [10–12], which explains the shorter time-to-positivity (TTP) of BC obtained from a catheter compared to those from a peripheral vein [13]. We therefore hypothesized that a rapid Real-Time Polymerase Chain Reaction (rt-PCR)-based assay performed in blood obtained through the infected catheter would have a high sensitivity for detecting the presence of microorganisms causing CRBSI. The main objective of this study was to assess the use of the GeneXpert MRSA/SA BC assay (Cepheid, Sunnyvale, USA) to detect methicillin-susceptible (MSSA), methicillin-resistant (MRSA) *S. aureus*, and methicillin-resistant CoNS (MR-CoNS) directly from blood obtained through the catheter and to perform a cost-effectiveness analysis comparing this new test to the traditional BC method.

Materials and Methods

Sample Collection

From October 2012 to October 2014 we collected 92 whole blood samples from 92 patients in whom CRBSI was suspected during hospitalization in our centre, a 700-bed university hospital. All patients were prospectively followed until a definitive source of bacteremia was established. Criteria for suspecting CRBSI included: sudden onset of fever with local inflammatory signs at the catheter insertion site, fever without local signs or any other evident source of infection. In all cases, 4 ml of whole blood were obtained through the catheter and submitted to the Microbiology laboratory in a sterile EDTA-containing tube for the GeneXpert assay and blood samples for paired BC (about 10 ml for a single BC vial) were drawn sequentially from the catheter and a peripheral vein without waiting between draws. Patients were included in the study during morning working time, and GeneXpert was performed within 1 hour before sample collection for BC in all cases.

The criteria of the definitive diagnosis of CRBSI were: isolation of the same microorganism from BCs obtained from the catheter and peripheral vein with a differential TTP of ≥ 2 hours or the isolation of the same microorganism from both a catheter tip and at least one percutaneous BC [1].

Microorganisms isolated from positive BC were considered as contaminants if commensal bacteria were detected in only one set of paired BC or different CoNS were isolated from each set of BC and another source of fever was identified.

The study was approved by the Hospital Clinic of Barcelona Ethics Committee (study no. 2012/7798). Patient records were anonymized and de-identified prior analysis. No informed consent was considered necessary for this study.

Routine microbiological techniques

BCs were collected and transported to the laboratory in less than 2 hours. BCs vials were incubated in BACTEC FX (Becton Dickinson, MD, USA) for a maximum of 120 h. In case of positivity, Gram staining and subculture on appropriate solid media were performed. The TTP of each BC bottle was recorded. If the catheter was removed, the Maki roll-on semiquantitative method for catheter tip culture was used. The final identification of bacterial species was achieved using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Routine antimicrobial susceptibility included the Phoenix system (Becton Dickinson, MD, USA) for *S. aureus* and the disk diffusion method for CoNS. Results of susceptibility testing were interpreted according to EUCAST guidelines (<http://www.eucast.org>).

The GeneXpert assay

To recover bacteria from whole blood, the EDTA collection tube was centrifuged at $430 \times g$ for 5 min and then the supernatant was centrifuged at $15,600 \times g$ for 2 min. The pellet obtained was resuspended in 100 μ l of sterile saline solution (0.9% NaCl) and used for the GeneXpert test according to the manufacturer's instructions. The GeneXpert used was Xpert MRSA-SA BC G3 Version 24. GeneXpert was considered positive for MR-CoNS if only the methicillin resistance gene (*mecA*) was detected; positive for MSSA if only the staphylococcal protein A (*spa*) target was detected; and positive for MRSA if the *spa*, *mecA* genes and the staphylococcal chromosome genomic island (SCC*mec*) were identified.

The current cycle threshold (Ct) cut-off values of the GeneXpert assay were established for positive BCs containing high bacterial concentrations, with a valid maximum cycle for all three targets of 36. Since the expected bacterial inoculum in whole blood is much lower, two bacterial strains of *S. aureus* (MSSA and MRSA) were used to study the analytical detection limits of GeneXpert assay. Four millilitres of whole blood were spiked with bacteria to achieve three different concentrations (10, 100 and 1000 CFU/ml). The GeneXpert assay was performed in duplicate for each *S. aureus* strain and each bacterial concentration. Taking into account the results of the detection limits study, prolonged Ct values (>36) were also considered as positive.

Cost-effectiveness analysis

The information was not provided to the physician in charge of the patient. Therefore, we performed an analysis according to the sensitivity and specificity of the test and using previous literature about complications related with *S. aureus* catheter-related bacteremia [5].

A cost-effectiveness analysis (CEA) of using GeneXpert to detect CRBSI caused by *S. aureus* and MR-CoNS was performed. The comparator was the conventional BC method. The main clinical outcome considered was the expected number of life years gained. Costs were measured from the perspective of our hospital and were obtained from hospital sources. Differences in costs and life years between testing strategies were used to compute the incremental cost-effectiveness ratio (ICER).

A decision tree based on the standard clinical approach to CRBSI was developed. The tree was used to model outcomes following different strategies (Fig 1). Individuals enter the model as patients with suspected CRBSI. All patients are tested with conventional BC. Under the standard protocol (lower branch of the tree) all patients receive empirical wide-spectrum antibiotics and a fraction of patients have the catheter removed before BC results are available. The removal decision is initially based solely on clinical criteria. In patients tested with GeneXpert (upper branch) the catheter is removed depending on the test result, which is known before BC

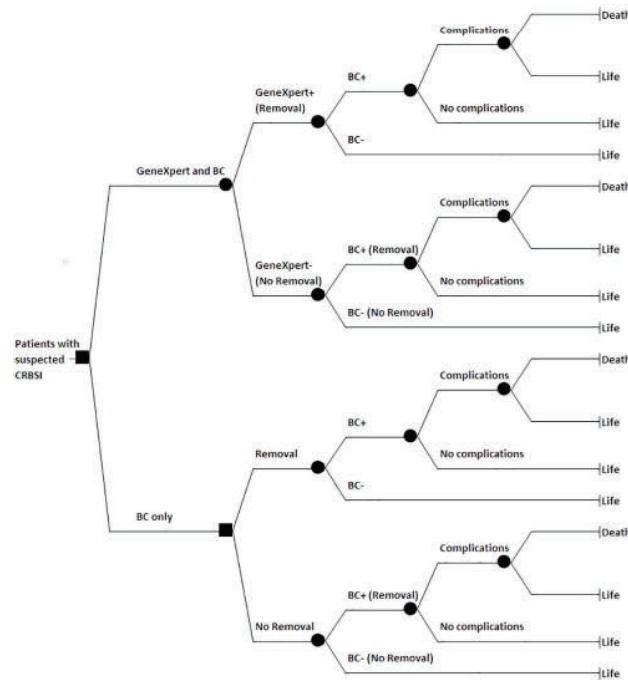


Fig 1. Decision tree for cost-effectiveness analysis. CRBSI, catheter-related bloodstream infection; BC, blood culture; -, negative; +, positive.

doi:10.1371/journal.pone.0161684.g001

results. The model assumes that a positive test leads to immediate catheter removal and patients are treated with specific antibiotics.

Variables determining the probability of each health outcome are: the prevalence rate of *S. aureus* and MR-CoNS among suspected patients, the sensitivity and specificity of the GeneXpert test, the probability of haematogenous complications when the catheter is removed on suspicion of CRBSI and when catheter removal is delayed until BC results are available, and the probability of death related to CRBSI. The [S1 File](#) provides a detailed description of the economic model and data sources.

Resources considered for the cost analysis included BC costs, the GeneXpert kit, technical staff, catheters, wide-spectrum and specific antibiotics; imaging (abdominal ultrasound, trans-thoracic echocardiogram, and PET scan) and the use of an intensive care unit in case of haematogenous complications. Treatment of co-morbidities or CRBSI caused by bacteria other than staphylococci was not considered in the cost analysis. One-way deterministic and multivariate probabilistic sensitivity analyses were performed to evaluate the robustness of CEA.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS software (SPSS, Chicago, IL). Differences were considered significant with a $P < 0.05$.

Results

The results of the analytical detection limits study were as follows: samples with 10 CFU/ml bacterial concentration were negative by GeneXpert for the three targets (*spa*, *mecA*, *SCCmec*); samples with 100 CFU/ml were positive but with prolonged Ct values (>36); samples with 1000 CFU/ml were positive with recommended Ct cut-off values (≤ 36) for the three targets.

We evaluated 92 blood samples obtained from 92 patients and processed with paired BCs and GeneXpert. The source of bacteremia was presumed to be a short peripheral intravenous catheter in 3 patients (3.2%), a peripherally inserted central catheter in 18 (19.6%), a central subclavian or jugular venous catheter in 63 (68.5%), and a tunnelled catheter in 8 patients (8.7%). The median (IQR) length of stay of patients was 13 (5–22) days and the median catheter dwell time was 12 (7–23) days.

BCs were positive in 34 patients. Eighteen cases did not fulfil the CRBSI definition. In 15 cases, the microorganisms isolated (14 CoNS and 1 viridans group *Streptococcus*) were considered contaminants. None of the 14 contaminant CoNS was detected by GeneXpert. No specific treatment was prescribed in these cases. Two patients had bacteremia by Gram-negative bacilli, with the suspected source being a urinary tract infection in both; and the other patient had bacteremia due to *Enterococcus faecium* from an unknown source.

A total of 16 CRBSI were diagnosed among 92 suspected patients, therefore, the prevalence of staphylococcal CRBSI in our study population was 17.4%. Among these 16 CRBSI no septic metastasis and no death related was observed. GeneXpert detected 14 out of 16 cases (87.5%), including 4 MSSA and 10 MR-CoNS. Table 1 shows the concordance between definitive CRBSI cases and GeneXpert results. There were 2 false negative GeneXpert results, both caused by MR-CoNS.

The median TTP in the BC of the 10 MR-CoNS detected by GeneXpert was 16.6h (IQR: 12.1–17.8), whereas the TTP of two MR-CoNS not detected by GeneXpert was 20.8 h and 24.1 h, respectively. Interestingly, the median TTP of not detected CoNS, including 14 contaminants and 2 false negatives, was 25.5 h (IQR: 20.0–41.8). The difference between the median TTP of MR-CoNS detected by GeneXpert (16.6 h) and those not detected (25.5 h) was statistically significant ($P = 0.005$).

On the other hand, GeneXpert identified 6 additional staphylococci (presumably false positives), including 3 MR-CoNS, 2 MSSA, and one sample, which offered two possibilities since the genes *mecA* and *spa* but not *SCCmec* were detected. These two possibilities are: 1) that both MR-CoNS and MSSA were present or 2) a MRSA strain with a *SCCmec* variant that was not detected. Indeed, the last option seems more plausible since the Ct values for both *mecA* and *spa* genes were similar with 37.7 and 37.5, respectively. Interestingly, 4 out of these 6 (66.7%) false positives were receiving active antibiotic treatment initiated at least 24 h before sampling. Briefly, one patient with MSSA was treated with ceftriaxone, the other patient with MSSA with meropenem and vancomycin; one patient with mixed MSSA and MR-CoNS was receiving meropenem and linezolid, and the other with MR-CoNS, received vancomycin. In contrast, among the 14 patients with GeneXpert results concordant to CRBSI diagnosis, only 2 (2/14, 14.3%) patients were receiving correct antimicrobial treatment for at least 24 h before sampling ($P = 0.037$).

Table 1. Comparison of results obtained by GeneXpert and convencional BC.

	No. of patients		
	Positive BC (%)	Negative BC (%)	Total (%)
GeneXpert positive	14 (15.2) ^a	6 (6.5) ^b	20 (21.7)
GeneXpert negative	2 (2.2)	70 (76.1) ^c	72 (78.3)
Total (%)	16 (17.4)	76 (82.6)	92 (100)

BC, blood culture

^a Including 4 *Staphylococcus aureus* detected.

^b Including 3 *S. aureus* detected.

^c Including 14 contaminant CoNS.

doi:10.1371/journal.pone.0161684.t001

The sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of GeneXpert in the present study were 87.5% (CI 95%: 60.4–97.8), 92.1% (CI 95%: 83–96.7), 70% (CI 95%: 45.7–87.2) and 97.2% (CI 95%: 89.4–99.5), respectively. The sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of GeneXpert for *S. aureus* were 100% (CI 95%: 39.6–100), 96.6% (CI 95%: 89.7–99.1), 57.1% (CI 95%: 20.2–88.2) and 100% (CI 95%: 94.6–100), respectively. The sensitivity of GeneXpert for MR-CoNS was 83.3%.

Cost-effectiveness results

Clinical outcomes. Using prevalence figures in the hospital and mortality rates published in the literature[14], the probability of death for patients with suspected CRBSI was estimated at 2.59% for patients tested with conventional BC alone and 1.59% for patients tested with GeneXpert (Table 2). Taking life expectancy of the general population in Spain as reference, the average discounted life expectancy (with a 3% discount rate) for patients tested with BC and with GeneXpert were 17.01 and 17.18 years, respectively. The use of GeneXpert allowed earlier detection of 14 cases of CRBSI among 92 suspected patients (15.2%).

Costs and cost-effectiveness. Costs per test were 60€ for one BC (on average, 15€ for one BC vial) and 67€ for the GeneXpert test. In the baseline analysis the cost per patient were 380.4 € and 411.5€, respectively. As mentioned in the methods section, these numbers only take into account testing and treatment of CRBSI caused by *S. aureus* and MR-CoNS. Because the use of GeneXpert is associated with a lower probability of haematogenous complications due to early detection and, therefore, lower treatment costs, the incremental cost of using GeneXpert is only of 31.1€ per patient. The incremental cost-effectiveness ratio (ICER) of GeneXpert compared with BC alone was about 180€ per life year gained. Similarly, the ICER per early detection was estimated at 204€.

The sensitivity analysis showed that the probability of haematogenous complication when the catheter removal is delayed, the joint prevalence of *S. aureus* and MR-CoNS and the sensitivity of the GeneXpert test were the parameters that introduced the highest variability in the ICER (Fig 2). For complication probability in case of delayed catheter removal, the ICER for the GeneXpert test ranged between 9€ per life year gained (when the probability = 42%) and 2,405€ (when probability = 13%). As regards the influence of prevalence, the ICER for the GeneXpert test ranged between minus 46€ per life year gained (i.e., dominance of GeneXpert) when the prevalence rate was 50% and 435€ per life year gained when the prevalence was lower (i.e., 10%). Changes in sensitivity also affected ICER, which varied from 124€ to 470€ per life

Table 2. Cost-effectiveness results (base case).

	GeneXpert and BC	Only BC	Difference
Clinical outcomes			
Death probability	1.59%	2.59%	-1.00%
Expected Life years (discounted)	17.183	17.010	0.173
Early detections	15.2%	-	15.2%
Costs			
Test price (€)	67+60	60	67
Cost per patient (€)	411.5	380.4	31.1
Cost-effectiveness (ICER)			
Incremental cost (€) per life year gained (discounted)			179.5
Incremental cost (€) per early detected case			204.2

BC, blood culture; ICER, incremental cost-effectiveness ratio.

doi:10.1371/journal.pone.0161684.t002

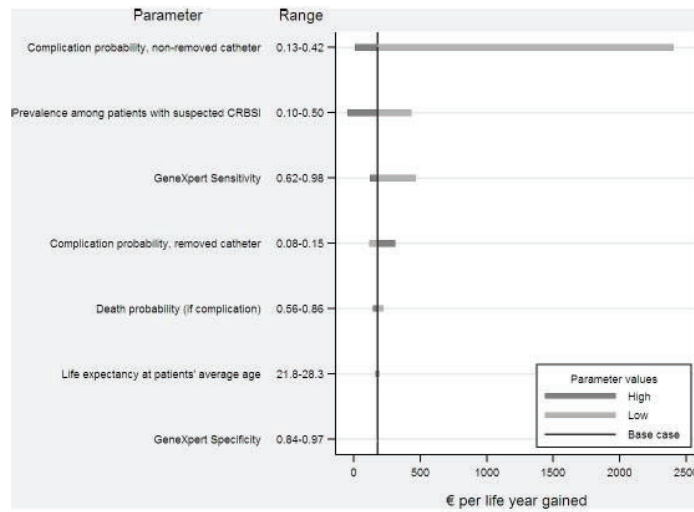


Fig 2. Univariate deterministic sensitivity analysis.

doi:10.1371/journal.pone.0161684.g002

year gained for high (98%) and low (62%) sensitivity rates, respectively. The remaining parameters of the model (complication probability when the removal of the catheter is not delayed, the unconditional death probability for true positives, life expectancy, and specificity of GeneXpert) introduced less variability in the ICER.

This analysis addresses changes in incremental cost-effectiveness ratio (€/life year gained) when individual parameter values are varied. The vertical line corresponds to the base case incremental cost-effectiveness ratio of the model. CRBSI, catheter-related bloodstream infection

Results from the probabilistic sensitivity analysis are summarized in Fig 3. At a willingness-to-pay of 0€ per life year gained GeneXpert had a 27% probability of being cost-effective compared with BC. As the willingness-to pay increased, the probability that Genexpert was cost-effective quickly raised to 98%.

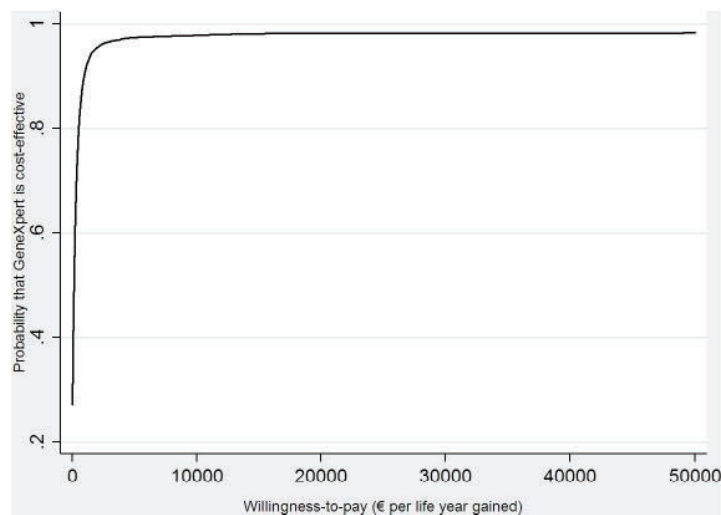


Fig 3. The probabilistic sensitivity analysis.

doi:10.1371/journal.pone.0161684.g003

Discussion

In this study, we demonstrated that GeneXpert is a useful and rapid test for the detection of *S. aureus* and MR-CoNS directly in blood samples obtained through an infected catheter. As GeneXpert results are available in approximately 1h, this test may help clinicians to early select the appropriate antibiotic treatment and to decide whether immediate catheter removal is necessary or not. A delay in the initiation of appropriate antibiotic therapy and prompt catheter removal are critical variables associated with the outcome of patients with CRBSI and the risk of developing septic metastases [5, 15]. In addition, as vancomycin treatment compared with a beta-lactam has been associated with a higher mortality rate in case of MSSA bacteremia, a rapid discrimination between MSSA and MRSA should improve the outcome of these patients. [16] Previously reported sensitivity of the GeneXpert from positive BC for MSSA and MRSA was 100% and 98.3%, respectively [17]. In the present study, the global sensitivity performed using blood obtained from an infected catheter was 87.5%, including MR-CoNS, and it increases up to 100% for MSSA.

According to a recent study from our institution, CoNS are the aetiology of 45% of CRBSI cases with a rate of methicillin resistance higher than 70% [18]. Interestingly, GeneXpert detects MR-CoNS in case of negative *spa* gene and positive *mecA*. To our knowledge, this is the first time that GeneXpert is used for this proposal and our results suggest that this is a promising diagnostic tool particularly because contaminants were not amplified. This could be attributed to the low bacterial density in contaminant cases as it was suggested by a significantly longer median TTP in concomitant BC of negative GeneXpert samples than of positive ones (25.5 h vs 16.6 h, $P = 0.005$). However, there were 2 true CRBSI due to MR-CoNS not detected by GeneXpert. In these cases the TTP was also ≥ 20 h and this is a limitation but it probably indicates less severe infections [19].

An interesting finding was the identification of six presumably false positive results. The most reasonable explanation is the previous exposure to active antibiotics, which inhibited their growth in culture media. However, we cannot rule out false positive results due to unspecific amplification.

Previously, the GeneXpert assay had been shown to have an important impact on the mean length of hospital stay and the mean hospital costs for bacteremic patients [20]. In another study, using GeneXpert results to guide anti-infective therapy proved to be less costly than empiric treatment for MRSA and also showed the potential to reduce mortality rates [21]. Regarding our results, the estimated ICER was only about 180€ per life year gained. Although there are no well-defined cost-effectiveness thresholds for life years gained, there are thresholds for quality adjusted life years (i.e., QALYs; range US \$20,000/16,800€ and US \$100,000/84,000 €) [22]. The ICER estimated here is well below these figures; if any adjustment for quality were made the main results will not be affected.

There are several limitations in our study. First, the number of patients included was small and the study was performed in a single hospital. Second, as GeneXpert allows detection of only *S. aureus* and MR-CoNS, CRBSI caused by other etiological agents, including methicillin-susceptible CoNS, cannot be identified by this system. Third, results of the GeneXpert test were not taken into account for patients' management; this fact and the low prevalence of *S. aureus* CRB in our sample led to take data from the literature regarding potential complications of bacteremia. Therefore, CEA represents a partially literature-derived model. Fourth, the numbers of discounted life years gained were likely to overestimate real gains in life years because a large share of patients with suspected bacteremia have a clinical condition different from staphylococcal CRBSI that can potentially lead to death before reaching the general population's expected age of death. Similarly, no attempt was done to estimate gains in quality-adjusted life

years. The heterogeneity of patients' original health condition would have made such calculation pointless. However, given that the GeneXpert test was found to be highly cost-effective in terms of unadjusted gains of life years, adjustments for quality are unlikely to change the qualitative results. Finally, the life expectancy figures could be overestimated, because large share of patients with CRBSI have a clinical condition (different from staphylococcal CRBSI) that can potentially lead to death before reaching the general population's expected age of death. However, given that the bias applies to the estimated life expectancy obtained with both tests, the change in life years of using GeneXpert compared with BC is not likely to suffer a significant bias.

In conclusion, GeneXpert can be used directly with whole blood sample obtained through an infected catheter for the detection of *S. aureus* and MR-CoNS in approximately 1 h after sampling. In addition, GeneXpert is cost-effective, especially in settings with a high prevalence of staphylococcal CRBSI. Finally, this test has a potential to identify cases not detected by BC, probably due to ongoing antibiotic treatment. However, further studies are necessary to confirm this finding.

Supporting Information

S1 File. Economic evaluation of the use of GeneXpert to detect staphylococcal catheter-related bloodstream infection (CRBSI). (DOCX)

Acknowledgments

This study was funded by Cepheid (Sunnyvale, CA; USA). This study was supported by grant 2014SGR0653 from the Departament de Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya, by the Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III, co-financed by European Regional Development Fund (ERDF) "A Way to Achieve Europe," the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015).

Study results were presented at the 54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Washington, DC, USA, September 5–9, 2014.

Author Contributions

Conceptualization: JM JV.

Data curation: MS LSC.

Formal analysis: JAM MS AS JV.

Funding acquisition: AM.

Investigation: YZ CDC MA NCT LM RA.

Methodology: JV AS MS LS.

Project administration: MJAM.

Resources: JV FM.

Software: JAM MS LSC.

Supervision: JV.

Writing – original draft: YZ MS.

Writing – review & editing: JV AS.

References

1. Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O'Grady NP, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009; 49(1):1–45. Epub 2009/06/06. doi: [10.1086/599376](https://doi.org/10.1086/599376) PMID: [19489710](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19489710/); PubMed Central PMCID: [PMC4039170](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4039170/).
2. Laupland KB, Ross T, Gregson DB. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: risk factors, outcomes, and the influence of methicillin resistance in Calgary, Canada, 2000–2006. *The Journal of infectious diseases*. 2008; 198(3):336–43. Epub 2008/06/05. doi: [10.1086/589717](https://doi.org/10.1086/589717) PMID: [18522502](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18522502/).
3. Lorente L, Henry C, Martin MM, Jimenez A, Mora ML. Central venous catheter-related infection in a prospective and observational study of 2,595 catheters. *Crit Care*. 2005; 9(6):R631–5. Epub 2005/11/11. doi: [10.1186/cc3824](https://doi.org/10.1186/cc3824) PMID: [16280064](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16280064/); PubMed Central PMCID: [PMC1414031](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC1414031/).
4. Soriano A, Martinez JA, Mensa J, Marco F, Almela M, Moreno-Martinez A, et al. Pathogenic significance of methicillin resistance for patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2000; 30(2):368–73. Epub 2000/02/15. doi: [10.1086/313650](https://doi.org/10.1086/313650) PMID: [10671343](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10671343/).
5. Fowler VG Jr., Justice A, Moore C, Benjamin DK Jr., Woods CW, Campbell S, et al. Risk factors for hematogenous complications of intravascular catheter-associated *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005; 40(5):695–703. Epub 2005/02/17. doi: [10.1086/427806](https://doi.org/10.1086/427806) PMID: [15714415](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15714415/).
6. Martinez JA, Pozo L, Almela M, Marco F, Soriano A, Lopez F, et al. Microbial and clinical determinants of time-to-positivity in patients with bacteraemia. *Clinical microbiology and infection*. 2007; 13(7):709–16. Epub 2007/05/09. doi: [10.1111/j.1469-0691.2007.01736.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01736.x) PMID: [17484763](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17484763/).
7. Liesenfeld O, Lehman L, Hunfeld KP, Kost G. Molecular diagnosis of sepsis: New aspects and recent developments. *European journal of microbiology & immunology*. 2014; 4(1):1–25. Epub 2014/03/29. doi: [10.1556/EuJMI.4.2014.1.1](https://doi.org/10.1556/EuJMI.4.2014.1.1) PMID: [24678402](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24678402/); PubMed Central PMCID: [PMC3955828](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3955828/).
8. Dark P, Blackwood B, Gates S, McAuley D, Perkins GD, McMullan R, et al. Accuracy of LightCycler® SeptiFast for the detection and identification of pathogens in the blood of patients with suspected sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Intensive care medicine*. 2015; 41(1):21–33. Epub 2014/11/25. doi: [10.1007/s00134-014-3553-8](https://doi.org/10.1007/s00134-014-3553-8) PMID: [25416643](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25416643/).
9. Yagupsky P, Nolte FS. Quantitative aspects of septicemia. *Clinical microbiology reviews*. 1990; 3(3):269–79. Epub 1990/07/01. PMID: [2200606](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2200606/); PubMed Central PMCID: [PMC358159](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC358159/).
10. Wing EJ, Norden CW, Shadduck RK, Winkelstein A. Use of quantitative bacteriologic techniques to diagnose catheter-related sepsis. *Archives of internal medicine*. 1979; 139(4):482–3. Epub 1979/04/01. PMID: [107870](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/107870/).
11. Andreumont A, Paulet R, Nitenberg G, Hill C. Value of semiquantitative cultures of blood drawn through catheter hubs for estimating the risk of catheter tip colonization in cancer patients. *Journal of clinical microbiology*. 1988; 26(11):2297–9. Epub 1988/11/01. PMID: [3069861](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3069861/); PubMed Central PMCID: [PMC266880](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC266880/).
12. Quilici N, Audibert G, Conroy MC, Bollaert PE, Guillemin F, Welfringer P, et al. Differential quantitative blood cultures in the diagnosis of catheter-related sepsis in intensive care units. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1997; 25(5):1066–70. Epub 1997/12/24. PMID: [9402359](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9402359/).
13. Blot F, Nitenberg G, Chachaty E, Raynard B, Germann N, Antoun S, et al. Diagnosis of catheter-related bacteraemia: a prospective comparison of the time to positivity of hub-blood versus peripheral-blood cultures. *Lancet*. 1999; 354(9184):1071–7. Epub 1999/10/06. PMID: [10509498](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10509498/).
14. Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infection control and hospital epidemiology: the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2005; 26(2):166–74. Epub 2005/03/11. doi: [10.1086/502522](https://doi.org/10.1086/502522) PMID: [15756888](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15756888/).
15. Molina J, Penuela I, Lepe JA, Gutierrez-Pizarra A, Gomez MJ, Garcia-Cabrera E, et al. Mortality and hospital stay related to coagulase-negative *Staphylococci* bacteremia in non-critical patients. *The Journal of infection*. 2013; 66(2):155–62. Epub 2012/10/30. doi: [10.1016/j.jinf.2012.10.021](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.10.021) PMID: [23103291](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23103291/).
16. Kim SH, Kim KH, Kim HB, Kim NJ, Kim EC, Oh MD, et al. Outcome of vancomycin treatment in patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrobial agents and*

- chemotherapy. 2008; 52(1):192–7. Epub 2007/11/07. doi: [10.1128/aac.00700-07](https://doi.org/10.1128/aac.00700-07) PMID: [17984229](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17984229/); PubMed Central PMCID: [PMCPmc2223910](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC/PMC2223910/).
17. Wolk DM, Struelens MJ, Pancholi P, Davis T, Della-Latta P, Fuller D, et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in wound specimens and blood cultures: multicenter preclinical evaluation of the Cepheid Xpert MRSA/SA skin and soft tissue and blood culture assays. *Journal of clinical microbiology*. 2009; 47(3):823–6. Epub 2009/01/16. doi: [10.1128/jcm.01884-08](https://doi.org/10.1128/jcm.01884-08) PMID: [19144803](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19144803/); PubMed Central PMCID: [PMCPmc2650929](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC/PMC2650929/).
 18. Marcos M, Soriano A, Inurrieta A, Martinez JA, Romero A, Cobos N, et al. Changing epidemiology of central venous catheter-related bloodstream infections: increasing prevalence of Gram-negative pathogens. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011; 66(9):2119–25. Epub 2011/06/15. doi: [10.1093/jac/dkr231](https://doi.org/10.1093/jac/dkr231) PMID: [21665905](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21665905/).
 19. Kassis C, Rangaraj G, Jiang Y, Hachem RY, Raad I. Differentiating culture samples representing coagulase-negative staphylococcal bacteremia from those representing contamination by use of time-to-positivity and quantitative blood culture methods. *Journal of clinical microbiology*. 2009; 47(10):3255–60. Epub 2009/08/21. doi: [10.1128/jcm.01045-09](https://doi.org/10.1128/jcm.01045-09) PMID: [19692564](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19692564/); PubMed Central PMCID: [PMCPmc2756952](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC/PMC2756952/).
 20. Bauer KA, West JE, Balada-Llasat JM, Pancholi P, Stevenson KB, Goff DA. An antimicrobial stewardship program's impact with rapid polymerase chain reaction methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*/*S. aureus* blood culture test in patients with *S. aureus* bacteremia. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010; 51(9):1074–80. Epub 2010/10/01. doi: [10.1086/656623](https://doi.org/10.1086/656623) PMID: [20879856](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20879856/).
 21. Brown J, Paladino JA. Impact of rapid methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* polymerase chain reaction testing on mortality and cost effectiveness in hospitalized patients with bacteraemia: a decision model. *Pharmacoeconomics*. 2010; 28(7):567–75. Epub 2010/06/17. doi: [10.2165/11533020-000000000-00000](https://doi.org/10.2165/11533020-000000000-00000) PMID: [20550222](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20550222/).
 22. Bell CM, Urbach DR, Ray JG, Bayoumi A, Rosen AB, Greenberg D, et al. Bias in published cost effectiveness studies: systematic review. *BMJ (Clinical research ed)*. 2006; 332(7543):699–703. Epub 2006/02/24. doi: [10.1136/bmj.38737.607558.80](https://doi.org/10.1136/bmj.38737.607558.80) PMID: [16495332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16495332/); PubMed Central PMCID: [PMCPmc1410902](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC/PMC1410902/).

Supplemental Material

Economic evaluation of the use of GeneXpert to detect staphylococcal catheter-related bloodstream infection (CRBSI).

Base case parameter values, sources and assumptions for sensitivity analysis are described in **Table S1**. Base case values correspond to actual values observed in the present study or in the mentioned literature. Expected life years were defined as the difference between life expectancy of the Spanish population and the average age of patients with suspected CRBSI. For the sensitivity analysis, most of the variables were assumed to follow a binomial distribution (defined by the appropriate number of observations and events). The high and low values used in the deterministic sensitivity analysis correspond to the 95% confidence interval boundaries. In the case of the prevalence rate, low and high values (10% and 50%, respectively) were chosen in order to estimate the effects on health (and costs) that would occur if GeneXpert were implemented in hospitals with those specific prevalence rates. In the probabilistic sensitivity analysis, the prevalence was assumed to have a discrete uniform distribution for values {0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5}.

Use of resources and costs data

The use of resources corresponds to the standard treatment of patients with suspected CRBSI. Resources considered for the costs analysis include BC costs, GeneXpert kit, technical staff, catheters, wide-spectrum and specific antibiotics, imaging (abdominal ultrasound, transthoracic echocardiogram and PET) in case of haematogenous complication and the use of intensive care unit (ICU) also in case of complication.

Doses of antibiotics, type and quantity of images and the number of days spent in ICU were obtained from hospital's clinicians (**Table S1**). Costs of resources were obtained from hospital's administrative staff (**Table S2**).

In the probabilistic sensitivity analysis prices were assumed to have a lognormal distribution with expected price equal to base case values and scale parameter equal to 0.5. These assumptions imply that roughly a 90% of simulated prices are between 40% and 200% of base case prices.

Sensitivity analysis

In addition to the deterministic analysis described in the main text, a probabilistic sensitivity analysis through Monte Carlo simulations was performed. A simulation consisted in a simultaneous random draw of each parameter assuming the distributions described in **Tables S1** and **Table S2**. In each simulation effects on outcomes and cost of treatment per patient were computed for different prevalence levels. A total number of 10,000 simulations were performed. The simulations showed that the mean incremental effect of GeneXpert on expected life years ranged from 0.11 when the joint prevalence of *S. aureus* and MR-CoNS was 10% to 0.55 years when the joint prevalence was 50% (**Fig S1**). The mean *incremental cost* of using GeneXpert varied from 41.2€ to -32.4€ per patient for low and high prevalence values, respectively (**Fig S2**).

At low prevalence (10%), the cost-effectiveness incremental ratio (ICER) was lower than 1,000€ per life year gained in 81.6% of the simulations and it dominated BC (i.e. it had lower cost per patient and better health outcomes) in 2.5% of the simulations. In the remaining cases, the ICER was higher than 1,000 € per patient (14.1% of the simulations) or GeneXpert was dominated (1.8%) by BC (**Fig S3**). When prevalence was high (50%) the ICER was lower than 1,000€ per life year gained in 32.1% of the simulations and GeneXpert dominated BC in a further 65% of the simulations (**Fig S4**).

Table S1. Parameters values, sources and assumptions.

Variable	Base case	Source	Distribution for Monte Carlo Simulations	Deterministic sensitivity analysis	
				Low value	High value
Sensitivity	0.875	Present study	Binomial	0.62	0.98
Specificity	0.921	Present study	Binomial	0.84	0.97
Prevalence	0.174	Present study	Discrete Uniform	0.10	0.50
Probability of complication if catheter is not removed at $t = 0^a$	0.26	Assumption based on literature[1]	Binomial	0.13	0.42
Probability of complication if catheter is removed at $t = 0^a$	0.11	Assumption based on literature[1]	Binomial	0.08	0.15
Probability of death (conditional on complication)	0.70	Assumption based on literature[1, 2]	Binomial	0.56	0.86
Expected life years of Spanish population at patient's average age	25.1	National Statistics Institute and the present study	Normal	21.9	28.3
Wide-spectrum antibiotic (days)	0 or 2 ^b	Hospital's clinicians	Not varied in the sensitivity analysis		
Narrow-spectrum antibiotic (days)	0 or 15 ^c				
BC (vials)	4				
GeneXpert	1				
Intensive care unit (days)	1				
PET	1				
Abdominal ultrasound	1				
Transthoracic echocardiogram	1				

^aat $t = 0$: moment at which a patient with suspected CRBSI is detected.

^b0 days if GeneXpert is performed and it gives a positive result and 2 days in any other case.

^cDepending on tests results.

Table S2. Cost data.

Item	Price (€)
Broad-spectrum antibiotic (per day)	69
Narrow-spectrum antibiotic (per day)	49
Central venous catheter (average)	22.8
BC (per vial):	
<i>Vial</i>	0.94
<i>Technical staff (20 min per vial)</i>	7.00
<i>Microbiologist (10 min per vial)</i>	7.00
GeneXpert (per sample):	
<i>Reagents</i>	54.95
<i>Technical staff (15 min per sample)</i>	5.25
<i>Microbiologist (10 min per sample)</i>	7.00
Additional costs if complications:	
One day of intensive care unit	555
One PET	700
One abdominal ultrasound	110
One transthoracic echocardiogram	355

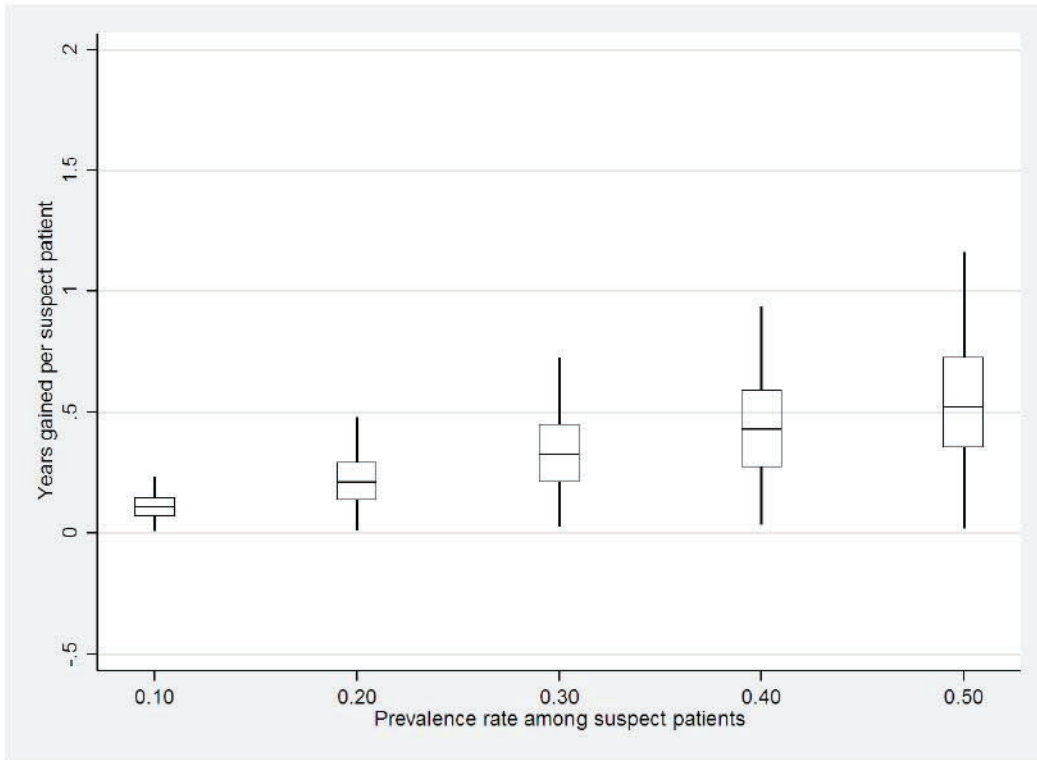


Fig S1. Life years gained, by prevalence of staphylococcal CRBSI.

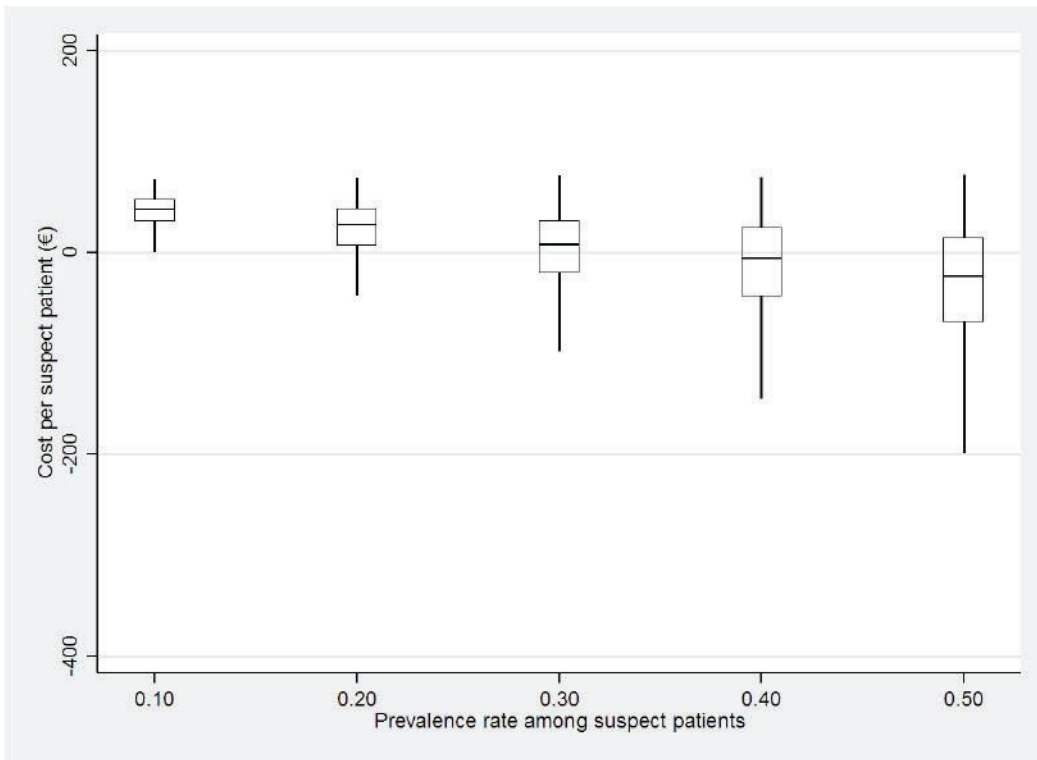


Fig S2. Incremental cost, by prevalence of staphylococcal CRBSI.

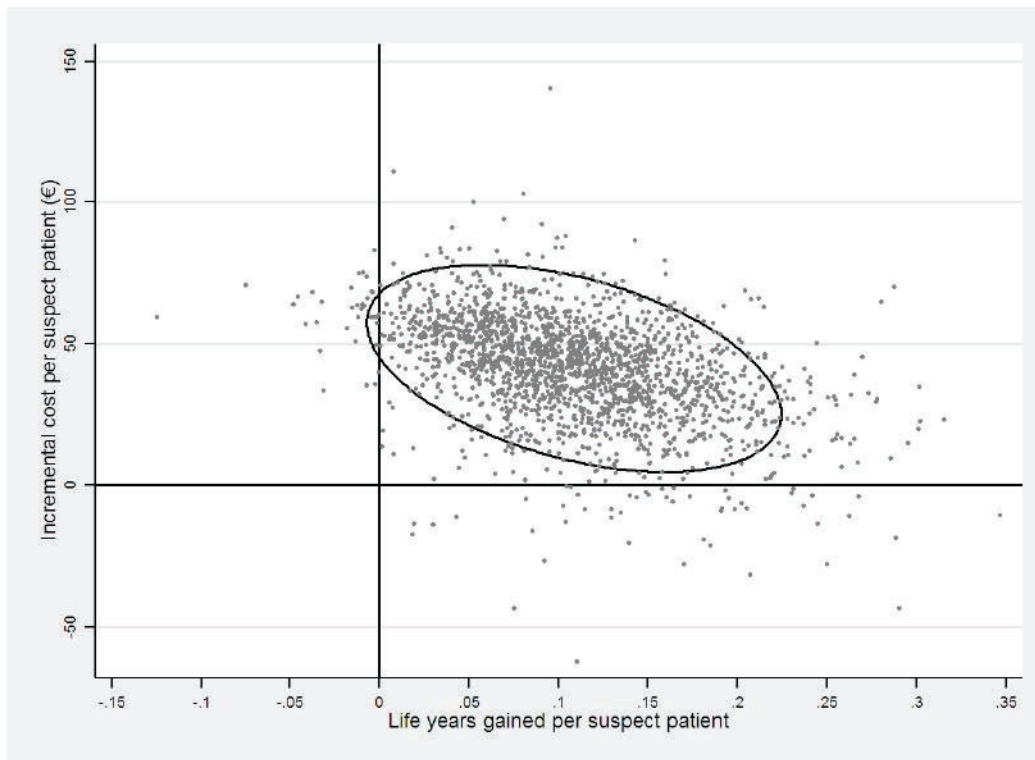


Fig S3. Cost-effectiveness simulations at the staphylococcal CRBSI prevalence of 10% (95% confidence surface).

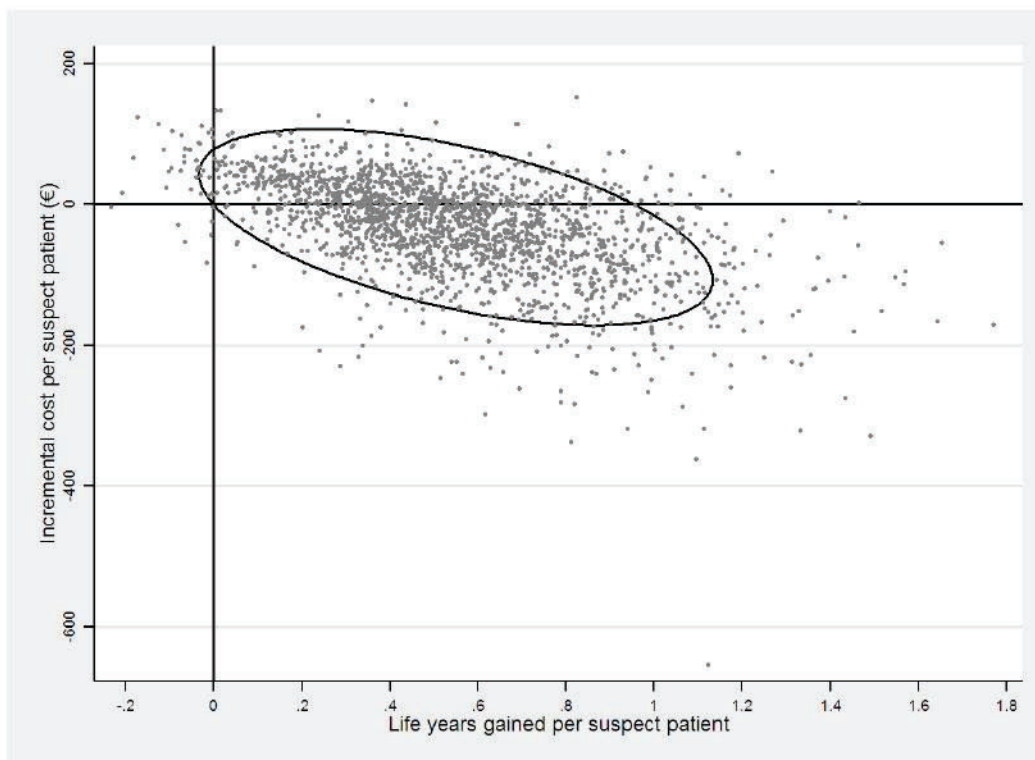


Fig S4. Cost-effectiveness simulations at the staphylococcal CRBSI prevalence of 50% (95% confidence surface).

REFERENCES

1. Fowler VG, Jr., Justice A, Moore C, Benjamin DK, Jr., Woods CW, Campbell S, et al. Risk factors for hematogenous complications of intravascular catheter-associated *Staphylococcus aureus* bacteremia. Clin Infect Dis. 2005; 40: 695-703. doi: 10.1086/427806 PMID: 15714415
2. Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. Infect Control Hosp Epidemiol. 2005; 26: 166-174. doi: 10.1086/502522 PMID: 15756888

RESULTADOS

1.2 Artículo 2

Evaluation of the Magicplex™ Sepsis real-time test for the rapid diagnosis of bloodstream infections in adults

Autores: **Yuliya Zboromyrska**, Catia Cillóniz, Nazaret Cobos-Trigueros, Manel Almela, Juan Carlos Hurtado, Andrea Vergara, Caterina Mata, Alex Soriano, Josep Mensa, Francesc Marco, Jordi Vila.

Front Cell Infect Microbiol. 2019 Mar 12;9: 56. doi: 10.3389/fcimb.2019.00056.

Factor de Impacto: 4.123 (2019) – Q1 (Scimago, Infectious Diseases); Q1 (Scimago, Medicine (Miscellaneous)); Q1 (Scimago, Microbiology (Medical)); Q1 (Scimago, Microbiology (Q1)). (Objetivo 1).

Objetivos

El objetivo de este estudio ha sido evaluar el ensayo molecular Magicplex™ Sepsis test (MP) para el diagnóstico de bacteriemia y sepsis en comparación con el hemocultivo estándar.

Métodos

En el estudio se han incluido 809 muestras de 636 pacientes. De cada paciente se ha obtenido al menos una pareja de hemocultivos y una muestra de sangre de 1 mL en un tubo con EDTA para MP. El MP test se ha realizado de acuerdo con las instrucciones de fabricante y ha incluido los siguientes pasos: pretratamiento, extracción, dos PCRs convencionales, seguidos por una PCR a tiempo real para detectar productos de amplificación y, finalmente, otra PCR a tiempo real para identificar 27 microorganismos a nivel de especies. La información sobre el tratamiento antibiótico y el foco de infección ha sido recogida para el análisis.

Resultados

De las 809 muestras procesadas 132 (16,3%) han sido positivas para al menos un microorganismo valorable mediante hemocultivos y/o MP. La concordancia global entre hemocultivos y MP fue del 87,1% (705/809). De las 809 muestras procesadas, 28 han sido positivas por ambas técnicas, 574 han sido negativas por ambas técnicas, 36 muestras han sido positivas para al menos un microorganismo valorable solo por MP, mientras que 68 muestras han sido positivas solo por hemocultivos. La tasa de positividad ha sido más alta para los hemocultivos (96/809, 11,9%) comparando con MP (64/809, 7,9%). Considerando los hemocultivos como *gold standard*, la sensibilidad y especificidad de MP han sido de 29,2% (95% CI, 20,6-39,5) y de 95% (95% CI, 93-96,4), respectivamente. La tasa de muestras contaminadas ha sido más alta para hemocultivos (10%) que para MP (4,8%) ($p < 0.001$). Los pacientes con muestras positivas solo por MP con mayor frecuencia recibían el tratamiento antimicrobiano (47%) que los pacientes con las muestras positivas solo por hemocultivo (18%) ($p = 0.002$).

RESULTADOS

Conclusiones

MP puede ser útil en los pacientes que reciben el tratamiento antimicrobiano y, por lo tanto, con alta probabilidad del resultado negativo del hemocultivo. No obstante, la técnica ha demostrado muy baja sensibilidad global, lo que hace difícil su incorporación como método diagnóstico de rutina.



Evaluation of the Magicplex™ Sepsis Real-Time Test for the Rapid Diagnosis of Bloodstream Infections in Adults

Yuliya Zboromyrska^{1†}, Catia Cillóniz^{2*†}, Nazaret Cobos-Trigueros³, Manel Almela¹, Juan Carlos Hurtado⁴, Andrea Vergara⁴, Caterina Mata⁵, Alex Soriano³, Josep Mensa³, Francesc Marco⁴ and Jordi Vila⁴

OPEN ACCESS

Edited by:

Bing Gu,
Affiliated Hospital of Xuzhou Medical
College, China

Reviewed by:

Krisztina M. Papp-Wallace,
Louis Stokes Cleveland VA Medical
Center, United States
Kevin Alby,
University of Pennsylvania,
United States
Peter Michael Keller,
Universität Bern, Switzerland

*Correspondence:

Catia Cillóniz
catiacilloniz@yahoo.com;
cilloniz@clinic.cat

† These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Clinical Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and Infection
Microbiology

Received: 18 December 2018

Accepted: 20 February 2019

Published: 12 March 2019

Citation:

Zboromyrska Y, Cillóniz C,
Cobos-Trigueros N, Almela M,
Hurtado JC, Vergara A, Mata C,
Soriano A, Mensa J, Marco F and
Vila J (2019) Evaluation of the
Magicplex™ Sepsis Real-Time Test
for the Rapid Diagnosis of
Bloodstream Infections in Adults.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 9:56.
doi: 10.3389/fcimb.2019.00056

¹ The Consortium of the Intercomarcal Laboratory of the Alt Penedès, Department of Microbiology, Vilafranca del Penedès, Spain, ² Department of Pneumology, Hospital Clinic of Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Networked Biomedical Research Center for Respiratory Diseases (CIBERES), University of Barcelona, Barcelona, Spain, ³ Department of Infectious Diseases, Hospital Clinic, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ⁴ Department of Microbiology, ISGlobal, Barcelona Centre for International Health Research, Hospital Clinic, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ⁵ Sample Preparation Team, Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica, Parc Científic de Barcelona – Torre I, Barcelona, Spain

Sepsis is a serious health condition worldwide, affecting more than 30 million people globally each year. Blood culture (BC) is generally used to diagnose sepsis because of the low quantity of microbes occurring in the blood during such infections. However, ~50% of bloodstream infections (BSI) give negative BC, this figure being higher for sepsis, which delays the start of appropriate antimicrobial therapy. This prospective study evaluated a multiplex real-time polymerase chain reaction, the Magicplex™ Sepsis test (MP), for the detection of pathogens from whole blood, comparing it to routine BC. We analyzed 809 blood samples from 636 adult patients, with 132/809 (16.3%) of the samples positive for one or more relevant microorganism according to BC and/or MP. The sensitivity and specificity of MP were 29 and 95%, respectively, while the level of agreement between BC and MP was 87%. The rate of contaminated samples was higher for BC (10%) than MP (4.8%) ($P < 0.001$). Patients with only MP-positive samples were more likely to be on antimicrobial treatment (47%) than those with only BC-positive samples (18%) ($P = 0.002$). In summary, the MP test could be useful in some clinical setting, such as among patients on antibiotic therapy. Nevertheless, a low sensitivity demonstrated impairs its use as a part of a routine diagnostic algorithm.

Keywords: bloodstream infection, PCR-based assay, blood culture, Magicplex™ Sepsis test, infection, sepsis

INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) in 2017 adopted a resolution on sepsis: “improving the prevention, diagnosis and clinical management of sepsis” (World Health Organization, 2018). Blood culture (BC) is generally used to diagnose sepsis because of the low quantity of microbes occurring in the blood during such infections. However, ~50% of bloodstream infections (BSI) give negative BC, this figure being higher for sepsis, which delays the start of appropriate antimicrobial therapy and consequently results in worse outcomes and higher mortality rates (Kumar et al., 2006; Ferrer et al., 2014). Prompt microbiological diagnosis enables a more appropriate antimicrobial

treatment than the empirical combination of broad-spectrum antibiotics that have negative effects such as an increased prevalence of resistant pathogens (Candel et al., 2018). The microbial diagnosis of sepsis by BC has two main advantages: first, it allows the growth of very small numbers of the microorganism, which is important since the concentration of bacteria in the blood of septic adult patients is usually low (<10 CFU/mL) (Yagupsky and Nolte, 1990); second, this technique allows the isolation of pathogens and, hence, antimicrobial susceptibility testing can be performed. However, BC also has limitations that do not make it an ideal gold standard test, including the long time required for growth detection, the frequent false negative results in patients receiving antimicrobial therapy, and the inability to detect fastidious microorganisms (Sinha et al., 2018) which can delay the initiation of an adequate antimicrobial therapy and consequently results in worse outcomes and higher mortality rates (Kumar et al., 2006; Ferrer et al., 2014). Molecular tests offer important advantages over BC that could improve the diagnosis of BSI, such as the lower amount of time taken to obtain results by working directly from blood. In addition, the low detection limits of molecular assays might make them more sensitive than BC, enabling the detection of fastidious, non-viable or non-culturable microorganisms, even from patients on antibiotic treatment (Fenollar and Raoult, 2007; Leitner et al., 2013; Sinha et al., 2018).

Another advantage of molecular assays is the ability to detect some specific resistance markers, which can provide important information for better treatment. Moreover, the rapid identification of the microorganism can be used to infer antimicrobial susceptibility according to local epidemiology.

The Magicplex™ Sepsis test (MP) (Seegene, Seoul, South Korea) is a multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR) that detects more than 90 microorganisms at the genus level (73 Gram-positive bacteria, 12 Gram-negative bacteria and 6 fungi), 27 at the species level and 3 drug-resistant genes (*mecA*, *vanA*, and *vanB*) within 6 h. In this study, we evaluated the ability of the MP test to rapidly detect pathogens causing BSI in adult patients from whole blood compared to conventional BC.

METHODS

Setting, Data, and Sample Collection

The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clinic of Barcelona (study no. 2011/6613). Written informed consent was waived because of the non-interventional study design.

Paired BC and 1 ml samples of whole blood in an EDTA tube were obtained from adult patients (≥18 years old) from the Hospital Clinic of Barcelona, a 700-bed university hospital in Barcelona, Spain, from May to September 2011.

Samples were obtained from patients with suspected BSI and who met the criteria for BC collection. Samples were processed in parallel by MP and BC. Blood samples for MP and BC were obtained simultaneously from the same catheter or venipuncture. For each case, additional clinical data about ongoing antibiotic treatment, the suspected source of infection, as well as the results of other microbiological tests were collected.

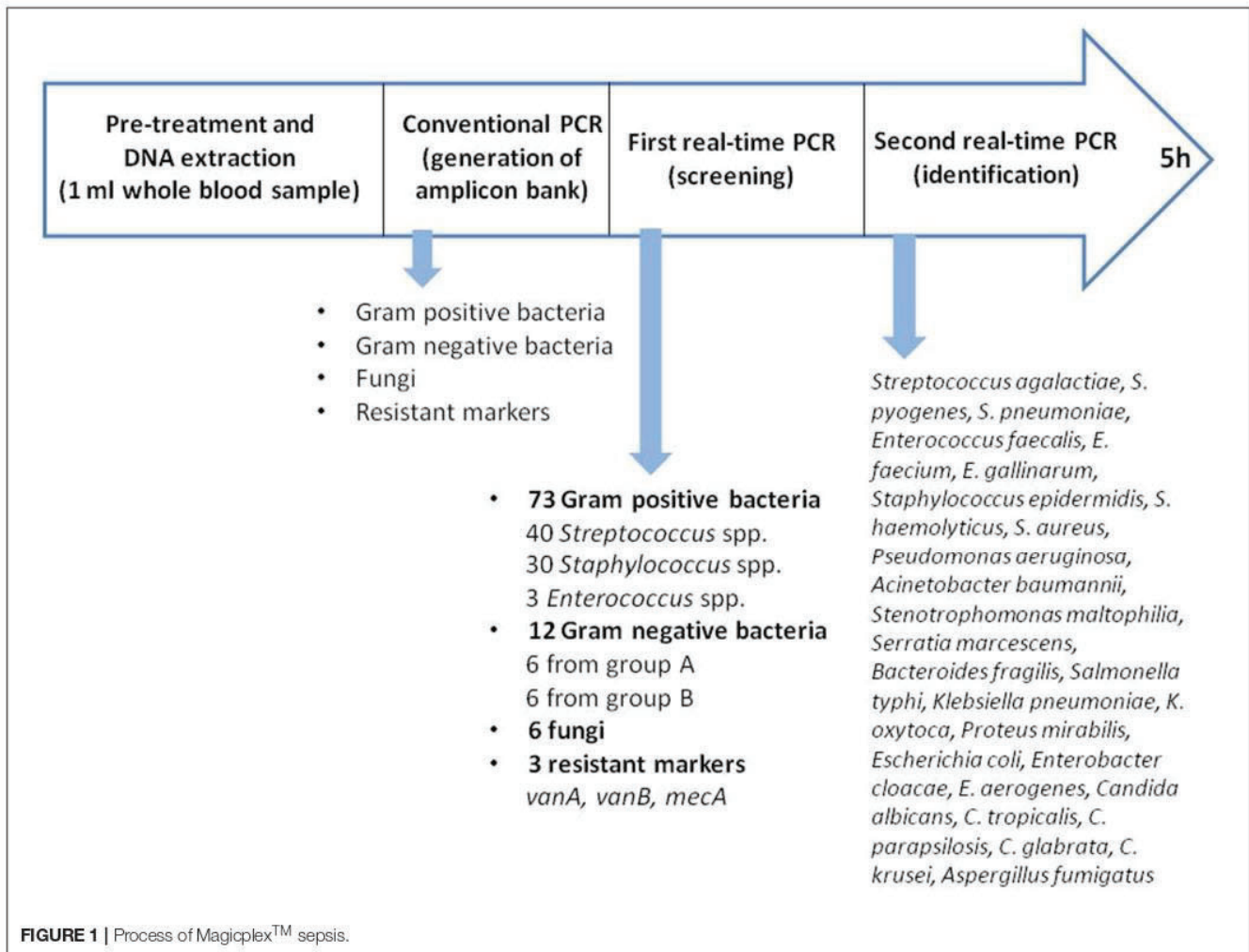
Routine Microbiological Techniques

BC was incubated in a Bactec 9240® (Becton Dickinson, MD, USA) for a maximum of 5 days. The following bottles were used: the resin-containing BACTEC Plus Aerobic/F and BACTEC Plus Anaerobic/F, and the non-resin-containing BACTEC Standard/10 Aerobic/F and BACTEC Lytic/10 Anaerobic/F. For positive samples, Gram staining and culturing on solid media were performed. Microorganisms were identified using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Routine susceptibility testing included the Phoenix™ system (Becton Dickinson, MD, USA), Etest (AB bioMérieux), microdilution (Sensititre, Trek Diagnostic Systems, Inc., Westlake, Ohio, USA) and disc diffusion tests, depending on the pathogen isolated. Determination of the isolates as contaminants or pathogens was achieved by combining the clinical setting, pathogenicity of the isolated microorganisms and the number of positive BC bottles in the case of potential skin contaminants, such as coagulase-negative staphylococci (CoNS). CoNS were considered pathogens if the same species was detected in both sets of BC showing the same antimicrobial susceptibility pattern. Samples with positive BC for pathogens not included in the MP panel were excluded from the analysis.

The Magicplex™ Sepsis Test (MP)

Blood samples were initially pre-treated with the Seegene Blood Pathogen Kit™, according to the manufacturer's instructions. This pre-treatment included the following steps: lysis of human cells with CM buffer, degradation of released DNA with MolDNase B, concentration by centrifugation of microorganisms and, finally, lysis of cells and release of nucleic acid. Bacterial DNA was automatically extracted and purified with the SeePrep12™ extractor (Seegene). Amplification, screening and identification were performed following the manufacturer's instructions. Each sample was first processed by two conventional PCRs performed in two separate tubes: one for the detection of Gram-positive bacteria and resistance genes, and the other for Gram-negative bacteria (GNB) and fungi (Figure 1).

For this step the thermal cycler System 9700, Applied Biosystems was used. The first real-time PCR for screening was performed in three separate tubes, allowing the identification of pathogens at the genus or group level: *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., GNB group A or B, fungi and 3 resistance genes (*vanA*, *vanB*, and *mecA*). For positive results, the second real-time PCR was carried out, allowing the identification of 27 pathogens at the species level, including 3 *Streptococcus* spp. (*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus pyogenes*), 3 *Enterococcus* spp. (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus gallinarum*), 3 *Staphylococcus* spp. (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus aureus*), 6 GNB from group A (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens*, *Bacteroides fragilis*, and *Salmonella typhi*), 6 GNB from group B (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, and *Enterobacter*



aerogenes), and 6 fungi (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Aspergillus fumigatus*). The real-time PCR were performed using the Cepheid SmartCycler.

The Seegene Viewer software was used to interpret the results, which were available within 6 h. All the samples were stored at 2–8°C and processed within 24 h after collection.

MP samples positive for CoNS were considered to be true positives if the same microorganism was detected in two sets of BC. Samples that were positive according to MP in the first real-time PCR screening and identified only at the group level (e.g., GNB group A), but negative in the second real-time-PCR were considered negative according to MP. To avoid confusing calculation in sensitivity and specificity we consider samples with only contaminants detected by MP and/or BC as negative. Internal control is included in each PCR step. Microorganisms identified by MP only at the genus level, such as *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp., were considered to be contaminants if the BC was negative or positive for staphylococci or streptococci that could be identified by MP at the species level.

Statistical Analysis

Categorical variables were compared using the chi-square test. To calculate the yield of the test, we analyzed sensitivity and specificity, and predictive values. All statistical comparisons were two-sided hypothesis tests, and the significance level was set at 0.05. All confidence intervals (CIs) were two-sided at 95% confidence level. All analyses were performed with IBM SPSS Statistics 22.0 (Armonk, New York).

RESULTS

A total of 809 samples from 636 adult patients were collected and analyzed. Among the samples, 435 out of 809 (54%) were from the emergency wards, 197 (24%) from intensive care units (ICUs) and surgery, 159 (20%) from oncology and hematology wards, and 18 (2%) from other medical wards. The average age of patients was 56.7 ± 5.6 ; 43% were females.

A total of 140 pathogens were detected among 132 positive samples (Table 1). *E. coli* was the most frequently detected

TABLE 1 | Comparison of microbiological results between BC and MP.

Pathogens detected	Positive only BC	Positive only MP	Positive both methods	Total, n (%)	Prevalence among 809 samples, %
<i>Escherichia coli</i>	27	15	5	47 (34)	5.8
CoNS	7	0	9	16 (11)	2
<i>Candida</i> spp.	9	2	3	14 (10)	1.7
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	7	4	13 (9)	1.6
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	3	3	11 (8)	1.4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	2	1	9 (6)	1.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	2	1	9 (6)	1.1
<i>Streptococcus</i> spp.	3 ^a	2 ^b	1 ^c	6 (4)	0.7
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	1	0	4 (3)	0.5
<i>Enterococcus faecium</i>	2	0	1	3 (2)	0.4
<i>Acinetobacter</i> spp.	1	2	0	3 (2)	0.4
<i>Serratia marcescens</i>	1	1	0	2 (2)	0.2
<i>Enterococcus gallinarum</i>	0	1	0	1 (1)	0.1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	1	0	1 (1)	0.1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	1	0	1 (1)	0.1
Total, n (%)	72 (51)	40 (29)	28 (20)	140 (100)	

BC, blood culture; MP, MagicPlex assay; CoNS, coagulase-negative staphylococci.

^aStreptococci of viridians group (*S. anginosus* and *S. gordonii*) and one *S. agalactiae*.

^bOne *S. agalactiae* and one *S. pneumoniae*.

^c*S. constellatus*.

pathogen (47/140, 33.6%), followed by CoNS (16/140, 11.4%), *Candida* spp. (14/140, 10%), and *S. aureus* (13/140, 9.3%).

BC identified 3 mixed infections: *E. cloacae* plus *K. pneumoniae*, *C. glabrata* plus *S. haemolyticus*, and *P. aeruginosa* plus *S. epidermidis*. MP detected 4 mixed infections: *S. agalactiae* plus *S. aureus*, *E. coli* plus *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* plus *S. marcescens*, and *E. coli* plus *E. gallinarum*. One mixed infection (*E. faecium* plus *S. haemolyticus*) was identified by both methods.

Three *mecA* genes were detected among the 9 pathogenic CoNS identified by the two methods. Routine susceptibility testing detected 7 methicillin-resistant CoNS and 2 methicillin-susceptible strains. Only one *vanB* resistance marker was detected in a sample positive for *E. faecalis* only according to MP and not BC. Therefore, this result remained unconfirmed. No additional BC or other microbiological samples positive for *E. faecalis* were obtained from this patient.

As shown in **Table 2**, samples with microbial contaminants were more frequently observed with BC than MP: 81/809 (10%) vs. 39/809 (4.8%) ($P < 0.001$), respectively.

Blood samples in which only microbial contaminants were detected were considered as negative for further analysis. As a result, 132/809 (16.3%) of the samples were considered positive for one or more relevant microorganism by BC and/or MP. The level of agreement between BC and MP was 87.1% (705/809). Regarding the 28 samples positive according to both methods, the same pathogen was identified in 27 of the cases, with the remaining one sample showing inconsistent results: *E. coli* detected by MP and *E. faecium* by BC. The rate of positive results was higher for BC (96/809, 11.9%) than MP (64/809, 7.9%). Considered BC the gold standard and considering negative the samples with only contaminants detected, the sensitivity,

TABLE 2 | Concordance of the results obtained by BC and MP.

	Number of samples			Total
	BC positive	BC negative	BC-contaminated	
MP-positive	28	31	5	64
MP-negative	62	574	70	706
MP-contaminated	6	27	6	39
Total	96	632	81	809

BC, blood culture; MP, MagicPlex assay.

specificity, positive predictive value and negative predictive value of MP were 29.2% (95% CI, 20.6–39.5), 95% (95% CI, 93–96.4), 43.8% (95% CI, 31.6–56.7), and 90.9% (95% CI, 88.5–92.8), respectively.

Additional clinical information, including underlying disease and the antibiotic or antifungal therapy administered on the day of sampling, was recorded for the patients with 36 MP-positive and BC-negative or contaminated results (**Table 3**). When comparing the percentage of patients with undergoing antimicrobial treatment at the time of sample collection between three groups: only BC-positive (12/68, 17.6%), only MP-positive (17/36, 47.2%), and BC and MP-positive (8/28, 28.6%), there was significantly higher number of patients receiving antimicrobials in the group of only MP-positive ($P = 0.002$). Interestingly, 3 of the 17 patients with only an MP-positive sample had a BC positive for the same microorganism in the previous days, while in 5 patients, other microbiological samples were positive for the pathogen detected by MP.

TABLE 3 | Additional information from 36 patients with MP-positive and BC-negative results.

Setting	MP result	Clinical condition	Other microbiological tests positive for the same pathogen	Ongoing antibiotic/antifungal treatment ^a
ICU and surgery (n = 16)	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Self-limiting fever after removal of a Kehrs tube in a liver transplant patient	–	–
	<i>Escherichia coli</i>	Subarachnoid hemorrhage Control BC 3 days after catheter-related <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bacteremia	–	Ciprofloxacin
	<i>Escherichia coli</i>	Necrotizing fasciitis	BC and wound swab culture positive for <i>E. coli</i> 3 days before sampling	Meropenem
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Necrotizing fasciitis	BC positive for <i>S. aureus</i> 2 days before sampling	Cloxacillin
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Acute myeloid leukemia with neutropenic fever without a clinical focus	–	Piperacillin-tazobactam, Vancomycin
	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>K. pneumoniae</i> bacteremia secondary to mesenteric vein thrombosis in a cirrhotic patient. Nosocomial pneumonia due to <i>S. aureus</i> and <i>Acinetobacter baumannii</i>	3 bronchial washing samples positive for <i>Candida</i> spp.	Fluconazole
	<i>Escherichia coli</i>	Septic shock due to <i>S. aureus</i> cellulitis in a cirrhotic patient. Ascites decompensation	Wound smear positive for <i>S. aureus</i>	Ceftazidime and Tigecycline
	<i>Escherichia coli</i>	Acute necrotizing pancreatitis with peripancreatic abscess	–	Meropenem
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Superinfection of Pulmonary contusion in a polytrauma patient	Tracheal aspirate positive for <i>S. aureus</i> 2 days before sampling	Levofloxacin
	<i>Escherichia coli</i>	Colonic perforation post-nephrectomy	–	Piperacillin-tazobactam
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Intestinal obstruction and abdominal sepsis secondary to inguinal hernia	–	Levofloxacin
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Post-operative fever (liver resection 48 h before sampling)	–	–
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Thoracic empyema in a cirrhotic patient	–	–
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Hepatocellular carcinoma. Metabolic decompensation of diabetes mellitus	–	–
	<i>Escherichia coli</i>	Urinary tract infection (UTI)	–	Ciprofloxacin and Ceftriaxone
	Emergency department (n = 15)	<i>Candida parapsilosis</i>	Post-operative intraabdominal abscess	–
<i>Escherichia coli</i>		UTI	–	–
<i>Staphylococcus aureus</i>		Stroke. Bronchoaspiration in a patient with prior colonization with <i>S. aureus</i> .	–	–
<i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>		Cellulitis	–	–
<i>Escherichia coli</i>		HIV patient with prosthetic aortic valve with progressive prurigo nodularis	–	Amoxicillin/clavulanic acid
<i>Escherichia coli</i>		Fever during hemodialysis	Urine culture positive for <i>E. coli</i>	Amoxicillin/clavulanic acid
<i>Escherichia coli</i>		Acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD)	Sputum sample positive for <i>E. coli</i>	–
<i>Enterococcus faecalis</i>		Traveler's diarrhea	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Acute gastroenteritis and community-acquired UTI	–	–
<i>Staphylococcus aureus</i>		Pneumonia	–	–
<i>Staphylococcus aureus</i>		UTI in a patient with permanent bladder catheter	–	Amoxicillin/clavulanic acid
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Acute exacerbation of Crohn's disease.	–	–
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Pneumocystis carinii</i> pneumonia in an AIDS patient	–	–

(Continued)

TABLE 3 | Continued

Setting	MP result	Clinical condition	Other microbiological tests positive for the same pathogen	Ongoing antibiotic/antifungal treatment ^a
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Community-acquired UTI	–	–
	<i>Escherichia coli</i>	Acute exacerbation of COPD	–	–
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pneumocystis carinii</i> pneumonia in an AIDS patient. Bacteremia caused by <i>E. faecalis</i>	–	–
Oncology and hematology (n = 4)	<i>Enterococcus faecalis</i> (varB positive)	Non-Hodgkin T-cell lymphoma. Neutropenic fever	–	Levofloxacin
	<i>Escherichia coli</i>	Acute myeloid leukemia. Neutropenic fever	–	–
	<i>Escherichia coli</i>	Stem cell transplanted patient due to acute myeloid leukemia. Neutropenic fever	–	–
	<i>Escherichia coli</i>	Fever in a patient with acute lymphoblastic leukemia	–	Meropenem
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Catheter-related blood stream infection in a patient transplanted due to acute myeloid leukemia	BC positive for <i>E. faecalis</i> 6 days before sampling	Daptomycin

ICU, intensive care unit; BC, blood culture; MP, MagicPlex assay.

^a Only antimicrobial/antifungal therapy potentially effective against pathogen detected and initiated before sampling.

DISCUSSION

Several molecular assays have been tested for the direct molecular identification of pathogens in blood samples (Lehmann et al., 2008; Wellinghausen et al., 2009; Bloos et al., 2012; Grif et al., 2012; Loonen et al., 2013; Nieman et al., 2016). However, few studies have focused on commercially available PCR-based tests other than the SeptiFast test for the detection of BSI (Kühn et al., 2011; Fitting et al., 2012). Recently, T2 magnetic resonance assay was evaluated to detect *Candida* spp. and some bacteria in whole blood (Mylonakis et al., 2015; Snyder et al., 2017; Peker et al., 2018). In the present study, we evaluated the Magicplex™ Sepsis test (MP), comparing it with conventional BC. We observed that MP showed a sensitivity and specificity of 29.2 and 95%, respectively. Only a few studies have evaluated the sensitivity and specificity of MP (Carrara et al., 2013; Loonen et al., 2013; Ljungström et al., 2015; Denina et al., 2016; Ziegler et al., 2016). Carrara et al. (2013), assessing 267 patients from ICU, emergency and hematology wards, reported an overall sensitivity of 65% for MP compared with 41% for BC. However, the authors calculated the sensitivities and specificities using a reference standard in which clinical data and other cultures were added to the BC results to see if a positive MP result represented a true BSI or not. Loonen et al. (2013), investigating 125 patients from the emergency department, reported a sensitivity of 37% and a positive predictive value (PPV) of 30% for MP, the low PPV resulting from many of the samples being positive for CoNS according to MP. Ljungström et al. (2015), analyzing samples from 375 patients with suspected sepsis collected from emergency wards, excluded suspected contaminants such as CoNS. They reported a sensitivity of 64% and specificity of 96% for MP. However, if they had included all the MP and BC results, the sensitivity of MP would have been 38%, PPV 17%, and specificity

65%. Taking into account all these results, the MP test could be useful in some clinical setting, such as among patients with undergoing antimicrobial treatment and negative blood cultures. Nevertheless, a low sensitivity demonstrated limits its use as a part of routine diagnostic algorithm. The low sensitivity of MP is probably due to the low bacterial concentration in whole blood and the low sample volume of 1 ml used. There are several strategies intended to improve bacterial recovery, such as removing or significantly reducing the amount of human DNA present in the whole blood sample. Nevertheless, this step is already included in the MP and SepsisTest assays. Another possibility is to introduce an additional incubation step prior to extraction (Serra et al., 2012). Although this approach can increase microbial concentrations, it lengthens the whole process and compromises the main advantage of the molecular assays, which is the rapid procurement of results. Another strategy is to increase the initial volume of the blood sample (>1 ml) (Hansen et al., 2009), which has been reported to give promising results and greatly improve the detection rates of PCR-based assays (Loonen et al., 2013) or increase the amount of bacterial DNA, as shown by Trung et al. (2016).

We observed 36 samples that were positive according to MP and negative according to BC. This could have been due to the fact that almost half of these samples were obtained from patients on antibiotic treatment, which could explain the negative BC results. Unfortunately, the data about the start time and duration of antimicrobial treatment was not collected; therefore more detailed analysis of the treatment impact on BC and MP positivity could not be performed. The presence of cell-free DNA or non-viable microorganisms or even contaminating DNA could explain the other 19 discordant results (Opota et al., 2015).

Importantly, MP detected 5 out of the 14 *Candida* spp. and 11 out of the 13 *S. aureus* isolates in our study. Early detection

of these two pathogens is essential due to the high mortality rates and risk of haematogenous complications associated with these microbes. In addition, some *Candida* requires a longer time for growth in BC than other pathogens, delaying the initiation of treatment by several days. *Candida* spp. was the third most frequently occurring pathogen detected in our study. As expected, most of the positive samples were obtained from ICU patients. We detected a small number of resistance genes. Although the three *mecA* genes detected by MP were confirmed by routine susceptibility testing, in four cases of CoNS methicillin-resistant by routine susceptibility testing *mecA* gene was not detected by MP. Furthermore, the only *vanB*-positive *E. faecalis* detected by MP was not isolated by BC. Therefore, the accuracy of MP in detecting resistance genes should be further evaluated and probably is necessary the second molecular assay to confirm discordant results due to low predictor value of some phenotypic testing for detection of methicillin resistance.

Despite the many advantages of molecular assays, these tests have several important limitations. First, these methods require specialized equipment and technical experience and are usually expensive. The MP test also has several manual steps that make it laborious and increase the risk of possible contamination. Moreover, its low sensitivity makes its implementation as a routine test difficult in clinical microbiology laboratories. Finally, the sensitivity and specificity of molecular assays vary according to the test, the extraction method, the algorithm used to evaluate the results, the comparative method and the study population. Data published to date support the use of PCR-based tests for specific groups of patients, such as critically ill patients in ICU, those with suspected candidaemia or patients receiving broad-spectrum antibiotics (von Lilienfeld-Toal et al., 2009; Bravo et al., 2011). There is no consensus about the interpretation of BC-negative and PCR-positive results (low pathogen concentrations, non-viable bacteria and DNAemia, etc.). Further studies are needed to evaluate the role of new molecular assays in the routine microbiological diagnosis of BSI. The main strengths of our study are: the higher sample number comparing with previous reports; patients included were not only from emergency departments but also from ICU and oncology/hematology; clinical conditions and antimicrobial treatment of patients with positive results detected only by PCR was investigated.

The main limitation of this study is that discordant only MP positive results were considered as false positive due to the use of BC as comparator. BC lacks sensitivity and the second molecular assay should be used to evaluate discordant results.

In conclusion, sepsis is a time-dependent disease that requires early diagnosis and prompt appropriate treatment to improve prognosis. The MP assay provides results within 6 h, thereby significantly reducing the amount of time for diagnosis and seems to be especially useful in patients on antimicrobial treatment. Nevertheless, the assay has to be optimized, mainly to improve the sensitivity and also including other significant microorganisms within the panel. Greater automation is necessary to facilitate introduction of the assay into routine laboratory workflow and to reduce turnaround time.

Furthermore, the microbial detection limits of the molecular assay need to be improved, probably by new extraction protocols and greater sample volumes to improve the positive and negative predictive power so that it can be a useful tool in clinical practice, especially regarding its impact on antibiotic use.

DATA AVAILABILITY

The raw data supporting the conclusions of this manuscript will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher. Requests to access the datasets should be directed to Catia Cillóniz.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CC, YZ, and JV had full access to all data in the study, and take full responsibility for its integrity, accuracy, and analysis. YZ, CC, NC-T, JH, MA, AV, CM, AS, JM, FM, and JV study concept and design, and acquisition, analysis, or interpretation of data, and critical revision of the manuscript for important intellectual content, and administrative, technical, or material support. CC, YZ, and JV drafting of the manuscript and study supervision, and statistical analysis.

FUNDING

This study was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III, and co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF) A Way to Achieve Europe and the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015). This study was also supported by grant 2014SGR653 from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació of the Generalitat de Catalunya, as well as by funding from the Innovative Medicines Initiative (COMBACTE, grant agreement 115523), *Ciber de Enfermedades Respiratorias* (CibeRes CB06/06/0028), 2009 Support to Research Groups of Catalonia 911 and IDIBAPS (CERCA Programme/Generalitat de Catalunya). The funding sources had no role in the design or conduct of the study; collection, management, analysis, or interpretation of the data; preparation, review, or approval of the manuscript; or decision to submit the manuscript for publication. CC is the recipient of a postdoctoral grant (Strategic Plan for Research and Innovation in Health - PERIS 2016-2020). CM was working with the IZASA-Werfen Group during the undertaking of this study.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to all our medical and nursing colleagues for their assistance and cooperation in this study. All the reagents for the Magicplex™ Sepsis test were provided by the IZASA-Werfen Group. Our article has been released as a pre-print at <https://www.biorxiv.org/content/early/2018/07/23/374736> (Zboromyrska et al., 2018).

REFERENCES

- Bloos, F., Sachse, S., Kortgen, A., Pletz, M. W., Lehmann, M., Straube, E., et al. (2012). Evaluation of a polymerase chain reaction assay for pathogen detection in septic patients under routine condition: an observational study. *PLoS ONE* 7:e46003. doi: 10.1371/journal.pone.0046003
- Bravo, D., Blanquer, J., Tormo, M., Aguilar, G., Borrás, R., Solano, C., et al. (2011). Diagnostic accuracy and potential clinical value of the lightcycler septicfast assay in the management of bloodstream infections occurring in neutropenic and critically ill patients. *Int. J. Infect. Dis.* 15, e326–e331. doi: 10.1016/j.ijid.2011.01.003
- Candel, F. J., Borges, S. á. M., Belda, S., Bou, G., Del Pozo, J. L., Estrada, O., et al. (2018). Current aspects in sepsis approach. turning things around. *Rev. Espanola. Quimioter.* 31, 298–315.
- Carrara, L., Navarro, F., Turbau, M., Seres, M., Morán, I., Quintana, I., et al. (2013). Molecular diagnosis of bloodstream infections with a new dual-priming oligonucleotide-based multiplex PCR assay. *J. Med. Microbiol.* 62(Pt 11), 1673–1679. doi: 10.1099/jmm.0.064758-0
- Denina, M., Scolfaro, C., Colombo, S., Calitri, C., Garazzino, S., Barbui Anna, A., et al. (2016). Magicplex(TM) sepsis real-time test to improve bloodstream infection diagnostics in children. *Eur. J. Pediatr.* 175, 1107–1111. doi: 10.1007/s00431-016-2745-3
- Fenollar, F., and Raoult, D. (2007). Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents* 30(Suppl 1), S7–S15. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.06.024
- Ferrer, R., Martin-Loeches, I., Phillips, G., Osborn, T. M., Townsend, S., Dellinger, R. P., et al. (2014). Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program. *Crit. Care Med.* 42, 1749–1755. doi: 10.1097/CCM.0000000000000330
- Fitting, C., Parlato, M., Adib-Conquy, M., Memain, N., Philippart, F., Misset, B., et al. (2012). DNAemia detection by multiplex PCR and biomarkers for infection in systemic inflammatory response syndrome patients. *PLoS ONE* 7:e38916. doi: 10.1371/journal.pone.0038916
- Grif, K., Fille, M., Würzner, R., Weiss, G., Lorenz, I., Gruber, G., et al. (2012). Rapid detection of bloodstream pathogens by real-time PCR in patients with sepsis. *Wien Klin Wochenschr.* 124, 266–270. doi: 10.1007/s00508-012-0159-4
- Hansen, W. L. J., Bruggeman, C. A., and Wolffs, P. F. G. (2009). Evaluation of new preanalysis sample treatment tools and DNA isolation protocols to improve bacterial pathogen detection in whole blood. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2629–2631. doi: 10.1128/JCM.00821-09
- Kühn, C., Disqué C., Mühl, H., Orszag, P., Stiesch, M., and Haverich, A. (2011). Evaluation of commercial universal rRNA gene PCR plus sequencing tests for identification of bacteria and fungi associated with infectious endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* 49, 2919–2923. doi: 10.1128/JCM.00830-11
- Kumar, A., Roberts, D., Wood, K. E., Light, B., Parrillo, J. E., Sharma, S., et al. (2006). Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit. Care Med.* 34, 1589–1596. doi: 10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9
- Lehmann, L. E., Hunfeld, K.-P., Emrich, T., Haberhausen, G., Wissing, H., Hoefl, A., et al. (2008). A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 197, 313–324. doi: 10.1007/s00430-007-0063-0
- Leitner, E., Kessler, H. H., Spindelboeck, W., Hoenigl, M., Putz-Bankuti, C., Stadlbauer-Köllner, V., et al. (2013). Comparison of two molecular assays with conventional blood culture for diagnosis of sepsis. *J. Microbiol. Methods* 92, 253–255. doi: 10.1016/j.mimet.2012.12.012
- Ljungström, L., Enroth, H., Claesson, B. E. B., Ovemyr, I., Karlsson, J., Fröberg, B., et al. (2015). Clinical evaluation of commercial nucleic acid amplification tests in patients with suspected sepsis. *BMC Infect. Dis.* 15:199. doi: 10.1186/s12879-015-0938-4
- Loonen, A. J. M., Bos, M. P., van Meerbergen, B., Neerken, S., Catsburg, A., Dobbelaer, I., et al. (2013). Comparison of pathogen DNA isolation methods from large volumes of whole blood to improve molecular diagnosis of bloodstream infections. *PLoS ONE* 8:e72349. doi: 10.1371/journal.pone.0072349
- Mylonakis, E., Clancy, C. J., Ostrosky-Zeichner, L., Garey, K. W., Alangaden, G. J., Vazquez, J. A., et al. (2015). T2 magnetic resonance assay for the rapid diagnosis of candidemia in whole blood: a clinical trial. *Clin. Infect. Dis.* 60, 892–899. doi: 10.1093/cid/ciu959
- Nieman, A. E., Savelkoul, P. H. M., Beishuizen, A., Henrich, B., Lamik, B., MacKenzie, C. R., et al. (2016). A prospective multicenter evaluation of direct molecular detection of blood stream infection from a clinical perspective. *BMC Infect. Dis.* 16:314. doi: 10.1186/s12879-016-1646-4
- Opota, O., Jatou, K., and Greub, G. (2015). Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood. *Clin. Microbiol. Infect.* 21, 323–331. doi: 10.1016/j.cmi.2015.02.005
- Peker, N., Couto, N., Sinha, B., and Rossen, J. W. (2018). Diagnosis of bloodstream infections from positive blood cultures and directly from blood samples: recent developments in molecular approaches. *Clin Microbiol Infect.* 24, 944–955. doi: 10.1016/j.cmi.2018.05.007
- Serra, J., Rosello, E., Figueras, C., Pujol, M., Peña, Y., Céspedes, P., et al. (2012). Clinical evaluation of the magicplex sepsis real-time test (Seegene) to detect candida DNA in pediatric patients. *Crit. Care* 16(Suppl 3):P42. doi: 10.1186/cc11729
- Sinha, M., Jupe, J., Mack, H., Coleman, T. P., Lawrence, S. M., and Fraley, S. I. (2018). Emerging technologies for molecular diagnosis of sepsis. *Clin. Microbiol. Rev.* 31:e00089-17. doi: 10.1128/CMR.00089-17
- Snyder, J. L., Giese, H., Bandoski-Gralinski, C., Townsend, J., Jacobson, B. E., Shivers, R., et al. (2017). T2 magnetic resonance assay-based direct detection of three lyme disease-related borrelia species in whole-blood samples. *J. Clin. Microbiol.* 55, 2453–2461. doi: 10.1128/JCM.00510-17
- Trung, N. T., Hien, T. T. T., Huyen, T. T. T., Quyen, D. T., Van Son, T., Hoan, P. Q., et al. (2016). Enrichment of bacterial DNA for the diagnosis of blood stream infections. *BMC Infect. Dis.* 16:235. doi: 10.1186/s12879-016-1568-1
- von Lilienfeld-Toal, M., Lehmann, L. E., Raadts, A. D., Hahn-Ast, C., Orlopp, K. S., Marklein, G., et al. (2009). Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2405–2410. doi: 10.1128/JCM.00491-09
- Wellinghausen, N., Kochem, A.-J., Disqué C., Mühl, H., Gebert, S., Winter, J., et al. (2009). Diagnosis of bacteremia in whole-blood samples by use of a commercial universal 16S rRNA gene-based PCR and sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2759–2765. doi: 10.1128/JCM.00567-09
- World Health Organization (2018). *Sepsis*. World Health Organization. Available online at: <http://www.who.int/sepsis/en/> (Accessed Oct 15, 2018)
- Yagupsky, P., and Nolte, F. S. (1990). Quantitative aspects of septicemia. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 269–279.
- Zboromyrska, Y., Cilloniz, C., Cobos-Trigueros, N., Almela, M., Hurtado, J. C., Vergara, A., et al. (2018). Magicplex™ Sepsis real-time test for the rapid diagnosis of bloodstream infections in adults. *bioRxiv* 1:374736. doi: 10.1101/374736
- Ziegler, I., Fagerström, A., Strålin, K., and Mölling, P. (2016). Evaluation of a commercial multiplex PCR assay for detection of pathogen DNA in blood from patients with suspected sepsis. *PLoS ONE* 11:e0167883. doi: 10.1371/journal.pone.0167883

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Zboromyrska, Cilloniz, Cobos-Trigueros, Almela, Hurtado, Vergara, Mata, Soriano, Mensa, Marco and Vila. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

RESULTADOS

2. Identificación de patógenos causantes de ITU mediante EM MALDI-TOF a partir de la muestra directa de orina

2.1 Artículo 3

Development of a new protocol for rapid bacterial identification and susceptibility testing directly from urine samples

Yuliya Zboromyrska, Elisa Rubio, Izaskun Alejo, Andrea Vergara, Anna Mons, Irene Campo, Jordi Bosch, Francesc Marco, Jordi Vila

Clin Microbiol Infect. 2016 Jun; 22(6): 561.e1-6. doi: 10.1016/j.cmi.2016.01.025.

Factor de Impacto: 5.292 (2016) – Q1 (Scimago, Infectious Diseases); Q1 (Scimago, Medicine (Miscellaneous)); Q1 (Scimago, Microbiology (Medical)). (Objetivo 2).

Objetivos

El objetivo del estudio ha sido elaborar un protocolo para acortar el tiempo de procesamiento de la muestra de orina hasta obtener el resultado de identificación, con la combinación de la citometría de flujo, como método de cribado, y EM MALDI-TOF para la identificación directa, seguidos por antibiograma convencional mediante difusión con discos a partir del sedimento bacteriano.

Métodos

El estudio se ha dividido en dos partes. Durante la primera parte se han procesado 675 orinas para establecer el *cut-off* del recuento bacteriano para incluir las muestras para la identificación directa. Durante la segunda parte se han procesado 1.029 muestras de orina, de las cuales 163 han alcanzado el *cut-off* establecido. La citometría de flujo se ha realizado con un UF-500i (Sysmex), usando 4 mL de orina. La preparación de la muestra para la identificación directa mediante EM MALDI-TOF ha incluido dos pasos de centrifugación y dos de lavado del sedimento bacteriano. Para ello, se han usado 10 mL de orina. Los resultados de identificación directa se han considerado válidos si se había obtenido un valor de ≥ 1.700 . En el caso de identificación directa válida se ha realizado antibiograma mediante el método de difusión con discos con el sedimento bacteriano. Los resultados se han comparado con los obtenidos mediante el procedimiento convencional.

Resultados

En la primera parte del estudio se ha establecido el *cut-off* de $\geq 5 \times 10^6$ bacterias/mL (5.000 bacterias por microlitro), ya que el 94% (110/117) de las muestras que han alcanzado este *cut-off* han sido positivas en urocultivo, con tan solo un 6% de las muestras contaminadas. De las 163 muestras que han cumplido el *cut-off* en la segunda parte del estudio, la identificación directa se ha realizado en 140 (85,9%), ya que en 23 casos no hubo muestra suficiente. De estas 140 muestras, las 125 han sido positivas por urocultivo, 12 se han considerado contaminadas y 3 han sido negativas. La identificación válida se ha obtenido en 108 de las 125 muestras positivas por cultivo (86,4%), mientras que en 17 (13,6%) no hubo identificación válida. El promedio del valor de la identificación directa ha sido 2.122 (mínimo 1.753; máximo

RESULTADOS

2.420). De las 12 muestras consideradas posteriormente como contaminadas según el urocultivo, se ha obtenido una identificación directa válida en seis. No hubo identificaciones válidas en ninguna de las tres muestras negativas por cultivo. El antibiograma directo se ha realizado en 102 de las 108 muestras con identificación válida y los resultados han sido concordantes con el procedimiento convencional para las 83 muestras con infección monomicrobiana, detectando 24 h antes 14 cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido y una cepa hiperproductora de β -lactamasa tipo ampC.

Conclusiones

El protocolo propuesto permite obtener la identificación del patógeno causante de la infección directamente en la muestra de orina en tan solo una hora desde el momento de la llegada de la muestra al laboratorio, y adelantar 18 – 24 h los resultados de la identificación y el antibiograma.

Development of a new protocol for rapid bacterial identification and susceptibility testing directly from urine samples

Y. Zboromyrska^{1,2}, E. Rubio¹, I. Alejo¹, A. Vergara¹, A. Mons¹, I. Campo¹, J. Bosch^{1,2}, F. Marco^{1,2} and J. Vila^{1,2}

1) Department of Clinical Microbiology, Hospital Clínic, School of Medicine and 2) ISGlobal, Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Hospital Clínic, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract

The current gold standard method for the diagnosis of urinary tract infections (UTI) is urine culture that requires 18–48 h for the identification of the causative microorganisms and an additional 24 h until the results of antimicrobial susceptibility testing (AST) are available. The aim of this study was to shorten the time of urine sample processing by a combination of flow cytometry for screening and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) for bacterial identification followed by AST directly from urine. The study was divided into two parts. During the first part, 675 urine samples were processed by a flow cytometry device and a cut-off value of bacterial count was determined to select samples for direct identification by MALDI-TOF-MS at $\geq 5 \times 10^6$ bacteria/mL. During the second part, 163 of 1029 processed samples reached the cut-off value. The sample preparation protocol for direct identification included two centrifugation and two washing steps. Direct AST was performed by the disc diffusion method if a reliable direct identification was obtained. Direct MALDI-TOF-MS identification was performed in 140 urine samples; 125 of the samples were positive by urine culture, 12 were contaminated and 3 were negative. Reliable direct identification was obtained in 108 (86.4%) of the 125 positive samples. AST was performed in 102 identified samples, and the results were fully concordant with the routine method among 83 monomicrobial infections. In conclusion, the turnaround time of the protocol described to diagnose UTI was about 1 h for microbial identification and 18–24 h for AST.

© 2016 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Antimicrobial susceptibility, bacterial identification, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, urinary tract infection, urine

Original Submission: 17 July 2015; **Revised Submission:** 23 November 2015; **Accepted:** 28 January 2016

Editor: D. Raoult

Article published online: 17 February 2016

Corresponding author: J. Vila, Department of Clinical Microbiology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain
E-mail: jvila@clinic.ub.es

Introduction

Urinary tract infection (UTI) is a common disease in both outpatients and inpatients [1,2]. Rapid diagnosis improves the management of patients, especially with sepsis, because inappropriate antibiotic therapy has an important impact on patient outcome and mortality rates [3]. Moreover, increasing bacterial

resistance to antibiotics is a challenge for administering adequate empirical treatment.

In recent years, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) has become the reference standard for identification (ID) of microorganisms in clinical microbiology laboratories. Although direct ID from clinical specimens may be a promising application of MALDI-TOF-MS, several limitations should be considered. First, a relatively high bacterial concentration is required to obtain a valid protein spectrum. Second, a sufficient sample volume is also needed, being critical for some types of biological specimens. Additionally, some clinical samples are extremely purulent and thick due to high leucocyte concentrations,

making it almost impossible to separate microorganisms from human cells. Previous studies have demonstrated that urine is an optimal specimen for direct MALDI-TOF-MS-based ID [4,5]. Once the pathogen is identified, an additional 18–24 h are needed to perform antimicrobial susceptibility testing (AST). Performing both ID and AST directly from urine samples could greatly shorten the time to the final microbiological report. As urine is the most common sample processed in microbiological laboratories, a screening method is required to rapidly identify positive samples suitable for direct ID and AST. Although flow cytometry is used mainly to identify negative samples that can be reported without culture [6,7], this method has also been used to rapidly identify positive urine samples to perform direct MALDI-TOF-MS ID [4,8].

The objective of our study was to elaborate a protocol for rapidly processing urine samples by a combination of flow cytometry for screening, mass spectrometry for ID followed by AST by a disc diffusion method directly from urine samples.

Material and Methods

Sample collection

Urine samples were collected during two time periods in the Department of Clinical Microbiology of a 700-bed university hospital in Barcelona, Spain. All samples were collected in 100-mL urine containers without any chemical preservatives and once received in the laboratory were processed immediately or stored at 4°C until processing. The first part of the study (Part A) lasted 5 weeks, during which 675 urine samples were collected and processed by flow cytometry to establish a cut-off value of bacterial count to select samples for direct ID by MALDI-TOF-MS. During the second part of the study (Part B), which lasted 8 weeks, 1029 urine samples were collected and processed by flow cytometry for screening. Samples achieving the cut-off value were then processed by MALDI-TOF-MS for bacterial ID followed by susceptibility testing. Ninety-six samples were needed to estimate a proportion using a 95% CI with 10% precision and assuming uncertainty (expected proportion 50%). We finally processed 140 samples by MALDI-TOF-MS for direct ID and 108 for direct susceptibility testing.

Routine microbiological processing

The routine protocol included conventional urine sample screening with a Clinitek® 500 Urine Chemistry Analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Germany) and quantitative urine culture on cysteine-lactose electrolyte-deficient agar (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) at 37°C for 24–48 h in aerobiosis. The final ID was achieved with MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonik, GmbH, Bremen, Germany).

Urine samples were considered positive with $>10^4$ /mL growth of one or two microorganisms whereas samples with more than two microorganisms were considered contaminated. Susceptibility testing was performed by a disc diffusion method and the results were interpreted according to EUCAST guidelines (<http://www.eucast.org>).

Flow cytometry

Flow cytometry analysis was performed by UF-500i (Sysmex, Kobe, Japan), using 4 mL of urine, as described previously [7,8].

Direct MALDI-TOF-MS-based identification

The following protocol was used to achieve direct ID by MALDI-TOF-MS. First, 10 mL of urine were centrifuged at 430 g for 5 min; then, the supernatant was centrifuged at 15 600 g for 2 min; the pellet obtained was washed twice with sterile water and used for ID by MALDI-TOF-MS. Each sample was analysed in duplicate. For this, two spots of MSP 96 target polished steel plates (Bruker Daltonik GmbH) were covered with 1 µL of the pellet obtained and air-dried. Then, one of the spots was covered with 1 µL of 70% formic acid (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and air-dried. Thereafter, both spots were covered with 1 µL of matrix solution (cyano-4-hydroxy-cinnamic acid) in 50% acetonitrile with 2.5% trifluoroacetic acid (Bruker Daltonik GmbH). Spectra acquisition was performed in MALDI Microflex LT (Bruker Daltonik GmbH) using FLEX-CONTROL v.3.0 software. The final ID was achieved using BIOTYPER v.3.0 software. According to the manufacturer, a score of <1.7 indicates no reliable identification (NRI), a score between 1.7 and 2.0 indicates genus identification, and a score ≥ 2.0 indicates species identification. Apart from a score value, MALDI-TOF-MS software provides a list of ten microorganisms with the most similar spectra. We considered the species-level ID valid if the same species with a score ≥ 1.7 was obtained for the first microorganism from the list of the two dropped spots or for the first two microorganisms from the list of the same spot if one of the spots was NRI or No Peaks (NP). We considered the genus-level ID valid if only the first option with a score ≥ 1.7 was obtained from the list of only one spot. The highest score obtained from two spots was recorded to calculate the average score value.

Direct antimicrobial susceptibility testing

Susceptibility testing was conducted with the remaining pellet after direct bacterial ID by MALDI-TOF-MS. To do this, an equivalent 0.5 McFarland suspension (0.5 McF) in sterile saline was prepared and plated on Müller–Hinton (MH) agar to perform AST by a disc diffusion method. If the pellet was insufficient to achieve 0.5 McF, an additional 10 mL of urine, if available, were centrifuged as described above. The results of

the direct susceptibility testing were interpreted according to EUCAST guidelines and compared with those obtained using the conventional procedure.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS software (SPSS, Chicago, IL, USA). To compare quantitative and qualitative data the Student's *t*-test and chi-squared test were used, respectively. Differences were considered significant with a $p < 0.05$.

Results

The characteristics of the samples from study groups A and B are shown in Table 1. To establish a cut-off value of bacterial count in Part A all the samples processed ($n = 675$) were divided into ten groups according to the bacterial count provided by flow cytometry. Table 2 shows the correlation between the urine culture results (positive, negative or contaminated) and the bacterial count obtained by UF-500i. The cut-off value was determined to be $\geq 5 \times 10^6$ bacteria/mL since 94% (110/117) of the samples achieving or exceeding the cut-off value were positive by urine culture with only 6% (7/117) of contaminated samples. We also compared the characteristics of the samples achieving the cut-off value with those that did not from the part B of the study (Table 3).

During Part B, 1029 consecutive urine samples were tested by UF-500i and 163 (15.8%) achieved the bacterial count cut-off (Table 2), with 140 out of 163 (85.9%) samples being processed by MALDI-TOF-MS for direct ID and 23 samples not having sufficient volume to be processed. On analysing the urine culture results, 125 of the 140 samples processed were positive, 12 samples were contaminated and three were negative.

MALDI-TOF-MS direct ID results

A valid ID was obtained in 108 (86.4%) of the 125 samples positive by culture, while 17 (13.6%) samples were NP ($n = 6$) or NRI ($n = 11$). Interestingly, species-level ID was obtained in 104 of these 108 samples. Table 4 summarizes the results of

direct MALDI-TOF-MS ID and conventional urine culture in the 125 culture-positive samples. None of the samples was misidentified with direct MALDI-TOF-MS compared with the routine method. Nineteen of the 108 samples identified were positive for two pathogens by standard culture. MALDI-TOF-MS correctly identified one of the two pathogens, most likely the predominant pathogen. The average score of direct MALDI-TOF-MS ID was 2.122 (min 1.753; max 2.420). The dominating pathogen was *Escherichia coli* (68/108, 63%), followed by *Klebsiella pneumoniae* (22/108, 20.4%). Of the 125 positive samples, 124 yielded growth of $\geq 10^5$ CFU/mL and only one sample showed growth between 10^4 and 10^5 CFU/mL on culture plates.

Among the 12 samples categorized as contaminated, five were NRI, one was NP and in six samples a reliable ID was obtained, including two *E. coli* (at the species level), two *K. pneumoniae* (at the genus level), one *K. oxytoca* (at the genus level) and one *Aerococcus urinae* (at the genus level).

On analysing three samples that were negative by conventional culture, two were NP and one was NRI. The turnaround time of direct MALDI-TOF-MS ID was about 1 h.

Direct AST results

Direct AST was performed in 102 out of 108 samples in which bacteria were identified, including three Gram-positive and 99 Gram-negative bacteria (GNB). In six samples the pellet obtained for MALDI-TOF-MS was not sufficient to achieve a 0.5 McF suspension, and no additional urine sample was available for further processing. The results of direct and routine susceptibility testing were fully concordant in 83 monomicrobial infections, including 3 Gram-positive bacteria and 80 GNB. Among 80 monomicrobial GNB samples, 14 (17.5%) showed extended-spectrum β -lactamase-producing GNB (nine *E. coli* and five *K. pneumoniae*) and one AmpC β -lactamase-hyper-producing *Enterobacter cloacae*.

Regarding the 19 samples in which two pathogens were isolated, *Enterococcus* spp. and GNB co-infection were identified in five cases, and the results of direct ID and AST corresponded to GNB. Nevertheless, enterococcal growth was detected on MH plates. The remaining 14 samples were positive for two Gram-negative bacteria and showed mixed growth on MH plates. Routine testing detected one extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli*, one cefamicinase-producing *E. coli* and one multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Interestingly, these resistance patterns were suspected in direct AST despite the presence of the second pathogen.

Direct AST was also performed in five of the six directly identified samples, which were later reported to be contaminated by the routine procedure, being of mixed growth on MH plates.

TABLE 1. Characteristics of the patients and urine samples from Part A ($n = 675$) and Part B ($n = 1029$) of the study

Characteristics	Part A, n (%)	Part B, n (%)	p^a
Female patients	413 (61.2)	634 (61.6)	0.859
Age (years), mean, SD	56.6, 19.3	54.9, 19.8	0.079
Outpatients	516 (76.4)	797 (77.5)	0.628
Urine catheter	100 (14.8)	135 (13.1)	0.321
Positive samples	198 (29.3)	289 (28.1)	0.577
Contaminated samples	164 (24.3)	241 (23.4)	0.678
Negative samples	313 (46.4)	499 (48.5)	0.391

^aDifferences were considered significant with a $p < 0.05$.

TABLE 2. Correlation between urine culture results and flow cytometer bacterial count among urine samples processed during Part A and Part B of the study

Urine culture	Bacterial count (bacteria/mL) by UF-500i										Total n (%)
	<5 × 10 ³ n (%)	5 × 10 ³ –10 ⁴ n (%)	10 ⁴ –5 × 10 ⁴ n (%)	5 × 10 ⁴ –10 ⁵ n (%)	10 ⁵ –5 × 10 ⁵ n (%)	5 × 10 ⁵ –10 ⁶ n (%)	10 ⁶ –5 × 10 ⁶ n (%)	5 × 10 ⁶ –10 ⁷ n (%)	10 ⁷ –10 ⁸ n (%)	≥10 ⁸ n (%)	
Urine samples processed during Part A of the study											
Positive	0 (0)	5 (6.9)	18 (11.6)	8 (14.5)	18 (18)	11 (26.2)	28 (45.9)	16 (80)	90 (96.8)	4 (100)	198 (29.3)
Contaminated	7 (9.6)	7 (9.7)	29 (18.7)	17 (30.9)	46 (46)	22 (52.4)	29 (47.5)	4 (20)	3 (3.2)	0	164 (24.3)
Negative	66 (90.4)	60 (83.3)	108 (69.7)	30 (54.5)	36 (36)	9 (21.4)	4 (6.6)	0	0	0	313 (46.4)
Total	73 (100)	72 (100)	155 (100)	55 (100)	100 (100)	42 (100)	61 (100)	20 (100)	93 (100)	4 (100)	675 (100)
Urine samples processed during Part B of the study											
Positive	2 (1.6)	5 (4.6)	20 (9.7)	12 (15.6)	34 (21.1)	23 (32.9)	51 (43.6)	29 (72.5)	112 (91.8)	1 (100)	289 (28.1)
Contaminated	5 (4)	12 (11)	34 (16.4)	28 (36.4)	66 (41)	32 (45.7)	46 (39.3)	8 (20)	10 (8.2)	0	241 (23.4)
Negative	118 (94.4)	92 (84.4)	153 (73.9)	37 (48.1)	61 (37.9)	15 (21.4)	20 (17.1)	3 (7.5)	0	0	499 (48.5)
Total	125 (100)	109 (100)	207 (100)	77 (100)	161 (100)	70 (100)	117 (100)	40 (100)	122 (100)	1 (100)	1029 (100) (100)

Positive samples with bacterial count greater than or equal to the established cut-off in the two study groups are shown in bold.

Discussion

Urinary tract infection is the second most common infection and is a common cause of sepsis [9]. The aim of this study was to elaborate a protocol for rapid urine sample processing to shorten the time of microbial ID and susceptibility testing results. We used a high urine volume (10 mL) for MALDI-TOF-MS ID as the pellet obtained was also needed for direct AST. This could explain the higher score values of direct ID compared with other studies [4,5,8]. However, the use of a high input volume could be a limitation for laboratories that receive urine in 10-mL urine containers, especially to perform both direct identification and susceptibility testing, and considering that an additional 4 mL are needed for flow cytometry screening. Another approach to increase bacterial concentrations involves the addition of a short incubation step before MALDI-TOF-MS ID [10]. Nevertheless, the incubation time of at least 4 h needed to obtain significantly better results obviously prolongs the time of urine processing, being more laborious and cumbersome. In concordance with our results, the authors concluded that the Sysmex UF-1000i bacterial count of >10⁷ bacterial/mL allows direct ID without previous incubation, using a centrifugation-based procedure, while a lower bacterial count was frequently insufficient to obtain a reliable ID. To improve the detection limits of MALDI-TOF-MS, the diafiltration method was also proposed [11]. Although this method allows identification of 10⁵ CFU/mL, its turnaround time is about 2–3 h, whereas the centrifugation protocol requires <1 h. Moreover, additional materials (centrifugal filters) for diafiltration are required. Sánchez-Juanes *et al.* improved direct ID from urine with pretreatment with SDS to enhance cell lysis and the release of microorganisms [12]. A protein extraction procedure with the bacterial pellet obtained has been reported to slightly improve direct MALDI-TOF-MS-based ID [4]. Nevertheless, since bacteria were also needed for direct AST, a protein extraction protocol could not have been used in the present study.

In our study, no valid direct ID was obtained in 17 (13.6%) samples with counts ≥10⁵ CFU/mL by culture and ≥5 × 10⁶ bacteria/mL by flow cytometry. The lower identification scores obtained in five cases could be explained by the presence of two pathogens, probably in equal proportion. The remaining failures may be due to the presence of urine proteins not removed during washing steps [13] or to the presence of contaminant bacteria in 10 mL of urine processed, that could not be isolated by routine culture, in which only 1 µL of urine is used [10]. Samples achieving the established cut-off value were more likely from older patients and patients with a urine catheter.

An interesting finding of our study was the direct ID of *Clostridium perfringens*, the obligate anaerobe that does not grow on cysteine-lactose electrolyte-deficient medium with standard incubation conditions. In this case, after direct MALDI-TOF-MS ID, the standard protocol was changed and this sample was cultured on Schaedler medium in anaerobiosis. After 18 h a pure culture was obtained with >10⁵ CFU/mL of *C. perfringens*, whereas the standard aerobic culture was negative after 48 h of incubation. As anaerobic bacteria are rarely involved in UTI, most laboratories do not include an anaerobic culture in the standard urine culture protocol. Nevertheless, UTI caused by anaerobic bacteria has been previously reported [14,15], being particularly relevant in patients with anatomical abnormalities.

TABLE 3. Characteristics of the patients and urine samples from Part B (n = 1029) of the study according to the cut-off value of bacterial count

Characteristics	<5 × 10 ⁶ bacteria/mL, n (%)	≥5 × 10 ⁶ bacteria/mL, n (%)	p ^a
Female patients	529 (61.1)	105 (64.4)	0.422
Age (years, mean, SD)	53.8, 19.4	60.3, 20.6	<0.001
Outpatients	665 (76.8)	132 (81)	0.240
Urine catheter	103 (11.9)	32 (19.6)	0.007

^aDifferences were considered significant with a p < 0.05. Statistically significant differences are indicated in bold.

TABLE 4. Results of direct MALDI-TOF-MS identification and conventional urine culture of 125 positive urine samples

Direct MALDI-TOF-MS identification	Number of samples	Urine culture results (number of samples)	Medium score of direct MALDI-TOF-MS identification	Direct susceptibility testing performed
<i>Escherichia coli</i>	68	<i>E. coli</i> (59)	2.100	63
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	22	<i>E. coli</i> and other microorganism (9) ^a <i>K. pneumoniae</i> (16)	2.102 2.175	22
<i>Proteus mirabilis</i>	5	<i>K. pneumoniae</i> and other microorganism (6) ^b <i>Proteus mirabilis</i> (3)	2.082 2.276	5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	<i>Proteus mirabilis</i> and <i>E. coli</i> (2) <i>K. oxytoca</i> (4)	2.115 2.163	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	<i>P. aeruginosa</i> (1) <i>P. aeruginosa</i> and <i>K. pneumoniae</i> (1) <i>P. aeruginosa</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> (1)	1.996 2.325 2.168	3
<i>Morganella morganii</i>	1	<i>M. morganii</i> (1)	2.276	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	<i>Enterobacter cloacae</i> (1)	1.881	1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	<i>Streptococcus agalactiae</i> (1)	2.203	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	<i>S. aureus</i> (1)	1.946	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	<i>Enterococcus faecalis</i> (1)	2.257	1
<i>Clostridium perfringens</i>	1	<i>C. perfringens</i> (1)	2.289	—
No peaks	6	<i>E. coli</i> (2), <i>K. pneumoniae</i> (1), <i>Proteus mirabilis</i> (1), <i>P. aeruginosa</i> and <i>M. morganii</i> (1), <i>P. aeruginosa</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> (1)	—	—
No reliable identification	11	<i>E. coli</i> (4), <i>K. pneumoniae</i> (1), <i>M. morganii</i> (1), <i>Enterobacter cloacae</i> (1), <i>K. pneumoniae</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> (1), <i>E. coli</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> (1), <i>E. coli</i> and <i>Citrobacter freundii</i> (1), <i>Enterococcus faecalis</i> (1)	—	—

Abbreviations: MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry.

^aNine mixed cultures included *E. coli* and *K. pneumoniae* (2), *Enterococcus faecalis* (1), *Serratia marcescens* (1), *P. aeruginosa* (1), *Enterococcus hirae* (1), *Proteus mirabilis* (1), *Enterobacter aerogenes* (1) and a different strain of *E. coli* (1).

^bSix mixed cultures included *K. pneumoniae* and *E. coli* (2), *Enterococcus faecalis* (2), *Proteus mirabilis* (1) and *Citrobacter koseri* (1).

Interestingly, this urine was from a patient with Crohn's disease who had presented several episodes of UTI in the previous 6 months. Therefore, the presence of complications, such as an enterovesicular fistula, should be ruled out [16].

Importantly, the results of direct AST were fully concordant among monomicrobial infections. The small number of directly identified GPB bacteria may be explained by the high cut-off value of the bacterial count used, which is more frequently achieved by GNB than by Gram-positive microorganisms [17].

The main limitation of our protocol was contaminated samples in which a valid direct ID ($n = 6$) could be reported as a true positive. This occurred in 4.3% (6/140) of the total number of urine samples processed, representing 5.3% (6/114) of samples with a valid direct ID. Although the number of directly identified contaminated samples was small, the clinical impact of reporting these samples as positive must be taken into account. On the other hand, since the results of direct AST were available simultaneously with traditional urine culture, contaminated samples were detected and the corresponding AST could be ruled out. Another limitation of this study is the high sample volume (minimum 14 mL) required to perform the protocol, which could be a problem if smaller urine collection containers are used. Regarding a future application of the protocol proposed, two main points should be considered. First, urine is the most common sample processed in microbiology laboratories, whereas sample preparation for MALDI-

TOF-MS requires time and dedicated personnel. Second, the patients who would most benefit from the application of the protocol should be determined. Direct ID and susceptibility testing should probably be reserved for patients with pyelonephritis or prostatitis and those with complicated UTI.

In conclusion, the protocol described provides rapid discrimination of positive urine samples suitable for direct ID and AST. This procedure shortens the time of urine sample processing by 24–48 h in cases of monomicrobial infection. Bacterial ID was available the same day as sample reception in the microbiology laboratory, thereby facilitating the implementation of appropriate empirical treatment, whereas AST results were available in 18–24 h, allowing treatment modification, if necessary. Nevertheless, the possible risk of reporting some contaminated samples as positive requires further study.

Transparency Declaration

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was supported by grant 2014SGR0653 from the Departament de Universitats, Recerca i Societat de la

Informació de la Generalitat de Catalunya, by the Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III, co-financed by European Regional Development Fund (ERDF) *A Way to Achieve Europe*, the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015). This study was also supported by the Innovative Medicines Initiative (COMBACTE-CARE, grant agreement 115620). In addition, YZ was supported by the Hospital Clínic of Barcelona.

The results of this study have been presented at the 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 25–28 April 2015 in Copenhagen, Denmark.

References

- [1] Wang A, Nizran P, Malone MA, Riley T. Urinary tract infections. *Prim Care* 2013;40:687–706.
- [2] Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoin MH, et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA* 1995;274:639–44.
- [3] Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, et al. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest* 2009;136:1237–48.
- [4] Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-Avila M, Cembrero-Fucinos D, Herrero-Hernandez A, Gonzalez-Buitrago JM, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010;48:2110–5.
- [5] March Rossello GA, Gutierrez Rodriguez MP, Ortiz de Lejarazu Leonardo R, Orduna Domingo A, Bratos Perez MA. New procedure for rapid identification of microorganisms causing urinary tract infection from urine samples by mass spectrometry (MALDI-TOF). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2015;33:89–94.
- [6] Jolkkonen S, Paattiniemi EL, Karpanoja P, Sarkkinen H. Screening of urine samples by flow cytometry reduces the need for culture. *J Clin Microbiol* 2010;48:3117–21.
- [7] Broeren MA, Bahceci S, Vader HL, Arents NL. Screening for urinary tract infection with the Sysmex UF-1000i urine flow cytometer. *J Clin Microbiol* 2011;49:1025–9.
- [8] Wang XH, Zhang G, Fan YY, Yang X, Sui WJ, Lu XX. Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry. *J Microbiol Methods* 2013;92:231–5.
- [9] Nicolle LE. Urinary tract infection. *Crit Care Clin* 2013;29:699–715.
- [10] March Rossello GA, Gutierrez Rodriguez MP, de Lejarazu Leonardo RO, Orduna Domingo A, Bratos Perez MA. Procedure for microbial identification based on Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry from screening-positive urine samples. *Apmis* 2014;122:790–5.
- [11] Demarco ML, Burnham CA. Diafiltration MALDI-TOF mass spectrometry method for culture-independent detection and identification of pathogens directly from urine specimens. *Am J Clin Pathol* 2014;141:204–12.
- [12] Sanchez-Juanes F, Siller Ruiz M, Moreno Obregon F, Criado Gonzalez M, Hernandez Egido S, de Frutos Serna M, et al. Pretreatment of urine samples with SDS improves direct identification of urinary tract pathogens with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2014;52:335–8.
- [13] Kohling HL, Bittner A, Muller KD, Buer J, Becker M, Rubben H, et al. Direct identification of bacteria in urine samples by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and relevance of defensins as interfering factors. *J Med Microbiol* 2012;61:339–44.
- [14] Ribot S, Gal K, Goldblat MV, Eslami HH. The role of anaerobic bacteria in the [pathogenesis of urinary tract infections. *J Urol* 1981;126:852–3.
- [15] Brook I. Urinary tract and genito-urinary suppurative infections due to anaerobic bacteria. *Int J Urol* 2004;11:133–41.
- [16] Kyle J. Urinary complications of Crohn's disease. *World J Surg* 1980;4:153–60.
- [17] Monsen T, Ryden P. Flow cytometry analysis using sysmex UF-1000i classifies uropathogens based on bacterial, leukocyte, and erythrocyte counts in urine specimens among patients with urinary tract infections. *J Clin Microbiol* 2015;53:539–45.

RESULTADOS

2.2 Artículo 4

A multicentre study investigating parameters which influence direct bacterial identification from urine

Yuliya Zboromyrska, Jordi Bosch, Jesús Aramburu, Juan Cuadros, Carlos García-Riestra, Julia Guzmán-Puche, Carmen Liébana Martos, Elena Loza, María Muñoz-Algarra, Carlos Ruiz de Alegría, Victoria Sánchez-Hellín, Jordi Vila

PLoS One. 2018 Dec 11;13(12): e0207822. doi: 10.1371/journal.pone.0207822.

Factor de Impacto: 2.776 (2018) – Q1 (Scimago, Multidisciplinary); Q1 (Scimago, Medicine (Miscellaneous)). (Objetivo 2).

Objetivos

El objetivo de este estudio ha sido estudiar la utilidad y eficacia del protocolo para la identificación directa a partir de la muestra de orina, usando la combinación de la citometría de flujo y EM MALDI-TOF, en nueve hospitales españoles, y evaluar los parámetros que tienen impacto en la identificación directa para mejorar en el futuro la preparación de la muestra.

Métodos

Durante el periodo de estudio cada hospital se ha comprometido a incluir alrededor de 118 muestras que cumplieran el *cut-off* de $\geq 5 \times 10^6$ bacterias/mL (5.000 bacterias por microlitro) para la identificación directa mediante EM MALDI-TOF. El procesamiento de rutina de la orina en cada centro no se ha cambiado. Para la preparación de la muestra se ha usado el método de centrifugación diferencial seguido de dos lavados del sedimento obtenido. La identificación válida para EM MALDI-TOF Microflex LT (Bruker Daltonik) se ha considerado a partir del valor de 1.700, mientras que para VITEK-MS (bioMérieux) se ha considerado válido el valor de 99,9%.

Resultados

Un total de 1.050 muestras han sido incluidas en el análisis. La identificación directa válida se ha obtenido en 72,8% de las muestras: en el 80,3% de las muestras positivas por cultivo, en el 32,2% de muestras consideradas contaminadas y en el 19,7% de las muestras negativas por cultivo. La concordancia entre la identificación de rutina y la identificación directa ha sido de 97,2% a nivel de especie y de 98,3% a nivel de género. En 12 muestras se ha obtenido una identificación discordante. Los parámetros que ayudan a la identificación directa válida han sido: alto recuento bacteriano, presencia de *Escherichia coli* y aviso de Bacilos en la citometría de flujo. Por otro lado, los parámetros que han demostrado su impacto negativo en la identificación directa han sido: altos recuentos de células epiteliales y leucocitos, así como las muestras de pacientes hospitalizados.

Conclusiones

En el estudio multicéntrico se ha confirmado la utilidad y fiabilidad del protocolo de identificación directa a partir de la muestra de orina con la combinación de citometría de flujo

RESULTADOS

para cribado y EM MALDI-TOF para identificación. Aparte del recuento bacteriano, otros parámetros tienen impacto en el resultado de la identificación directa y deben ser considerados.

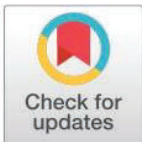
RESEARCH ARTICLE

A multicentre study investigating parameters which influence direct bacterial identification from urine

Yuliya Zboromyrska^{1*}, Jordi Bosch^{2,3}, Jesus Aramburu⁴, Juan Cuadros⁵, Carlos García-Riestra⁶, Julia Guzmán-Puche⁷, Carmen Liébana Martos⁸, Elena Loza⁹, María Muñoz-Algarra¹⁰, Carlos Ruiz de Alegría¹¹, Victoria Sánchez-Hellín¹², Jordi Vila^{2,3}

1 Consorci del Laboratori Intercomarcal, Vilafranca del Penedès, Spain, **2** Department of Clinical Microbiology, Hospital Clínic, School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **3** ISGlobal, Instituto de Salud Global de Barcelona, Barcelona, Spain, **4** Microbiology Unit, Hospital Universitari Aneu de Vilanova, Lleida, Spain, **5** Microbiology Department, Hospital Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Spain, **6** Microbiology Department, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain, **7** Microbiology Unit, Hospital Reina Sofía, IMIBIC-Reina Sofía University Hospital-University of Córdoba, Córdoba, Spain, **8** Infectious Diseases and Clinical Microbiology Unit, Complejo Hospitalario de Jaén, Jaén, Spain, **9** Department of Microbiology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain, **10** Department of Clinical Microbiology, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Spain, **11** Microbiology Department, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain, **12** Microbiology Department, Hospital General Universitario de Elche, Elche, Spain

* zbores@cli.cat



OPEN ACCESS

Citation: Zboromyrska Y, Bosch J, Aramburu J, Cuadros J, García-Riestra C, Guzmán-Puche J, et al. (2018) A multicentre study investigating parameters which influence direct bacterial identification from urine. PLoS ONE 13(12): e0207822. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207822>

Editor: Holger Rohde, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, GERMANY

Received: June 16, 2018

Accepted: November 5, 2018

Published: December 11, 2018

Copyright: © 2018 Zboromyrska et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Sysmex España S.L. financially supported the study, providing reagents and equipment. Additionally, Yuliya Zboromyrska received travel grants from Sysmex España S.L. The funder had no role in data analysis and interpretation, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Rapid diagnosis is one of the best ways to improve patient management and prognosis as well as to combat the development of bacterial resistance. The aim of this study was to study parameters that impact the achievement of reliable identification using a combination of flow cytometry and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-ToF-MS). The study was carried out in nine hospitals in Spain and included 1,050 urine samples with bacterial counts of 5×10^6 bacteria/ml. MALDI-ToF-MS-based identification was performed according to a previously described protocol. Valid identification by direct MALDI-ToF-MS was obtained in 72.8% of samples, in 80.3% of samples found to be positive by culture, 32.2% of contaminated samples, and 19.7% of negative samples. Among the positives samples with a valid identification the concordance at the species level was 97.2%. The parameters related to success of direct identification were: high bacterial count, the presence of *Escherichia coli* as a pathogen and rod-bacteria morphology provided by flow cytometry. The parameters related to failure were a high epithelial cell (EC) count, a high white blood cell (WBC) count and urine samples obtained from in-patients. In summary, this multicentre study confirms previously published data on the usefulness and accuracy of direct MALDI-ToF-MS-based identification of bacteria from urine samples. It seems important to evaluate not only the bacterial count, but also other parameters, such as EC and WBC counts, bacterial species and morphology, and the health care setting, to decide whether the sample is suitable for direct identification.

Competing interests: Sysmex España S.L. financially supported the study providing reagents and equipment. Additionally, Yuliya Zboromyrska received travel grants from Sysmex España S.L. This does not alter the authors' adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials. The funder had no role in data analysis and interpretation, decision to publish, or preparation of the manuscript. There are no patents, products in development or marketed products associated with this research to declare.

Introduction

Urinary tract infection (UTI) is one of the most frequent infections attended in primary care and hospital settings [1, 2]. UTI is an important cause of morbidity and mortality as well as one of the major causes of prescribing antimicrobial therapy [3, 4]. In recent years we have observed a rise in bacterial resistance, not only in hospitals but also in the community [5]. This makes the choice of appropriate empirical therapy difficult and could have a negative impact on patient outcomes. Therefore, there is a need for rapid diagnostic tools which could improve patient management and treatment, especially in patients with pyelonephritis and urinary sepsis, providing rapid and accurate information within a few hours.

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-ToF-MS) has become a standard method for bacterial identification (ID) in most of Clinical Microbiology laboratories, mainly in colonies of microorganisms grown on culture media. Although MALDI-ToF-MS can be used for ID from direct biological samples, it has several limitations. There is a need for sufficient numbers of bacterial cells and sample volume. The presence of human cells as well as proteins and other organic components requires sample preparation before analysis with MALDI-ToF-MS. Successful direct ID from urine samples has been previously reported [6, 7]. Nevertheless, urine is the most common sample processed in microbiological laboratories. The rate of negative samples can be of up to 60–70% of total urine samples received [8, 9]. Flow cytometry can classify and count different cells present in the sample, including human cells and bacteria. Currently this method is widely used for the detection of negative urine samples to avoid their cultivation [10, 11]. Several studies have shown the utility of flow cytometry to identify positive urine samples prior to MALDI-ToF-MS-based ID [12–14]. However, these were single-centre studies. In addition, parameters other than bacterial count provided by flow cytometry may be important and their impact on direct identification should be investigated. The aim of this multicentre study was to evaluate the efficacy and accuracy of a combination of flow cytometry and MALDI-ToF-MS for direct ID from urine samples, using a previously described protocol for direct ID [13] without changing the routine culture and identification procedure for each participant, and while also evaluating parameters that affect the achievement of direct identification for future improvements in the sample preparation protocol.

Materials and methods

The study was conducted in two periods, from May to July and from September to November 2016 in nine hospitals in Spain (Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida (a median of 150 urine samples processed per day), Hospital General Universitario de Elche (80 samples per day), Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (80 samples per day), Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba (120 samples per day), Complejo Hospitalario Universitario Santiago (250 samples per day), Hospital Universitario Príncipe de Asturias (190 samples per day), Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda (200 samples per day), Hospital Universitario Ramón y Cajal (350 samples per day), Complejo Hospitalario de Jaén (100 samples per day)). Six out of the nine participating centres used tubes with a preservative agent. Samples from all centres but one were transported with refrigeration. Patient data were collected and anonymized before the analysis was performed. Based on the 86.4% of reliable direct ID obtained in a previous study with samples with a bacterial count of 5,000 bacteria/ μ l by flow cytometry and considering a non-inferiority limit of 75% and admitting 10% of losses, it was estimated that 118 samples were needed from each participating centre [13]. Samples were collected, transported and processed for urine culture according to the routine protocol of each centre. During working hours, all samples received were processed by flow cytometry

and samples that achieved the cut-off value of 5,000 bacteria/ μ l were randomly included in the study. Bacterial identification of colonies grown on culture media was performed using conventional techniques according to the routine procedure of each participating centre and included chromogenic media, the MicroScan system (Beckman Coulter, Spain), the Wider system (Francisco Soria Melguizo, Spain) and MALDI-ToF-MS, depending on the centre. Flow cytometry was performed using UF-1000i (Sysmex, Kobe, Japan) in accordance with the manufacturer's instructions. All centres followed the guidelines of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC) for performing quantitative urine culture and criteria of positivity. Generally, a culture was considered to be positive when $\geq 100,000$ colony-forming units per millilitre (CFU/ml) of one or two microorganisms were isolated, and negative, when no growth was detected. Among samples with $< 100,000$ CFU/ml, the number and species (commensal flora) of microorganisms isolated, as well as clinical data were taken into account to consider a culture as positive or contaminated. Samples with three or more microorganisms were considered as contaminated.

MALDI-ToF-MS-based identification was performed according to a previously described protocol [13]. Briefly, 10 ml of urine were centrifuged at 850 g for 5 min; then, the supernatant was centrifuged at 15,500 g for 2 min; the pellet obtained was washed twice with sterile water and used for ID by MALDI-ToF-MS (Fig 1). Each sample was processed in duplicate using two spots on a spectrometer plate. All but one of the centres used MALDI-TOF Microflex LT (Bruker Daltonik GmbH). The remaining centre used VITEK-MS (bioMérieux, France). Identifications were carried out according to the manufacturer's instructions. Valid ID for Microflex LT was considered if the same ID was obtained with a score of ≥ 1.7 for the first option from both spots or for the first two options from the list of one spot if the second spot did not provide a reliable identification or no peaks were detected. A valid ID for VITEK MS was considered when the two spots provided the same species identification with a confidence value of 99.9%.

Statistical analysis

Descriptive statistics, including mean, standard deviation (SD), median and range for continuous variables and frequency and percent for categorical variables are provided by group.

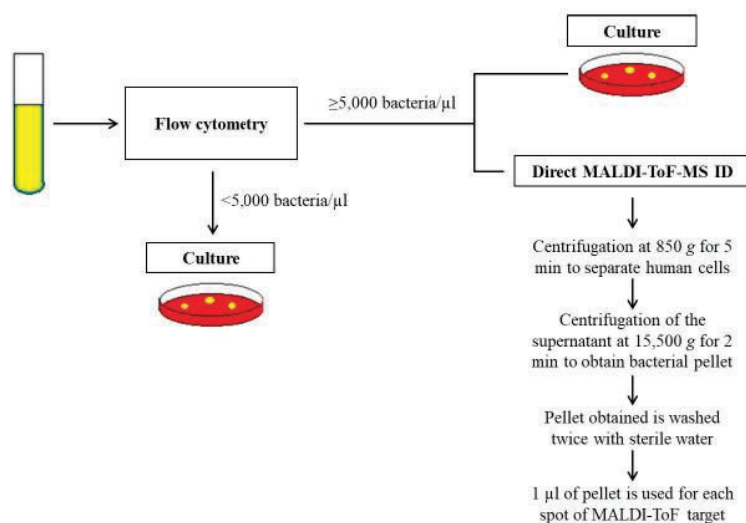


Fig 1. Scheme of the study protocol.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207822.g001>

Statistical significance (P -value) between two independent subgroups was obtained using the Fisher's exact test for categorical variables and the Student's t -test for continuous variables. If the analysis of variance assumptions were violated (e.g. non-normality or heterogeneity) the comparison of continuous variables was performed using non-parametric tests: the Mann-Whitney U test in the case of two subgroups or the Kruskal-Wallis test in the case of more than two subgroups. A P value less than 0.05 was considered statistically significant. Multivariate logistic regression was applied by stepwise selection and adjusting for the effect of the centre to obtain the parameters associated with valid direct ID in positive urine samples. The effect of each parameter is presented with an odds ratio and 95% confidence interval.

Ethical approval

The study was reviewed and approved by the Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida Institutional Review Board (IRB), acting as the single reference IRB (29/06/2016). The study was carried out without additional intervention of patients. All the samples were processed for the diagnosis of UTI as ordered by clinicians, and patient data were anonymized before the analysis. Informed Consent was not required.

Results

After excluding samples with lost data, a total of 1050 urine samples were analysed. [Table 1](#) shows the main characteristics of the samples included. A total of 224 (23.2%) samples were from male and 806 (76.8%) from female patients. Of 902 samples positive by urine culture, 870 (96.5%) had $\geq 10^5$ CFU/ml, 30 (3.3%) samples had $\geq 10^4$ CFU/ml and two samples (0.2%) had $\geq 10^3$ CFU/ml.

Pathogens isolated from positive urine samples were: *Escherichia coli* (70.6%), *Klebsiella* spp. (16%), *Proteus* group (including species of *Proteus*, *Morganella* and *Providencia*) (4.7%), *Enterococcus* spp. (2.7%), *Enterobacter* spp. (2%), *Pseudomonas* spp. (1.1%) and others (2.9%). There were significant differences in the percentage of uropathogens between males and females for *E. coli* (61% vs. 73.6%, $P = 0.0006$) and *Enterococcus* spp. (5.2% vs. 1.9%, $P = 0.0143$).

On comparing in-patients and out-patients, there were no significant differences in the rates of positive, negative and contaminated samples. However, samples with the isolation of two pathogens were more frequent among in-patients (8.6% vs. 4.1%, $P = 0.0196$). Regarding the aetiology, microorganisms from the *Proteus* group and enterococci were more frequent among in-patients (8% vs. 3.8%, $P = 0.0261$, and 5.2% vs. 2.1%, $P = 0.0328$, respectively) whereas *E. coli* was more frequent among out-patients (62.6% vs. 72.5%, $P = 0.0123$). The rate of reliable direct ID was 73% among in-patients vs. 82% among out-patients. Valid ID was obtained in 84.3% of patients with positive urine culture and recorded a diagnosis of pyelonephritis (59 out of 70 with positive culture).

[Table 2](#) shows the differences in cell count among positive, negative and contaminated samples.

Valid ID by direct MALDI-ToF-MS was obtained in 72.8% of samples, in 80.3% of samples positive by culture, 32.2% of contaminated samples, and 19.7% of negative samples. Among positive samples with valid ID the concordance at the species level was 97.2% and 98.3% at the genus level, and 12 samples (1.7%) showed a discordant result with the conventional ID ([Table 3](#)).

Twelve samples (19.7%) with valid ID and negative by culture included: 4 *E. coli*, 1 *Aerococcus* *urinae*, 1 *Actinotignum* *schaalii*, 1 *Gardnerella* *vaginalis*, 1 *Streptococcus* sp., 1 *Lactobacillus* sp., 1 *Alloscardovia* *omnicolens*, 1 *Corynebacterium* *riegelii* and 1 *Veillonella* *ratti*.

Table 1. Characteristics of patients and samples included in the study.

	Total	Male	Female	P-value
Age				
Mean (SD)	62.8 (21.7)	67.6 (17.2)	61.3 (22.7)	<0.0001 ^b
95% CI	(61.5; 64.1)	(65.4; 69.7)	(59.8; 62.9)	
In/out-patients				
In-patients	192 (18.3%)	72 (29.5%)	120 (14.9%)	<0.0001 ^a
Out-patients	858 (81.7%)	172 (70.5%)	686 (85.1%)	
Sample collection*				
Midstream	980 (94.1%)	205 (85.8%)	775 (96.6%)	<0.0001 ^a
Indwelling catheter	35 (3.4%)	21 (8.8%)	14 (1.8%)	
Catheterization	13 (1.2%)	6 (2.5%)	7 (0.9%)	
Urostomy	13 (1.2%)	7 (2.9%)	6 (0.7%)	
Urine collection system with a preservative				
No	428 (40.8%)	112 (45.9%)	316 (39.2%)	0.0363 ^a
Yes	622 (59.2%)	132 (54.1%)	490 (60.8%)	
Urinary tract infection (UTI)**				
Uncomplicated UTI	616 (79%)	111 (68.5%)	505 (81.7%)	NA
Pyelonephritis	73 (9.4%)	27 (16.7%)	46 (7.4%)	
Prostatitis	10 (1.3%)	10 (6.2%)	-	
No UTI	81 (10.4%)	14 (8.6%)	67 (10.8%)	
Urine culture				
Positive	902 (85.9%)	213 (87.3%)	689 (85.5%)	0.0462 ^a
Contaminated	87 (8.3%)	24 (9.8%)	63 (7.8%)	
Negative	61 (5.8%)	7 (2.9%)	54 (6.7%)	
Mono/polymicrobial urine culture				
Total of positive urine cultures	902	213	689	0.0699 ^a
Monomicrobial	857 (95%)	197 (92.5%)	660 (95.8%)	
Polymicrobial	45 (5%)	16 (7.5%)	29 (4.2%)	
Cell count by flow cytometry				
Epithelial cells				
Median (Range) cells/μl	6.5 (0–495.6)	3.6 (0–447.1)	7.9 (0–495.6)	<0.0001 ^c
Red blood cells				
Median (Range) cells/μl	25.8 (0–4706)	39 (0–4706)	22.7 (0–2612)	<0.0001 ^c
White blood cells				
Median (Range) cells/μl	194 (0–48,887)	552 (1–33,128)	146 (0–48,887)	<0.0001 ^c
Bacteria				
Median (Range) bacteria/μl	20,206 (5002–454,734,000)	18,703 (5029/12,000,000)	20,518 (5002/454,734,000)	0.3513 ^c

*Data available for 1041 samples: 239 from males and 802 from females

**Data available for 780 samples: 162 from males and 618 from females

^a Fisher's exact test

^b Student's t-test

^c Mann-Whitney U test.

SD: standard deviation; CI: confidence interval

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207822.t001>

Interestingly, on analysing a total of 1050 samples, we obtained a higher rate of valid direct ID among samples without than with a preservative (76.4% vs. 70.4%, $P = 0.0342$).

Table 2. Cell count (median (range)) according to the positivity of the urine sample.

Median (Range) cells/ μ l	Positive (902)	Contaminated (87)	Negative (67)	P-value
EC	5.7 (0–447.1)	20.2 (0.2–495.6)	33.4 (0.5–167.7)	<0.0001 ^a
RBC	24.5 (0–4,706)	48.2 (2.1–1525.6)	27.9 (2.5–421.6)	0.0005 ^a
WBC	194 (0–48,887)	253 (3–18,505)	168 (4–13,046)	0.4313 ^a
Bacteria	21,752 (5,002–454,734,000)	12,401 (5,124/84,439)	8,016 (5,010/91,119)	<0.0001 ^a

^a Kruskal-Wallis test

EC: epithelial cells; RBC: red blood cells; WBC: white blood cells

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207822.t002>

Nevertheless, regarding only positive samples by culture, there was no significant difference between the two groups (81.2% vs. 79.6%, $P = 0.5562$).

Table 4 shows the parameters associated with valid direct MALDI-ToF-MS ID on multivariate analysis.

Additionally, we analysed the accuracy of bacterial morphology provided by flow cytometry in 835 of 902 positive samples (92.6%), with 83 samples being reported as cocci/mixed and 752 as rods. In 67 positive samples no bacterial morphology was provided. The global concordance was 92.1%. The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value was 92.8%, 73.3%, 98.9% and 27.5%, respectively for cultures positive for bacilli or mixed cultures that included bacilli (Table 5).

Discussion

The usefulness of a combination of flow cytometry and MALDI-ToF-MS for direct identification of pathogens in urine samples has been reported previously. The percentage of accuracy

Table 3. Results of routine identification and MALDI-ToF-MS direct ID in 902 culture positive samples.

Species	Positive samples with valid direct ID (n = 724)	Concordant samples between routine and direct ID (n = 712)	Species level direct ID among concordant samples (%)	Positive samples with no valid direct ID (n = 178)
<i>Escherichia coli</i>	530	524 ^a	524/524 (100)	107
<i>Klebsiella</i> spp.	117	114 ^b	111/114 (97.4)	27
<i>Proteus</i> group	31	31	31/31 (100)	11
<i>Enterobacter</i> spp.	15	14 ^c	12/14 (85.7)	3
<i>Enterococcus</i> spp.	10	8 ^d	8/8 (100)	14
<i>Citrobacter</i> spp.	6	6	6/6 (100)	2
<i>Pseudomonas</i> spp.	6	6	5/6 (83.3)	4
<i>Serratia marcescens</i>	3	3	3/3 (100)	0
<i>Streptococcus</i> spp.	2	2	2/2 (100)	3
<i>Aerococcus</i> sp.	1	1	0/1 (0)	2
<i>Staphylococcus</i> sp.	1	1	1/1 (100)	4
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1	1	1/1 (100)	0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	1	0/1 (0)	0
<i>Oligella urethralis</i>	0	-	-	1

^aDiscordant direct ID for 6 *E. coli* included 2 *Lactobacillus* spp., 1 *Bifidobacterium breve*, 1 *Gardnerella vaginalis*, 1 *Aerococcus* sp. and 1 *Klebsiella pneumoniae*

^bDiscordant direct ID for 3 *Klebsiella* spp. included 1 *Raoultella ornithinolytica*, 1 *Pseudomonas* sp. and 1 *Aerococcus* sp.

^cDiscordant direct ID for 1 *Enterobacter aerogenes* was *Klebsiella pneumoniae*

^dDiscordant direct ID for 2 *Enterococcus faecalis* included 1 *Raoultella ornithinolytica* and 1 *Lactobacillus* sp.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207822.t003>

Table 4. Parameters associated with valid direct identification in positive urine samples.

	OR	CI 95%	P-value
Centre			<0.0001 ^a
In-patients	0.516	0.314–0.848	0.0090
<i>E. coli</i>	2.073	1.386–3.099	0.0004
Bacterial morphology as Rods	2.292	1.299–4.045	0.0042
Log EC	0.849	0.737–0.977	0.0227
Log WBC	0.701	0.628–0.782	<0.0001
Log bacteria	2.206	1.662–2.928	<0.0001

^athis variable was included in the analysis as the percentage of valid ID was different among centres
OR, Odds ratio; CI, Confidence Interval; EC: epithelial cells; WBC: white blood cells

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207822.t004>

in bacterial identification directly from the sample depends on several factors, with bacterial count being the main factor. Samples with positive urine culture but with $<10^5$ CFU/ml show a lower percentage of reliable direct identification compared to those with $\geq 10^5$ CFU/ml [7, 15, 16]. Another variable that negatively influences direct identification is the presence of a second pathogen. Wang *et al.* showed that the ratio of bacterial count between two pathogens determines the possibility of a reliable identification of one of the pathogens [15]. This could explain cases of valid identification obtained in contaminated samples due to the presence of a dominant microorganism. From the multivariate analysis, we showed that the presence of a high count of human cells such as WBC and EC associated negatively associated with a reliable identification. Our data suggest that more sophisticated protocols of sample preparation should be used if a high WBC count is detected by flow cytometry. Sanchez-Juanes *et al.* proposed the treatment of urine samples with SDS solution to enhance direct identification [17]. Previous studies also demonstrated better results, if protein extraction was applied to the bacterial pellet [7, 18]. Veron *et al.* compared a filtration-based sample preparation protocol with a differential centrifugation method and 5 hours of bacterial cultivation, obtaining better results with the filtration protocol [19]. Recently, Kitagawa *et al.* implemented ultrasonic baths to disperse bacterial aggregation prior to the centrifugation steps, improving the final identification [20]. Another approach for the samples with a high bacterial as well as WBC count could be a few hours of subculture on a solid medium prior to MALDI-ToF-MS ID [21]. The presence of samples with a high EC count could indicate poor sample collection quality, and these samples should not be processed for direct ID due to the increased probability of contamination.

In the present study we used a lower score than recommended by the manufacturer to consider a species ID as being reliable with MALDI-ToF-MS (1.7 vs 2.0). Although this could be criticized, according to the experience of the authors, species ID with scores ≥ 1.7 usually provide a reliable species level ID. Taking into account that we work with direct biological samples with a complex composition, lower scores can be expected compared with colony-based ID. In

Table 5. Concordance between bacterial morphology provided by flow cytometry and culture results.

Number of samples according to morphology	Rods by flow cytometry (n = 752)	Cocci/mixed by flow cytometry (n = 83)
Bacilli on culture (n = 786)	728	58
Bacilli and cocci mixed culture (n = 19)	16	3
Cocci on culture (n = 30)	8	22

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207822.t005>

the study published by March Rosselló *et al.*, the authors demonstrated that a lower score of even less than 1.7 could be considered for direct ID from urine samples [18].

While samples from in-patients showed a lower probability of valid direct ID, the rate of valid ID was sufficiently high to justify its application. Moreover, in this population, rapid ID may have a greater impact on patient management, as the percentage of resistant microorganisms, as well as species other than *E. coli* is higher [22].

We also analysed the presence of preservative substance in sample collection tubes. Preservatives help to avoid cell destruction and bacterial proliferation [23, 24]. In the absence of preservatives, contaminating flora may grow, while human cells are destroyed. This could explain the higher percentage of valid ID in samples without a preservative, when we analysed a total of samples, including contaminated ones. Among positive samples there were no significant differences in the percentage of valid ID between these two groups. Therefore, the use of a preservative could avoid valid direct ID of contaminated samples without affecting the rate of positive samples identified. Therefore, we recommend the use of preservatives for samples that cannot be processed immediately (mainly samples from primary care), especially if an efficient cold chain during transport is not assured.

Of 12 samples with discordant ID, in seven an identified microorganism usually grows with difficulty in conventional media. These directly identified microorganisms were probably present in the urine specimen in a higher concentration than the pathogen detected by the conventional method. Five of the remaining discordant results were probably due to erroneous ID by direct MALDI-ToF-MS or the routine method. Unfortunately, these discordant results were not confirmed by 16S rRNA gene sequencing, as has been done in previous studies [15, 25]. Regarding negative samples with valid ID, four *E. coli* cases could be explained by the therapy received (data not collected in this study). Other microorganisms showed fastidious growth, and most seemed to be contaminant microorganisms.

Regarding the data on bacterial morphology, we obtained an acceptable positive predictive value for bacilli. Nevertheless, we included only samples with a high bacterial count, and the number of samples which were positive for cocci was low in this study. Previous data support better results in predicting bacillary morphology with flow cytometry [26, 27].

Although the combination of flow cytometry and MALDI-ToF-MS could improve patient management, especially in a hospital setting, direct identification includes many manual steps that may impair implementation of this approach in routine laboratory work. Flow cytometry analysis takes about one minute, but the median time required to prepare one sample for MALDI-ToF-MS is about 20 min. Until a more automated process of sample preparation is established, direct identification should only be used in some cases with great clinical impact, such as those suspected of urinary sepsis and pyelonephritis.

Our study also suggests that different approaches should be studied and used for sample processing depending on the presence of EC or WBC. Since a high EC count may indicate probable sample contamination during sample collection, direct ID is not recommended due to the risk of obtaining false positive results by contaminating flora. A high WBC count is a good predictor of infection but may impair direct ID. We likely need to perform additional studies to determine the WBC count cut-off in order to apply more rigorous sample preparation protocols including the use of agents such as SDS to enhance cell lysis or even opting for short subcultures prior to MALDI-ToF-MS.

In summary, the results of this multicentre study confirm previously published data about the usefulness and accuracy of direct MALDI-ToF-MS ID from urine samples. It was of note that we observed an excellent concordance between direct and routine ID in all the participating centres without changing local urine processing protocols. Analysis of all the parameters provided by flow cytometry is useful for evaluating the quality of sample collection, the

feasibility of direct MALDI-ToF-MS ID and for deciding upon the most adequate sample preparation protocol to be applied. Direct ID also allows the application of methods for antimicrobial susceptibility testing or resistance detection from a direct clinical sample once a reliable ID is obtained [13, 14].

Supporting information

S1 Appendix. Original database.
(XLSX)

Acknowledgments

We are grateful to the 9 participating centres.

Author Contributions

Conceptualization: Yuliya Zboromyrska, Jordi Bosch, Jordi Vila.

Data curation: Yuliya Zboromyrska.

Formal analysis: Yuliya Zboromyrska.

Investigation: Jesus Aramburu, Juan Cuadros, Carlos García-Riestra, Julia Guzmán-Puche, Carmen Liébana Martos, Elena Loza, María Muñoz-Algarra, Carlos Ruiz de Alegría, Victoria Sánchez-Hellín.

Methodology: Yuliya Zboromyrska, Jordi Vila.

Supervision: Yuliya Zboromyrska, Jordi Bosch, Jordi Vila.

Writing – original draft: Yuliya Zboromyrska.

Writing – review & editing: Jordi Bosch, Jesus Aramburu, Juan Cuadros, Carlos García-Riestra, Julia Guzmán-Puche, Carmen Liébana Martos, Elena Loza, María Muñoz-Algarra, Carlos Ruiz de Alegría, Victoria Sánchez-Hellín, Jordi Vila.

References

1. Foxman B, Barlow R, D'Arcy H, Gillespie B, Sobel JD. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Annals of epidemiology*. 2000; 10(8):509–15. PMID: [11118930](#)
2. Sticchi C, Alberti M, Artioli S, Assensi M, Baldelli I, Battistini A, et al. Regional point prevalence study of healthcare-associated infections and antimicrobial use in acute care hospitals in Liguria, Italy. *The Journal of hospital infection*. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.12.008>. PMID: [29253622](#)
3. Shaw E, Benito N, Rodriguez-Bano J, Padilla B, Pintado V, Calbo E, et al. Risk factors for severe sepsis in community-onset bacteraemic urinary tract infection: impact of antimicrobial resistance in a large hospitalised cohort. *The Journal of infection*. 2015; 70(3):247–54. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.09.011>. PMID: [25305497](#)
4. Petersen I, Hayward AC. Antibacterial prescribing in primary care. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007; 60 Suppl 1:i43–7. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm156>. PMID: [17656380](#)
5. Mazzariol A, Bazaj A, Cornaglia G. Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*. 2017; 29(sup1):2–9. <https://doi.org/10.1080/1120009x.2017.1380395>. PMID: [29271736](#)
6. Burillo A, Rodriguez-Sanchez B, Ramiro A, Cercenado E, Rodriguez-Creixems M, Bouza E. Gram-stain plus MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) for a rapid diagnosis of urinary tract infection. *PloS one*. 2014; 9(1):e86915. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086915>. PMID: [24466289](#)
7. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-Avila M, Cembrero-Fucinos D, Herrero-Hernandez A, Gonzalez-Buitrago JM, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-

- assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*. 2010; 48(6):2110–5. <https://doi.org/10.1128/jcm.02215-09>. PMID: 20392910
8. Jolkkonen S, Paattiniemi EL, Karpanoja P, Sarkkinen H. Screening of urine samples by flow cytometry reduces the need for culture. *Journal of clinical microbiology*. 2010; 48(9):3117–21. <https://doi.org/10.1128/jcm.00617-10>. PMID: 20592157
 9. Pieretti B, Brunati P, Pini B, Colzani C, Congedo P, Rocchi M, et al. Diagnosis of bacteriuria and leukocyturia by automated flow cytometry compared with urine culture. *Journal of clinical microbiology*. 2010; 48(11):3990–6. <https://doi.org/10.1128/jcm.00975-10>. PMID: 20739491
 10. Monsen T, Ryden P. A new concept and a comprehensive evaluation of SYSMEX UF-1000i flow cytometer to identify culture-negative urine specimens in patients with UTI. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2017. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2964-1>. PMID: 28386705
 11. Martin-Gutierrez G, Porrás-González A, Martín-Pérez C, Lepe JA, Aznar J. Evaluation and optimization of the Sysmex UF1000i system for the screening of urinary tract infection in primary health care elderly patients. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2015; 33(5):320–3. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.07.010>. PMID: 25444045
 12. Inigo M, Coello A, Fernandez-Rivas G, Rivaya B, Hidalgo J, Quesada MD, et al. Direct Identification of Urinary Tract Pathogens from Urine Samples, Combining Urine Screening Methods and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of clinical microbiology*. 2016; 54(4):988–93. <https://doi.org/10.1128/jcm.02832-15>. PMID: 26818668
 13. Zboromyrska Y, Rubio E, Alejo I, Vergara A, Mons A, Campo I, et al. Development of a new protocol for rapid bacterial identification and susceptibility testing directly from urine samples. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2016; 22(6):561.e1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.025>. PMID: 26899829
 14. Oviano M, Ramirez CL, Barbeyto LP, Bou G. Rapid direct detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical urine samples by MALDI-TOF MS analysis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2017; 72(5):1350–4. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw579>. PMID: 28119478
 15. Wang XH, Zhang G, Fan YY, Yang X, Sui WJ, Lu XX. Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry. *Journal of microbiological methods*. 2013; 92(3):231–5. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.12.016>. PMID: 23305925
 16. March Rossello GA, Gutierrez Rodriguez MP, de Lejarazu Leonardo RO, Orduna Domingo A, Bratos Perez MA. Procedure for microbial identification based on Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry from screening-positive urine samples. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2014; 122(9):790–5. <https://doi.org/10.1111/apm.12208>. PMID: 24320741
 17. Sanchez-Juanes F, Siller Ruiz M, Moreno Obregon F, Criado Gonzalez M, Hernandez Egido S, de Frutos Serna M, et al. Pretreatment of urine samples with SDS improves direct identification of urinary tract pathogens with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*. 2014; 52(1):335–8. <https://doi.org/10.1128/jcm.01881-13>. PMID: 24226916
 18. March Rossello GA, Gutierrez Rodriguez MP, Ortiz de Lejarazu Leonardo R, Orduna Domingo A, Bratos Perez MA. New procedure for rapid identification of microorganisms causing urinary tract infection from urine samples by mass spectrometry (MALDI-TOF). *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2015; 33(2):89–94. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.02.022>. PMID: 24796945
 19. Veron L, Mailler S, Girard V, Muller BH, L'Hostis G, Ducruix C, et al. Rapid urine preparation prior to identification of uropathogens by MALDI-TOF MS. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2015; 34(9):1787–95. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2413-y>. PMID: 26054715
 20. Kitagawa K, Shigemura K, Onuma KI, Nishida M, Fujiwara M, Kobayashi S, et al. Improved bacterial identification directly from urine samples with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2017. <https://doi.org/10.1002/jcla.22301>. PMID: 28737838
 21. Haiko J, Savolainen LE, Hilla R, Patari-Sampo A. Identification of urinary tract pathogens after 3-hours urine culture by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of microbiological methods*. 2016; 129:81–4. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.08.006>. PMID: 27503535
 22. Pigrau C. [Nocosomial urinary tract infections]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2013; 31(9):614–24. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.11.015>. PMID: 23375744
 23. Kupelian AS, Horsley H, Khasriya R, Amussah RT, Badiani R, Courtney AM, et al. Discrediting microscopic pyuria and leucocyte esterase as diagnostic surrogates for infection in patients with lower urinary

- tract symptoms: results from a clinical and laboratory evaluation. *BJU international*. 2013; 112(2):231–8. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2012.11694.x>. PMID: 23305196
24. Fabbro C, Darolles J, Rault JP. [Preservation of urine samples for UF 1000i (bioMerieux(c)) analysis]. *Annales de biologie clinique*. 2011; 69(5):588–92. <https://doi.org/10.1684/abc.2011.0625>. PMID: 22008140
 25. Huang B, Zhang L, Zhang W, Liao K, Zhang S, Zhang Z, et al. Direct Detection and Identification of Bacterial Pathogens from Urine with Optimized Specimen Processing and Enhanced Testing Algorithm. *Journal of clinical microbiology*. 2017; 55(5):1488–95. <https://doi.org/10.1128/jcm.02549-16>. PMID: 28249997
 26. Jimenez-Guerra G, Heras-Canas V, Valera-Arcas MD, Rodriguez-Granger J, Navarro JM, Gutierrez-Fernandez J. Comparison between urine culture profile and morphology classification using fluorescence parameters of the Sysmex UF-1000i urine flow cytometer. *Journal of applied microbiology*. 2017; 122(2):473–80. <https://doi.org/10.1111/jam.13354>. PMID: 27860075
 27. Geerts N, Jansz AR, Boonen KJ, Wijn RP, Koldewijn EL, Boer AK, et al. Urine flow cytometry can rule out urinary tract infection, but cannot identify bacterial morphologies correctly. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2015; 448:86–90. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.06.020>. PMID: 26123581

RESULTADOS

2.3 Manuscrito 5

Implementación del nuevo protocolo de identificación directa a partir de la orina en la rutina de diagnóstico microbiológico.

Yuliya Zboromyrska, Jordi Bosch, Verónica Rico, Cristina Pitart, Mariana José Fernández, Alex Soriano, Jordi Vila.

Objetivos

El objetivo de este trabajo ha sido analizar la implementación del protocolo de identificación directa a partir de la muestra de orina en el diagnóstico de rutina en nuestro laboratorio y valorar su impacto en el tratamiento y manejo de pacientes con sospecha de bacteriemia de foco urinario atendidos en el Servicio de Urgencias de nuestro hospital.

Métodos

Se han analizado 298 muestras procesadas desde el 4 de junio, momento de la introducción del nuevo protocolo, hasta el 31 de diciembre del 2020, para la identificación directa y la detección rápida de cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas. Para el cribado de las muestras se ha usado la citometría de flujo. Las muestras que cumplían el *cut-off* de $\geq 5 \times 10^6$ bacterias/mL (5.000 bacterias por microlitro), han sido procesadas con EM MALDI-TOF para la identificación. La preparación de la muestra se ha realizado mediante la técnica de centrifugación diferencial seguida por dos lavados del sedimento obtenido. En el caso de la identificación fiable para las especies de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* complex y *Enterobacter cloacae* complex se ha realizado la técnica rápida de inmunocromatografía (*lateral flow*) para la detección de BLEE grupo CTX-M y carbapenemasas. Los resultados de la identificación y de la detección de resistencias han sido comunicados de inmediato al médico responsable. Los resultados directos se han comparado con la identificación y el antibiograma convencional.

Resultados

Del total de 298 muestras procesadas 86 cumplían criterio de citometría de flujo (incluyendo 78 (90,7%) positivas por cultivo), mientras que 212 no lo cumplían (incluyendo 36 (17%) positivas por cultivo). El valor predictivo positivo de la identificación directa para las 86 muestras que cumplían el criterio de citometría ha sido del 96,4%. Cincuenta y cuatro (47,4%) de 114 muestras positivas por cultivo han sido identificadas correctamente el mismo día de su llegada al laboratorio. El promedio del valor de identificación directa ha sido de 2.198. Veintisiete hemocultivos han sido positivos para la misma especie aislada en el urocultivo (bacteriemias de foco urinario): 14/27 (51,8%) eran casos con resultado concordante entre hemocultivo, urinocultivo e identificación directa. En cuanto a la detección de resistencia, de las 54 muestras con la identificación fiable y positivas por cultivo, en 37 muestras se ha realizado la detección de BLEE y/o carbapenemasas con una concordancia de 100% entre las técnicas rápidas y el antibiograma convencional.

RESULTADOS

Conclusiones

El protocolo establecido de identificación directa y detección rápida de cepas productoras de BLEE y carbapenemasas a partir de la muestra de orina es una herramienta fiable y útil que mejora el manejo clínico de los pacientes con infección del tracto urinario grave.

Implementación del nuevo protocolo de identificación directa a partir de la orina en la rutina de diagnóstico microbiológico.

Yuliya Zboromyrska^a, Jordi Bosch^{a,b}, Veronica Rico^c, Cristina Pitart^{a,b}, Mariana José Fernández^a, Alex Soriano^c, Jordi Vila^{a,b}.

^a Servicio de Microbiología Clínica, CDB, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

^b ISGlobal, Hospital Clínic – Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain

^c Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

Autor de correspondencia: Yuliya Zboromyrska, yzboromy@clinic.cat

Palabras clave: orina, MALDI-TOF, citometría de flujo

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La infección del tracto urinario (ITU) es una de las infecciones más comunes. La identificación rápida de los microorganismos causantes de la infección junto con la detección de resistencias permitiría ajustar precozmente los tratamientos antimicrobianos empíricos, lo que podría tener un impacto importante sobre todo en pacientes con ITU complicada.

MÉTODOS

Se han analizado 298 muestras procesadas desde el 4 de junio, momento de la introducción del nuevo protocolo en la rutina diagnóstica del laboratorio, hasta el 31 de diciembre de 2020, para la identificación directa mediante la combinación de citometría de flujo y EM MALDI-TOF, así como para la detección rápida de cepas productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs) y carbapenemasas. Los resultados se han comparado con la identificación y antibiograma convencional.

RESULTADOS

El Valor Predictivo Positivo de la identificación directa para 86 muestras que cumplían criterio de citometría, ha sido de 96,4%. Cincuenta y cuatro (47,4%) de 114 muestras positivas por cultivo han sido identificadas correctamente el mismo día de su llegada al laboratorio. Veintisiete hemocultivos han sido positivos para la misma especie aislada en el urocultivo (bacteriemias de foco urinario): 14/27 (51,8%) eran casos con resultado concordante entre hemocultivo, urinocultivo e identificación directa.

CONCLUSIÓN

El protocolo establecido de identificación directa y detección rápida de cepas productoras de BLEE y carbapenemasas a partir de la muestra de orina es una herramienta fiable y útil que mejora el manejo clínico de pacientes con ITU.

INTRODUCCIÓN

Infección del tracto urinario (ITU) es una de las infecciones más comunes tanto en el ámbito comunitario como en el intrahospitalario^{1,2}. El cuadro clínico varía desde una infección leve no complicada hasta urosepsis. El reto de administrar el tratamiento antimicrobiano correcto es importante, teniendo en cuenta el aumento de resistencias entre los patógenos que con mayor frecuencia causan ITU, especialmente entre enterobacterias³. La producción de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas son cada día más frecuentes entre las enterobacterias, incluso en el ámbito extrahospitalario⁴. La identificación precoz del patógeno causante de infección, así como la detección de mecanismos de resistencia más frecuentes que pueden comprometer los tratamientos empíricos, son los dos pilares de diagnóstico rápido.

La espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) constituye actualmente la principal herramienta para la identificación rutinaria de microorganismos en el laboratorio de microbiología clínica. Su potencial para la identificación directa a partir de la muestra de orina ha sido demostrado en numerosos estudios⁵⁻⁷. Nosotros hemos evaluado esta técnica y hemos propuesto un protocolo combinado de citometría de flujo y EM MALDI-TOF para la identificación directa, y posteriormente hemos evaluado la utilidad del protocolo propuesto en un estudio multicéntrico^{8,9}. A pesar de que existe una clara evidencia de la utilidad de esta técnica y del potencial impacto sobre el manejo del paciente con ITU, la identificación directa a partir de orina no acaba de ser implementada de manera rutinaria en el proceso diagnóstico. En nuestro hospital hemos puesto en marcha el protocolo propuesto que actualmente forma parte del diagnóstico de rutina. En el presente artículo describimos nuestra experiencia y resultados obtenidos durante los siete primeros meses de puesta en marcha del circuito de identificación directa a partir de la muestra de orina junto con la aplicación directa de las técnicas rápidas de detección de cepas productoras de BLEE y carbapenemasas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Se han analizado 298 muestras procesadas desde el 4 de junio hasta 31 de diciembre de 2020. Para la aplicación de protocolo de la identificación directa se seleccionaban las orinas acompañadas por hemocultivo cursado el mismo día. Los hemocultivos concomitantes han servido como un indicador indirecto de gravedad de paciente y de sospecha de bacteriemia, lo

que junto con los recuentos altos de bacterias según la citometría de flujo permite identificar rápidamente desde el laboratorio las muestras de pacientes con bacteriemia de probable foco urinario. En esta primera fase de la introducción de nuevo protocolo a la rutina, se ha optado por incluir únicamente las muestras provenientes del servicio de Urgencias del hospital. El criterio de selección se ha acordado anteriormente con el Servicio de Enfermedades Infecciosas del hospital. De esta manera, las muestras tenían que cumplir los siguientes criterios para la aplicación del protocolo de identificación directa: llegar al laboratorio entre las 0:00 de la madrugada y las 15:00 de la tarde para su procesamiento dentro del horario laboral de rutina del laboratorio (de 8:00 a 15:00), volumen de la muestra ≥ 10 mL y recuento según el citómetro de flujo de ≥ 5.000 bacterias/ μ L. Para facilitar la búsqueda de orinas que se acompañaban de hemocultivos, hemos introducido un filtro con aviso específico en LIS (sistema informático del laboratorio).

Citometría de flujo

Las muestras se procesaron con el citómetro de flujo UF-1000 (Sysmex, Kobe, Japan). Para ello se ha utilizado 1 mL de orina (modo manual). Se han recogido los siguientes parámetros: recuento de bacterias, recuento de hematíes, recuento de células epiteliales y de leucocitos, así como el aviso sobre la naturaleza Gram positiva y/o Gram negativa de las bacterias detectadas (tres opciones de aviso: presencia de Gram negativos (GNEG), Gram positivos (GPOS), Gram negativos y Gram positivos (GNEG/POS)).

Cultivo y estudio de sensibilidad antibiótica

Las muestras se han sembrado de forma cuantitativa en agar CLED (cistina-lactosa deficiente en electrolitos) (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) y se han incubado durante 48 h a 37°C en atmósfera aerobia. Los microorganismos aislados en el cultivo se han identificado mediante espectrómetro de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonik, GmbH, Bremen, Germany). Los cultivos se han considerado positivos si se aislaron 10^4 UFC/mL o más de uno o dos microorganismos. Los cultivos con tres o más microorganismos se han informado como contaminados. El estudio de sensibilidad se ha realizado mediante el método de difusión con discos y los resultados se han interpretado según la última guía de EUCAST (<http://www.eucast.org>).

Identificación directa

Primero, la muestra se ha centrifugado a bajas revoluciones para separar las células humanas (430 g durante 5 min). A continuación, la parte sobrenadante se ha centrifugado durante 2 min

a 15.600 g para sedimentar los microorganismos. El sedimento obtenido se ha lavado dos veces con agua estéril y se ha procesado por duplicado para la identificación. Para ello, una pequeña cantidad de sedimento se ha depositado en dos pocillos de la placa metálica de MALDI-TOF, se ha cubierto con 1 µL de ácido fórmico al 70% y, tras el secado al aire, se ha añadido 1 µL de la matriz HCCA (ácido ciano-4-hidroxi-cinámico en acetonitrilo al 50% y ácido trifluoracético al 2,5%). Para el procesamiento se ha utilizado el FLEXCONTROL v.3.0 software. La identificación fiable se ha considerado a partir de un valor de 1.700 si se obtenía la misma especie como primera y segunda opción de los dos pocillos. Se registraba el máximo valor obtenido entre los dos pocillos. En el caso de resultado NRI (*no reliable identification*) o NP (*no peaks*), el resultado se ha registrado como “No identificación”.

Detección directa de resistencias (BLEE y carbapenemasa)

En el caso de la identificación fiable para las especies de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* complex (incluye las especies *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* y *K. variicola*) y *Enterobacter cloacae* complex (incluye las especies *E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*) se ha realizado la técnica rápida de inmunocromatografía (*lateral flow*), NG-Test CTX-M MULTI (detecta los grupos 1, 2, 8, 9 y 25 de CTX-M, los más frecuentes en nuestro medio) y NG-Test CARBA 5 (detecta carbapenemasas NDM, VIM, IMP, KPC y OXA-48) (ambas de NG biotech, France). Las especies han sido escogidas según la epidemiología local de nuestra institución, siendo estas tres especies las que con mayor frecuencia presentan dichas beta-lactamasas. En el caso de *E. coli* solo se ha realizado la detección de BLEE, en el caso de *E. cloacae* complex solo se ha realizado la detección de carbapenemasas y en el caso de *K. pneumoniae* complex se han realizado ambas pruebas. Las pruebas se han realizado según las instrucciones del fabricante. El tiempo de procesamiento era de un minuto y la lectura de resultados se realizaba al cabo de 15 min.

Comunicación de resultados

El circuito de comunicación de resultados se ha acordado con el Servicio de Enfermedades Infecciosas. En el caso de la identificación fiable, el resultado de identificación y de detección de resistencias (cuando procedía) se comunicaba al infectólogo asignado, quien revisaba la historia clínica de paciente y el tratamiento empírico que éste llevaba; además los resultados de citometría (recuentos de hematíes, leucocitos, células epiteliales y bacterias por microlitro), así como de la identificación directa mediante MALDI-TOF se introducían en el LIS y se validaban para que fueran visibles en el HIS (sistema informático del hospital). En el caso de no obtener

identificación fiable, los resultados de citometría simplemente se apuntaban internamente para llevar el control de las muestras procesadas y no se comunicaban a los clínicos.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se resumen en la **Figura 1**.

Del total de 298 muestras procesadas hubo 141 (47,3%) negativas por cultivo, 114 (38,3%) positivas por cultivo y 43 (14,4%) contaminadas. El valor predictivo positivo de la identificación directa para 86 muestras que cumplían criterio de citometría ha sido del 96,4%. Cincuenta y cuatro (47,4%) de 114 muestras positivas por cultivo han sido identificadas correctamente el mismo día de su llegada al laboratorio. En la **Tabla 1** se muestran las especies identificadas, el valor de EM MALDI-TOF directo y el resultado de urocultivo. El promedio del valor de identificación directa ha sido de 2.198.

Si analizamos 23 muestras en las que no se ha conseguido la identificación directa a pesar de que eran positivas por urocultivo, en cuatro muestras hubo dos microorganismos, en tres se aisló un microorganismo con un recuento de $<10^5$ UFC/mL y en las otras tres el recuento de leucocitos ha sido superior a 10.000 células/ μ L. Para el resto de las muestras no se ha identificado una posible causa del fracaso de la identificación directa.

En 12 muestras de las 78 positivas por cultivo que cumplían con el criterio de un recuento de ≥ 5.000 bacterias/ μ L, se han aislado dos microorganismos. La identificación directa de estas 12 muestras ha dado un resultado discordante (*Lactobacillus crispatus* según EM MALDI-TOF directo y *K. pneumoniae* y *Candida albicans* según el cultivo), en cuatro no han dado identificación fiable y en siete muestras se ha identificado uno de los dos microorganismos.

Otro resultado discordante se obtuvo en una muestra reportada al día siguiente como contaminada. En esta última EM MALDI-TOF directo ha identificado *E. coli*, mientras que en urocultivo se ha observado el crecimiento de tres o más microorganismos. De esta manera dos resultados de identificación discordante del total de 86 muestras procesadas suponen 2,3% de falsos positivos.

De las 212 muestras que no cumplían con el criterio de un recuento de ≥ 5.000 bacterias/ μ L, tan solo 36 resultaron positivas por cultivo, lo que supone 31,6% del total de las muestras positivas. Hay que destacar que 22/36 (61,1%) muestras tenían recuentos de $<10^5$ UFC/mL.

Si analizamos el aviso sobre la presencia de Gram negativos y o Gram positivos según la citometría de flujo en 78 muestras que cumplían criterio (≥ 5.000 bacterias/ μL), de 55 muestras con aviso de GNEG en 54 solo han crecido bacilos Gram negativos y en una muestra aparte de bacilos Gram negativos creció coco Gram positivo en menor recuento; de 4 muestras con aviso de GPOS en tres han crecido solo bacterias Gram positivas y en una ha crecido solo un bacilo Gram negativo; de 19 muestras con aviso de GNEG/POS hubo 15 muestras con solo bacterias Gram negativas en el cultivo, 3 con bacterias Gram positivas y negativas y una con solo Gram positivas.

En cuanto a la detección de resistencia, de 54 muestras con la identificación fiable y positivas por cultivo en 37 muestras se ha realizado la detección de BLEE y/o carbapenemasas con la concordancia de 100% entre las técnicas rápidas y antibiograma convencional. No se ha detectado ninguna cepa productora de carbapenemasa y se han identificado correctamente 10 cepas productoras de BLEE, incluyendo 6 *E. coli* y 4 *K. pneumoniae* complex. Los resultados han sido comunicados al médico correspondiente y los tratamientos se revisaron y se realizaron cambios de antibiótico cuando procedía: en cuatro pacientes se ha cambiado ceftriaxona empírica a ertapenem tras el aviso desde Microbiología, en cuatro casos ya estaba pautado ertapenem empírico por antecedentes de cepas productoras de BLEE y dos casos llevaban meropenem empírico. En cuanto a los casos donde no procedía realizar las técnicas rápidas por no tratarse de especies indicadas, no hubo ninguna BLEE ni carbapenemasa detectadas en el antibiograma convencional.

Del total de 238 hemocultivos cursados el mismo día que la muestra de orina, hubo 54 positivos. De éstos, 27 hemocultivos han sido positivos para la misma especie aislada en urocultivo (bacteriemias de foco urinario): 14/27 (51,8%) eran casos con resultado concordante entre hemocultivo, urocultivo e identificación directa; 8/27 correspondían a los casos sin identificación directa fiable, en un caso no se ha realizado la identificación directa porque el recuento bacteriano era $< 5.000 \mu\text{L}/\text{mL}$ en citometría, y, finalmente, un caso correspondía a uno de los dos resultados discordantes comentados anteriormente. En la **Tabla 2** se resumen los resultados de las pruebas de casos con bacteriemias del foco urinario.

DISCUSIÓN

La necesidad de herramientas diagnósticas rápidas es cada vez más evidente en el ámbito de microbiología. Cada día hay más técnicas novedosas llamadas a cubrir esta necesidad. No obstante, muchas veces se pueden llegar a proporcionar resultados de importancia clínica y en

un tiempo relativamente corto con las herramientas de las que disponemos en nuestros laboratorios, buscando nuevas aplicaciones y combinando con otras técnicas que están a nuestro alcance. El protocolo de identificación directa de microorganismos a partir de la muestra de orina que hemos incorporado en nuestra rutina de diagnóstico es un ejemplo claro. La mayoría de los laboratorios ya disponen de EM MALDI-TOF para la identificación de microorganismos. Por otra parte, el cribado de orinas puede ser realizado con citometría de flujo, pero en el caso de no disponer de esta herramienta, se puede realizar mediante la tinción de Gram. Mientras no disponemos de la automatización del proceso de la preparación de la muestra directa para EM MALDI-TOF, habrá que seleccionar bien la población de pacientes donde el impacto de la identificación directa será importante, ya que el proceso de preparación es laborioso y requiere tiempo exclusivo del técnico. Nosotros hemos optado por aplicar el protocolo en las muestras de pacientes con probable bacteriemia de foco urinario atendidos en el Servicio de Urgencias de nuestro hospital. Para no sobrecargar el personal médico y dada la imposibilidad de una formación en cuanto a la petición de esta prueba durante el tiempo de la pandemia de COVID19, hemos optado por identificar las muestras correspondientes desde el laboratorio mediante el aviso en LIS. El siguiente paso será incorporar la prueba de citometría e identificación directa en el petitorio de HIS y extender las horas en las que se puede realizar.

El análisis de datos de los siete meses después de la incorporación del protocolo en la rutina ha demostrado la tasa más baja de identificación fiable entre las muestras que cumplían el criterio de citometría y eran positivos por cultivo que en nuestros estudios anteriores (69,2% vs. 86,4% y 80,3%)^{8,9}. El porcentaje alto de muestras no identificadas (29,5%) puede ser debido al hecho de que la prueba se realizaba por técnicos distintos con experiencia variable en procesamiento de muestras para la identificación directa. Aun así, más de la mitad de las muestras positivas por cultivo han sido identificadas correctamente el mismo día de su llegada al laboratorio, incluidos 14 casos de bacteriemia de foco urinario.

Según nuestros datos, y de acuerdo con los resultados obtenidos en dos estudios previos, el valor de EM MALDI-TOF en muestras identificadas ha sido bastante alto (2.198). En la absoluta mayoría de los casos, si se obtenía el valor por debajo de 1700, la lista de especies era muy heterogénea. Por esta razón nosotros no vemos conveniente bajar el punto de corte del valor de EM MALDI-TOF en el caso de aplicarlo a la muestra directa, tal y como se ha propuesto en otros estudios¹⁰⁻¹². En nuestra opinión, es más conveniente buscar técnicas de preparación de muestra que permiten obtener el sedimento microbiano lo más purificado posible. Muchos autores han propuesto estrategias para mejorar las tasas de la identificación directa fiable. Así Kitagawa *et al.* han propuesto aplicar ultrasonido a la muestra previa centrifugación para romper

agregados bacterianos y de esta manera mejorar la identificación¹³. Sanchez-Juanes *et al.* han propuesto pretratamiento de la muestra con la solución de SDS para lisar las células humanas¹⁴. Veron *et al.* ha comparado el protocolo de centrifugación diferencial, filtración y preincubación, demostrando la superioridad del método de filtración¹⁵. Nosotros hemos implementado el simple protocolo de centrifugación diferencial que nos permite obtener identificación fiable en la mayoría de las muestras seleccionados en un periodo de tiempo razonable (30 min para la preparación de muestra). Cualquier paso adicional implica hacer la técnica aún más laboriosa y dedicar más tiempo, lo que puede comprometer su implementación en la rutina.

Hemos obtenido solo dos resultados discordantes durante el periodo de tiempo analizado. Uno de ellos corresponde a la identificación de *E. coli* en la muestra reportada posteriormente como contaminada según el cultivo. Era orina obtenida de catéter urinario que con frecuencia se colonizan por varios microorganismos. La detección fiable de uno de los microorganismos predominantes en una mezcla bacteriana ha sido reportada previamente⁷. Otro caso corresponde a la identificación de *Lactobacillus crispatus*, un microorganismo que forma parte de microbiota genital femenino. El urocultivo ha sido positivo para *K. pneumoniae* complex y *C. albicans*. Seguramente *Lactobacillus* se encontraba en recuentos mucho más altos en la orina directa, aunque su crecimiento ha sido enmascarado por otros dos microorganismos. En el estudio multicéntrico hemos obtenido resultados parecidos en algunas muestras, donde se identificaban los microorganismos de microbiota normal o alterado, tales como *Gardnerella vaginalis*, *Bifidobacterium* spp. o *Lactobacillus* spp.⁹. A pesar de considerar estos resultados como discordantes, detección directa de estos microorganismos debe ayudar a valorar los hallazgos de urocultivo, ya que refleja probable contaminación de la muestra.

La detección rápida de cepas productoras de BLEE y carbapenemasas aporta una información de importancia clínica indiscutible. Las carbapenemasas incluidas en el ensayo que hemos evaluado (KPC, NDM, OXA-48 y VIM) son también las más prevalentes en España, especialmente OXA-48¹⁶. No obstante, en el periodo analizado no hemos detectado ninguna carbapenemasa en las muestras analizadas. Por otra parte, hemos incluido la detección de BLEE grupo CTX-M. Las BLEE de la familia CTX-M prácticamente han desplazado otras familias, incluidas TEM y SHV, siendo especialmente frecuentes las variantes de grupos CTX-M 1 y 9, incluidos en el ensayo evaluado¹⁷. Según los datos analizados, en 10 casos con detección de BLEE positiva, en cuatro se ha cambiado tratamiento empírico. Dos de estos cuatro pacientes tenían bacteriemia de foco urinario (en hemocultivo se ha aislado la misma cepa) y eran inmunodeprimidos (un paciente trasplantado cardíaco y un paciente VIH). La selección de especies para la realización de la prueba rápida, basándonos en la epidemiología local, ha demostrado su utilidad, ya que no hubo

cepas productoras de BLEE y/o carbapenemasas entre otras especies de enterobacterias identificadas directamente en orina. Este enfoque permite hacer el uso racional de los recursos disponibles.

En resumen, la implementación del protocolo de identificación directa a partir de las muestras de orina permite realizar el diagnóstico rápido en casi 50% de las muestras que posteriormente son positivas por cultivo y en más de la mitad de las muestras de pacientes con bacteriemia de foco urinario confirmada. La detección rápida de cepas productoras de BLEE y carbapenemasas permite revisar y ajustar los tratamientos empíricos precozmente. Aunque hemos enfocado la implementación de este protocolo en los pacientes con sospecha de bacteriemia de foco urinario atendidos en Urgencias, la idea es extender su aplicación a los pacientes con pielonefritis e ITU complicada independientemente de procedencia de pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Foxman B, Barlow R, D'Arcy H, Gillespie B, Sobel JD. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Ann Epidemiol.* 2000;10:509-15.
2. Sticchi C, Alberti M, Artioli S, Assensi M, Baldelli I, Battistini A, *et al.* Regional point prevalence study of healthcare-associated infections and antimicrobial use in acute care hospitals in Liguria, Italy. *J Hosp Infect.* 2017.
3. Canton 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.
4. Merino I, Shaw E, Horcajada JP, Cercenado E, Mirelis B, Pallares MA, *et al.* CTX-M-15-H30Rx-ST131 subclone is one of the main causes of healthcare-associated ESBL-producing *Escherichia coli* bacteraemia of urinary origin in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:2125-30.
5. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-Avila M, Cembrero-Fucinos D, Herrero-Hernandez A, Gonzalez-Buitrago JM, *et al.* Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2110-5.
6. March Rossello GA, Gutierrez Rodriguez MP, de Lejarazu Leonardo RO, Orduna Domingo A, Bratos Perez MA. Procedure for microbial identification based on Matrix-

- Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry from screening-positive urine samples. *Apmis*. 2014;122:790-5.
7. Wang XH, Zhang G, Fan YY, Yang X, Sui WJ, Lu XX. Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry. *J Microbiol Methods*. 2013;92:231-5.
 8. Zboromyrska Y, Rubio E, Alejo I, Vergara A, Mons A, Campo I, *et al*. Development of a new protocol for rapid bacterial identification and susceptibility testing directly from urine samples. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22:561.e1-6.
 9. Zboromyrska Y, Bosch J, Aramburu J, Cuadros J, Garcia-Riestra C, Guzman-Puche J, *et al*. A multicentre study investigating parameters which influence direct bacterial identification from urine. *PLoS One*. 2018;13:e0207822.
 10. March Rossello GA, Gutierrez Rodriguez MP, Ortiz de Lejarazu Leonardo R, Orduna Domingo A, Bratos Perez MA. New procedure for rapid identification of microorganisms causing urinary tract infection from urine samples by mass spectrometry (MALDI-TOF). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33:89-94.
 11. Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, Ludes B, Kostrzewa M, Riegel P, *et al*. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16:1631-8.
 12. La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One*. 2009;4:e8041.
 13. Kitagawa K, Shigemura K, Onuma KI, Nishida M, Fujiwara M, Kobayashi S, *et al*. Improved bacterial identification directly from urine samples with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Lab Anal*. 2017.
 14. Sanchez-Juanes F, Siller Ruiz M, Moreno Obregon F, Criado Gonzalez M, Hernandez Egado S, de Frutos Serna M, *et al*. Pretreatment of urine samples with SDS improves direct identification of urinary tract pathogens with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2014;52:335-8.
 15. Veron L, Mailler S, Girard V, Muller BH, L'Hostis G, Ducruix C, *et al*. Rapid urine preparation prior to identification of uropathogens by MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34:1787-95.
 16. Sánchez-López J, Cantón R. Current status of ESKAPE microorganisms in Spain: Epidemiology and resistance phenotypes. *Rev Esp Quimioter*. 2019;32 Suppl 2:27-31.

17. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72:2145-55.

Figuras y Tablas

Figura 1.

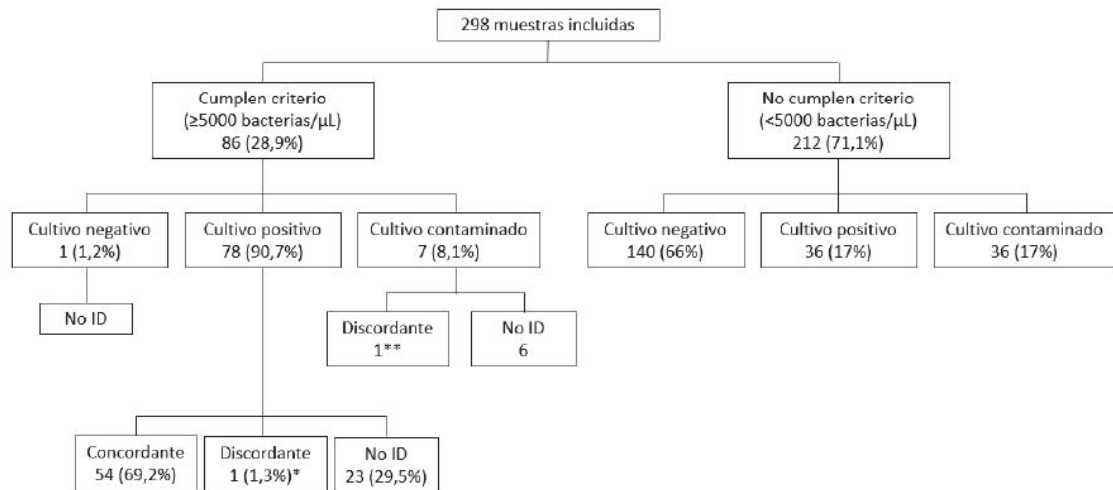


Fig. 1. Resultados de 298 muestras analizadas. **Lactobacillus crispatus* según MALDI-TOF directo y *K. pneumoniae* y *Candida albicans* según el cultivo; ** *E. coli* según MALDI-TOF directo y orina contaminada según urocultivo; ID, identificación

Tabla 1. Resumen de 54 muestras positivas por cultivo con la identificación directa fiable

ID directa mediante MALDI-TOF (número de muestras)	El promedio o máximo valor de ID directa (min – max)	Resultado de cultivo (número de muestras)
<i>E. coli</i> (30)	2214 (1861 – 2498)	<i>E. coli</i> (27), <i>E. coli</i> + <i>Enterococcus faecalis</i> (1), <i>E. coli</i> + <i>K. pneumoniae</i> complex (1) y <i>E. coli</i> + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)
<i>K. pneumoniae</i> complex (10)	2189 (1898 – 2430)	<i>K. pneumoniae</i> complex (8), <i>K. pneumoniae</i> complex + <i>P. aeruginosa</i> (1) y <i>K. pneumoniae</i> complex + <i>Enterococcus faecium</i> (1)
<i>P. aeruginosa</i> (3)	2018 (1770 – 2145)	<i>P. aeruginosa</i> (2) y <i>P. aeruginosa</i> + <i>K. pneumoniae</i> complex (1)
<i>Klebsiella aerogenes</i> (2)	2367 y 2394	<i>K. aerogenes</i> (2)
<i>Klebsiella oxytoca</i> (2)	2291 y 2377	<i>K. oxytoca</i> (2)
<i>Proteus mirabilis</i> (2)	1857 y 2232	<i>P. mirabilis</i> (2)
<i>Morganella morganii</i> (1)	2305	<i>M. morganii</i> (1)
<i>E. cloacae</i> complex (1)	2221	<i>E. cloacae</i> complex (1)
<i>E. faecalis</i> (1)	2334	<i>E. faecalis</i> (1)
<i>E. faecium</i> (1)	2089	<i>E. faecium</i> + <i>E. faecalis</i> (1)
<i>Aerococcus urinae</i> (1)	1883	<i>A. urinae</i> (1)

ID, identificación

Tabla 2. Resumen de 27 casos de bacteriemias de foco urinario

Hemocultivo	Urocultivo	MALDI-TOF directo	Detección directa de resistencias	Resultado del antibiograma
<i>E. coli</i> (19)	<i>E. coli</i> (19)	<i>E. coli</i> (11)	Detección de BLEE positiva (4/11)	Cepas productoras de BLEE (4/11)
		Sin identificación fiable (6) No cumplían criterio para ID directa (2)	NA	Cepas productoras de BLEE (3/8)
<i>K. pneumoniae</i> complex (4)	<i>K. pneumoniae</i> complex (4) <i>K. pneumoniae</i> complex + <i>E. coli</i> (1) <i>K. pneumoniae</i> + <i>C. albicans</i> (1)	<i>K. pneumoniae</i> complex (2)	Detección de BLEE positiva (1/2)	Cepas productoras de BLEE (1/2)
		Sin identificación fiable (1) Discordante (<i>Lactobacillus crispatus</i>) (1)	NA	Cepas no productoras de BLEE o carbapenemasas (2/2)
<i>P. aeruginosa</i> (1)	<i>P. aeruginosa</i> (1)	No cumple criterio para ID directa	NA	NA
<i>E. cloacae</i> complex (1)	<i>E. cloacae</i> complex (1)	Sin identificación fiable (1)	NA	NA
<i>P. mirabilis</i> (1)	<i>P. mirabilis</i> (1)	<i>P. mirabilis</i> (1)	NA	NA
<i>Staphylococcus aureus</i> (1)	<i>S. aureus</i> (1)	No cumple criterio para ID directa	NA	NA

NA, no aplica

DISCUSIÓN

IV. DISCUSIÓN

Tal y como se ha expuesto en introducción, el diagnóstico de bacteriemia y sepsis tiene un impacto importante sobre la morbi-mortalidad de los pacientes y requiere acortar el máximo posible el tiempo hasta obtener los resultados. La utilidad y aplicabilidad que pueden tener los métodos moleculares en el diagnóstico de bacteriemia depende de muchos factores. En primer lugar, hay que tener en cuenta el número de patógenos que permiten detectar. Las técnicas moleculares pueden estar dirigidas a detectar un microorganismo en concreto o usar un panel más o menos amplio de patógenos.

En el primer trabajo (**Artículo 1**) hemos estudiado la posibilidad de usar una técnica molecular con la plataforma GeneXpert (Xpert MRSA/SA BC), originalmente aprobada para su uso en hemocultivo positivo, para detectar *S. aureus* en la muestra de sangre extraída a través del catéter. En los trabajos previos donde se ha estudiado cuantitativamente la presencia de bacterias en sangre periférica y sangre extraída a través del catéter colonizado se ha visto que el inóculo de bacterias en la muestra del catéter puede llegar a miles de bacterias por mililitro [122, 123]. Aunque en los catéteres de corta duración la principal vía de colonización del catéter suele ser extraluminal, en los catéteres de larga duración (> 10 días), que eran la mayoría en nuestro estudio, mayor importancia adquiere la vía intraluminal [124, 125]. Por lo tanto, el inóculo de bacterias que esperábamos detectar en la muestra extraída a través del catéter era alto, lo que permitió plantear el uso de una técnica diseñada para detectar densidades bacterianas altas, habituales en hemocultivos positivos.

Los estafilococos son los principales agentes etiológicos de BRC [126]. El ensayo Xpert MRSA/SA BC permite detectar e identificar *S. aureus*, pero además detecta los genes de resistencia a meticilina lo que permite no solo discriminar entre MSSA (*S. aureus* meticilina sensible) y MRSA (*S. aureus* meticilina resistente), sino que también detectar de manera indirecta los estafilococos coagulasa negativa (ECN) resistentes a meticilina en tan solo una hora. La BRC causada por *S. aureus* tiene alto riesgo de complicaciones por metástasis y diseminación de la infección hacia otros sistemas y órganos, mientras que las BRC por ECN aumentan las estancias hospitalarias [127, 128]. Actualmente en nuestro medio la tasa de ECN resistentes a meticilina supera el 70%, así que la técnica empleada detectaría la mayoría de BRC causadas por ECN [129]. Esta hipótesis se ha confirmado en el presente estudio (**Artículo 1**), ya que los doce ECNs causantes de BRC eran meticilina resistentes. Por otro lado, el antibiótico empírico que con frecuencia se administra ante la sospecha de BRC estafilocócica es vancomicina. Varios estudios han demostrado que los antibióticos beta-lactámicos son la mejor opción para el tratamiento de bacteriemias causadas por MSSA en comparación con vancomicina [130, 131], por lo tanto, descartar la presencia de MRSA en el caso de BRC por *S. aureus* y ajustar cuanto antes el tratamiento empírico es de gran importancia para el pronóstico de los pacientes. La sensibilidad para MSSA en el presente estudio fue de 100%, lo que demuestra su utilidad para el diagnóstico, ya que todas las cepas de *S. aureus* causantes de BRC que crecieron en hemocultivo fueron detectadas por GeneXpert.

En cambio, la técnica evaluada en el segundo trabajo (**Artículo 2**), MagicPlex System, está diseñada para detectar múltiples especies de microorganismos a partir de la muestra directa de sangre de pacientes con sospecha de bacteriemia, independientemente del foco de la infección. Como ya se ha discutido en la Introducción, las tres plataformas más evaluadas para

DISCUSIÓN

el diagnóstico de bacteriemia a partir de sangre directa son SeptiFast [132-134], SeptiTest [135, 136] y MagicPlex [75, 76, 137, 138]. Las tres plataformas presentan una variabilidad importante en cuanto a los parámetros analíticos (sensibilidad y especificidad), sobre todo en función de la población de pacientes a la que se aplican. El tiempo requerido también difiere, siendo en torno a 5-8 h para SeptiFast, 6-7 h para MagicPlex y 8-12 h para SepsitTest [139]. La sensibilidad analítica de cada uno también es distinta y depende de la especie: para SeptiFast es de 3-30 UFC/mL, para SeptiTest es de 20-460 UFC/mL y para MagicPlex es a partir de 30 UFC para *Candida albicans*, *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. No obstante, cuando nos referimos a las técnicas moleculares, es más correcto hablar del número de copias genómicas de un microorganismo, que incluye no solo microorganismos viables, sino todo el ADN del microorganismo en cuestión, incluyendo ADN libre o fagocitado. En este caso se estima que el ADN circulante por mililitro de sangre en el caso de bacteriemia está en torno a $10^3 - 10^4$ copias/mL [34]. A diferencia de ensayo Xpert MRSA/SA BC aplicado a la sangre extraída a través del catéter que ha demostrado una sensibilidad alta para la detección tanto de *S. aureus* como de ECN resistentes a meticilina (**Artículo 1**), la sensibilidad de MagicPlex ha sido muy baja en nuestro estudio (**Artículo 2**).

La sensibilidad y especificidad de las técnicas moleculares dependen de muchos factores. Por una parte, el volumen de sangre que se procesa en el caso de técnicas moleculares es mucho más bajo en comparación con el del hemocultivo, lo que también influye en la capacidad de detectar bacteriemias, a pesar de que la cantidad de ADN circulante debería ser mayor y permitir su detección por dichas técnicas. Así en un estudio se ha logrado incrementar la sensibilidad de detección de *Mycobacterium tuberculosis* complex por una técnica molecular del 33% hasta el 71% procesando un volumen de 2 mL y 9 mL de sangre, respectivamente [140]. MagicPlex test usa tan solo 1 mL de sangre (**Artículo 2**), lo que puede ser una de las causas de la baja sensibilidad demostrada en nuestro estudio en comparación con el hemocultivo estándar. En el estudio con Xpert MRSA/SA BC (**Artículo 1**) también hemos usado 1 mL de sangre. No obstante, en este caso la densidad bacteriana esperable en una muestra obtenida a través de un catéter colonizado es mucho más alta que la concentración de microorganismos en bacteriemias de otro foco en una muestra obtenida por venopunción o a través de un catéter no infectado (1-10 UFC/mL). El carácter intermitente de la bacteriemia es otra limitación para las técnicas moleculares, si se realizan solo una vez en el proceso diagnóstico. Este carácter intermitente es debido a que los microorganismos que alcanzan el torrente sanguíneo desde los respectivos focos de la infección son rápidamente aclarados por el sistema reticuloendotelial, polimorfonucleares y macrófagos [141]. En el caso de los hemocultivos, además de extraer dos parejas separadas por un tiempo de 30 minutos, si persiste la sospecha de bacteriemia a pesar de que el primer set de hemocultivos sea negativo tras 24-48 horas de incubación, se suelen extraer más parejas de hemocultivos. Debido a los costes asociados, no es habitual repetir las técnicas de diagnóstico molecular, si la primera prueba resulta negativa, aunque esta práctica podría aumentar la sensibilidad de las técnicas moleculares. La realización de pruebas moleculares seriadas ha sido evaluada en algunos estudios para el seguimiento de los pacientes para monitorizar la respuesta al tratamiento y definir la duración de éste, o para predecir las complicaciones [142, 143]. En estos estudios los pacientes estaban bajo tratamiento correcto y los hemocultivos se habían negativizado antes que los ensayos moleculares. En cuanto a la detección de ADN de microorganismos no viables, aunque los estudios *ex vivo* han detectado el material genético pasadas decenas y centenares

DISCUSIÓN

de años [144], en el organismo vivo esta persistencia no está tan clara y depende de muchos factores, tales como el foco de infección, presencia de material calcificado, vascularización, etc. Bacterias no viables no se han detectado más allá de 2 días después de su introducción en un estudio del modelo de infección articular [145]. Cuánto tiempo se puede detectar el material genético de una infección resuelta en sangre no está claro, pero los estudios anteriormente citados sobre el seguimiento de los pacientes bajo tratamiento apropiado indican que puede tardar varios días en aclararse.

Otro parámetro que influye en el cálculo de sensibilidad de una técnica es el método comparador utilizado. Así en los estudios donde se usa el hemocultivo como único comparador, la sensibilidad suele ser más baja que en los estudios con el criterio combinado: clínico y del laboratorio [146]. En un estudio reciente el objetivo principal ha sido evaluar el valor clínico de las bacterias detectadas por el ensayo T2Bacteria, centrándose en aquellos casos con hemocultivo concomitante negativo y T2Bacteria positivo [83]. Para ello los autores han definido como bacteriemia probable cuando existían otros hemocultivos positivos para el mismo microorganismo tomados en otro momento (no concomitante) en el margen de 7 días respecto al análisis con T2Bacteria, o el microorganismo se había aislado de otros focos (orina, heridas, etc.); han considerado como bacteriemia posible, si en ausencia de cultivos positivos el microorganismo aislado era un patógeno habitual causante de la infección en cuestión (por ejemplo, *E. coli* en pielonefritis); y, finalmente, han considerado como falso positivo, si no se cumplían ninguno de los dos criterios antes mencionados. En resumen, el 71% de los resultados discordantes se han clasificado como bacteriemias posibles o probables, y además en todos los casos los pacientes recibieron al menos una dosis de antibiótico activo en los dos días previos al análisis de sangre con T2Bacteria. En nuestro primer estudio (**Artículo 1**) hubo 6 resultados no confirmados por hemocultivo. En 4 de los 6 casos, el paciente estuvo recibiendo una cobertura antibiótica que podía explicar la negativización de los hemocultivos. Resultados similares se han observado en otros estudios donde se han evaluado los métodos moleculares de diagnóstico de bacteriemia y sepsis [70, 80]. El tratamiento antibiótico previo es el principal factor de hemocultivos negativos en pacientes con sospecha de bacteriemia y es donde los métodos moleculares pueden ofrecer otra ventaja diagnóstica aparte de la rapidez. En el segundo estudio (**Artículo 2**) también hemos analizado los resultados discordantes entre MagicPlex y el hemocultivo concomitante. El hallazgo más significativo es que los pacientes que solo fueron positivos por MagicPlex recibieron con mayor frecuencia un tratamiento antibiótico activo para el microorganismo detectado. Igual que en el estudio de Kalligeros *et al.*, algunos de los pacientes con resultados discordantes tenían hemocultivos u otros cultivos positivos en días previos [83]. Considerando estos casos como verdaderos positivos, la especificidad de MagicPlex podría ser mayor.

Otro factor importante es la población en la que se estudia la bacteriemia. Así SeptiFast ha sido evaluado en pacientes con sospecha de endocarditis infecciosa con resultados similares a los del hemocultivo [147]. En pacientes trasplantados el uso de técnicas moleculares permite detectar más bacteriemias, si se usa en combinación con el hemocultivo convencional [148].

La contaminación supone un problema importante de la técnica de hemocultivo. Varios factores pueden ayudar a determinar si un microorganismo aislado es un contaminante o es uno valorable [149]. En primer lugar, tal y como se ha discutido en la Introducción, es la especie de microorganismo detectado. En nuestro primer estudio (**Artículo 1**) nos hemos

DISCUSIÓN

centrado en la BRC estafilocócica y hemos observado que el 75% (12/16) de las infecciones han sido causadas por ECN. Siendo estos microorganismos parte de la microbiota comensal de la piel, en cada caso era necesario hacer un análisis exhaustivo clínico y microbiológico para determinar su papel en el cuadro clínico de los pacientes incluidos. El número de parejas de hemocultivos y el número de frascos positivos en cada pareja es otro parámetro frecuentemente usado para valorar la verdadera bacteriemia [150-152]. En cambio, el tiempo de positividad, aunque se ha valorado como un parámetro útil a tener en cuenta en varios estudios [153, 154], en otros no se han demostrado diferencias entre los ECN valorables y los que se han considerado contaminantes [155]. En nuestro estudio (**Artículo 1**) se ha observado una diferencia significativa en el tiempo de positividad de los hemocultivos con ECN detectados por GeneXpert (10 BRC) *versus* los no detectados (solo positivos por hemocultivo). Este último grupo de hemocultivos negativos por GeneXpert incluye dos BRC por ECN y 14 hemocultivos con ECN que se consideraron contaminantes. El hecho de que GeneXpert no haya detectado ningún ECN contaminante confirma la hipótesis de un inóculo muy bajo inicial en el caso de contaminación del hemocultivo, que queda reflejado en el tiempo de positividad más largo en comparación con los casos de BRC por ECN detectados por GeneXpert en muestra directa. Aun así, la presencia de dos BRC con tiempos de positividad más largos resalta la importancia de valorar este parámetro siempre juntamente con la clínica y otros factores analíticos del paciente. Como sabemos, el tiempo de positividad del hemocultivo está influenciado por muchos factores: la especie de microorganismo, el inóculo inicial (en el caso de la muestra extraída a través del catéter el inóculo está relacionado con el grado de colonización intraluminal del catéter en cuestión), volumen de sangre inoculada en cada frasco, antibiótico previo, etc. Es probable que todas estas variables difíciles de controlar hagan que los tiempos de positividad sean poco discriminativos entre los ECN contaminantes y los causantes de BRC. La tasa de microorganismos contaminantes detectados por MagicPlex en el segundo estudio (**Artículo 2**) también ha sido significativamente más baja que la tasa de hemocultivos contaminados.

El principal problema de la implementación de plataformas moleculares en la rutina de diagnóstico microbiológico es su coste. Además, tampoco hay estudios suficientes que demuestren el impacto de estas técnicas en el manejo de los pacientes. Las plataformas moleculares destinadas a acelerar el diagnóstico deben cumplir con tres objetivos: 1. Tener parámetros analíticos (sensibilidad, especificidad, etc.) aceptables; 2. Permitir su integración relativamente fácil en los flujos de trabajo del laboratorio; y 3. Tener un impacto en el manejo de los pacientes (mortalidad, estancias hospitalarias, años de vida ajustados por calidad, etc.). Los estudios de coste-efectividad ayudan a evaluar simultáneamente el coste y beneficio que aporta un método en concreto, si lo introducimos en nuestro algoritmo diagnóstico. El ensayo Xpert MRSA/SA BC aplicado a hemocultivo positivo ya ha demostrado en estudios previos su utilidad en términos de acortar la duración de las estancias hospitalarias o disminuir los costes hospitalarios [156], así como ser un método coste-eficiente en comparación con estrategias de tratamiento empírico en escenarios con distinta prevalencia de MRSA [56]. Aun así, su impacto dependerá mucho de la aplicación clínica de estos resultados microbiológicos. Así, en un estudio donde se evaluó el coste-efectividad de distintos métodos de diagnóstico rápido de bacteriemias en comparación con el diagnóstico convencional, se ha observado que la combinación de técnicas rápidas con los programas de optimización de uso de antibióticos es coste-efectiva, mientras que el impacto disminuye de manera significativa, si las técnicas

DISCUSIÓN

rápidas no se acompañan de dichos programas [157]. En nuestro estudio (**Artículo 1**), para valorar la relación entre el coste de nueva estrategia diagnóstica (GeneXpert junto con hemocultivo) y la medida de su efecto (años de vida ganados), se ha calculado la razón incremental de coste-efectividad (RCEI). El coste extra por año de vida ganado ha sido de 180 euros. El análisis de sensibilidad para estimar el nivel de incertidumbre demostró que el RCEI está más afectado por la variable de probabilidad de complicaciones, aumentando hasta 2.405 euros si la probabilidad es de tan solo 13%. Teniendo en cuenta que en España se considera una estrategia coste-efectiva si el RCEI está por debajo de 30.000 euros por año de vida ganado, GeneXpert en todo caso demostró su coste-efectividad [158].

La posibilidad de introducción de paneles moleculares en el flujo diagnóstico de rutina dependerá en muchos casos del trabajo técnico que supone el procesamiento de las muestras. Una limitación importante de MagicPlex test (**Artículo 2**) y de otros ensayos similares es que no es un sistema integrado y requiere varios pasos manuales. Este hecho, por una parte, requiere personal entrenado y, por otra parte, hace difícil la integración de las técnicas en la rutina diaria, ya que requiere disponibilidad de personal 24 horas 7 días a la semana. En caso contrario, las muestras que lleguen fuera del horario de trabajo del laboratorio no serán procesadas hasta el día siguiente. Actualmente tan solo el 42% de laboratorios europeos introducen botellas de hemocultivos de forma continua 24 horas al día, tan solo el 13% empiezan el procesamiento del hemocultivo positivo inmediatamente y menos del 5% tienen servicio de 24 horas para la validación y notificación de los resultados de la identificación y el antibiograma [159]. El tiempo de 5-6 horas hasta obtener el resultado también es un condicionante. No obstante, en el caso de sistemas totalmente integrados, como GeneXpert (**Artículo 1**), es más fácil la incorporación de la prueba en la rutina por no requerir personal entrenado y por el tiempo reducido hasta obtener el resultado [160].

Algunas de las técnicas moleculares, aparte de la detección de microorganismos incluyen la detección de genes de resistencia. Este es el caso del ensayo Xpert MRSA/SA BC que permite la identificación de especie de *S. aureus* y la determinación del principal mecanismo de resistencia a beta-lactámicos (gen *mecA*) (**Artículo 1**). Además, tal y como hemos demostrado en nuestro estudio, el ensayo permite la detección indirecta de ECNs resistentes a metilicina. MagicPlex incluye tres genes de resistencia: *mecA*, *vanA* y *vanB*. No obstante, el número limitado de ECNs detectados en el segundo estudio (**Artículo 2**) hace difícil la evaluación de la fiabilidad de la detección de la resistencia a metilicina en estafilococos por MagicPlex. En este estudio también hemos obtenido un resultado positivo para el gen *vanB* en una muestra donde MagicPlex ha detectado la presencia de *E. faecalis*. No obstante, este resultado no se ha confirmado ni por el hemocultivo correspondiente ni por otros cultivos microbiológicos del paciente. Hay que resaltar que el número de marcadores de resistencia incluidos en el ensayo MagicPlex es muy insuficiente. Hoy en día es importante que los paneles moleculares que detectan bacilos Gram-negativos incluyan también la detección de β -lactamasas, al menos las más prevalentes, tales como BLEE grupo CTX-M, y ciertos tipos de carbapenemasas.

Los resultados obtenidos en los estudios descritos (**Artículo 1 y 2**) confirman el hecho que hemocultivo sigue siendo el *gold standard* para el diagnóstico de bacteriemias. Hay que resaltar que muchas otras estrategias, aparte de las técnicas moleculares, pueden ayudar a acortar los tiempos de diagnóstico. Tal y como ha propuesto Lamy *et al.* en su revisión, un enfoque multifactorial ("*bundle approach*") es necesario para mejorar el diagnóstico

DISCUSIÓN

microbiológico de bacteriemia, incluyendo la optimización de parámetros pre-analíticos (asepsia, volumen de sangre inoculado, inicio de incubación sin demoras, etc.), analíticos (rápido procesamiento de hemocultivos 24 horas 7 días a la semana, uso de técnicas rápidas de identificación y antibiograma, etc.) y post-analíticos (comunicación rápida de resultados, equipos PROA, etc.) [161].

Tal y como hemos resaltado en la parte de la Introducción, la etiología de bacteriemia puede ser muy diversa y depende en gran medida del foco de infección. La infección urinaria (ITU) es una de las más frecuentes tanto en el ámbito extra como intrahospitalario, siendo además un foco importante de bacteriemia y sepsis [162, 163]. La identificación rápida de microorganismos causantes de ITU en la muestra directa permite confirmar el diagnóstico y ajustar el tratamiento antibiótico el mismo día de la extracción de la muestra de orina, lo que adquiere especial importancia en el caso de una infección grave que cursa con sepsis.

En primer lugar, hemos propuesto un protocolo para conseguir la identificación directa mediante EM MALDI-TOF a partir de la muestra de orina (**Artículo 3**), realizando además el antibiograma convencional con el sedimento bacteriano obtenido y adelantando de esta manera los resultados 18-48 h, y, luego, hemos evaluado la fiabilidad del protocolo propuesto en nueve hospitales españoles (**Artículo 4**). A continuación, hemos puesto en marcha la identificación directa en muestras de orina combinada con la detección rápida de BLEE y carbapenemasas en la rutina del diagnóstico microbiológico de nuestro laboratorio (**Manuscrito 5**).

Teniendo en cuenta que la orina es la muestra más común en el laboratorio de bacteriología, hemos utilizado la citometría de flujo como método de cribado para identificar las orinas con alta densidad bacteriana. El citómetro de flujo ofrece la posibilidad de obtener un recuento de bacterias, así como de leucocitos y hematíes por μL . Esta técnica está ampliamente evaluada y es usada para el cribado de orinas para decidir cuáles son las muestras que se van a sembrar. Para ello se establecieron distintos *cut-off* dependiendo de la población a la que se aplica la técnica [93, 94, 96]. El objetivo del cribado es tener una sensibilidad alta y por lo tanto los recuentos de bacterias por μL que se usan como *cut-off* suelen ser bajos, para asegurar que haya muy pocas orinas positivas que no se siembran. En nuestro caso el objetivo ha sido diferente, ya que necesitábamos estimar un recuento de microorganismos a partir del cual la mayoría de las orinas resultaban positivas por cultivo. El *cut-off* de 5.000 bacterias/ μL (5×10^6 bacterias/mL) asegura que al menos el 80% de las muestras van a ser positivas por cultivo (**Artículo 3**). En el estudio de March Rosello *et al.* los autores han demostrado que los recuentos de $>10^7$ bacterias/mL por citometría indican la densidad bacteriana suficiente para asegurar la identificación directa de muestras monomicrobianas con la sensibilidad de una 87,5% [164]. Para los recuentos menores los autores proponen el paso previo de pre-incubación para aumentar el inóculo. Aunque el paso de pre-incubación ciertamente puede ayudar a tener inóculo más alto de microorganismos, se pierde la principal ventaja que es la rapidez del método. Además, dependiendo de la hora en que se recibe la muestra en el laboratorio, sería difícil incorporar este paso al flujo de trabajo. Una alternativa al citómetro como método de cribado puede ser la tinción de Gram, que tiene la ventaja de ser un método fácil de realizar, disponible en cualquier laboratorio de microbiología y que no necesita equipamiento especial. La tinción de Gram ha demostrado su utilidad como un método de cribado previo a la identificación mediante EM MALDI-TOF [101]. No obstante, hay que

DISCUSIÓN

mencionar que es un método laborioso si hay que aplicarlo al gran número de orinas que se reciben en el laboratorio, y la valoración es subjetiva. Guzman-Puché *et al.* han propuesto un algoritmo de cribado basado en la combinación de un método de bioluminiscencia (Coral UTI Screen) y tinción de Gram como paso previo a la EM MALDI-TOF directa de la orina [165]. El algoritmo ha demostrado alta sensibilidad y especificidad y es una alternativa válida para los laboratorios que tienen incorporado el método de bioluminiscencia en su rutina. Otros autores han evaluado la técnica de cribado basada en la dispersión de luz (BacterioScan 216Dx) para identificar las muestras aptas para la identificación directa con EM MALDI-TOF [166]. La sensibilidad de la técnica para detectar muestras positivas ha sido de 96,5%. Tras establecer un *cut-off* de densidad óptica para aplicar EM MALDI-TOF, la combinación de BacterioScan y EM MALDI-TOF ha demostrado una sensibilidad del 72%. No obstante, hay que tener en cuenta que el cribado con BacterioScan requiere un tiempo mínimo de 3 h de incubación de la muestra sembrada en un medio líquido hasta detectar el aumento de turbidez. En cambio, nuestro protocolo permite procesar la muestra sin demora y tener los resultados de la citometría en pocos minutos.

En nuestro protocolo se ha usado un volumen inicial de 10 mL de orina (**Artículos 3, 4 y Manuscrito 5**). Esta cantidad de orina junto con el *cut-off* establecido de ≥ 5.000 bacterias/ μL ($\geq 5 \times 10^6$ bacterias/mL) nos ha permitido disponer de suficiente sedimento bacteriano para no solo realizar una identificación directa, sino también preparar una suspensión 0,5 McF para el antibiograma mediante difusión con discos en el primer trabajo (**Artículo 3**) o realizar las técnicas de inmunocromatografía para detectar BLEE y carbapenemasas (**Manuscrito 5**). En otros trabajos el volumen inicial de la muestra varía entre uno y 15 mL [98, 99, 101, 167]. Cuanto mayor es la densidad de microorganismos en la muestra, menos volumen se necesita para obtener una identificación válida. Así que, al implementar este protocolo en la rutina, el volumen de muestra como parámetro aislado no debe ser usado para decidir si la muestra es apta o no para la aplicación directa de la EM MALDI-TOF. Habrá que tener en cuenta el recuento de bacterias y otras células para tomar la decisión, tal y como se va a discutir más adelante.

El protocolo de doble centrifugación que hemos utilizado en nuestro trabajo es fácil de realizar, rápido y no necesita ni reactivos ni dispositivos adicionales aparte de las centrifugas. Otros autores han estudiado la posibilidad de obtener el sedimento bacteriano mediante filtración, aunque es más laborioso y necesita un dispositivo especial [168]. También es posible aplicar a la muestra de orina la técnica propuesta para un hemocultivo positivo con el fin de separar bacterias de células humanas [51]. En este caso la muestra se centrifuga en los tubos de suero con gel separador y los microorganismos se concentran en la superficie del gel. No obstante, en nuestra opinión, la técnica de doble centrifugación es más fácil y asequible y además permite una recuperación eficiente de microorganismos de las orinas con densidad suficiente para la identificación directa. Una vez se obtiene el sedimento de microorganismos, la identificación puede ser realizada directamente, depositando parte del sedimento en el pocillo, cubriendo después con 1 μL de ácido fórmico al 70% para facilitar la lisis de microorganismos, y finalmente con 1 μL de la matriz. El protocolo de extracción de proteínas aplicado al sedimento bacteriano puede mejorar ligeramente las tasas de identificación directa fiable, tal y como se ha demostrado en algunos estudios [98, 101, 164]. En nuestro estudio necesitábamos preservar la integridad de las células bacterianas para poder utilizar el sedimento restante para antibiograma directo (**Artículo 3**) o realizar la detección rápida de

DISCUSIÓN

BLEE y cabapenemasas (**Manuscrito 5**). Por esta razón no hemos usado el protocolo de extracción de proteínas.

Los dos principales problemas de la identificación directa a partir de la muestra clínica son la cantidad de microorganismos disponibles para el análisis tras su recuperación y la presencia de las sustancias que interfieren en el análisis de espectros proteicos microbianos. En muchos trabajos previos se ha demostrado que la identificación fiable se obtiene sobre todo en las orinas que presentan los recuentos de $\geq 10^5$ UFC/mL en el urocultivo cuantitativo [98, 99, 164]. En nuestros estudios el *cut-off* de 5.000 bacterias/ μ L (5×10^6 bacterias/mL) según la citometría de flujo, ha permitido incluir las orinas que en su mayoría (99,2% de los positivos por cultivo en el **Artículo 3** y 96,5% de los positivos en el **Artículo 4**) tenían recuentos de $\geq 10^5$ UFC/mL por cultivo. El recuento de microorganismos proporcionado por citometría ha demostrado ser un parámetro independiente que influye en el éxito de la identificación directa en el análisis multivariado (**Artículo 4**). El protocolo de extracción de proteínas previo análisis mediante EM MALDI-TOF puede mejorar aún más las tasas de identificación fiable, como ya hemos mencionado antes, con el inconveniente de no disponer posteriormente de bacterias intactas para otros posibles estudios. Kitagawa *et al.* han propuesto aplicar ultrasonidos a la muestra de orina previa centrifugación para romper agregados bacterianos y de esta manera mejorar la identificación [169]. Pero aun teniendo los recuentos muy altos, la presencia de más de un microorganismo en el sedimento obtenido puede comprometer la identificación. En los casos en los que hay dos microorganismos, la proporción relativa de cada uno determina el resultado de la identificación: una identificación no fiable se obtiene si ambos microorganismos se encuentran en cantidades equivalentes, mientras que una identificación fiable de un solo patógeno se obtiene si éste es claramente predominante [99]. En nuestro primer trabajo (**Artículo 3**) no hemos obtenido una identificación fiable en el 13,6% (n=17) de las muestras con un recuento de $\geq 10^5$ UFC/mL en el cultivo y de $\geq 5 \times 10^6$ bacterias/mL según la citometría de flujo, de las cuales en cinco casos puede ser debido a la presencia de dos microorganismos en proporciones iguales. Por otro lado, en 19 casos de orinas con dos microorganismos en el cultivo hubo una identificación fiable de uno de ellos. Hemos obtenido resultados parecidos en el **Manuscrito 5**. Aparte de las situaciones en que hay dos microorganismos patógenos, podemos encontrarnos con los casos en los que se identifica un microorganismo de la microbiota urogenital presente en mucho mayor cantidad (por ejemplo, *Lactobacillus* spp.) que el microorganismo potencialmente responsable de la infección. En el estudio multicéntrico (**Artículo 4**) entre las seis muestras discordantes, positivas para *E. coli* en el cultivo la identificación directa dio dos resultados positivos para *Lactobacillus* spp., uno para *Bifidobacterium breve* y uno para *Gardnerella vaginalis*, microorganismos que forman parte de microbiota vaginal normal o alterada y que seguramente se encontraban en mucho mayor recuento que *E. coli*. En el **Manuscrito 5** hemos obtenido hallazgos parecidos en las orinas con dos microorganismos en cultivo: la identificación directa de estas 12 muestras ha dado un resultado discordante (*Lactobacillus crispatus* según EM MALDI-TOF directo y *K. pneumoniae* y *Candida albicans* según el cultivo), en cuatro no han dado identificación fiable y en siete muestras se ha identificado con fiabilidad uno de los dos microorganismos. Otros autores han sugerido que las bacterias contaminantes, aunque presentes en menor recuento que el uropatógeno causante de la infección, pueden condicionar la identificación directa, ya que su cantidad en 10 mL de muestra procesada puede llegar a ser importante [164]. No obstante, estas bacterias contaminantes no se detectan en urocultivo donde tan solo 1 μ L de la muestra

DISCUSIÓN

se siembra. De esta manera, al encontrarse en menor cantidad que el uropatógeno en 10 mL de la muestra directa, no se identifican por EM MALDI-TOF, pero interfieren en la identificación fiable del mismo.

Otro problema importante es la presencia de sustancias que interfieren en el análisis a partir de la muestra directa, y, en primer lugar, las células humanas o sus restos. El análisis multivariado (**Artículo 4**) ha demostrado que el resultado de identificación fiable está inversamente relacionado con el recuento de células epiteliales y leucocitos. Inicialmente hemos pensado que el promedio de recuento de estas células puede ser diferente entre las muestras positivas, negativas y contaminadas. No obstante, no hemos encontrado diferencias significativas en el recuento de leucocitos, lo que puede ser explicado por dos razones principales. En primer lugar, presencia de piuria por causas no infecciosas. Por otro lado, también puede haber pacientes con cultivos negativos que recibieron antibióticos, aunque este dato no ha sido recogido en nuestro estudio. En cuanto a las células epiteliales, sí que se ha observado una diferencia significativa. Se ha detectado un número más elevado de células epiteliales por microlitro en las muestras contaminadas y negativas en comparación con las muestras positivas. Se sabe que la presencia de células epiteliales escamosas se usa ampliamente como un marcador de probable contaminación de la muestra, sobre todo en la población femenina. Tener en cuenta este parámetro antes de aplicar la EM MALDI-TOF de la muestra directa puede ayudar a evitar resultados falsos positivos en el caso de orinas contaminadas con un microorganismo predominante. El impacto negativo de la presencia de leucocitos y células epiteliales en la identificación fiable seguramente es debido a los restos de células humanas que quedan después de la centrifugación. Otra posible explicación de las identificaciones no válidas es la presencia de proteínas de la orina que interfieren en el análisis [170]. Se sabe que la orina de personas sanas contiene más de 2.000 proteínas distintas, mientras que las muestras de pacientes con procesos inflamatorios contienen más de 5.000 proteínas [171, 172]. Pinault *et al.* ha realizado un estudio donde primero han establecido una base de datos específica a partir de las muestras positivas de orina [173]. Argumentando que la orina es un entorno muy complejo que interfiere en el análisis de espectros, han decidido crear una base donde está presente el “background” típico de orina, lo que podría aportar una ventaja a la hora de obtener la identificación fiable. Aun así, los autores limitan la ventana de lectura de los espectros proteicos (m/z) de entre 4000 y 16000 Da, para dejar fuera los picos intensos de α -defensinas. La ventaja principal de este enfoque es poder usar menor volumen inicial de muestra (1 mL) y menor recuento de bacterias ($<10^4$ UFC/mL) para llegar a la identificación fiable. Sin embargo, la complejidad que supone la creación de una base de datos específica junto con el protocolo de preparación de las muestras mucho más laborioso que en otros estudios hace dudar de la utilidad de la propuesta. En el caso de las orinas, se suele disponer de volúmenes de muestra más que suficientes para su procesamiento directo. Además, hay que valorar con precaución los resultados obtenidos en las muestras con los recuentos más bajos de microorganismos en cultivo. Un aspecto importante a tener en cuenta es que mediante el protocolo de preparación del sedimento bacteriano a partir de la orina que utilizamos la mayoría de las proteínas de la orina quedan separadas del sedimento bacteriano. Probablemente esta propuesta sería más interesante para algún otro tipo de líquidos biológicos (LCR, articular, etc.). También se han propuesto otras soluciones para resolver el problema de las sustancias que interfieren en el análisis y mejorar las tasas de identificación directa. Sanchez-Juanes *et al.* han propuesto un pretratamiento de la muestra con la solución

DISCUSIÓN

de SDS para lisar las células humanas [174]. Veron *et al.* han comparado el protocolo de centrifugación diferencial, filtración y pre-incubación, demostrando la superioridad del método de filtración [175]. Afortunadamente, en la mayoría de las muestras monomicrobianas con el *cut-off* establecido en nuestro estudio no hace falta ningún procedimiento adicional para conseguir una identificación fiable. No obstante, no descartamos usar en el futuro algún método adicional para conseguir una identificación fiable en las orinas con recuentos más bajos de bacterias, si la situación clínica del paciente lo requiere.

En cuanto a la fiabilidad de la identificación directa, el fabricante fija el valor de identificación por EM MALDI-TOF en 2.000 para considerarla fiable a nivel de especie, y entre 1.700 y 2.000 a nivel de género. En nuestro protocolo (**Artículos 3, 4 y Manuscrito 5**) hemos considerado la identificación fiable a nivel de especie a partir de 1.700. En trabajos previos distintos autores estudiaron bajar el valor aceptable incluso por debajo de 1.700, apelando a que la muestra directa difícilmente puede ser equiparada a la colonia pura de microorganismos. Así March Rosselló *et al.* en su estudio han propuesto usar el valor de ≥ 1.400 si al menos 2 de las 4 réplicas de cada muestra alcanzan este valor [100]. Anteriormente Moussaoui *et al.* han propuesto aceptar la identificación como fiable para hemocultivos positivos, si la misma especie aparece en las cuatro primeras opciones de la lista, con el valor de la primera de al menos 1.400 [176]. La Scola *et al.* han considerado como válida la identificación, si las 4 réplicas han identificado la misma especie con el valor de ≥ 1.200 [177]. Nosotros consideramos que es más apropiado utilizar el límite de fiabilidad de identificación propuesto por el fabricante (≥ 1.700), sobre todo teniendo en cuenta que la orina no es comparable con el hemocultivo y en muchas ocasiones puede presentar recuentos considerables de microorganismos que forman parte de la microbiota. Bajar el valor de fiabilidad supone aumentar la probabilidad de los resultados falsos positivos, sobre todo en el caso de orinas contaminadas.

Aparte de utilizar el valor de fiabilidad y tener en cuenta los recuentos de células humanas que proporciona el citómetro, ¿de qué otra manera podemos minimizar la posibilidad de resultados falsamente positivos en las muestras contaminadas? En nuestro primer trabajo (**Artículo 3**) una identificación válida se ha obtenido en seis muestras contaminadas (4,3%). En el **Manuscrito 5**, de 7 muestras contaminadas hubo identificación fiable en una. En el estudio multicéntrico (**Artículo 4**) hasta el 32% de muestras contaminadas han dado una identificación directa fiable, lo que supone el 2,6% del total de muestras procesadas para la identificación directa. Como se ha explicado antes en el texto, la presencia de un microorganismo predominante en una muestra polimicrobiana puede resultar en una identificación fiable de este microorganismo. El transporte en frío y sin demora y el procesamiento inmediato de las muestras de orina ayudan a evitar el sobrecrecimiento de bacterias contaminantes. Se sabe que el uso de recipientes para la orina con conservantes permite inhibir la proliferación de flora microbiana y al mismo tiempo preservar otros elementos formes, como leucocitos, para su posterior análisis [178, 179]. En el estudio multicéntrico (**Artículo 4**) hemos observado que la tasa de identificación fiable es superior en los tubos sin conservante cuando se comparan los dos grupos sin tener en cuenta el resultado de cultivo. Pero si solo nos centramos en las muestras positivas por cultivo, no se observan diferencias. Es decir, el uso de tubos con conservantes sobre todo evita las identificaciones en muestras contaminadas, sin afectar las muestras positivas. Es de especial importancia cuando se trata de muestras de atención primaria que suelen llegar al laboratorio pasadas horas

DISCUSIÓN

después de su recogida, o cualquier muestra de orina que no pueda ser sembrada o procesada por EM MALDI-TOF en las dos horas posteriores a su recogida, ni puede guardarse refrigerada. En estos casos el uso de tubos con conservantes, principalmente ácido bórico, es recomendable. Pero hay que tener en cuenta dos aspectos: 1. El volumen de la muestra no puede ser inferior a 3 mL para evitar el efecto inhibitor sobre los microorganismos que van a ser cultivados; 2. La muestra debe ser cultivada en las siguientes 24 h. A pesar de que hubo estudios que indicaban un posible efecto tóxico del ácido bórico sobre los microorganismos, otros autores no han observado ninguna diferencia significativa ni en las tasas de positividad, ni en los recuentos de microorganismos pasadas 24 h, siempre y cuando se cumplan las condiciones de recogida (volumen mínimo) [180].

Otro aspecto importante que discutir son las muestras con el resultado discordante en la identificación directa y a partir de colonia. En nuestro estudio multicéntrico (**Artículo 4**) en siete casos se trataba de microorganismos que crecen más lentamente o con dificultad en los medios de cultivo. Muchos de ellos forman parte de microbiota normal o alterada del tracto genital (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Gardnerella vaginalis*), pero otros pueden ser patógenos causantes de ITU (*Aerococcus* spp.). Como ya hemos explicado antes, si estos microorganismos están presentes en mayor cantidad que el microorganismo aislado en el cultivo (*E. coli*, *Klebsiella* spp., etc.), la EM MALDI-TOF puede proporcionar una identificación fiable a partir de la muestra directa. Además, en la mayoría de los casos en el cultivo ha crecido un bacilo Gram-negativo que obviamente tiene una cinética de crecimiento mucho más rápida que los microorganismos mencionados. En los cinco casos restantes los resultados discordantes de identificación podrían ser debidos a la identificación errónea, tanto directa como convencional. Lamentablemente en nuestro estudio no hemos incluido la parte de confirmación molecular de los resultados discordantes, como se hizo en algún otro estudio [99, 181]. Tampoco se puede excluir la posibilidad de la presencia de dos microorganismos en la orina directa, uno de los cuales no ha crecido por alguna razón en el medio de cultivo. En el caso de una identificación directa válida de orinas con resultado negativo en el cultivo (**Artículo 4**), excepto cuatro muestras con *E. coli*, el resto de los microorganismos identificados crecen con dificultad en los medios habituales y suelen ser contaminantes de la microbiota urogenital. En el caso de cuatro muestras con *E. coli* según la identificación directa y que no creció en el urocultivo, la explicación más plausible es que los pacientes tomaron antibiótico previo. Lamentablemente este dato no ha sido recogido en el estudio.

Un hallazgo interesante observado en nuestro primer estudio (**Artículo 3**) fue la identificación directa de *Clostridium perfringens*, una bacteria anaerobia que obviamente no creció en el medio de CLED usado en la rutina bajo las condiciones de incubación estándar. En este caso particular, después de obtener la identificación directa, la muestra se sembró tanto de manera convencional como en el medio de Schaedler que se incubó en condiciones de anaerobiosis. En este último medio se observó el crecimiento puro de *C. perfringens* después de 18 h de incubación, mientras que el cultivo convencional en CLED fue negativo tras 48 h de incubación. Las bacterias anaerobias rara vez están involucradas en ITU y por eso su búsqueda activa no se recomienda. No obstante, en los pacientes con ciertas patologías de base se han reportado los casos de ITU causadas por microorganismos anaerobios [182, 183]. En este caso el paciente presentaba la enfermedad de Crohn y varios episodios de ITU en los últimos meses, lo que hacía sospechar de la presencia de una fístula enterovesical. Aunque este hallazgo es más bien excepcional, pone de manifiesto la utilidad adicional de la identificación directa mediante EM

DISCUSIÓN

MALDI-TOF: la identificación de los patógenos que no crecerían en condiciones convencionales de cultivo.

Un parámetro adicional que nos proporciona la citometría de flujo es la morfología de los microorganismos detectados: un aviso de morfología de bacilos, de cocos o morfología mixta. Los anteriores estudios han demostrado que la citometría tiene mejores resultados en predecir la morfología bacilar que cocoide o mixta [184, 185]. En el estudio multicéntrico (**Artículo 4**) hemos obtenido un valor predictivo positivo aceptable para la morfología bacilar. El número de muestras con otra morfología ha sido bajo, probablemente debido al alto *cut-off* usado en nuestro estudio, pocas veces alcanzado por cocos Gram-positivos. Se ha observado que las bacterias Gram-positivas suelen tener en orina recuentos más bajos por citometría de flujo [186]. También hay que tener en cuenta que los bacilos Gram-negativos son los principales agentes etiológicos de ITU. Aunque en el primer trabajo (**Artículo 3**) no hemos analizado este parámetro, hubo pocas muestras con bacterias Gram-positivas en el cultivo. Las nuevas versiones de *software* de citometría han cambiado el tipo de aviso, informando sobre la presencia de Gram-positivos *versus* Gram-negativos, basándose en las diferencias en la captación del colorante fluorescente entre ambos grupos de microorganismos. En un estudio reciente se ha demostrado un valor predictivo positivo de 95,8% para el aviso de Gram-negativos [187]. En nuestra experiencia con este nuevo software, la concordancia con el urocultivo para el aviso de Gram-negativos es muy alta (de 55 muestras con aviso de Gram-negativos en 54 solo han crecido bacilos Gram-negativos en cultivo) (**Manuscrito 5**).

La gran ventaja de nuestro protocolo de identificación directa no es solo detectar el patógeno causante de la infección, sino obtener el sedimento bacteriano suficiente para realizar las técnicas de detección de resistencias. Hoy en día, teniendo en cuenta el problema importante de resistencias en los bacilos Gram-negativos, tan solo la identificación de la especie no es suficiente para ajustar el tratamiento. Sin duda las guías locales de antibioticoterapia empírica basadas en los mapas microbiológicos son de gran ayuda. Aun así, disponer de un antibiograma completo cuanto antes o descartar/confirmar ciertos mecanismos de resistencias al mismo tiempo que identificar el agente etiológico, supone una mejora indiscutible en el manejo de pacientes. En nuestro primer trabajo (**Artículo 3**) hemos aprovechado el sedimento obtenido para realizar el antibiograma mediante el método de difusión con discos. Los resultados de este antibiograma directo han estado disponibles 24 h antes del procedimiento convencional, incluyendo un 17,5% de microorganismos productores de BLEE. En el estudio de Li *et al.* los autores también han combinado la citometría de flujo para el cribado de orinas, EM MALDI-TOF para la identificación directa y el método convencional de antibiograma (VITEK 2) aplicado al sedimento directo de las muestras identificadas con fiabilidad [188]. La concordancia global entre el antibiograma directo y a partir de colonias fue de 94,83% para *Enterobacterales*, 94,44% para bacilos Gram-negativos no-fermentadores, de 94,38% para *Staphylococcus* spp. y de 92,94% para *Enterococcus* spp. Los resultados de VITEK 2 pueden estar disponibles en tan solo 6-8 h en el caso de enterobacterias. En un estudio reciente se ha evaluado la combinación de la identificación directa mediante EM MALDI-TOF y el uso de sondas fluorescentes para la detección de carbapenemasas [189]. Este método proporciona resultados en 50-90 min y es relativamente laborioso. Al implementar el protocolo en la rutina de nuestro laboratorio (**Manuscrito 5**) hemos combinado la identificación directa mediante EM MALDI-TOF con la detección rápida de cepas productoras de BLEE y carbapenemasas por técnicas de inmunocromatografía (*lateral*

DISCUSIÓN

flow): CTX-M MULTI (detecta los grupos 1, 2, 8, 9 y 25 de CTX-M, los más frecuentes en nuestro medio) y NG-Test CARBA 5 (detecta carbapenemasas NDM, VIM, IMP, KPC y OXA-48) (ambas de NG biotech, France). Las principales ventajas consisten en que son técnicas muy rápidas (máximo 15 min hasta el resultado) y muy fáciles de realizar, y que no necesitan ni personal entrenado ni equipamiento especial. Las técnicas incluyen las β -lactamasas más prevalentes en nuestro medio [190-193]. Basándonos en la epidemiología local, hemos aplicado las técnicas a tres grupos de microorganismos identificados directamente en la orina con fiabilidad: *E. coli*, *K. pneumoniae* complex y *Enterobacter cloacae* complex. La concordancia con el antibiograma convencional ha sido del 100% y los tratamientos empíricos han sido revisados y ajustados, cuando procedía, el mismo día de la obtención de la muestra.

Un reciente metaanálisis ha confirmado la fiabilidad de la identificación directa mediante EM MALDI-TOF a partir de la muestra directa [194]. Pero la pregunta más importante que tenemos que contestar es a que pacientes aplicaríamos el protocolo estudiado. Sin duda alguna la situación ideal sería poder hacer un cribado e identificación directa en todas las muestras recibidas en el laboratorio. No obstante, es difícil de llevar a cabo, ya que actualmente cualquier protocolo de la identificación directa mediante EM MALDI-TOF es una técnica bastante laboriosa, que no puede ser automatizada y que requiere varios pasos manuales y tiempo exclusivamente dedicado al procesamiento de estas muestras. Si tenemos en cuenta el volumen de muestras de orina que se reciben diariamente en el laboratorio y que además se reciben a lo largo de todo el día, resulta imposible la aplicación indiscriminada del protocolo. También hay que tener en cuenta que las muestras recibidas de los centros de atención primaria pertenecen a pacientes con infección habitualmente no complicada, que en su mayoría van a su domicilio con tratamiento empírico y que no se van a beneficiar del resultado rápido. Todo lo dicho resalta la necesidad de identificar bien la población de pacientes que pueden beneficiarse de la identificación directa. El grupo más indicado serían los pacientes con sospecha de bacteriemia o sepsis de foco urinario. En estos casos se recogen dos tipos de muestras para el cultivo: la sangre (hemocultivo) y la orina. Como ya hemos discutido en dos primeros artículos que forman parte de esta tesis (**Artículo 1 y 2**), la concentración de bacterias en sangre suele ser baja en la persona adulta. Los métodos moleculares aplicados a sangre directa son caros, requieren equipamiento sofisticado y tienen una sensibilidad muy variable. Los hemocultivos requieren como mínimo 9-12 horas en el caso de enterobacterias, los uropatógenos más frecuentes, para detectar su crecimiento. En cambio, la orina de estos pacientes suele presentar una densidad elevada del microorganismo causante de infección, lo que permite la identificación directa con la técnica de EM MALDI-TOF disponible en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica. El resultado de la identificación puede estar disponible en tan solo una hora desde la recepción de la muestra en el laboratorio. Pero no es solo la identificación. Como ya hemos explicado, el sedimento bacteriano obtenido de la orina permite aplicar las técnicas rápidas de detección de resistencias disponibles en cada laboratorio, o simplemente realizar el antibiograma convencional, adelantando significativamente el resultado. Esta información, facilitada en tan poco tiempo al médico responsable, puede mejorar sustancialmente el pronóstico de los pacientes con sepsis. Realizar la detección directa en muestras bien seleccionadas también permitiría evitar los resultados falsos positivos. Hay que tener en cuenta que en nuestros dos primeros estudios (**Artículo 3 y 4**) no hemos seleccionado las muestras antes de cribar con citometría de flujo. El único parámetro de inclusión ha sido el *cut-off* de recuento bacteriano. Por lo tanto, se han

DISCUSIÓN

incluido tanto las muestras de pacientes probablemente asintomáticos o de ITU no complicadas, como las muestras de pacientes con infección grave. La aplicación del protocolo solo a las muestras seleccionadas de pacientes con síntomas claros de ITU y criterios de gravedad puede ayudar a evitar los resultados falsos positivos. Aunque los pacientes con bacteriemia y sepsis de foco urinario son una diana perfecta para la aplicación de nuestro protocolo (**Manuscrito 5**), seguramente otros grupos de pacientes con ITU complicada pueden beneficiarse de la identificación directa: pacientes con pielonefritis, con patología urológica, con aislamientos previos de bacterias multirresistentes, etc. En nuestro estudio (**Artículo 4**) la tasa de identificación fiable en el grupo de pacientes hospitalizados ha sido más baja que en los no hospitalizados (73% *versus* 82%). Es comprensible, ya que este grupo de pacientes con mayor frecuencia son portadores de catéteres y tienen infecciones / colonizaciones polimicrobianas. Aun así, la tasa de la identificación fiable es suficientemente alta como para aplicar el protocolo, teniendo en cuenta un gran beneficio potencial en esta población.

Los trabajos descritos en los **Artículos 3, 4 y Manuscrito 5** han confirmado la utilidad de la identificación directa mediante EM MALDI-TOF a partir de la muestra de orina. Las tasas de identificación fiable y la concordancia con la identificación convencional han sido muy altas independientemente de las variables en el procesamiento rutinario de muestras propio de cada centro, como ha demostrado el estudio multicéntrico. Los parámetros adicionales, tales como recuentos de leucocitos y células epiteliales o aviso sobre presencia de Gram-negativos y Gram-positivos, son de gran utilidad para valorar la idoneidad de la muestra para su procesamiento directo. La identificación directa es un paso imprescindible pero no suficiente hoy en día, ya que el creciente número de resistencias tiene un impacto negativo en los tratamientos empíricos. En la actualidad el impacto clínico solo puede ser conseguido combinando los siguientes pasos: determinar claramente la población de pacientes que se va a beneficiar del protocolo de identificación directa a partir de la muestra de orina; realizar la identificación directa; combinar el resultado de la identificación directa con algunas técnicas de detección rápida de resistencias según la especie detectada y la epidemiología local; comunicación fluida con los médicos responsables. Sin conseguir estos cuatro pilares, el impacto del protocolo será insuficiente.

CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

1. El ensayo Xpert MRSA/SA realizado directamente con la sangre extraída a través del catéter proporciona un diagnóstico rápido y fiable de la BRC estafilocócica, lo que permite su tratamiento precoz.
2. Hemos demostrado que una técnica molecular diseñada originalmente para ser aplicada al caldo del hemocultivo puede ser útil en el caso de muestras de sangre directa extraída a través de catéter cuando hay un inóculo bacteriano elevado.
3. A pesar de que el estudio de coste-efectividad ha demostrado que la aplicación de Xpert MRSA/SA es una estrategia coste-efectiva, su implementación tendría un mayor impacto en las áreas de alta prevalencia de BRC por *S. aureus*, que es la que presenta mayor tasa de complicaciones y morbi-mortalidad.
4. El ensayo molecular Magicplex™ Sepsis test ha demostrado una baja sensibilidad global para el diagnóstico de bacteriemia, además de requerir varios pasos manuales y dedicación exclusiva para llevar a cabo esta técnica, lo que hace difícil su implementación en el diagnóstico de rutina, a pesar de su posible ventaja en el subgrupo de pacientes con tratamiento antibiótico activo.
5. La combinación de la citometría de flujo para el cribado y de la EM MALDI-TOF para la identificación directa a partir de muestras de orina ha demostrado su utilidad y fiabilidad tanto en el estudio unicéntrico como en el multicéntrico, lo que ha permitido incorporar el protocolo de identificación directa al proceso diagnóstico de rutina en nuestro centro.
6. El *cut-off* de la citometría de flujo establecido para realizar la identificación directa (≥ 5.000 bacterias/ μL) permite detectar la mayoría de las muestras positivas por cultivo y disponer del número suficiente de bacterias para realizar las técnicas de detección de resistencias.
7. Una de las limitaciones del protocolo de identificación directa es la posibilidad de obtener una identificación fiable en las muestras contaminadas en las que uno de los microorganismos se encuentra en mayor proporción. Aun así, las ventajas que puede aportar la identificación directa en un paciente con infección grave o con factores de riesgo, justifican la implementación del protocolo a pesar de la limitación descrita.
8. En los primeros dos estudios (Xpert y Magicplex) hemos intentado diagnosticar bacteriemias a partir de sangre directa, adelantándonos al resultado del hemocultivo. En el caso de las bacteriemias de foco urinario, dicho adelanto se consigue gracias a la identificación del microorganismo causante directamente en la muestra de orina. En la mitad de los casos de bacteriemia de foco urinario el patógeno causante ha sido identificado poco después de la llegada de la muestra de orina al laboratorio.
9. Una ventaja adicional de la identificación directa es que permite detectar los microorganismos que no crecen bien en los medios de cultivo convencionales o en condiciones estándares de incubación.

CONCLUSIONES

10. Las técnicas rápidas de detección de resistencias aplicadas al sedimento bacteriano recuperado de la muestra de orina han demostrado una excelente concordancia con los métodos fenotípicos convencionales. La elección de las especies a las que aplicar estas técnicas después de obtener una identificación directa fiable dependerá de la epidemiología local. Esta estrategia permite reducir gastos innecesarios y aplicar las técnicas de manera dirigida.

11. Es imprescindible combinar el uso de técnicas rápidas de identificación y detección de resistencias con la implementación de una buena comunicación con los clínicos para la correcta interpretación de los resultados y la posible modificación del tratamiento empírico de los pacientes. En nuestro caso, se ha constituido un grupo de trabajo específico, formado por microbiólogos e infectólogos con conocimiento de la infección urinaria.

12. Aun siendo un protocolo fácil de realizar y muy asequible para cualquier laboratorio que disponga de espectrómetro de masas, la identificación directa a partir de la orina y la aplicación de técnicas de detección de resistencias requiere tiempo (unos 30 minutos), varios pasos manuales y el trabajo de un técnico exclusivamente dedicado a ello. Ello hace imposible aplicar el protocolo de manera indiscriminada a todas las muestras de orina recibidas en el laboratorio.

13. Por lo tanto, es necesario determinar los grupos de pacientes que tendrán mayor beneficio clínico de un diagnóstico rápido. En nuestro caso hemos decidido que, en primer lugar, sean los pacientes con sospecha de bacteriemia de foco urinario. En el futuro se pueden incluir otros grupos de pacientes, tales como pacientes con pielonefritis o con antecedentes de infección urinaria causada por bacterias multirresistentes.

BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992;101(6):1644-55. Epub 1992/06/01. doi: 10.1378/chest.101.6.1644. PubMed PMID: 1303622.
2. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Critical care medicine*. 2003;31(4):1250-6. Epub 2003/04/12. doi: 10.1097/01.ccm.0000050454.01978.3b. PubMed PMID: 12682500.
3. 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;315(8):801-10. Epub 2016/02/24. doi: 10.1001/jama.2016.0287. PubMed PMID: 26903338; PubMed Central PMCID: PMC4968574.
4. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2016;193(3):259-72. Epub 2015/09/29. doi: 10.1164/rccm.201504-0781OC. PubMed PMID: 26414292.
5. Levy MM, Evans LE, Rhodes A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. *Intensive care medicine*. 2018;44(6):925-8. Epub 2018/04/21. doi: 10.1007/s00134-018-5085-0. PubMed PMID: 29675566.
6. Zaragoza R, Artero A, Camarena JJ, Sancho S, Gonzalez R, Nogueira JM. The influence of inadequate empirical antimicrobial treatment on patients with bloodstream infections in an intensive care unit. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2003;9(5):412-8. Epub 2003/07/10. doi: 10.1046/j.1469-0691.2003.00656.x. PubMed PMID: 12848754.
7. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical care medicine*. 2006;34(6):1589-96. Epub 2006/04/21. doi: 10.1097/01.ccm.0000217961.75225.e9. PubMed PMID: 16625125.
8. Vogelaers D, De Bels D, Foret F, Cran S, Gilbert E, Schoonheydt K, et al. Patterns of antimicrobial therapy in severe nosocomial infections: empiric choices, proportion of appropriate therapy, and adaptation rates--a multicentre, observational survey in critically ill patients. *International journal of antimicrobial agents*. 2010;35(4):375-81. Epub 2010/02/04. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.11.015. PubMed PMID: 20122817.
9. Ruiz-Garbajosa P, Cantón R. [Epidemiology of multi-drug resistant gramnegative bacilli]. *Revista española de quimioterapia : publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*. 2016;29 Suppl 1:21-5. Epub 2016/09/09. PubMed PMID: 27608308.
10. van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence*. 2017;8(4):460-9. Epub 2016/09/07. doi: 10.1080/21505594.2016.1222343. PubMed PMID: 27593176; PubMed Central PMCID: PMC477705.
11. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical microbiology reviews*. 2018;31(4). Epub 2018/09/14. doi: 10.1128/cmr.00020-18. PubMed PMID: 30209034; PubMed Central PMCID: PMC6148192.
12. Havey TC, Fowler RA, Pinto R, Elligsen M, Daneman N. Duration of antibiotic therapy for critically ill patients with bloodstream infections: A retrospective cohort study. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale*. 2013;24(3):129-37. Epub 2014/01/15.

BIBLIOGRAFÍA

- doi: 10.1155/2013/141989. PubMed PMID: 24421823; PubMed Central PMCID: PMC3852449.
13. Yagupsky P, Nolte FS. Quantitative aspects of septicemia. *Clinical microbiology reviews*. 1990;3(3):269-79. Epub 1990/07/01. PubMed PMID: 2200606; PubMed Central PMCID: PMC358159.
 14. Wain J, Diep TS, Ho VA, Walsh AM, Nguyen TT, Parry CM, et al. Quantitation of bacteria in blood of typhoid fever patients and relationship between counts and clinical features, transmissibility, and antibiotic resistance. *Journal of clinical microbiology*. 1998;36(6):1683-7. Epub 1998/06/10. PubMed PMID: 9620400; PubMed Central PMCID: PMC3104900.
 15. Henry NK, McLimans CA, Wright AJ, Thompson RL, Wilson WR, Washington JA, 2nd. Microbiological and clinical evaluation of the isolator lysis-centrifugation blood culture tube. *Journal of clinical microbiology*. 1983;17(5):864-9. Epub 1983/05/01. PubMed PMID: 6863507; PubMed Central PMCID: PMC31272757.
 16. Zboromyrska Y, Cilloniz C, Cobos-Trigueros N, Almela M, Hurtado JC, Vergara A, et al. Evaluation of the Magicplex Sepsis Real-Time Test for the Rapid Diagnosis of Bloodstream Infections in Adults. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2019;9:56. Epub 2019/04/02. doi: 10.3389/fcimb.2019.00056. PubMed PMID: 30931259; PubMed Central PMCID: PMC6423426.
 17. Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene. Estudio EPINE-EPPS 2018. Informe global de España. [Internet]. Available from: <https://www.epine.es/docs/public/reports/esp/2018%20EPINE%20Informe%20España.pdf>.
 18. Chaves F, Garnacho-Montero J, Del Pozo JL, Bouza E, Capdevila JA, de Cueto M, et al. Diagnosis and treatment of catheter-related bloodstream infection: Clinical guidelines of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology and (SEIMC) and the Spanish Society of Intensive and Critical Care Medicine and Coronary Units (SEMICYUC). *Medicina intensiva*. 2018;42(1):5-36. Epub 2018/02/07. doi: 10.1016/j.medin.2017.09.012. PubMed PMID: 29406956.
 19. Safdar N, Maki DG. The pathogenesis of catheter-related bloodstream infection with noncuffed short-term central venous catheters. *Intensive care medicine*. 2004;30(1):62-7. Epub 2003/12/03. doi: 10.1007/s00134-003-2045-z. PubMed PMID: 14647886.
 20. Catton JA, Dobbins BM, Kite P, Wood JM, Eastwood K, Sugden S, et al. In situ diagnosis of intravascular catheter-related bloodstream infection: a comparison of quantitative culture, differential time to positivity, and endoluminal brushing. *Critical care medicine*. 2005;33(4):787-91. Epub 2005/04/09. doi: 10.1097/01.ccm.0000157968.98476.f3. PubMed PMID: 15818106.
 21. Blot F, Nitenberg G, Chachaty E, Raynard B, Germann N, Antoun S, et al. Diagnosis of catheter-related bacteraemia: a prospective comparison of the time to positivity of hub-blood versus peripheral-blood cultures. *Lancet*. 1999;354(9184):1071-7. Epub 1999/10/06. doi: 10.1016/s0140-6736(98)11134-0. PubMed PMID: 10509498.
 22. Raad I, Hanna HA, Alakech B, Chatzinikolaou I, Johnson MM, Tarrand J. Differential time to positivity: a useful method for diagnosing catheter-related bloodstream infections. *Annals of internal medicine*. 2004;140(1):18-25. Epub 2004/01/07. doi: 10.7326/0003-4819-140-1-200401060-00007. PubMed PMID: 14706968.
 23. Dobbins BM, Kite P, Catton JA, Wilcox MH, McMahon MJ. In situ endoluminal brushing: a safe technique for the diagnosis of catheter-related bloodstream infection. *The Journal of hospital infection*. 2004;58(3):233-7. Epub 2004/10/27. doi: 10.1016/j.jhin.2004.06.025. PubMed PMID: 15501340.
 24. Bouza E, Burillo A, Munoz P. Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2002;8(5):265-74. Epub 2002/06/06. doi: 10.1046/j.1469-0691.2002.00385.x. PubMed PMID: 12047403.

BIBLIOGRAFÍA

25. Quintana R, Prieto MF, Bagilet DH, Dalman MC, Gregorini E. [Acridine orange staining method in the diagnosis of catheter-related bloodstream infections]. *Medicina intensiva*. 2008;32(4):168-71. Epub 2008/04/17. doi: 10.1016/s0210-5691(08)70933-1. PubMed PMID: 18413121.
26. Bong JJ, Kite P, Ammori BJ, Wilcox MH, McMahon MJ. The use of a rapid in situ test in the detection of central venous catheter-related bloodstream infection: a prospective study. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition*. 2003;27(2):146-50. Epub 2003/04/01. doi: 10.1177/0148607103027002146. PubMed PMID: 12665171.
27. Aldea Mansilla C, Martinez-Alarcon J, Gracia Ahufinger I, Guembe Ramirez M. Microbiological diagnosis of catheter-related infections. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. 2019;37(10):668-72. Epub 2018/09/18. doi: 10.1016/j.eimc.2018.07.009. PubMed PMID: 30220518.
28. Biendo M, Mammeri H, Pluquet E, Guillon H, Rousseau F, Canarelli B, et al. Value of Xpert MRSA/SA blood culture assay on the Gene Xpert(R) Dx System for rapid detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in patients with staphylococcal bacteremia. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2013;75(2):139-43. Epub 2013/01/01. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.005. PubMed PMID: 23273338.
29. Pasqualini L, Mencacci A, Leli C, Montagna P, Cardaccia A, Cenci E, et al. Diagnostic performance of a multiple real-time PCR assay in patients with suspected sepsis hospitalized in an internal medicine ward. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(4):1285-8. Epub 2012/02/11. doi: 10.1128/jcm.06793-11. PubMed PMID: 22322348; PubMed Central PMCID: PMC3318564.
30. Millar MR, Johnson G, Wilks M, Skinner R, Stoneham S, Pizer B, et al. Molecular diagnosis of vascular access device-associated infection in children being treated for cancer or leukaemia. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008;14(3):213-20. Epub 2007/12/21. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01909.x. PubMed PMID: 18093238.
31. Millar M, Zhou W, Skinner R, Pizer B, Hennessy E, Wilks M, et al. Accuracy of bacterial DNA testing for central venous catheter-associated bloodstream infection in children with cancer. *Health technology assessment (Winchester, England)*. 2011;15(7):1-114. Epub 2011/02/08. doi: 10.3310/hta15070. PubMed PMID: 21294989.
32. Jain S. Sepsis: An Update on Current Practices in Diagnosis and Management. *The American journal of the medical sciences*. 2018;356(3):277-86. Epub 2018/10/06. doi: 10.1016/j.amjms.2018.06.012. PubMed PMID: 30286823.
33. Opota O, Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2015;21(4):313-22. Epub 2015/03/11. doi: 10.1016/j.cmi.2015.01.003. PubMed PMID: 25753137.
34. Guna Serrano MR, Larrosa Escartín N, Marín Arriaza M, Rodríguez Díaz JC. Microbiological diagnosis of bacteraemia and fungaemia: Blood cultures and molecular methods. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. 2019;37(5):335-40. Epub 2018/04/25. doi: 10.1016/j.eimc.2018.03.005. PubMed PMID: 29691073.
35. Linsenmeyer K, Gupta K, Strymish JM, Dhanani M, Brecher SM, Breu AC. Culture if spikes? Indications and yield of blood cultures in hospitalized medical patients. *Journal of hospital medicine*. 2016;11(5):336-40. Epub 2016/01/15. doi: 10.1002/jhm.2541. PubMed PMID: 26762577.
36. Crepin O, Roussel-Delvallez M, Martin GR, Courcol RJ. Effectiveness of resins in removing antibiotics from blood cultures. *Journal of clinical microbiology*. 1993;31(3):734-5. Epub 1993/03/01. PubMed PMID: 8458976; PubMed Central PMCID: PMC262858.
37. Spaargaren J, van Boven CP, Voorn GP. Effectiveness of resins in neutralizing antibiotic activities in bactec plus Aerobic/F culture medium. *Journal of clinical microbiology*.

BIBLIOGRAFÍA

- 1998;36(12):3731-3. Epub 1998/11/18. PubMed PMID: 9817911; PubMed Central PMCID: PMC105278.
38. Cockerill FR, 3rd, Wilson JW, Vetter EA, Goodman KM, Torgerson CA, Harmsen WS, et al. Optimal testing parameters for blood cultures. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2004;38(12):1724-30. Epub 2004/07/01. doi: 10.1086/421087. PubMed PMID: 15227618.
39. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Critical care medicine*. 2006;34(2):344-53. Epub 2006/01/21. doi: 10.1097/01.ccm.0000194725.48928.3a. PubMed PMID: 16424713.
40. Fenollar F, Raoult D. Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria. *International journal of antimicrobial agents*. 2007;30 Suppl 1:S7-15. Epub 2007/08/21. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.06.024. PubMed PMID: 17707613.
41. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews*. 2013;26(3):547-603. Epub 2013/07/05. doi: 10.1128/cmr.00072-12. PubMed PMID: 23824373; PubMed Central PMCID: PMC3719498.
42. Alcaide F, Amlerová J, Bou G, Ceyssens PJ, Coll P, Corcoran D, et al. How to: identify non-tuberculous Mycobacterium species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2018;24(6):599-603. Epub 2017/11/28. doi: 10.1016/j.cmi.2017.11.012. PubMed PMID: 29174730.
43. Dupont D, Normand AC, Persat F, Hendrickx M, Piarroux R, Wallon M. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of moulds in the routine microbiology laboratory. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2019;25(7):892-7. Epub 2018/11/06. doi: 10.1016/j.cmi.2018.10.013. PubMed PMID: 30394360.
44. Di Gaudio F, Indelicato S, Indelicato S, Tricoli MR, Stampone G, Bongiorno D. Improvement of a rapid direct blood culture microbial identification protocol using MALDI-TOF MS and performance comparison with SepsiTyper kit. *Journal of microbiological methods*. 2018;155:1-7. Epub 2018/11/18. doi: 10.1016/j.mimet.2018.10.015. PubMed PMID: 30442592.
45. Altun O, Botero-Kleiven S, Carlsson S, Ullberg M, Ozenci V. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by MALDI-TOF MS following short-term incubation on solid media. *Journal of medical microbiology*. 2015;64(11):1346-52. Epub 2015/09/13. doi: 10.1099/jmm.0.000168. PubMed PMID: 26361761.
46. Idelevich EA, Schule I, Grunastel B, Wullenweber 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. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014;20(10):1001-6. Epub 2014/04/05. doi: 10.1111/1469-0691.12640. PubMed PMID: 24698361.
47. 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. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2015;305(4-5):469-79. Epub 2015/05/09. doi: 10.1016/j.ijmm.2015.04.004. PubMed PMID: 25953498.
48. March-Rossello GA, Munoz-Moreno MF, Garcia-Loygorri-Jordan de Urries MC, Bratos-Perez MA. A differential centrifugation protocol and validation criterion for enhancing mass spectrometry (MALDI-TOF) results in microbial identification using blood culture growth bottles. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of*

BIBLIOGRAFÍA

- the European Society of Clinical Microbiology. 2013;32(5):699-704. Epub 2013/01/01. doi: 10.1007/s10096-012-1797-1. PubMed PMID: 23274860.
49. Morgenthaler NG, Kostrzewa M. Rapid identification of pathogens in positive blood culture of patients with sepsis: review and meta-analysis of the performance of the sepsityper kit. *International journal of microbiology*. 2015;2015:827416. Epub 2015/05/23. doi: 10.1155/2015/827416. PubMed PMID: 26000017; PubMed Central PMCID: PMCPMC4426779.
50. 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. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2016;52:37-42. Epub 2016/11/05. doi: 10.1016/j.ijid.2016.09.014. PubMed PMID: 27658644.
51. Azrad M, Keness Y, Nitzan O, Pastukh N, Tkhawkho L, Freidus V, et al. Cheap and rapid in-house method for direct identification of positive blood cultures by MALDI-TOF MS technology. *BMC infectious diseases*. 2019;19(1):72. Epub 2019/01/20. doi: 10.1186/s12879-019-3709-9. PubMed PMID: 30658585; PubMed Central PMCID: PMCPMC6339441.
52. French K, Evans J, Tanner H, Gossain S, Hussain A. The Clinical Impact of Rapid, Direct MALDI-ToF Identification of Bacteria from Positive Blood Cultures. *PloS one*. 2016;11(12):e0169332. Epub 2016/12/31. doi: 10.1371/journal.pone.0169332. PubMed PMID: 28036369; PubMed Central PMCID: PMCPMC5201237.
53. Osthoff M, Gurtler N, Bassetti S, Balestra G, Marsch S, Pargger H, et al. Impact of MALDI-TOF-MS-based identification directly from positive blood cultures on patient management: a controlled clinical trial. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2017;23(2):78-85. Epub 2016/08/30. doi: 10.1016/j.cmi.2016.08.009. PubMed PMID: 27569710.
54. Wolk DM, Struelens MJ, Pancholi P, Davis T, Della-Latta P, Fuller D, et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in wound specimens and blood cultures: multicenter preclinical evaluation of the Cepheid Xpert MRSA/SA skin and soft tissue and blood culture assays. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(3):823-6. Epub 2009/01/16. doi: 10.1128/jcm.01884-08. PubMed PMID: 19144803; PubMed Central PMCID: PMCPMC2650929.
55. Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*. 2005;26(2):166-74. Epub 2005/03/11. doi: 10.1086/502522. PubMed PMID: 15756888.
56. Brown J, Paladino JA. Impact of rapid methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* polymerase chain reaction testing on mortality and cost effectiveness in hospitalized patients with bacteraemia: a decision model. *PharmacoEconomics*. 2010;28(7):567-75. Epub 2010/06/17. doi: 10.2165/11533020-000000000-00000. PubMed PMID: 20550222.
57. Altun O, Almuhayawi M, Ullberg M, Ozenci V. Clinical evaluation of the FilmArray blood culture identification panel in identification of bacteria and yeasts from positive blood culture bottles. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(12):4130-6. Epub 2013/10/04. doi: 10.1128/jcm.01835-13. PubMed PMID: 24088863; PubMed Central PMCID: PMCPMC3838040.
58. Zheng X, Polanco W, Carter D, Shulman S. Rapid identification of pathogens from pediatric blood cultures by use of the FilmArray blood culture identification panel. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(12):4368-71. Epub 2014/10/03. doi: 10.1128/jcm.02133-14. PubMed PMID: 25274998; PubMed Central PMCID: PMCPMC4313318.
59. Paolucci M, Foschi C, Tamburini MV, Ambretti S, Lazzarotto T, Landini MP. Comparison between MALDI-TOF MS and FilmArray Blood Culture Identification panel for rapid identification of yeast from positive blood culture. *Journal of microbiological methods*.

BIBLIOGRAFÍA

- 2014;104:92-3. Epub 2014/07/11. doi: 10.1016/j.mimet.2014.06.018. PubMed PMID: 25008463.
60. Huang TD, Melnik E, Bogaerts P, Evrard S, Glupczynski Y. Evaluation of the ePlex Blood Culture Identification Panels for Detection of Pathogens in Bloodstream Infections. *Journal of clinical microbiology*. 2019;57(2). Epub 2018/11/30. doi: 10.1128/jcm.01597-18. PubMed PMID: 30487304; PubMed Central PMCID: PMC6355516.
61. Makristathis A, Riss S, Hirschl AM. A novel fluorescence in situ hybridization test for rapid pathogen identification in positive blood cultures. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014;20(10):O760-3. Epub 2014/01/24. doi: 10.1111/1469-0691.12561. PubMed PMID: 24450815.
62. Deck MK, Anderson ES, Buckner RJ, Colasante G, Davis TE, Coull JM, et al. Rapid detection of *Enterococcus* spp. direct from blood culture bottles using *Enterococcus* QuickFISH method: a multicenter investigation. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2014;78(4):338-42. Epub 2014/01/21. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.12.004. PubMed PMID: 24439447.
63. Marschal M, Bachmaier J, Autenrieth I, Oberhettinger P, Willmann M, Peter S. Evaluation of the Accelerate Pheno System for Fast Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing from Positive Blood Cultures in Bloodstream Infections Caused by Gram-Negative Pathogens. *Journal of clinical microbiology*. 2017;55(7):2116-26. Epub 2017/04/28. doi: 10.1128/jcm.00181-17. PubMed PMID: 28446572; PubMed Central PMCID: PMC5483913.
64. Ledebner NA, Lopansri BK, Dhiman N, Cavagnolo R, Carroll KC, Granato P, et al. Identification of Gram-Negative Bacteria and Genetic Resistance Determinants from Positive Blood Culture Broths by Use of the Verigene Gram-Negative Blood Culture Multiplex Microarray-Based Molecular Assay. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(8):2460-72. Epub 2015/05/23. doi: 10.1128/jcm.00581-15. PubMed PMID: 25994165; PubMed Central PMCID: PMC4508435.
65. Bacconi A, Richmond GS, Baroldi MA, Laffler TG, Blyn LB, Carolan HE, et al. Improved sensitivity for molecular detection of bacterial and *Candida* infections in blood. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(9):3164-74. Epub 2014/06/22. doi: 10.1128/jcm.00801-14. PubMed PMID: 24951806; PubMed Central PMCID: PMC4313132.
66. Oputa O, Jatun K, Greub G. Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2015;21(4):323-31. Epub 2015/02/18. doi: 10.1016/j.cmi.2015.02.005. PubMed PMID: 25686695.
67. Bravo D, Blanquer J, Tormo M, Aguilar G, Borrás R, Solano C, et al. Diagnostic accuracy and potential clinical value of the LightCycler SeptiFast assay in the management of bloodstream infections occurring in neutropenic and critically ill patients. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2011;15(5):e326-31. Epub 2011/03/01. doi: 10.1016/j.ijid.2011.01.003. PubMed PMID: 21353616.
68. Guido M, Quattrocchi M, Zizza A, Pasanisi G, Pavone V, Lobreglio G, et al. Molecular approaches in the diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignancies. *Journal of preventive medicine and hygiene*. 2012;53(2):104-8. Epub 2012/12/18. PubMed PMID: 23240170.
69. Varani S, Stanzani M, Paolucci M, Melchionda F, Castellani G, Nardi L, et al. Diagnosis of bloodstream infections in immunocompromised patients by real-time PCR. *The Journal of infection*. 2009;58(5):346-51. Epub 2009/04/14. doi: 10.1016/j.jinf.2009.03.001. PubMed PMID: 19362374.

BIBLIOGRAFÍA

70. Gies F, Tschiedel E, Felderhoff-Muser U, Rath PM, Steinmann J, Dohna-Schwake C. Prospective evaluation of SeptiFast Multiplex PCR in children with systemic inflammatory response syndrome under antibiotic treatment. *BMC infectious diseases*. 2016;16:378. Epub 2016/08/10. doi: 10.1186/s12879-016-1722-9. PubMed PMID: 27503068; PubMed Central PMCID: PMC4977629.
71. Kasper DC, Altiok I, Mechtler TP, Bohm J, Straub J, Langgartner M, et al. Molecular detection of late-onset neonatal sepsis in premature infants using small blood volumes: proof-of-concept. *Neonatology*. 2013;103(4):268-73. Epub 2013/03/15. doi: 10.1159/000346365. PubMed PMID: 23485823.
72. Leitner E, Kessler HH. Broad-range PCR for the identification of bacterial and fungal pathogens from blood: a sequencing approach. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2015;1237:129-38. Epub 2014/10/17. doi: 10.1007/978-1-4939-1776-1_13. PubMed PMID: 25319786.
73. Nieman AE, Savelkoul PH, Beishuizen A, Henrich B, Lamik B, MacKenzie CR, et al. A prospective multicenter evaluation of direct molecular detection of blood stream infection from a clinical perspective. *BMC infectious diseases*. 2016;16:314. Epub 2016/07/02. doi: 10.1186/s12879-016-1646-4. PubMed PMID: 27364885; PubMed Central PMCID: PMC4928256.
74. Ziegler I, Fagerstrom A, Stralin K, Molling P. Evaluation of a Commercial Multiplex PCR Assay for Detection of Pathogen DNA in Blood from Patients with Suspected Sepsis. *PloS one*. 2016;11(12):e0167883. Epub 2016/12/21. doi: 10.1371/journal.pone.0167883. PubMed PMID: 27997618; PubMed Central PMCID: PMC45172567.
75. Carrara L, Navarro F, Turbau M, Seres M, Moran I, Quintana I, et al. Molecular diagnosis of bloodstream infections with a new dual-priming oligonucleotide-based multiplex PCR assay. *Journal of medical microbiology*. 2013;62(Pt 11):1673-9. Epub 2013/08/09. doi: 10.1099/jmm.0.064758-0. PubMed PMID: 23924662.
76. Ljungstrom L, Enroth H, Claesson BE, Ovemyr I, Karlsson J, Froberg B, et al. Clinical evaluation of commercial nucleic acid amplification tests in patients with suspected sepsis. *BMC infectious diseases*. 2015;15:199. Epub 2015/05/01. doi: 10.1186/s12879-015-0938-4. PubMed PMID: 25928122; PubMed Central PMCID: PMC4419503.
77. Marco D, Carlo S, Sara C, Carmelina C, Silvia G, Maria BA, et al. Magicplex(TM) Sepsis Real-Time test to improve bloodstream infection diagnostics in children. *European journal of pediatrics*. 2016;175(8):1107-11. Epub 2016/07/01. doi: 10.1007/s00431-016-2745-3. PubMed PMID: 27357410.
78. Bloos F, Sachse S, Kortgen A, Pletz MW, Lehmann M, Straube E, et al. Evaluation of a polymerase chain reaction assay for pathogen detection in septic patients under routine condition: an observational study. *PloS one*. 2012;7(9):e46003. Epub 2012/10/03. doi: 10.1371/journal.pone.0046003. PubMed PMID: 23029360; PubMed Central PMCID: PMC3459981.
79. Fitting C, Parlato M, Adib-Conquy M, Memain N, Philippart F, Missot B, et al. DNAemia detection by multiplex PCR and biomarkers for infection in systemic inflammatory response syndrome patients. *PloS one*. 2012;7(6):e38916. Epub 2012/06/22. doi: 10.1371/journal.pone.0038916. PubMed PMID: 22719987; PubMed Central PMCID: PMC3376137.
80. Jordana-Lluch E, Gimenez M, Quesada MD, Rivaya B, Marco C, Dominguez MJ, et al. Evaluation of the Broad-Range PCR/ESI-MS Technology in Blood Specimens for the Molecular Diagnosis of Bloodstream Infections. *PloS one*. 2015;10(10):e0140865. Epub 2015/10/17. doi: 10.1371/journal.pone.0140865. PubMed PMID: 26474394; PubMed Central PMCID: PMC4608784.
81. Desmet S, Maertens J, Bueselinck K, Lagrou K. Broad-Range PCR Coupled with Electrospray Ionization Time of Flight Mass Spectrometry for Detection of Bacteremia and Fungemia in Patients with Neutropenic Fever. *Journal of clinical microbiology*.

BIBLIOGRAFÍA

- 2016;54(10):2513-20. Epub 2016/07/22. doi: 10.1128/jcm.01066-16. PubMed PMID: 27440820; PubMed Central PMCID: PMCPMC5035419.
82. Mylonakis E, Clancy CJ, Ostrosky-Zeichner L, Garey KW, Alangaden GJ, Vazquez JA, et al. T2 magnetic resonance assay for the rapid diagnosis of candidemia in whole blood: a clinical trial. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2015;60(6):892-9. Epub 2015/01/15. doi: 10.1093/cid/ciu959. PubMed PMID: 25586686.
83. Kalligeros M, Zacharioudakis IM, Tansarli GS, Tori K, Shehadeh F, Mylonakis E. In-depth analysis of T2Bacteria positive results in patients with concurrent negative blood culture: a case series. *BMC infectious diseases*. 2020;20(1):326. Epub 2020/05/10. doi: 10.1186/s12879-020-05049-9. PubMed PMID: 32380973; PubMed Central PMCID: PMCPMC7206677.
84. Clancy CJ, Nguyen MH. T2 magnetic resonance for the diagnosis of bloodstream infections: charting a path forward. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2018;73(suppl_4):iv2-iv5. Epub 2018/04/03. doi: 10.1093/jac/dky050. PubMed PMID: 29608754.
85. Schreiber J, Nierhaus A, Braune SA, de Heer G, Kluge S. Comparison of three different commercial PCR assays for the detection of pathogens in critically ill sepsis patients. *Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin*. 2013;108(4):311-8. Epub 2013/03/22. doi: 10.1007/s00063-013-0227-1. PubMed PMID: 23516029.
86. Dark P, Blackwood B, Gates S, McAuley D, Perkins GD, McMullan R, et al. Accuracy of LightCycler((R)) SeptiFast for the detection and identification of pathogens in the blood of patients with suspected sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Intensive care medicine*. 2015;41(1):21-33. Epub 2014/11/25. doi: 10.1007/s00134-014-3553-8. PubMed PMID: 25416643.
87. Warhurst G, Dunn G, Chadwick P, Blackwood B, McAuley D, Perkins GD, et al. Rapid detection of health-care-associated bloodstream infection in critical care using multipathogen real-time polymerase chain reaction technology: a diagnostic accuracy study and systematic review. *Health technology assessment (Winchester, England)*. 2015;19(35):1-142. Epub 2015/05/12. doi: 10.3310/hta19350. PubMed PMID: 25961752; PubMed Central PMCID: PMCPMC4781461.
88. Loonen AJ, de Jager CP, Tosserams J, Kusters R, Hilbink M, Wever PC, et al. Biomarkers and molecular analysis to improve bloodstream infection diagnostics in an emergency care unit. *PloS one*. 2014;9(1):e87315. Epub 2014/01/30. doi: 10.1371/journal.pone.0087315. PubMed PMID: 24475269; PubMed Central PMCID: PMCPMC3903623.
89. Marco F. Molecular methods for septicemia diagnosis. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. 2017. Epub 2017/04/22. doi: 10.1016/j.eimc.2017.03.002. PubMed PMID: 28427796.
90. Kenig A, Salameh S, Gershinsky Y, Amit S, Israel S. Blood cultures of adult patients discharged from the emergency department-is the safety net reliable? *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2020. Epub 2020/02/14. doi: 10.1007/s10096-020-03838-3. PubMed PMID: 32052342.
91. Pieretti B, Brunati P, Pini B, Colzani C, Congedo P, Rocchi M, et al. Diagnosis of bacteriuria and leukocyturia by automated flow cytometry compared with urine culture. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(11):3990-6. Epub 2010/08/27. doi: 10.1128/jcm.00975-10. PubMed PMID: 20739491; PubMed Central PMCID: PMCPMC3020858.
92. Jolkkonen S, Paattiniemi EL, Karpanoja P, Sarkkinen H. Screening of urine samples by flow cytometry reduces the need for culture. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(9):3117-21. Epub 2010/07/02. doi: 10.1128/jcm.00617-10. PubMed PMID: 20592157; PubMed Central PMCID: PMCPMC2937741.
93. Broeren MA, Bahceci S, Vader HL, Arents NL. Screening for urinary tract infection with the Sysmex UF-1000i urine flow cytometer. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(3):1025-9.

BIBLIOGRAFÍA

- Epub 2011/01/21. doi: 10.1128/jcm.01669-10. PubMed PMID: 21248088; PubMed Central PMCID: PMCPMC3067737.
94. Martin-Gutierrez G, Porrás-González A, Martín-Pérez C, Lepe JA, Aznar J. Evaluation and optimization of the Sysmex UF1000i system for the screening of urinary tract infection in primary health care elderly patients. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2015;33(5):320-3. Epub 2014/12/03. doi: 10.1016/j.eimc.2014.07.010. PubMed PMID: 25444045.
95. Inigo M, Coello A, Fernández-Rivas G, Rivaya B, Hidalgo J, Quesada MD, et al. Direct Identification of Urinary Tract Pathogens from Urine Samples, Combining Urine Screening Methods and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of clinical microbiology*. 2016;54(4):988-93. Epub 2016/01/29. doi: 10.1128/jcm.02832-15. PubMed PMID: 26818668; PubMed Central PMCID: PMCPMC4809960.
96. Geerts N, Boonen KJ, Boer AK, Scharnhorst V. Cut-off values to rule out urinary tract infection should be gender-specific. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2016;452:173-6. Epub 2015/12/01. doi: 10.1016/j.cca.2015.11.022. PubMed PMID: 26616731.
97. Monsen T, Ryden P. A new concept and a comprehensive evaluation of SYSMEX UF-1000i flow cytometer to identify culture-negative urine specimens in patients with UTI. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2017. Epub 2017/04/08. doi: 10.1007/s10096-017-2964-1. PubMed PMID: 28386705; PubMed Central PMCID: PMCPMC5554267.
98. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Avila M, Cembrero-Fucinos D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(6):2110-5. Epub 2010/04/16. doi: 10.1128/jcm.02215-09. PubMed PMID: 20392910; PubMed Central PMCID: PMCPMC2884468.
99. Wang XH, Zhang G, Fan YY, Yang X, Sui WJ, Lu XX. Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry. *Journal of microbiological methods*. 2013;92(3):231-5. Epub 2013/01/12. doi: 10.1016/j.mimet.2012.12.016. PubMed PMID: 23305925.
100. March Rossello GA, Gutierrez Rodriguez MP, Ortiz de Lejarazu Leonardo R, Orduna Domingo A, Bratos Perez MA. New procedure for rapid identification of microorganisms causing urinary tract infection from urine samples by mass spectrometry (MALDI-TOF). *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2015;33(2):89-94. Epub 2014/05/07. doi: 10.1016/j.eimc.2014.02.022. PubMed PMID: 24796945.
101. Burillo A, Rodríguez-Sánchez B, Ramiro A, Cercenado E, Rodríguez-Creixems M, Bouza E. Gram-stain plus MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) for a rapid diagnosis of urinary tract infection. *PloS one*. 2014;9(1):e86915. Epub 2014/01/28. doi: 10.1371/journal.pone.0086915. PubMed PMID: 24466289; PubMed Central PMCID: PMCPMC3899310.
102. Hrabak J, Studentova V, Walkova R, Zemlickova H, Jakubu V, Chudackova E, et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(7):2441-3. Epub 2012/05/04. doi: 10.1128/jcm.01002-12. PubMed PMID: 22553235; PubMed Central PMCID: PMCPMC3405576.
103. Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(9):3321-4. Epub 2011/07/29. doi: 10.1128/jcm.00287-11. PubMed PMID: 21795515; PubMed Central PMCID: PMCPMC3165621.
104. Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel JM, Drissi M, et al. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser

BIBLIOGRAFÍA

- desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PloS one*. 2012;7(2):e31676. Epub 2012/02/24. doi: 10.1371/journal.pone.0031676. PubMed PMID: 22359616; PubMed Central PMCID: PMC3280980.
105. Oviano M, Ramirez CL, Barbeyto LP, Bou G. Rapid direct detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical urine samples by MALDI-TOF MS analysis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2017;72(5):1350-4. Epub 2017/01/26. doi: 10.1093/jac/dkw579. PubMed PMID: 28119478.
106. Oviano M, Sparbier K, Barba MJ, Kostrzewa M, Bou G. Universal protocol for the rapid automated detection of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli directly from blood cultures by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS). *International journal of antimicrobial agents*. 2016;48(6):655-60. Epub 2016/11/12. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.08.024. PubMed PMID: 27836381.
107. Carvalhaes CG, Cayo R, Visconde MF, Barone T, Frigatto EA, Okamoto D, et al. Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(8):2132-6. Epub 2014/04/12. doi: 10.1093/jac/dku094. PubMed PMID: 24722840.
108. Jung JS, Popp C, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, Schubert S. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of beta-lactam resistance in *Enterobacteriaceae* derived from blood cultures. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(3):924-30. Epub 2014/01/10. doi: 10.1128/jcm.02691-13. PubMed PMID: 24403301; PubMed Central PMCID: PMC3957742.
109. Oviano M, Fernandez B, Fernandez A, Barba MJ, Mourino C, Bou G. Rapid detection of enterobacteriaceae producing extended spectrum beta-lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014;20(11):1146-57. Epub 2014/06/20. doi: 10.1111/1469-0691.12729. PubMed PMID: 24942177.
110. Lehmann LE, Hauser S, Malinka T, Klaschik S, Weber SU, Schewe JC, et al. Rapid qualitative urinary tract infection pathogen identification by SeptiFast real-time PCR. *PloS one*. 2011;6(2):e17146. Epub 2011/03/02. doi: 10.1371/journal.pone.0017146. PubMed PMID: 21359187; PubMed Central PMCID: PMC3040229.
111. Heytens S, De Sutter A, Coorevits L, Cools P, Boelens J, Van Simaey L, et al. Women with symptoms of a urinary tract infection but a negative urine culture: PCR-based quantification of *Escherichia coli* suggests infection in most cases. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2017;23(9):647-52. Epub 2017/05/02. doi: 10.1016/j.cmi.2017.04.004. PubMed PMID: 28457846.
112. van der Zee A, Roorda L, Bosman G, Ossewaarde JM. Molecular Diagnosis of Urinary Tract Infections by Semi-Quantitative Detection of Uropathogens in a Routine Clinical Hospital Setting. *PloS one*. 2016;11(3):e0150755. Epub 2016/03/10. doi: 10.1371/journal.pone.0150755. PubMed PMID: 26954694; PubMed Central PMCID: PMC4783162.
113. McDonald M, Kameh D, Johnson ME, Johansen TEB, Albala D, Mouraviev V. A Head-to-Head Comparative Phase II Study of Standard Urine Culture and Sensitivity Versus DNA Next-generation Sequencing Testing for Urinary Tract Infections. *Reviews in urology*. 2017;19(4):213-20. Epub 2018/02/24. doi: 10.3909/riu0780. PubMed PMID: 29472825; PubMed Central PMCID: PMC5811878.
114. Schmidt K, Mwaigwisya S, Crossman LC, Doumith M, Munroe D, Pires C, et al. Identification of bacterial pathogens and antimicrobial resistance directly from clinical urines by nanopore-based metagenomic sequencing. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2017;72(1):104-14. Epub 2016/09/27. doi: 10.1093/jac/dkw397. PubMed PMID: 27667325.

BIBLIOGRAFÍA

115. Sathiananthamoorthy S, Malone-Lee J, Gill K, Tymon A, Nguyen TK, Gurung S, et al. Reassessment of Routine Midstream Culture in Diagnosis of Urinary Tract Infection. *Journal of clinical microbiology*. 2019;57(3). Epub 2018/12/14. doi: 10.1128/jcm.01452-18. PubMed PMID: 30541935; PubMed Central PMCID: PMC6425166.
116. Hinic V, Ziegler J, Straub C, Goldenberger D, Frei R. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) detection directly from urine samples with the rapid isothermal amplification-based eazyplex(R) SuperBug CRE assay: Proof of concept. *Journal of microbiological methods*. 2015;119:203-5. Epub 2015/10/28. doi: 10.1016/j.mimet.2015.10.015. PubMed PMID: 26506282.
117. Schmidt K, Stanley KK, Hale R, Smith L, Wain J, O'Grady J, et al. Evaluation of multiplex tandem PCR (MT-PCR) assays for the detection of bacterial resistance genes among Enterobacteriaceae in clinical urines. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2019;74(2):349-56. Epub 2018/11/27. doi: 10.1093/jac/dky419. PubMed PMID: 30476137.
118. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing enterobacteriaceae from urine samples by use of the ESBL NDP test. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(10):3701-6. Epub 2014/08/08. doi: 10.1128/jcm.01578-14. PubMed PMID: 25100819; PubMed Central PMCID: PMC4187794.
119. Gallah S, Decre D, Genel N, Arlet G. The beta-Lacta test for direct detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in urine. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(10):3792-4. Epub 2014/08/01. doi: 10.1128/jcm.01629-14. PubMed PMID: 25078913; PubMed Central PMCID: PMC4187766.
120. Dortet L, Brechard L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from blood cultures. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014;20(4):340-4. Epub 2013/07/31. doi: 10.1111/1469-0691.12318. PubMed PMID: 23889766.
121. Dortet L, Agathine A, Naas T, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. Evaluation of the RAPIDEC(R) CARBA NP, the Rapid CARB Screen(R) and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2015;70(11):3014-22. Epub 2015/08/12. doi: 10.1093/jac/dkv213. PubMed PMID: 26260131.
122. Andremont A, Paulet R, Nitenberg G, Hill C. Value of semiquantitative cultures of blood drawn through catheter hubs for estimating the risk of catheter tip colonization in cancer patients. *Journal of clinical microbiology*. 1988;26(11):2297-9. Epub 1988/11/01. PubMed PMID: 3069861; PubMed Central PMCID: PMC6425166.
123. Wing EJ, Norden CW, Shadduck RK, Winkelstein A. Use of quantitative bacteriologic techniques to diagnose catheter-related sepsis. *Archives of internal medicine*. 1979;139(4):482-3. Epub 1979/04/01. PubMed PMID: 107870.
124. Crnich CJ, Maki DG. The promise of novel technology for the prevention of intravascular device-related bloodstream infection. I. Pathogenesis and short-term devices. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2002;34(9):1232-42. Epub 2002/04/10. doi: 10.1086/339863. PubMed PMID: 11941550.
125. Crnich CJ, Maki DG. The promise of novel technology for the prevention of intravascular device-related bloodstream infection. II. Long-term devices. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2002;34(10):1362-8. Epub 2002/05/01. doi: 10.1086/340105. PubMed PMID: 11981732.
126. Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O'Grady NP, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009;49(1):1-45. Epub 2009/06/06. doi: 10.1086/599376. PubMed PMID: 19489710; PubMed Central PMCID: PMC4039170.

BIBLIOGRAFÍA

127. Fowler VG, Jr., Justice A, Moore C, Benjamin DK, Jr., Woods CW, Campbell S, et al. Risk factors for hematogenous complications of intravascular catheter-associated *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005;40(5):695-703. Epub 2005/02/17. doi: 10.1086/427806. PubMed PMID: 15714415.
128. Molina J, Penuela I, Lepe JA, Gutierrez-Pizarra A, Gomez MJ, Garcia-Cabrera E, et al. Mortality and hospital stay related to coagulase-negative *Staphylococci* bacteremia in non-critical patients. *The Journal of infection*. 2013;66(2):155-62. Epub 2012/10/30. doi: 10.1016/j.jinf.2012.10.021. PubMed PMID: 23103291.
129. Marcos M, Soriano A, Inurrieta A, Martinez JA, Romero A, Cobos N, et al. Changing epidemiology of central venous catheter-related bloodstream infections: increasing prevalence of Gram-negative pathogens. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(9):2119-25. Epub 2011/06/15. doi: 10.1093/jac/dkr231. PubMed PMID: 21665905.
130. Kim SH, Kim KH, Kim HB, Kim NJ, Kim EC, Oh MD, et al. Outcome of vancomycin treatment in patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(1):192-7. Epub 2007/11/07. doi: 10.1128/aac.00700-07. PubMed PMID: 17984229; PubMed Central PMCID: PMC2223910.
131. Schweizer ML, Furuno JP, Harris AD, Johnson JK, Shardell MD, McGregor JC, et al. Comparative effectiveness of nafcillin or cefazolin versus vancomycin in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *BMC infectious diseases*. 2011;11:279. Epub 2011/10/21. doi: 10.1186/1471-2334-11-279. PubMed PMID: 22011388; PubMed Central PMCID: PMC3206863.
132. Casalta JP, Gouriet F, Roux V, Thuny F, Habib G, Raoult D. Evaluation of the LightCycler SeptiFast test in the rapid etiologic diagnostic of infectious endocarditis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2009;28(6):569-73. Epub 2008/12/03. doi: 10.1007/s10096-008-0672-6. PubMed PMID: 19048317.
133. Westh H, Lisby G, Breyse F, Boddington B, Chomarat M, Gant V, et al. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2009;15(6):544-51. Epub 2009/04/28. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02736.x. PubMed PMID: 19392905.
134. Fernandez-Cruz A, Marin M, Kestler M, Alcalá L, Rodríguez-Creixems M, Bouza E. The value of combining blood culture and SeptiFast data for predicting complicated bloodstream infections caused by Gram-positive bacteria or *Candida* species. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(4):1130-6. Epub 2013/02/01. doi: 10.1128/jcm.02882-12. PubMed PMID: 23363819; PubMed Central PMCID: PMC3666801.
135. Wellinghausen N, Kochem AJ, Disque C, Muhl H, Gebert S, Winter J, et al. Diagnosis of bacteremia in whole-blood samples by use of a commercial universal 16S rRNA gene-based PCR and sequence analysis. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(9):2759-65. Epub 2009/07/03. doi: 10.1128/jcm.00567-09. PubMed PMID: 19571030; PubMed Central PMCID: PMC2738079.
136. Kuhn C, Disque C, Muhl H, Orszag P, Stiesch M, Haverich A. Evaluation of commercial universal rRNA gene PCR plus sequencing tests for identification of bacteria and fungi associated with infectious endocarditis. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(8):2919-23. Epub 2011/07/01. doi: 10.1128/jcm.00830-11. PubMed PMID: 21715592; PubMed Central PMCID: PMC3147771.
137. Orszag P, Disque C, Keim S, Lorenz MG, Wiesner O, Hadem J, et al. Monitoring of patients supported by extracorporeal membrane oxygenation for systemic infections by broad-range rRNA gene PCR amplification and sequence analysis. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(1):307-11. Epub 2013/10/25. doi: 10.1128/jcm.02493-13. PubMed PMID: 24153127; PubMed Central PMCID: PMC3911412.

BIBLIOGRAFÍA

138. Lebovitz EE, Burbelo PD. Commercial multiplex technologies for the microbiological diagnosis of sepsis. *Molecular diagnosis & therapy*. 2013;17(4):221-31. Epub 2013/05/03. doi: 10.1007/s40291-013-0037-4. PubMed PMID: 23636778; PubMed Central PMCID: PMC3720738.
139. Dubourg G, Raoult D. Emerging methodologies for pathogen identification in positive blood culture testing. *Expert review of molecular diagnostics*. 2016;16(1):97-111. Epub 2015/11/13. doi: 10.1586/14737159.2016.1112274. PubMed PMID: 26559655.
140. Bwanga F, Disqué C, Lorenz MG, Allerheiligen V, Worodria W, Luyombya A, et al. Higher blood volumes improve the sensitivity of direct PCR diagnosis of blood stream tuberculosis among HIV-positive patients: an observation study. *BMC infectious diseases*. 2015;15:48. Epub 2015/02/07. doi: 10.1186/s12879-015-0785-3. PubMed PMID: 25656799; PubMed Central PMCID: PMC34326319.
141. Haq G, Siddiqui PM. Intermittent bacteraemia. *JPMA The Journal of the Pakistan Medical Association*. 1983;33(5):108-9. Epub 1983/05/01. PubMed PMID: 6410095.
142. Falces-Romero I, Cendejas-Bueno E, Laplaza-González M, Escosa-García L, Schuffelmann-Gutiérrez C, Calderón-Llopis B, et al. T2Candida[®] to guide antifungal and length of treatment of candidemia in a pediatric multivisceral transplant recipient. *Medical mycology case reports*. 2018;21:66-8. Epub 2018/08/11. doi: 10.1016/j.mmcr.2018.05.006. PubMed PMID: 30094130; PubMed Central PMCID: PMC6076387.
143. Fernández-Cruz A, Marín M, Kestler M, Alcalá L, Rodríguez-Créixems M, Bouza E. The value of combining blood culture and SeptiFast data for predicting complicated bloodstream infections caused by Gram-positive bacteria or Candida species. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(4):1130-6. Epub 2013/02/01. doi: 10.1128/jcm.02882-12. PubMed PMID: 23363819; PubMed Central PMCID: PMC3666801.
144. Donoghue HD, Lee OY, Minnikin DE, Besra GS, Taylor JH, Spigelman M. Tuberculosis in Dr Granville's mummy: a molecular re-examination of the earliest known Egyptian mummy to be scientifically examined and given a medical diagnosis. *Proceedings Biological sciences*. 2010;277(1678):51-6. Epub 2009/10/02. doi: 10.1098/rspb.2009.1484. PubMed PMID: 19793751; PubMed Central PMCID: PMC2842630.
145. Kaplan HB, Miranda JA, Gogola GR, Gomez K, Ambrose CG. Persistence of bacterial DNA in orthopedic infections. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2018;91(2):136-40. Epub 2018/02/23. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.01.009. PubMed PMID: 29467085.
146. Chang SS, Hsieh WH, Liu TS, Lee SH, Wang CH, Chou HC, et al. Multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis - a systemic review and meta-analysis. *PloS one*. 2013;8(5):e62323. Epub 2013/06/05. doi: 10.1371/journal.pone.0062323. PubMed PMID: 23734173; PubMed Central PMCID: PMC3667030.
147. Mencacci A, Leli C, Montagna P, Cardaccia A, Meucci M, Bietolini C, et al. Diagnosis of infective endocarditis: comparison of the LightCycler SeptiFast real-time PCR with blood culture. *Journal of medical microbiology*. 2012;61(Pt 6):881-3. Epub 2012/03/10. doi: 10.1099/jmm.0.040113-0. PubMed PMID: 22403141.
148. Chaidaroglou A, Manoli E, Marathias E, Gkouziouta A, Saroglou G, Alivizatos P, et al. Use of a multiplex polymerase chain reaction system for enhanced bloodstream pathogen detection in thoracic transplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2013;32(7):707-13. Epub 2013/06/26. doi: 10.1016/j.healun.2013.04.014. PubMed PMID: 23796153.
149. Dawson S. Blood culture contaminants. *The Journal of hospital infection*. 2014;87(1):1-10. Epub 2014/04/29. doi: 10.1016/j.jhin.2014.02.009. PubMed PMID: 24768211.
150. Tokars JI. Predictive value of blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci: implications for patient care and health care quality assurance. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2004;39(3):333-41. Epub 2004/08/13. doi: 10.1086/421941. PubMed PMID: 15306999.

BIBLIOGRAFÍA

151. Weinstein MP, Reller LB, Murphy JR, Lichtenstein KA. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I. Laboratory and epidemiologic observations. *Reviews of infectious diseases*. 1983;5(1):35-53. Epub 1983/01/01. doi: 10.1093/clinids/5.1.35. PubMed PMID: 6828811.
152. Mirrett S, Weinstein MP, Reimer LG, Wilson ML, Reller LB. Relevance of the number of positive bottles in determining clinical significance of coagulase-negative staphylococci in blood cultures. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(9):3279-81. Epub 2001/08/30. doi: 10.1128/jcm.39.9.3279-3281.2001. PubMed PMID: 11526163; PubMed Central PMCID: PMCPMC88331.
153. Haimi-Cohen Y, Shafinoori S, Tucci V, Rubin LG. Use of incubation time to detection in BACTEC 9240 to distinguish coagulase-negative staphylococcal contamination from infection in pediatric blood cultures. *The Pediatric infectious disease journal*. 2003;22(11):968-74. Epub 2003/11/14. doi: 10.1097/01.inf.0000095195.60494.ba. PubMed PMID: 14614369.
154. Lefebvre CE, Renaud C, Chartrand C. Time to Positivity of Blood Cultures in Infants 0 to 90 Days Old Presenting to the Emergency Department: Is 36 Hours Enough? *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 2017;6(1):28-32. Epub 2015/12/02. doi: 10.1093/jpids/piv078. PubMed PMID: 26621327.
155. Khatib R, Riederer KM, Clark JA, Khatib S, Briski LE, Wilson FM. Coagulase-negative staphylococci in multiple blood cultures: strain relatedness and determinants of same-strain bacteremia. *Journal of clinical microbiology*. 1995;33(4):816-20. Epub 1995/04/01. PubMed PMID: 7790443; PubMed Central PMCID: PMCPMC228047.
156. Bauer KA, West JE, Balada-Llasat JM, Pancholi P, Stevenson KB, Goff DA. An antimicrobial stewardship program's impact with rapid polymerase chain reaction methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*/S. aureus blood culture test in patients with S. aureus bacteremia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010;51(9):1074-80. Epub 2010/10/01. doi: 10.1086/656623. PubMed PMID: 20879856.
157. Pliakos EE, Andreatos N, Shehadeh F, Ziakas PD, Mylonakis E. The Cost-Effectiveness of Rapid Diagnostic Testing for the Diagnosis of Bloodstream Infections with or without Antimicrobial Stewardship. *Clinical microbiology reviews*. 2018;31(3). Epub 2018/06/01. doi: 10.1128/cmr.00095-17. PubMed PMID: 29848775; PubMed Central PMCID: PMCPMC6056844.
158. García-Lorenzo B, Vallejo-Torres L, Trujillo-Martín MM, Perestelo-Pérez L, Valcárcel-Nazco C, Serrano Aguilar P. [Economic evaluation seeks threshold to support decision-making]. *Revista española de salud pública*. 2015;89(6):537-44. Epub 2016/01/21. doi: 10.4321/s1135-57272015000600002. PubMed PMID: 26786302.
159. Idelevich EA, Seifert H, Sundqvist M, Scudeller L, Amit S, Balode A, et al. Microbiological diagnostics of bloodstream infections in Europe-an ESGBIES survey. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2019;25(11):1399-407. Epub 2019/04/14. doi: 10.1016/j.cmi.2019.03.024. PubMed PMID: 30980927.
160. Cendejas-Bueno E, Romero-Gómez MP, Mingorance J. The challenge of molecular diagnosis of bloodstream infections. *World journal of microbiology & biotechnology*. 2019;35(4):65. Epub 2019/04/04. doi: 10.1007/s11274-019-2640-y. PubMed PMID: 30941578.
161. Lamy B, Sundqvist M, Idelevich EA. Bloodstream infections - Standard and progress in pathogen diagnostics. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2020;26(2):142-50. Epub 2019/11/25. doi: 10.1016/j.cmi.2019.11.017. PubMed PMID: 31760113.
162. Foxman B, Barlow R, D'Arcy H, Gillespie B, Sobel JD. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Annals of epidemiology*. 2000;10(8):509-15. Epub 2000/12/19. PubMed PMID: 11118930.
163. Sticchi C, Alberti M, Artioli S, Assensi M, Baldelli I, Battistini A, et al. Regional point prevalence study of healthcare-associated infections and antimicrobial use in acute care

BIBLIOGRAFÍA

- hospitals in Liguria, Italy. *The Journal of hospital infection*. 2017. Epub 2017/12/19. doi: 10.1016/j.jhin.2017.12.008. PubMed PMID: 29253622.
164. March Rossello GA, Gutierrez Rodriguez MP, de Lejarazu Leonardo RO, Orduna Domingo A, Bratos Perez MA. Procedure for microbial identification based on Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry from screening-positive urine samples. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2014;122(9):790-5. Epub 2013/12/11. doi: 10.1111/apm.12208. PubMed PMID: 24320741.
165. Guzmán-Puche J, Gracia-Ahufinger I, Causse M, Tejero-García R, Rodríguez-López FC, Casal-Román M. Combination of Coral UTI Screen(TM) system, gram-stain and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for diagnosis of urinary tract infections directly from urine samples. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*. 2019;31(2):74-80. Epub 2019/02/21. doi: 10.1080/1120009x.2019.1573284. PubMed PMID: 30784363.
166. Montgomery S, Roman K, Ngyuen L, Cardenas AM, Knox J, Tomaras AP, et al. Prospective Evaluation of Light Scatter Technology Paired with Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Rapid Diagnosis of Urinary Tract Infections. *Journal of clinical microbiology*. 2017;55(6):1802-11. Epub 2017/03/31. doi: 10.1128/jcm.00027-17. PubMed PMID: 28356414; PubMed Central PMCID: PMC5442536.
167. Sun C, Zhang X, Wang J, Cheng C, Kang H, Gu B, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry combined with UF-5000i urine flow cytometry to directly identify pathogens in clinical urine specimens within 1 hour. *Annals of translational medicine*. 2020;8(9):602. Epub 2020/06/23. doi: 10.21037/atm.2019.10.73. PubMed PMID: 32566628; PubMed Central PMCID: PMC57290531.
168. Demarco ML, Burnham CA. Diafiltration MALDI-TOF mass spectrometry method for culture-independent detection and identification of pathogens directly from urine specimens. *American journal of clinical pathology*. 2014;141(2):204-12. Epub 2014/01/18. doi: 10.1309/ajcpqyw3b6jlkilc. PubMed PMID: 24436267.
169. Kitagawa K, Shigemura K, Onuma KI, Nishida M, Fujiwara M, Kobayashi S, et al. Improved bacterial identification directly from urine samples with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2017. Epub 2017/07/25. doi: 10.1002/jcla.22301. PubMed PMID: 28737838.
170. Kohling HL, Bittner A, Muller KD, Buer J, Becker M, Rubben H, et al. Direct identification of bacteria in urine samples by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and relevance of defensins as interfering factors. *Journal of medical microbiology*. 2012;61(Pt 3):339-44. Epub 2012/01/26. doi: 10.1099/jmm.0.032284-0. PubMed PMID: 22275503.
171. Yu Y, Sikorski P, Bowman-Gholston C, Cacciabeve N, Nelson KE, Pieper R. Diagnosing inflammation and infection in the urinary system via proteomics. *Journal of translational medicine*. 2015;13:111. Epub 2015/04/19. doi: 10.1186/s12967-015-0475-3. PubMed PMID: 25889401; PubMed Central PMCID: PMC4396075.
172. Adachi J, Kumar C, Zhang Y, Olsen JV, Mann M. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. *Genome biology*. 2006;7(9):R80. Epub 2006/09/05. doi: 10.1186/gb-2006-7-9-R80. PubMed PMID: 16948836; PubMed Central PMCID: PMC1794545.
173. Pinault L, Chabrière E, Raoult D, Fenollar F. Direct Identification of Pathogens in Urine by Use of a Specific Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Spectrum Database. *Journal of clinical microbiology*. 2019;57(4). Epub 2019/02/01. doi: 10.1128/jcm.01678-18. PubMed PMID: 30700506; PubMed Central PMCID: PMC6440795.
174. Sanchez-Juanes F, Siller Ruiz M, Moreno Obregon F, Criado Gonzalez M, Hernandez Egido S, de Frutos Serna M, et al. Pretreatment of urine samples with SDS improves direct identification of urinary tract pathogens with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(1):335-8. Epub

BIBLIOGRAFÍA

- 2013/11/15. doi: 10.1128/jcm.01881-13. PubMed PMID: 24226916; PubMed Central PMCID: PMC3911447.
175. Veron L, Mailler S, Girard V, Muller BH, L'Hostis G, Ducruix C, et al. Rapid urine preparation prior to identification of uropathogens by MALDI-TOF MS. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2015;34(9):1787-95. Epub 2015/06/10. doi: 10.1007/s10096-015-2413-y. PubMed PMID: 26054715.
176. Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, Ludes B, Kostrzewa M, Riegel P, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clinical microbiology and infection* : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2010;16(11):1631-8. Epub 2010/09/10. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03356.x. PubMed PMID: 20825442.
177. La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PloS one*. 2009;4(11):e8041. Epub 2009/12/01. doi: 10.1371/journal.pone.0008041. PubMed PMID: 19946369; PubMed Central PMCID: PMC2777307.
178. Kupelian AS, Horsley H, Khasriya R, Amussah RT, Badiani R, Courtney AM, et al. Discrediting microscopic pyuria and leucocyte esterase as diagnostic surrogates for infection in patients with lower urinary tract symptoms: results from a clinical and laboratory evaluation. *BJU international*. 2013;112(2):231-8. Epub 2013/01/12. doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11694.x. PubMed PMID: 23305196.
179. Fabbro C, Darolles J, Rault JP. [Preservation of urine samples for UF 1000i (bioMerieux(c)) analysis]. *Annales de biologie clinique*. 2011;69(5):588-92. Epub 2011/10/20. doi: 10.1684/abc.2011.0625. PubMed PMID: 22008140.
180. Eisinger SW, Schwartz M, Dam L, Riedel S. Evaluation of the BD Vacutainer Plus Urine C&S Preservative Tubes compared with nonpreservative urine samples stored at 4°C and room temperature. *American journal of clinical pathology*. 2013;140(3):306-13. Epub 2013/08/21. doi: 10.1309/ajcp5on9jhxvnqod. PubMed PMID: 23955448.
181. Huang B, Zhang L, Zhang W, Liao K, Zhang S, Zhang Z, et al. Direct Detection and Identification of Bacterial Pathogens from Urine with Optimized Specimen Processing and Enhanced Testing Algorithm. *Journal of clinical microbiology*. 2017;55(5):1488-95. Epub 2017/03/03. doi: 10.1128/jcm.02549-16. PubMed PMID: 28249997; PubMed Central PMCID: PMC5405266.
182. Ribot S, Gal K, Goldblat MV, Eslami HH. The role of anaerobic bacteria in the pathogenesis of urinary tract infections. *The Journal of urology*. 1981;126(6):852-3. Epub 1981/12/01. doi: 10.1016/s0022-5347(17)54781-3. PubMed PMID: 7321142.
183. Kyle J. Urinary complications of Crohn's disease. *World journal of surgery*. 1980;4(2):153-60. Epub 1980/01/01. PubMed PMID: 7405253.
184. Jimenez-Guerra G, Heras-Canas V, Valera-Arcas MD, Rodriguez-Granger J, Navarro JM, Gutierrez-Fernandez J. Comparison between urine culture profile and morphology classification using fluorescence parameters of the Sysmex UF-1000i urine flow cytometer. *Journal of applied microbiology*. 2017;122(2):473-80. Epub 2016/11/20. doi: 10.1111/jam.13354. PubMed PMID: 27860075.
185. Geerts N, Jansz AR, Boonen KJ, Wijn RP, Koldewijn EL, Boer AK, et al. Urine flow cytometry can rule out urinary tract infection, but cannot identify bacterial morphologies correctly. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2015;448:86-90. Epub 2015/07/01. doi: 10.1016/j.cca.2015.06.020. PubMed PMID: 26123581.
186. Monsen T, Ryden P. Flow cytometry analysis using sysmex UF-1000i classifies uropathogens based on bacterial, leukocyte, and erythrocyte counts in urine specimens among patients with urinary tract infections. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(2):539-45. Epub 2014/12/05. doi: 10.1128/jcm.01974-14. PubMed PMID: 25472486; PubMed Central PMCID: PMC4298542.

BIBLIOGRAFÍA

187. De Rosa R, Grosso S, Lorenzi G, Bruschetta G, Camporese A. Evaluation of the new Sysmex UF-5000 fluorescence flow cytometry analyser for ruling out bacterial urinary tract infection and for prediction of Gram negative bacteria in urine cultures. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2018;484:171-8. Epub 2018/05/29. doi: 10.1016/j.cca.2018.05.047. PubMed PMID: 29803898.
188. Li W, Sun E, Wang Y, Pan H, Zhang Y, Li Y, et al. Rapid Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing for Urinary Tract Pathogens by Direct Analysis of Urine Samples Using a MALDI-TOF MS-Based Combined Protocol. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:1182. Epub 2019/06/25. doi: 10.3389/fmicb.2019.01182. PubMed PMID: 31231323; PubMed Central PMCID: PMC6560049.
189. Kim HS, Kim JO, Lee JE, Park KG, Lee HK, Kim SY, et al. Performance of a Novel Fluorogenic Assay for Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae from Bacterial Colonies and Directly from Positive Blood Cultures. *Journal of clinical microbiology*. 2019;58(1). Epub 2019/11/02. doi: 10.1128/jcm.01026-19. PubMed PMID: 31666362; PubMed Central PMCID: PMC6935934.
190. Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46(9):3045-9. Epub 2002/08/17. doi: 10.1128/aac.46.9.3045-3049.2002. PubMed PMID: 12183268; PubMed Central PMCID: PMC127423.
191. Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Current opinion in microbiology*. 2006;9(5):466-75. Epub 2006/09/01. doi: 10.1016/j.mib.2006.08.011. PubMed PMID: 16942899.
192. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2017;72(8):2145-55. Epub 2017/05/26. doi: 10.1093/jac/dkx146. PubMed PMID: 28541467.
193. Sánchez-López J, Cantón R. Current status of ESKAPE microorganisms in Spain: Epidemiology and resistance phenotypes. *Revista española de quimioterapia : publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*. 2019;32 Suppl 2(Suppl 2):27-31. Epub 2019/09/03. PubMed PMID: 31475806; PubMed Central PMCID: PMC6755364 this manuscript.
194. Tang M, Yang J, Li Y, Zhang L, Peng Y, Chen W, et al. Diagnostic Accuracy of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Direct Identification of Clinical Pathogens from Urine. *Open medicine (Warsaw, Poland)*. 2020;15:266-73. Epub 2020/04/16. doi: 10.1515/med-2020-0038. PubMed PMID: 32292823; PubMed Central PMCID: PMC7147288.