

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACIÓN DE MÉTODO MODIFICADO DE IDENTIFICACIÓN DIRECTA DE  
MICROORGANISMOS A PARTIR DE LAS BOTELLAS DE HEMOCULTIVO  
POSITIVAS EMPLEANDO MALDI-TOF MS EN EL LABORATORIO CLÍNICO DEL  
HOSPITAL MÉXICO

Trabajo final de graduación sometido a la consideración de la Comisión del Programa de  
Estudios de Posgrado en Especialidades en Microbiología para optar al grado y título de  
Especialista en Bacteriología Clínica

MARIEL SOLÍS HERNÁNDEZ

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2023

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Dra. Estrada la confianza que depositó en mí para que bajo su dirección y organización realizara este trabajo, las enseñanzas compartidas y el apoyo en la ejecución del mismo y mi formación como Bacterióloga. Agradezco a los lectores de este trabajo, el Dr. León y la Dra. Sandí, el tiempo que han dedicado y el acompañamiento y retroalimentación en este proceso. Asimismo agradezco el respaldo del Laboratorio Clínico del Hospital México que me permitió cursar mis estudios; y agradezco a los compañeros de la División de Microbiología, que de alguna forma sumaron en la realización de este proyecto y me alentaron en la culminación de esta especialidad.

Muy especialmente agradezco a mi familia que a pesar de la distancia siempre me han apoyado y motivado en cada camino que emprendo; y a Ariel, mi compañero de vida que ha sido mi soporte y complemento idóneo. Finalmente agradezco a los compañeros y amigos que me ha dado la Microbiología, por los cuáles el estudio se tornó más ameno y memorable.



SISTEMA DE ESTUDIOS EN POSGRADO
PROGRAMA DE POSGRADO EN ESPECIALIDADES EN MICROBIOLOGÍA

ACTA-83-2022

Acta presentación de Requisito Final de Graduación Trabajo de Investigación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el miércoles 18 de enero de 2023 con el objeto de recibir el informe oral de la estudiante Mariel Solís Hernández carné #B46833, quien se acoge al Reglamento General del Sistema de Estudios de Posgrado para presentar el Trabajo Final de Graduación, para optar por el grado académico de Especialista en Bacteriología Médica. Están presentes los siguientes miembros del Tribunal Examinador: Heylin Estrada Murillo, Esp. quien preside y tutora, Randall León Solís, Esp. y Cindy Sandí Villalobos, Esp. lectores.

ARTICULO 1

Quien preside solicita a la postulante realizar la presentación oral de su Trabajo de Investigación titulado: "Evaluación de método modificado de identificación directa de microorganismos a partir de las botellas de hemocultivo positivas empleando MALDI-TOF MS en el Laboratorio del Hospital México".

ARTICULO 2

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a la postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 3

El Tribunal Examinador declara el Trabajo Final de Graduación: Aprobado [X] Reprobado [ ]

ARTICULO 4

Se da lectura al acta que firman los miembros del Tribunal Examinador y el Postulante, a las 16:50 horas.

Table with 3 columns: Nombre, Firma, No. Cédula. Rows include Heylin Estrada Murillo (Quien preside), Randall León Solís, Cindy Sandí Villalobos, and Mariel Solís Hdez (Estudiante).

Observaciones: Mención de honor

Nota: Solamente firmarán el acta los responsables de la actividad descrita
Si el trabajo es merecedor de mención de honor anotar en observaciones

## Índice

<b>Resumen .....</b>	<b>v</b>
<b>Lista de tablas y figuras .....</b>	<b>vi</b>
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>vii</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Pregunta de investigación.....</b>	<b>5</b>
<b>3. Hipótesis.....</b>	<b>5</b>
<b>4. Objetivos .....</b>	<b>5</b>
<b>4.1. Objetivo General:.....</b>	<b>5</b>
<b>4.2. Objetivos Específicos: .....</b>	<b>5</b>
<b>5. Antecedentes.....</b>	<b>6</b>
<b>5.1 Infecciones del torrente sanguíneo .....</b>	<b>6</b>
<b>5.2 Diagnóstico de infecciones del torrente sanguíneo.....</b>	<b>8</b>
<b>5.3 MALDI-TOF MS en la identificación rápida de agentes de sepsis.....</b>	<b>12</b>
<b>6. Materiales y métodos .....</b>	<b>18</b>
<b>6.1. Análisis estadístico .....</b>	<b>18</b>
<b>7. Resultados .....</b>	<b>24</b>
<b>8. Discusión.....</b>	<b>27</b>
<b>9. Conclusiones.....</b>	<b>35</b>
<b>10. Referencias .....</b>	<b>37</b>

## Resumen

El sistema de desorción-ionización láser asistida por matriz acoplada a espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) es una técnica que permite la identificación bacteriana con resultados sumamente rápidos y confiables. La identificación rápida y precisa de los patógenos causantes de infecciones del torrente sanguíneo es fundamental, ya que en estos pacientes el tiempo de respuesta del tratamiento óptimo es un factor determinante de su supervivencia. El hemocultivo se mantiene como el estándar de oro en el diagnóstico de estas infecciones, sin embargo requiere del subcultivo en medios sólidos e incubación durante la noche para poder obtener una identificación a partir de colonias aisladas de cultivo puro, prolongando significativamente el tiempo de respuesta.

Estudios previos han demostrado que el MALDI-TOF MS puede ser aplicado de forma exitosa en extractos preparados directamente de los hemocultivos positivos, eliminando la necesidad de subcultivar en medios sólidos para poder obtener una identificación del agente etiológico. Existen kits comerciales disponibles para este propósito, sin embargo el costo de los reactivos y los tiempos de procesamiento los convierten en opciones que no son aplicables en cualquier laboratorio de Microbiología. En los últimos años se ha generado un volumen creciente de publicaciones que describen métodos internos que consiguen tasas de identificación similares a las de los métodos comerciales; sin embargo, no existe un consenso respecto a cuál método debería ser integrado por los laboratorios.

Además de reducir la morbi-mortalidad de los pacientes, una identificación rápida permitiría un desescalamiento de la terapia antimicrobiana, la detección pronta de brotes, mejoramiento de la resistencia a los antimicrobianos y consecuentes reducciones en los costos de manejo y hospitalización. El presente estudio efectúa una evaluación de un método de extracción modificado para la identificación directa a partir de hemocultivos positivos, empleando 126 muestras de pacientes con infecciones del torrente sanguíneo, presentando resultados promisorios para una eventual implementación en un laboratorio de Microbiología Clínica.

## Lista de tablas y figuras

- Tabla 1.** Especies bacterianas identificadas mediante extracción directa de hemocultivos positivos con tritón y ácido acético, empleando MALDI-TOF MS.....25
- Tabla 2.** Exactitud y concordancia del método propuesto de extracción con tritón y ácido acético directamente de botellas de hemocultivo positivas monomicrobianas para su identificación mediante MALDI-TOF MS, en relación con el método de referencia y la identificación basada en PCR.....26
- Tabla 3.** Exactitud del método propuesto de identificación directa de los microorganismos directamente de las botellas de hemocultivo positivas mediante MALDI-TOF MS y exactitud del método molecular.....26

## Lista de abreviaturas

RAM: Resistencia a los antimicrobianos.

BLEE:  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.

PSA: Patrón de susceptibilidad a los antibióticos.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

CDC: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades.

MALDI-TOF MS: Desorción-ionización láser asistida por matriz acoplada a espectrometría de masas (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*).

NTM: Micobacterias no tuberculosas.

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos.

CMI: Concentraciones Mínimas Inhibitorias.

PCR: *Polimerase Chain Reaction*.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

FDA: Food and Drug Administration.

SCoN: *Staphylococcus* Coagulasa Negativa.

PROA: Programa para la Optimización del uso de Antimicrobianos.

SDS: Dodecilsulfato de sodio.

BCID: *'Blood Culture Identification'*.



UNIVERSIDAD DE  
COSTA RICA

SEP Sistema de  
Estudios de Posgrado

**Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.**

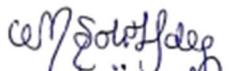
Yo, Mariel Solís Hernández, con cédula de identidad 1-1635-0160, en mi condición de autor del TFG titulado Evaluación de método modificado de identificación directa de microorganismos a partir de las botellas de hemocultivo positivas empleando MALDI-TOF MS en el laboratorio Clínico del Hospital México.

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI  NO

\*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: \_\_\_\_\_ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

  
FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

## 1. Introducción

A pesar de que el diagnóstico y el tratamiento han mejorado con el tiempo, las infecciones del torrente sanguíneo y la sepsis siguen siendo causas importantes de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; las cuales además conducen a estadías hospitalarias prolongadas y costos médicos más elevados (Goto y Al-Hasan, 2013). Los datos epidemiológicos son escasos, pero una estimación reciente indicó que anualmente ocurren 31,5 millones de casos de sepsis y 5,3 millones de muertes atribuibles a esta (Fleischmann et al., 2016). Este cálculo se basa en datos recopilados de países de ingresos altos y, por lo tanto, probablemente subestima la carga real de la enfermedad a nivel global, especialmente en países de bajos y medianos ingresos (Reinhart et al., 2017).

La mayoría de los estudios informan una incidencia creciente de sepsis e infecciones del torrente sanguíneo en las últimas dos décadas, particularmente entre los pacientes inmunocomprometidos, multimórbidos y de edad avanzada; o debido al fracaso de los regímenes de antibióticos empíricos como resultado de la resistencia a los antimicrobianos (RAM) (Cassini et al., 2019).

El reconocimiento temprano de los agentes infecciosos causales es clave para el tratamiento eficaz de la sepsis; el tiempo desde el triaje hasta la administración de los antimicrobianos apropiados son determinantes críticos de la mortalidad (Hawiger, Veach y Zienkiewicz, 2015; Kisson y Carapetis, 2015). Según una revisión de más de 2600 casos de 15 unidades de cuidados intensivos en cinco ciudades de EE. UU. y Canadá, las primeras 24 horas se han identificado como críticas en términos de administración de un tratamiento antimicrobiano eficaz. Además, cada hora de retraso en la administración de los antibióticos apropiados se asocia con una disminución de la supervivencia del 7,6 %, mientras que la administración de antibióticos inapropiados se ha asociado con una tasa de supervivencia aproximadamente cinco veces menor (Kumar et al., 2006; Kumar et al., 2009). Es decir que para los pacientes con infección del torrente sanguíneo, el inicio rápido de la terapia antimicrobiana adecuada es esencial para reducir la mortalidad y la morbilidad (Cattoir et al., 2018).

Con la propagación alarmante de patógenos multirresistentes a los antimicrobianos, los regímenes de tratamiento empírico ampliamente adoptados para la sepsis basados en penicilina o aminopenicilina en combinación con gentamicina están siendo cuestionados. En particular, la creciente carga de infecciones debidas a bacterias Gram negativas productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) representa un problema de salud importante. Estas bacterias, principalmente *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, no solo son resistentes a todas las penicilinas y cefalosporinas de tercera generación, sino que también expresan con frecuencia coresistencia a la gentamicina (Taxt et al., 2020).

Es decir, cada vez las opciones son más limitadas y con la creciente RAM y riesgo de fracaso del tratamiento, los médicos optan por antibióticos de último recurso; como los carbapenémicos, como terapia empírica. El tratamiento empírico de amplio espectro es un enfoque común pero a menudo costoso que puede fallar en atacar de manera efectiva al microorganismo correcto, y puede aumentar la morbilidad de los pacientes por su propia toxicidad o la resistencia antimicrobiana posterior (Martinez y Wolk, 2016). Se ha observado que 20% de los pacientes con shock séptico son inicialmente asignados a antimicrobianos inapropiados con graves consecuencias en términos de mortalidad (Bazzi et al., 2016). Esta administración de antibióticos de amplio espectro de forma innecesaria resulta en un ciclo vicioso, ya que contribuye al desarrollo y la propagación de la RAM y a un mayor aumento de la carga de infecciones causadas por bacterias resistentes (Taxt et al., 2020). Por lo tanto, la identificación temprana del patógeno etiológico es vital para mejorar el pronóstico del paciente y reducir el número de patógenos resistentes a los antimicrobianos (Ashikawa et al., 2018).

La terapia antibiótica rápida salva más vidas que cualquier otra intervención. En casos de sepsis, la intervención rápida con la terapia antimicrobiana adecuada puede ser crítica para la supervivencia del paciente (Nguyen et al., 2004). Para aerobios, anaerobios y hongos, la terapia antibiótica adecuada aumenta la supervivencia en aproximadamente un 25 a 45%. La atención antibiótica optimizada requiere antibióticos intravenosos de amplio espectro con administración diaria, reevaluación para optimizar la eficacia, prevenir la resistencia, evitar la toxicidad y minimizar los costos, con el objetivo máximo de suspender

la terapia de amplio espectro dentro de 3 a 5 días y con continuar antibióticos dirigidos contra el patógeno causante (Sharma y Kumar, 2008).

Actualmente el diagnóstico de infecciones del torrente sanguíneo se basa en hemocultivos y generalmente requiere de 1 a 2 días para la identificación del agente bacteriano y de 2 a 3 días adicionales para la determinación del patrón de susceptibilidad a los antibióticos (PSA). El diagnóstico de infecciones del torrente sanguíneo y la prescripción de la terapia antimicrobiana adecuada son cruciales para la reducción de la morbilidad y la mortalidad causadas por estas infecciones, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) tienen como objetivo un tiempo de respuesta máximo de dos horas (Buehler et al., 2016); lo cual dista bastante de la realidad actual (Taxt et al., 2020).

Desafortunadamente, a pesar del enorme impacto humano y financiero de la sepsis, su diagnóstico sigue siendo en gran medida clínico, debido a la falta de pruebas de laboratorio rápidas, sensibles y específicas para detectar los patógenos causantes (Martinez y Wolk, 2016). Por lo tanto, con el fin de proporcionar un diagnóstico más preciso, es evidente la apremiante necesidad de implementar técnicas fiables, rentables y fáciles de usar que mejoren la velocidad y la amplitud diagnóstica, y así logren reducir la morbilidad y mortalidad derivadas de los cuadros de infección del torrente sanguíneo y sepsis (Bazzi et al., 2016).

Existe una amplia variedad de enfoques diagnósticos para la identificación y el tratamiento de la bacteriemia y la sepsis (Martinez y Wolk, 2016). A la actualidad, se han reportado varias técnicas de extracción de los microorganismos directamente de las botellas de hemocultivo positivas para su identificación directa mediante MALDI-TOF MS. Entre estos, el método de extracción con ácido acético y tritón, propuesto por Bazzi et al. (2016), presentó resultados satisfactorios además del atractivo de ser sencillo y requerir de reactivos relativamente económicos; por lo que este trabajo pretende evaluar el desempeño de esta técnica, partiendo de la interrogante sobre la posibilidad de adaptarla a la rutina de un laboratorio de Microbiología de hospitales del sector público, bajo la hipótesis de que su implementación según las condiciones de trabajo locales, permitirá la obtención rápida de

resultados válidos y confiables; en aras de la optimización del procesamiento de muestras de tan gran importancia como los hemocultivos.

## **2. Pregunta de investigación**

¿Es posible adaptar el método propuesto de extracción con tritón y ácido acético para la identificación de microorganismos directamente de las botellas de hemocultivo positivas empleando el sistema VITEK MALDI-TOF MS (bioMérieux)?

## **3. Hipótesis**

El método propuesto de extracción con tritón y ácido acético para la identificación de microorganismos directamente de las botellas de hemocultivo positivas empleando el sistema VITEK MALDI-TOF MS (bioMérieux) proporciona resultados válidos.

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo General:**

Evaluar un método propuesto de extracción con tritón y ácido acético para la identificación de microorganismos directamente de las botellas de hemocultivo positivas empleando el sistema VITEK MALDI-TOF MS (bioMérieux).

### **4.2. Objetivos Específicos:**

- a) Desarrollar un protocolo para la extracción e identificación directa a partir de las botellas positivas de hemocultivo empleando el sistema VITEK MALDI-TOF MS (bioMérieux).
- b) Determinar si mediante el método propuesto de extracción directa de microorganismos de las botellas de hemocultivo positivas empleando el sistema VITEK MALDI-TOF MS (bioMérieux) es posible obtener resultados de identificación confiables.
- c) Evaluar la concordancia entre los resultados del método propuesto con el método de rutina y comparar su desempeño con el de las pruebas moleculares, empleando el método de rutina como referencia.

## **5. Antecedentes**

### **5.1 Infecciones del torrente sanguíneo**

La sepsis se define como la presencia probable o documentada de infección del torrente sanguíneo junto con manifestaciones sistémicas de esta, incluyendo la disfunción orgánica; la cual se puede presentar con presión arterial baja, reducción de diuresis, parálisis intestinal, reducción de la circulación, aumento de la creatinina, reducción del oxígeno en el sangre, lactato elevado, bilirrubina elevada, coagulación anormal o acidosis metabólica. Si no se trata, esta puede transformarse en shock séptico, el cuál consiste en una sepsis complicada por hipotensión refractaria a los líquidos de reanimación o por hiperlactatemia, y eventualmente llevar a la disfunción orgánica y la muerte (Angus y van der Poll, 2013). A pesar de los avances modernos, la sepsis se mantiene como una de las principales causas de muerte en todo el mundo (Cawcutt y Peters, 2014).

El reconocimiento temprano de esta enfermedad es esencial y el tratamiento incluye estabilización de la presión arterial mediante el manejo temprano de líquidos y vasopresores y el tratamiento de la infección con la administración inmediata de antibióticos. Idealmente, los hemocultivos se obtienen del paciente antes de la administración de antimicrobianos, y la terapia empírica con agentes antimicrobianos de amplio espectro se inicia dentro de la primera hora de diagnóstico (Martinez y Wolk, 2016).

En un paciente inmunosupreso, el espectro de microorganismos causantes de infecciones del torrente sanguíneo ha cambiado durante la última década, pasando de Gram negativos a Gram positivos. Las razones podrían deberse a modificaciones recientes en la práctica clínica que incluyen terapia antimicrobiana, cambios en los regímenes inmunosupresores o quimioterapéuticos y aumentos significativos en el uso de dispositivos permanentes a largo plazo. Además, la resistencia antimicrobiana emergente afecta la epidemiología de las infecciones del torrente sanguíneo que se encuentran en este tipo de pacientes (Martinez y Wolk, 2016).

La sepsis grave puede ser el resultado de infecciones adquiridas en la comunidad o asociadas a la atención de la salud, pero pueden también ser producto de la diseminación de infecciones primarias, como neumonía, infecciones del tracto urinario e intraabdominales. Los agentes bacterianos más comunes incluyen *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella* spp. (Martinez y Wolk, 2016). Por otro lado, las infecciones del torrente sanguíneo causadas por micobacterias no tuberculosas (NTM) y levaduras que no son *Candida* están en aumento. Por esto, como parte de la evaluación inicial de un paciente inmunosupreso con sospecha de infección del torrente sanguíneo, se le debe realizar hemocultivos por bacterias aerobias y anaerobias, así como de levaduras. Desafortunadamente, los hemocultivos no son una prueba diagnóstica completamente confiable; en algunas poblaciones, sólo un tercio de los casos de sepsis resultan en hemocultivos positivos (Angus y van der Poll, 2013); pero de igual forma se encuentran entre los cultivos más importantes realizados por los laboratorios de microbiología clínica.

Después de las 24 a 48 horas de detección, cuando los resultados de susceptibilidad a los antimicrobianos aún no están disponibles, los médicos pueden basarse en los antibiogramas de su institución como guía en la selección del tratamiento; y en algunos casos, si la información está disponible, basarse en antibiogramas de locaciones específicas como la UCI (Unidad de Cuidados Intensivos) y el Servicio de Emergencias (Martinez y Wolk, 2016).

Aunque algunos organismos, como los estreptococos del grupo viridans poseen patrones predecibles y es posible que no se realicen pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, los médicos deben tener en cuenta que pueden presentarse patrones inusuales en los pacientes inmunosupresos. Por ejemplo, se ha observado que *Streptococcus mitis* y *S. salivarius*, dos microorganismos que se consideran muy sensibles a la penicilina, tienen CMI (Concentraciones Mínimas Inhibitorias) de penicilina elevadas cuando se recuperan de pacientes con neutropenia febril (Martinez y Wolk, 2016). Asimismo, las infecciones por bacilos Gram negativos multirresistentes también se están convirtiendo en un problema grave en los inmunosupresos (Ramphal, 2004), por lo que

según la frecuencia de resistencia de la institución debido a BLEE (betalactamasas de espectro extendido) o mecanismos mediados por AmpC, puede verse justificado el tratamiento empírico con un carbapenémico (Martinez y Wolk, 2016).

## 5.2 Diagnóstico de infecciones del torrente sanguíneo

El hemocultivo sigue siendo el estándar de oro para el diagnóstico de las infecciones del torrente sanguíneo, y aunque este ha ido evolucionando continuamente a lo largo de los años; su principal desventaja es el tiempo requerido en cada paso del procedimiento analítico (incubación del frasco, subcultivo, identificación y antibiograma). Esto significa que, en la mayoría de los casos, no se dispone de un resultado confiable antes de las 18 a 24 horas a partir de que los frascos de hemocultivo presenten positividad (a menudo tardan de 1 a 3 días), ya que conllevan el subcultivo en medios sólidos e incubación durante la noche para obtener colonias aisladas para la identificación y las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos (PSA); además, el análisis puede tardar aún más en el caso de bacterias u hongos de crecimiento lento (Lucignano et al., 2011; Wieser et al., 2012).

El tiempo hasta la positividad de las botellas de hemocultivo está influenciado por una serie de factores clínicos y microbiológicos, como la fuente de bacteriemia, el nivel de bacteriemia, la presencia o ausencia de antibióticos preadministrados y la especie bacteriana (Palmer et al., 2013). Por otro lado, el hemocultivo es poco sensible a algunos patógenos, como *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae* (responsables de enfermedades pulmonares comunitarias) y a algunos patógenos de difícil o imposible cultivo, como *Bartonella* spp., *Francisella tularensis*, *Hiphomycetes*, *Nocardia* spp., *Ricketia* spp. y *Coxiella burnetii* (Stathopoulos et al., 2004; Fenollar y Raoult, 2007).

En síntesis, el diagnóstico basado en hemocultivos generalmente requiere de 1 a 2 días para la identificación del agente bacteriano y de 2 a 3 días adicionales para la determinación fenotípica del patrón de susceptibilidad a los antibióticos (PSA). Hasta la obtención de la PSA, la elección del tratamiento se basa en la evaluación clínica, las pautas empíricas y la epidemiología local sobre la RAM.

La PCR (*Polimerase Chain Reaction*) de genes de amplio espectro y la secuenciación de material clínico proporcionan un método alternativo e independiente del cultivo para detectar patógenos. Existen varios sistemas comerciales basados en PCR multiplex o microarreglos que permiten la identificación de patógenos bacterianos y fúngicos a partir de hemocultivos positivos en 1-4 horas (Lamy et al., 2020). El gen diana que se usa más comúnmente para detectar bacterias en una muestra de sangre es el ARN ribosomal 16S (gen ARNr 16S o ADNr 16S), un gen de aproximadamente 1500 pares de bases que codifica una porción del ribosoma 30S (Lamy et al., 2020).

Algunos de estos sistemas incluyen marcadores de genes de resistencia seleccionados en sus paneles multiplex. Se ha demostrado que esta información es beneficiosa en el caso de la detección del gen *mecA* (Emonet et al., 2016) pero tiene un valor práctico limitado en muchas áreas; ya que para muchos mecanismos de resistencia, un resultado negativo no excluye la resistencia fenotípica debida a otros mecanismos de resistencia distintos de los incluidos en la prueba. Por lo tanto, los médicos a menudo no modifican el régimen de antibióticos a la luz de los resultados moleculares, con una pérdida de interés por un diagnóstico tan rápido (Lamy et al., 2020).

El FilmArray Blood Culture Identification Panel (BCID), un sistema basado en PCR multiplex completamente automático (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francia) (Altun, Almuhayawi, Ullberg y Ozenci, 2013) identifica automáticamente hasta 24 patógenos microbianos, incluidos 19 géneros/especies bacterianas y cinco especies de *Candida*, así como los genes *mecA*, *van A/B* y *blaKPC*. Este sistema puede detectar con éxito los patógenos causales con el uso de frascos de hemocultivo antes de que se puedan obtener resultados positivos con los protocolos de cultivo convencionales (Almuhayawi, Altun, Stralin y Ozenci, 2014).

En general, el protocolo de detección basado en la prueba de amplificación de ácidos nucleicos posee un buen potencial para el desarrollo de un método temprano de diagnóstico de infecciones del torrente sanguíneo; sin embargo, la pequeña cantidad de ADN patógeno y la presencia de varios inhibidores de la PCR en los frascos de hemocultivo influyen sustancialmente en los resultados de la amplificación (Bloos et al., 2012). Los inhibidores de PCR que se encuentran comúnmente incluyen compuestos

derivados de la sangre, heparina, EDTA, sulfonato de poliacetal contenido en los medios de cultivo, grandes cantidades de ADN humano y polisacáridos derivados de bacterias (Trung et al., 2016). Además, las paredes celulares de los cocos Gram positivos contienen altas proporciones de pentaglicina y son resistentes a los tensioactivos como el dodecilsulfato de sodio y al pretratamiento con proteinasa K (Unno et al., 2015).

Aunque los métodos moleculares proporcionan un resultado confiable para los patógenos incluidos, todos comparten los inconvenientes comunes de ser costosos, solo procesan unas pocas muestras simultáneamente y tienen paneles limitados de patógenos (Lamy et al., 2020). La promesa de esta técnica se ha mantenido fuerte, especialmente para el dominio bacteriano, pero su aplicación no ha sido confiablemente reproducible, debido en gran parte a problemas de contaminación y sensibilidad inadecuada (Martinez y Wolk, 2016); y a pesar de que permiten una comunicación más rápida de la identificación de especies a los médicos y una terapia antimicrobiana dirigida más temprana, no se ha observado un efecto significativo sobre la mortalidad (Lamy et al., 2020).

En los últimos años, también se han puesto a disposición ciertos métodos automatizados y rápidos basados en la hibridación, incluidas las pruebas de ácido nucleico de cultivo de sangre para Gram positivos y Gram negativos de Verigene (Nanosphere Inc., Northbrook, IL), que tienen la ventaja de poder detectar los patógenos bacterianos más comunes y los posibles genes de resistencia a los antibióticos directamente de los hemocultivos en 2,5 horas. La desventaja es la limitación en los tipos de patógenos detectables (Hayakawa et al., 2017).

Por lo tanto, mejorar la cobertura de patógenos sigue siendo un desafío y como método innovador de identificación, el secuenciador de nanoporos MinION (Oxford Nanopore Technologies [ONT], Oxford, Reino Unido) se ha introducido en varios entornos clínicos (Quick et al., 2015). Las innovaciones clave de la plataforma MinION incluyen costos iniciales y operativos sustancialmente reducidos y secuenciación en tiempo real, a diferencia de la secuenciación de nueva generación (NGS) y la secuenciación Sanger (Cao et al., 2016).

En 2018, Oxford Nanopore Technologies anunció un nuevo modelo de celda de flujo MinION más accesible y rentable para procedimientos analíticos más pequeños

(Ashikawa et al., 2018). Sin embargo, los costos de las tecnologías de secuenciación no dejan de ser significativos, además de que requieren de un personal altamente especializado y capacitado para su operación y de forma más importante, para el manejo e interpretación de los datos. Además, no funcionan para abordar las infecciones polimicrobianas o la contaminación dentro de las botellas de cultivo. Desafortunadamente, también es evidente que la secuencia de ARNr 16S en la taxonomía bacteriana no puede distinguirse entre especies estrechamente relacionadas (Fox, Wisotzkey y Jurtschuk, 1992) y la contaminación con genes humanos reduce la cobertura de las secuencias bacterianas obtenidas con MinION, lo que puede complicar la identificación precisa de especies bacterianas a partir de hemocultivos positivos (Anson et al., 2018).

También es importante considerar las muestras con cultivo negativo con o sin evidencia clara de infección; las cuáles podrían resultar positivas por PCR debido a varios factores, como la presencia de patógenos difíciles de cultivar, terapia antibiótica previa y contaminación del ADN bacteriano en la Taq polimerasa. Se requieren más investigaciones para evaluar muestras con cultivo negativo y con PCR positivas en función de la secuenciación de amplicón con MinION (Ashikawa et al., 2018).

Aunque los investigadores han demostrado la capacidad de detectar bacterias directamente de la sangre con la amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr, no se recomienda su realización de forma rutinaria ya que el cultivo sigue siendo una prueba de diagnóstico más sensible. Además, la PCR de amplio rango se asocia con contaminación, y un resultado positivo siempre debe correlacionarse con la historia clínica (Martinez y Wolk, 2016).

### **5.3 MALDI-TOF MS en la identificación rápida de agentes de sepsis**

El sistema de identificación por MALDI-TOF MS es una técnica rápida y confiable para la identificación microbiana, siendo que la mayoría de los resultados que produce son similares a los obtenidos por secuenciación del ARNr 16S, pero con mayor rapidez y menores costos. Numerosos reportes indican que esta técnica genera resultados de identificación más exactos que los generados por varios métodos fenotípicos y bioquímicos convencionales en laboratorios de microbiología (Paauw et al., 2008)

La identificación rápida de microorganismos que causan infecciones del torrente sanguíneo es una de las aplicaciones más impactantes del MALDI-TOF MS en la microbiología clínica (Rodríguez-Sánchez, Cercenado, Coste y Greub, 2018). Esta tecnología ha demostrado la identificación oportuna y precisa de una amplia variedad de microorganismos directamente a partir de hemocultivos positivos y tiene la ventaja añadida de ser económica y eficiente (Opota, Croxatto, Prod'hom, y Greub, 2015). La mayoría de los laboratorios de Microbiología en todo el mundo han implementado este enfoque para que los médicos puedan iniciar rápidamente un tratamiento antimicrobiano óptimo, que se ha demostrado que se correlaciona con tasas más altas de resultados favorables para el paciente (Oviaño et al., 2021).

El sistema MALDI-TOF MS aprovecha la alta sensibilidad de la espectrometría de masas con el enlace a grandes bases de datos microbianas para proporcionar espectros específicos de cada especie, de forma que se pueden usar para identificar de manera reproducible, tanto aislamientos puros o patógenos de frascos de hemocultivos positivos (Schieffer et al., 2014). El método consiste en la ionización directa de una colonia bacteriana intacta o un extracto de proteína bacteriana y la identificación se produce después de correlacionar la firma espectral (según la relación masa a carga  $[m/z]$ ) de un aislamiento con una base de datos de espectros recopilados de cepas de referencia. Los biomarcadores que se miden son proteínas intracelulares implicadas en mantenimiento y que poseen altos niveles de expresión, como componentes ribosómicos, chaperonas y factores de transcripción/traducción; lo que las hace altamente conservadas y útiles para la identificación (De Groote y Huitt, 2006).

Este sistema permite la identificación rápida de bacterias Gram positivas, Gram negativas, micobacterias, levaduras y hongos filamentosos (Di Gaudio et al., 2018) y se usa ampliamente por su alta precisión, bajo costo de consumibles y velocidad de análisis. Además, la identificación por espectrometría de masas presenta diversas posibilidades, ya que es un método rápido y sensible para medir proteínas, lípidos y otras dianas, y no requiere conocimiento previo sobre el organismo a identificar (Martínez y Wolk, 2016).

Entre sus limitaciones, actualmente este sistema no es capaz de distinguir entre *Shigella* y *E.coli*, *Bordetella pertussis* y *Achromobater ruhlandii*, *A. xylooxidans* y *A. ruhlandii* y entre *Bacteroides nordii* y *B.salyersiae*. Similarmente, el complejo *E. cloacae*, un grupo de 6 especies estrechamente relacionadas (*E.asburiae*, *E. cloacae*, *E.hormaechei*, *E.kobei*, *E.ludwigii* y *E. nimipressuralis*) no puede ser distinguido por este método (Paauw et al., 2008).

Actualmente la utilización estándar del sistema MALDI-TOF MS requiere colonias puras de los microorganismos cultivados y una pequeña cantidad de matriz (normalmente menos de 1 µL/muestra), sin embargo, con los años se han desarrollado varias técnicas de pre-procesamiento para la identificación directa mediante MALDI-TOF MS de patógenos presentes en hemocultivos, que abarcan diferentes métodos internos y tres kits comerciales: (i) el kit Sepsityper® y (ii) el kit Vitek® MS Blood Culture, que se basan en el uso de un buffer de lisis y limpieza mejorada de las bacterias por centrifugación o filtración, y (iii) el kit Rapid BACpro® II; que contiene un copolímero de polialilamina-poliestireno para la recuperación de los microorganismos (Oviaño et al., 2021).

El kit Sepsityper® (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) etiquetado como CE-IVD (*In vitro Diagnostic*) y aprobado por la FDA, es ampliamente utilizado y numerosos estudios han informado resultados de identificación exitosos. El kit Vitek® MS Blood Culture (bioMérieux, Lyon, Francia) actualmente está etiquetado como RUO (*Research Use Only*) y ha presentado altas tasas de identificación correcta a nivel de especie de diferentes microorganismos; sin embargo, las publicaciones de revisión por pares sobre este kit aún son escasas y es posible que sea necesaria una evaluación adicional para conocer su rendimiento, además de que su utilización está limitada al área de la investigación. El Rapid BACpro® II (Nittobo Medical Co., Tokio, Japón) es relativamente reciente y posee

etiqueta CE-IVD (Oviaño et al., 2021). Su funcionamiento se basa en que los aislamientos bacterianos se adhieren a polímeros cargados positivamente, formando agregados macroscópicos que pueden recuperarse fácilmente mediante centrifugación (Oviaño et al., 2021), pero su rendimiento analítico no se ha estudiado en grandes muestras clínicas prospectivas (Yonezawa et al., 2018).

A pesar de la existencia de estos kits; en términos de costos de funcionamiento y rendimiento analítico, la aplicación de un método interno ha demostrado ser mejor opción para un entorno de microbiología de diagnóstico. Los resultados de Di Gaudio et al. (2018) sugieren que la identificación basada en MALDI-TOF MS directamente a partir de hemocultivos no es mucho más laboriosa (en particular, reduce los pasos de extracción), y requiere costos de reactivos más bajos en comparación con los métodos convencionales o con los sistemas de PCR multiplex automatizados.

Es así como esta tecnología simplificada que ha reducido drásticamente tanto el costo como el trabajo y tiempo involucrados, se ha convertido en una alternativa útil en el diagnóstico rápido de las infecciones del torrente sanguíneo (Ashikawa et al., 2018) y se ha introducido recientemente como un enfoque innovador para la identificación de bacterias a partir de las botellas de hemocultivo positivas (Stevenson, Drake y Murray, 2018). Se ha demostrado que la identificación de microorganismos directamente a partir de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF MS reduce significativamente el tiempo de respuesta en comparación con los métodos convencionales (Lagacé-Wiens et al., 2012); permitiendo una identificación muy rápida con un tiempo de procesamiento de 20-40 minutos, lo cual implica un efecto muy positivo en el manejo de los pacientes (Lamy et al., 2020).

Asimismo se ha demostrado un gran beneficio de esta identificación microbiana rápida en el ajuste de la terapia antimicrobiana empírica (Martiny et al., 2013; Huang et al., 2013; Clerc et al., 2013). Clerc et al. (2013) evaluaron el impacto clínico de realizar MALDI-TOF MS directamente a hemocultivos positivos, donde esta metodología permitió ajustar el tratamiento antibiótico en el 35,1% de los casos. Además observaron que la estancia hospitalaria se redujo en aproximadamente 2 días y la aplicación rutinaria de la identificación directamente de hemocultivos mediante MALDI-TOF MS presentó un claro

beneficio en la racionalización de los antimicrobianos, con reducción del uso de carbapenémicos y otros antibióticos de amplio espectro.

Jakovljević y Bergh (2015) encontraron varios casos de ajustes terapéuticos en función de la resistencia antimicrobiana intrínseca o los patrones de resistencia local conocidos de las especies bacterianas identificadas (NORM/NORM-VET, 2013). Ejemplos de estos son los casos de bacteriemia por *Enterococcus faecalis* o *E. faecium* cuando la terapia preventiva fue una cefalosporina, o la identificación de *Acinetobacter* spp. y algunas de las Enterobacteriaceae a nivel de género, lo que podría indicar la necesidad de cambiar a una terapia más amplia de cefalosporina a un carbapenémico. Además, la diferenciación rápida entre *S. aureus* y SCoN podría ser útil tanto para la elección de la terapia (cloxacilina o vancomicina) como para iniciar la búsqueda de un posible foco de infección del torrente sanguíneo (Jakovljević y Bergh, 2015).

La identificación rápida también resulta especialmente útil cuando se detectan patógenos raros; por ejemplo Jakovljević y Bergh (2015) lograron la identificación de *Listeria monocytogenes* a partir de hemocultivos, que aunque obtuvo una puntuación máxima no confiable (1,497, en el caso del equipo Bruker®), las diversas especies de *Listeria*, incluida *L. monocytogenes*, clasificadas sucesivamente como las siete primeras propuestas en la lista de identificaciones, proporcionaron información valiosa sobre una posible listeriosis que provocó la realización inmediata de una PCR que resultó positiva. Según las observaciones de Moussaoui et al. (2010) cuando al menos cuatro propuestas de especies sucesivas con puntuaciones iniciales mayores a 1,4 se obtuvieron directamente de hemocultivos, la identificación de especies no es falsa en su serie (Jakovljević y Bergh, 2015).

Actualmente el desafío más importante de la implementación de una identificación directamente de las botellas de hemocultivo positivas mediante el sistema MALDI-TOF MS, es la preparación de las muestras; que son matrices complejas que incluyen células sanguíneas y proteínas plasmáticas. Varios estudios recientes se han centrado en el desarrollo de métodos óptimos para este fin, por ejemplo, tubos separadores de suero (Moussaoui et al., 2010; Stevenson et al., 2010; Wimmer et al., 2012), la centrifugación diferencial, filtros (Fothergill et al., 2013), procedimientos mejorados de lisis de eritrocitos

que emplean cloruro de amonio, dodecilsulfato de sodio (SDS) o saponina (Oviaño et al., 2021), y los kits comerciales. Sin embargo, estas técnicas reportadas también tienen algunas deficiencias, como el requisito de equipos sofisticados, altos costos y una precisión de identificación relativamente baja (Pan et al., 2018), no existe una estandarización y el rendimiento a menudo depende de las habilidades de los operadores y por lo tanto, solo se emplean a nivel local (Kayin, Mert, Aydemir y Özenci, 2019).

Con su protocolo de identificación rápida de microorganismos mediante lisis con saponina, Martiny et al. (2013) lograron identificar correctamente el 73,7 % de las bacterias del hemocultivo a nivel de especie en menos de una hora. En este estudio se observó una disminución de 26,85 horas en el tiempo necesario para la identificación y un aumento del 13,38% en la proporción de pacientes que reciben un tratamiento antimicrobiano adecuado 24 horas después del hemocultivo positivo; resultados que concuerdan con los presentados por Vlek et al. (2012) (28,8 horas, 11,3 %). Por otro lado, su método resultó ser hasta 10 veces más económico, además de más rápido y fácil de implementar que el kit comercial Sepsityper™ (Martiny et al., 2013). El kit Sepsityper® permite resultados de identificación en 30 minutos y hasta ahora, los resultados publicados muestran que su rendimiento analítico se encuentra entre el 76 y el 90 % (Morgenthaler y Kostrzewa, 2015); pero cabe mencionar, que los estudios que comparan este kit comercial con algunos de los métodos internos no han mostrado un beneficio significativo en la aplicación de este método (Chen et al., 2013; Juiz et al., 2012; Meex et al., 2012).

Martiny et al. (2013) encontraron que la identificación rápida de especies de *Enterococcus* y estreptococos  $\beta$ -hemolíticos fue responsable del 30% de las modificaciones del tratamiento antimicrobiano, lo que sugiere que puede ser de interés aplicar estas técnicas en hemocultivos positivos que muestren cocos Gram positivos en pares o cadenas; a pesar de las limitaciones conocidas del sistema MALDI-TOF MS, que no consigue la discriminación de *Streptococcus mitis/oralis* de *Streptococcus pneumoniae* (Martiny et al., 2013).

Aunque no siempre puede conducir a la modificación del régimen de tratamiento, la identificación rápida de los patógenos juega un papel importante, y lamentablemente difícil de cuantificar, en el manejo global del paciente. La confirmación de un contaminante es de

especial interés para pacientes no hospitalizados y puede ayudar a evitar la administración de antibióticos innecesarios. Por otro lado, la confirmación de una infección relacionada con el catéter, generalmente realizada mediante la determinación del "tiempo hasta la positividad", permite la extracción rápida de los dispositivos infectados y puede ayudar a prevenir más infecciones. La detección de organismos particulares también puede permitir que el médico identifique el origen de la sepsis y, por lo tanto, contribuir a las medidas de ahorro de costos (Martiny et al., 2013).

## 6. Materiales y métodos

Se realizó un protocolo modificado de identificación directa de los microorganismos a partir de 126 botellas de hemocultivo positivas inoculadas con muestras de pacientes del Hospital México, en el periodo de mayo a setiembre del 2022. El método se basó en el procedimiento de lisis-centrifugación descrito por Bazzi et al. (2016); empleando tritón y ácido acético. Se seleccionó aquellas botellas monomicrobianas en las que se observó bacilos Gram negativos o cocos Gram positivos en la tinción de Gram que se realiza rutinariamente posterior a que el equipo BACT/ALERT® VIRTUO® | (bioMérieux) las indique como positivas.

Para la extracción directa de cada cultivo positivo seleccionado la metodología consistió en coleccionar 3 mL de cada botella seleccionada y dispensar 1 mL en cada uno de 3 tubos Eppendorf (1.5 mL). Se añadió 50µL de Tritón (10×) a cada tubo, seguido de una agitación con vórtex y centrifugación 1 minuto a 13 000 rpm. Posteriormente se removieron los sobrenadantes y se resuspendió los *pellets* en 1 mL de solución salina (0.9%), seguido de una centrifugación de 1 minuto a 13 000 rpm; este lavado del *pellet* se efectuó tres veces. Nuevamente se removió los sobrenadantes y se añadió 50 µL Ácido acético (30%), seguido por agitación con vórtex y una última centrifugación de 1 minuto a 13 000 rpm. Finalmente, se vertió 1 µL, 2 µL o 3 µL del sobrenadante de cada tubo correspondiente a 3 distintos pocillos de la lámina de MALDI-TOF MS consecutivamente y se secó al aire; seguido por la adición de 1 µL de matrix CHCA a cada spot de la lámina y secado al aire para efectuar la corrida de identificación en el sistema VITEK MALDI-TOF MS (bioMérieux). En la División de Microbiología semanalmente se realiza controles de calidad a los reactivos CHCA y ácido fórmico con una cepa de *Klebsiella aerogenes* ATCC 13098 y una cepa de *Candida glabrata* ATCC MYA-2950; además de la calibración realizada en cada corrida con la cepa de *E.coli* ATCC 8739.

## **6.1. Análisis estadístico**

Para el análisis de los datos obtenidos se aplicó la prueba de Chi cuadrado de MacNemar para comparar los datos de exactitud obtenidos mediante el método propuesto con los resultados obtenidos por el método molecular, empleando el método de rutina como referencia. Se utilizó la prueba Chi cuadrado para comparar los resultados de exactitud obtenidos para microorganismos Gram positivos y Gram negativos obtenidos por el método propuesto y las pruebas moleculares; considerando una significancia estadística cuando  $p < 0.05$  (Jakovljević y Bergh, 2015).

## 7. Resultados

Se incluyó un total de 126 frascos de hemocultivo positivos monitorizados continuamente con un sistema BACT/ALERT® VIRTUO® | (bioMérieux). Se realizó microscopía de la tinción de Gram de cada frasco y se incluyeron solamente muestras monomicrobianas (82 Gram negativos y 44 Gram positivos). Los scores de identificación entre 60% y 99,9% se consideraron válidos, según Wang et al. (2014).

Los hemocultivos seleccionados se analizaron a la mañana siguiente después de informar la señal de positividad vía el método propuesto de extracción con tritón y ácido acético para la identificación directa usando MALDI-TOF MS a partir de las botellas de hemocultivo. Asimismo, todos se procesaron de manera rutinaria de acuerdo a los procedimientos del laboratorio por el método estándar de oro dependiente de subcultivo en medios sólidos e incubación durante la noche para la identificación de colonias aisladas empleando MALDI-TOF MS; así como los paneles moleculares disponibles en el centro hospitalario: el ensayo GeneXpert® MRSA/SA BC de Cepheid, los paneles de sepsis (BCID) ePlex® de GeneMark Diagnostics para Gram positivos y Gram negativos y el panel de sepsis (BCID) FilmArray® de BioFire®. Las especies identificadas con el método propuesto se enlistan en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Especies bacterianas identificadas mediante extracción directa de las botellas de hemocultivos positivos con tritón y ácido acético, empleando MALDI-TOF MS.

<b>Especies Gram negativos</b>	<b>Número</b>	<b>Especies Gram positivos</b>	<b>Número</b>
<i>K. aerogenes</i>	5	<i>Enterococcus faecalis</i>	7
<i>Escherichia coli</i>	23	<i>Staphylococcus aureus</i>	10
<i>K.pneumoniae</i>	18	<i>S. hominis</i>	5
<i>E.cloacae/asburiae</i>	4	<i>Streptococcus agalactiae</i>	3
<i>P.orzyhabitans</i>	1	<i>S.lugdunensis</i>	2
<i>P.aeruginosa</i>	5	<i>S.epidermidis</i>	9
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	<i>S.warneri</i>	2
<i>P.putida</i>	2	<i>S.haemolyticus</i>	3
<i>Moraxella catarrhalis</i>	2	<i>S.capitis</i>	1
<i>Salmonella enterica spp. enterica</i>	3		
<i>Aeromonas punctata</i>	1		
<i>A. hydrophila</i>	1		
<i>Serratia marcescens</i>	4		
<i>K.oxytoca</i>	5		
<i>Citrobacter braakii</i>	2		
<i>Burkholderia cepacia</i>	2		
<i>E.hormachei</i>	3		

Los resultados de identificación obtenidos con el método propuesto se compararon con los obtenidos por el método de rutina para evaluar la exactitud de la identificación. La exactitud del método a prueba se calculó mediante la comparación del número de resultados correctos generados por el método a prueba dividido por el número generado por el método estándar de oro, multiplicado por 100%.

Como se muestra en la **Tabla 2**, en el caso de los Gram negativos se obtuvo una exactitud de 81,7%, mientras que para los Gram positivos la exactitud fue de 77,27%. En

todos los casos en los que se obtuvo una identificación, la concordancia fue del 100% con el método estándar de oro y las pruebas moleculares. Según los datos obtenidos, sí existe una diferencia significativa en los valores de exactitud reportados para el método propuesto y las pruebas moleculares ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 2.** Exactitud y concordancia del método propuesto de extracción con tritón y ácido acético directamente de botellas de hemocultivo positivas monomicrobianas para su identificación mediante MALDI-TOF MS, en relación con el método de referencia y la identificación basada en PCR.

<b>Organismo</b>	<b>Exactitud (%)</b>	<b>Concordancia Referencia (%)</b>	<b>Concordancia Molecular (%)</b>
<b>Gram negativos (n=82)</b>	81,7	100	100
<b>Gram positivos (n=44)</b>	77,27	100	100

Asimismo, se efectuó una comparación entre los resultados obtenidos por el método a prueba y las pruebas moleculares; empleando el método de rutina como referencia. Los datos se resumen en la **Tabla 3**. Este estudio no muestra diferencia significativa entre la identificación de Gram negativos y Gram positivos ( $p < 0,05$ ), como sí lo indican otros estudios. Además, tampoco se observa una diferencia significativa entre los resultados de identificación de Gram negativos entre el método propuesto y el método molecular ( $p < 0,05$ ), mientras que la diferencia sí es significativa entre los resultados de identificación de Gram positivos entre el método propuesto y el método molecular ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 3.** Exactitud del método propuesto de identificación directa de los microorganismos directamente de las botellas de hemocultivo positivas mediante MALDI-TOF MS y exactitud del método molecular.

<b>Método Organismo</b>	<b>Propuesto Exactitud nivel de especie (%)</b>	<b>Molecular Exactitud nivel de especie (%)</b>	<b>Molecular Exactitud nivel de género (%)</b>
<b>Gram negativos (n=82)</b>	81,70	75,61	89,02
<b>Gram positivos (n=44)</b>	77,27	54,55	70,45

## 8. Discusión

La identificación de bacterias mediante MALDI-TOF MS es dependiente de su perfil proteico único y requiere, en general, colonias puras (Krishnamurthy y Ross, 1996). Por lo tanto, la identificación precisa de microorganismos directamente de los frascos de hemocultivo empleando esta técnica, constituye un desafío que requiere la separación de las células bacterianas de otras señales perturbadoras, incluidas las células humanas, los medios de cultivo y otros desechos que están presentes en el caldo de hemocultivo (Özenci y Strålin, 2019).

Los protocolos reportados hasta el momento generalmente incluyen la suspensión con un agente detergente seguido de un procedimiento de centrifugación y, en algunos casos, extracción de proteínas con etanol y ácido fórmico (Lamy et al., 2020). En este caso, la acción detergente fue ejercida por el tritón, mientras que el ácido acético se empleó como agente para la extracción proteica.

El rendimiento analítico del método, el diseño experimental y la epidemiología de las especies bacterianas que causan infecciones del torrente sanguíneo son factores importantes que pueden influir en el resultado del método probado. Por lo tanto, no es adecuado comparar estudios sobre el desempeño de métodos de extracción distintos utilizados en la identificación directa de bacterias a partir de hemocultivos (Kayin, Mert, Aydemir y Özenci, 2019). Hasta el momento, los artículos publicados han mostrado resultados variables en el rendimiento de diversos métodos de preparación que oscilan entre el 61 y el 98 % (De Carolis et al., 2014), por lo que los resultados obtenidos en el presente estudio se ubican dentro un nivel satisfactorio según estos datos.

Es importante destacar que el volumen de muestra empleado para la extracción refleja el tamaño del inóculo y este probablemente sea uno de los factores más importantes en el rendimiento del MALDI-TOF MS directo a partir de métodos de hemocultivo, ya que a mayor volumen obtiene mayor cantidad de las proteínas bacterianas para la generación de espectros y la consecuente identificación. Estudios previos incluyeron un rango de volúmenes de muestra de 0,2 (Ferroni et al., 2010) a 8 ml (Stevenson, Drake y Murray, 2010). Los datos actuales con rendimientos más altos con el Rapid BACpro® II y el kit

Sepsityper® muestran que el volumen de muestra de 1 ml es suficiente si el método de preparación es efectivo (Kayin, Mert, Aydemir y Özenci, 2019), el cual fue el volumen empleado en el presente trabajo. La escasa concentración de bacterias en los frascos de hemocultivo, así como los perfiles proteómicos insuficientes en la base de datos, teóricamente podrían explicar la obtención de identificaciones no confiables (Stevenson, Drake y Murray, 2010). Se considera necesaria una concentración mínima de  $10^6$  UFC/mL para obtener espectros de alta calidad (Stevenson, Drake y Murray, 2010; Christner et al., 2010); sin embargo, algunos autores informan una mayor sensibilidad de MALDI-TOF MS con suficiente relación señal-ruido generada a partir de una muestra que contenga al menos  $10^4$  UFC/mL (Demirev y Fenselau, 2008).

Se debe tomar en cuenta que además de estas implicaciones del volumen de muestra, el ratio de biomasa entre las células sanguíneas y los microorganismos en un hemocultivo positivo es mucho mayor que 1:1000, en donde las células humanas están en extremo exceso sobre las células bacterianas. Esto hace esperable que los espectros de biomasa resultantes presenten una menor calidad en comparación con la identificación a partir de colonias crecidas cultivo puro, ya que la cantidad de células sanguíneas remanentes pueden resultar en picos de masa adicionales. Es decir que el volumen de muestra no solamente es el aspecto más determinante del rendimiento del método, sino que al mismo tiempo es el que podría generar mayor interferencia.

La reducción en la calidad de los espectros deriva en una reducción en su resolución para especies estrechamente relacionadas. Esta relación entre espectros de masa de menor calidad; y por lo tanto peor resolución de espectros de especies, es muy común y una propiedad fundamental de los métodos de identificación basados en MALDI-TOF MS y por lo tanto, esperable.

Barnini et al. (2015) mencionan que entre posibles factores influyentes en el rendimiento se encuentra una dependencia del tiempo durante el proceso de extracción, ya que en su método observaron que una prolongación del tiempo de reacción con acetonitrilo (agente para extracción de proteínas, en su caso) durante solo unos minutos influyó en la identificación proporcionando resultados inconsistentes. Algunos otros puntos excluyentes fueron la necesidad de una mezcla absolutamente cuidadosa de los *pellets* durante la

extracción y, en algunos casos, el ajuste de los volúmenes de ácido fórmico y acetonitrilo agregado dependiendo de los tamaños variables de los *pellets*; ya que las botellas de hemocultivo son inoculadas a partir de muestras sanguíneas de pacientes con distintos valores de hematocrito, leucocitos y otros interferentes. Estos podrían ser factores a considerar en el análisis de los resultados de exactitud obtenidos en el presente estudio y en la posible optimización del procedimiento propuesto, efectuando un ajuste de los volúmenes de tritón y ácido acético de forma proporcional al *pellet* obtenido.

Casi todos los estudios publicados anteriormente han demostrado que la identificación de bacterias Gram negativas es más exitosa que la de bacterias Gram positivas mediante MALDI-TOF MS directa a partir de hemocultivos (Faron, Buchan y Ledebøer, 2017; Bazzi et al., 2016). Aunque se desconoce la razón subyacente de esta discrepancia, es razonable sugerir que los componentes de la pared celular bacteriana pueden generar interferencias (Kayin, Mert, Aydemir y Özenci, 2019). Sin embargo, los resultados de exactitud del presente estudio de 81.7% contra 77.3% respectivamente, no poseen una diferencia estadística significativa que concuerde con este hallazgo; pero se mantienen como un aspecto a considerar en el contexto de una posible optimización e implementación a futuro de un método de extracción directa.

Robinson y Ussher (2016) indican que de los aislamientos que no lograron identificar con su método de extracción con SDS y centrifugación diferencial, la mayoría se trató de Gram positivos, principalmente *S. epidermidis* y *S. pneumoniae*. La menor identificación de estas bacterias podría estar relacionada con menores concentraciones en los hemocultivos al momento de la positividad (De Cueto et al., 2004, Tan et al., 2008), mayor cantidad de peptidoglicán en la pared proveyendo mayor resistencia a la lisis y una presencia aumentada de proteínas sanguíneas residuales que tienen mayor propensión a adherirse a bacterias Gram positivas (Schubert et al. 2011).

Respecto a esta menor exactitud para el caso de los Gram positivos, es oportuno mencionar que es ampliamente reconocido que los estreptococos del grupo viridans son difíciles de identificar a nivel de especie. Aunque MALDI-TOF se ha reconocido como un método prometedor para superar esta dificultad, puede verse afectado, por ejemplo, por una mala resolución de *Streptococcus mitis* de *S. pneumoniae*, de manera similar a la

identificación basada en la secuencia del gen ARNr 16S. Jakovljević y Bergh (2015) hipotetizan que el material proteómico insuficiente, posiblemente debido a la autólisis, podría ser una explicación. Prod'homme G et al. (2010) informaron una proporción similar de resultados negativos donde 8/10 aislamientos de *S. pneumoniae* no alcanzaron puntuaciones válidas (Jakovljević y Bergh, 2015).

La identificación de estreptococos también ha sido problemática en otros estudios que utilizan MALDI-TOF (Kok et al., 2011) y se ha sugerido que hasta que las bases de datos MALDI-TOF se amplíen para incluir más espectros de especies de estreptococos bien identificadas, esta técnica no es adecuada para la identificación de estreptococos (Van Veen, Claas y Kuijper, 2010). Sin embargo, aunque una identificación directa de un hemocultivo para el cual la tinción de Gram mostró estreptococos probables no confirmaría la presencia/ausencia de *S. pneumoniae*, probablemente excluiría o confirmaría la presencia de una especie de *Enterococcus* o *Streptococcus* β-hemolítico, lo cual sería un dato valioso para el manejo de la infección (Martiny, Dediste y Vandenberg, 2012).

Otro factor que podría pensarse influyente en los resultados es el de la incubación adicional de las botellas de hemocultivo, desde la positividad hasta el montaje mediante el método propuesto ya que al trabajar con los hemocultivos positivos del día anterior este tiempo era variable para cada uno. Se ha reportado previamente que se obtiene menores identificaciones con el sistema VITEK MALDI-TOF MS al emplear hemocultivos viejos que con hemocultivos frescos (Robinson y Ussher, 2016). Sin embargo Martiny, Dediste y Vandenberg (2012) observaron que el tiempo de incubación adicional no pareció afectar la tasa de identificaciones correctas de especies de su método propuesto (lisis con saponina). Sin embargo, dicha evaluación debe realizarse preferentemente sobre un mayor número de aislamientos y para cada especie por separado a fin de obtener conclusiones precisas.

Otro desafío con el uso del MALDI-TOF MS directamente de hemocultivos es el análisis de los resultados de la prueba. Las puntuaciones obtenidas directamente de muestras clínicas suelen ser más bajas que el uso de cultivos puros de placas de agar (Kayin, Mert, Aydemir y Özenci, 2019), por lo que debe tenerse en cuenta al observar menor calidad de los espectros y por lo tanto de los porcentajes de identificación.

En cuanto a las limitaciones, este trabajo no incluyó hemocultivos con crecimiento polimicrobiano o levaduras; sin embargo, el objetivo del estudio era determinar el rendimiento del método en términos generales y es sabido que el software de análisis de datos MALDI-TOF MS actual no puede identificar de forma fiable todos los microorganismos presentes en los hemocultivos polimicrobianos (Hong., Chang, Song y Kim, 2014). Asimismo, la utilización de únicamente hemocultivos monomicrobianos no constituye un inconveniente significativo ya que solo una minoría de hemocultivos positivos involucra más de una especie (Lamy et al., 2020). Sin embargo, cabe mencionar que cuando se analiza un hemocultivo positivo que contiene varios microorganismos, el MALDI-TOF MS generalmente conduce a la identificación exitosa de la especie predominante y existen varios reportes que indican que no hubo una identificación errónea como resultado de la presencia concomitante de varias especies de bacterias empleando el sistema Microflex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) (Martiny, Dediste y Vandenberg, 2012).

Cabe destacar que la identificación de microorganismos por espectrometría de masas se basa en su proteoma, el cual se define como la serie completa de proteínas que son sintetizadas por la célula en un momento dado. Es decir que el proteoma está sujeto a modificaciones según las condiciones de crecimiento en las que se encuentren las bacterias. Por lo tanto, la temperatura y tiempos de incubación y el medio de cultivo deben mantenerse lo más estables posible para obtener resultados de identificación confiables y reproducibles. Para las bacterias, la mayoría de biomarcadores empleados en su identificación son proteínas ribosomales y se conoce que estas varían su expresión bajo el déficit de nutrientes o condiciones de estrés por temperaturas bajas. Incluso, para prevenir identificaciones erróneas, los cultivos no deben ser expuestos a almacenamiento en frío y los microorganismos que no puedan ser identificados de forma inmediata deben preservarse en etanol 70% (Pavlovic, Huber, Konrad y Busch, 2013). Se debe considerar que este trabajo se desarrolló como un estudio piloto, en el que las extracciones proteicas a partir de las botellas de hemocultivo positivas se realizaban al día siguiente de la positividad de las mismas y que por lo tanto, la proteómica bacteriana naturalmente se vio modificada, afectando el rendimiento obtenido. Bazzi et al. (2012) emplearon una centrífuga refrigerada; que debido a limitaciones de equipo no pudo ser empleada para el desarrollo de

este trabajo, pero se desconoce el impacto que podría implicar esta medida; sin embargo, la mayoría de estudios revisados no utilizan este tipo de equipo. En una implementación del método propuesto, la extracción sería efectuada de forma más inmediata y con mayor homogeneidad en las condiciones de procesamiento para cada cultivo, por lo que sería de esperarse resultados de calidad superior.

Por otro lado, Martiny, Dediste y Vandenberg, (2012) incluyeron el análisis de cinco hemocultivos negativos que dieron lugar a perfiles espectrales similares. Esto sugiere que el desarrollo de un algoritmo que permita discriminar varias especies de un mismo espectro también podría ser de ayuda para la identificación bacteriana directa a partir de hemocultivos positivos (discriminación de proteínas sanguíneas de proteínas bacterianas).

Respecto a las ventajas del método propuesto en este trabajo, la más significativa es el poco tiempo de procesamiento requerido por muestra (menos de 15 minutos) en comparación con los métodos comerciales; además de la drástica reducción en el tiempo de respuesta para el reporte de la identificación bacteriana, después de que se presente la positividad de un hemocultivo. El tiempo de análisis se reduce porque no incluye un procedimiento de extracción muy prolongado (Martiny, Dediste y Vandenberg, 2012); y además de la rapidez, el método requiere la utilización de insumos baratos, como lo son el ácido acético y tritón. A modo de ejemplo, Martiny, Dediste y Vandenberg (2012) encontraron que su método interno es 10 veces más barato que la opción comercial (0.72 vs. 7.45 €/análisis) y su tiempo de procesamiento fue de aproximadamente 20 minutos contra los 40 minutos requeridos por el kit Sepsityper™ (Martiny, Dediste y Vandenberg, 2012).

Además, es importante mencionar que aunque una identificación rápida mediante el sistema MALDI-TOF MS no proporciona información sobre el perfil de susceptibilidad antimicrobiana del organismo, una técnica de identificación rápida puede ofrecer varias ventajas. En primer lugar, puede permitir el uso de un antimicrobiano de espectro más reducido, incluso antes de obtener los resultados de las pruebas de susceptibilidad, esto con base en el PROA y la epidemiología local del centro de salud. Asimismo, la identificación rápida puede ayudar al médico a identificar la fuente de la infección, reduciendo así los costos asociados a estudios complementarios (Martiny, Dediste y Vandenberg, 2012),

además de que la identificación rápida permite la detección temprana de brotes, pudiendo optar por medidas de contingencia de forma oportuna.

En el presente estudio, se observa que en los casos en los que se logró la identificación directamente de las botellas de hemocultivo positivas, se presentó una concordancia completa con los resultados obtenidos tanto por el método estándar como por las pruebas moleculares. Superando inclusive los resultados del panel en casos en que este solamente permite reportar el género del microorganismo. Dado que los métodos basados en MALDI-TOF MS proporcionan la identificación a partir de hemocultivos positivos en un tiempo similar a las pruebas moleculares para una gama más amplia de microorganismos, con un costo mucho menor y con la posibilidad de combinarlo con una PSA rápida, las ventajas de los sistemas moleculares no son claramente reconocibles (Lamy et al., 2020). Hasta ahora, se ha demostrado que la detección del patógeno causante de infección del torrente sanguíneo mediante técnicas moleculares es subóptima y el hemocultivo sigue siendo el estándar de referencia y la herramienta de primera línea en el diagnóstico de sepsis (Rhodes et al., 2016).

En los últimos años al menos dos metanálisis han demostrado tanto la rentabilidad como las mejoras terapéuticas cuando se utilizan métodos rápidos de identificación de microorganismos (Pliakos et al., 2018). El impacto aún leve sobre la mortalidad se debe en parte al hecho de que a pesar de las mejoras, aún no hay suficiente rapidez antes y después de producir los resultados, ya que prácticamente todos los estudios se han realizado sin optimizar el tiempo de carga de botellas y; lo que es más importante, la mortalidad se redujo solo cuando los métodos rápidos se acompañaron con administración de terapia antimicrobiana (Timbrook et al., 2017). Por ejemplo, es de considerar que solo el 42 % de los laboratorios europeos insertan botellas de hemocultivo las 24 horas del día y solo el 13 % inicia el procesamiento de las botellas positivas las 24 horas, y menos del 5 % establece un servicio de 24 horas para la validación y transmisión de la identificación y los resultados de PSA a los médicos (Idelevich et al., 2019), por lo que estos factores son los primeros pasos por mejorar en el procesamiento de estas muestras (Lamy et al., 2020).

Es decir que estos desarrollos técnicos su vez a exigen mejoras en todos los demás aspectos, especialmente en la logística preanalítica y postanalítica, incluyendo desde el

muestreo hasta el informe de resultados; de forma que se pueda promover una plena reciprocidad de estas técnicas en el manejo del paciente. El progreso en el diagnóstico de patógenos se basa en la optimización de los parámetros preanalíticos, el inicio rápido de la incubación, el uso de métodos rápidos, y la reorganización en aspectos como el transporte de muestras y una relación y comunicación estrecha con los equipos PROA de cada centro de salud (Lamy et al., 2020).

Por lo tanto, la implementación de este tipo de métodos sería oportuna en centros de salud que como en el que se desarrolló este estudio, cuenten con un equipo PROA establecido, donde se realicen estudios de epidemiología local y se encuentren consolidados buenos flujos de trabajo y sistemas de comunicación entre los médicos y el laboratorio. El hecho de que existan tres turnos laborales que emiten resultados de identificación y PSA con reporte inmediato a los médicos, presenta las condiciones idóneas para el aprovechamiento de un método de identificación a partir de extracción directa de las botellas de hemocultivo positivas.

La alta variabilidad en la utilidad, la difusión y el costo de las nuevas técnicas como el MALDI-TOF MS, hace que sea difícil definir el estándar actual de diagnóstico de patógenos del torrente sanguíneo. A falta de directrices específicas, los nuevos métodos se han adoptado de forma muy diferente (Idelevich et al., 2019).

## 9. Conclusiones

Este trabajo demostró la posibilidad de desarrollar un protocolo para la extracción e identificación directa a partir de las botellas positivas de hemocultivo empleando el sistema VITEK MALDI-TOF MS en un laboratorio de Microbiología Clínica de un hospital de Clase A. Además, los resultados obtenidos presentaron completa concordancia con el método estándar empleado en el centro hospitalario así como con las pruebas moleculares, siendo superior a estas últimas en el caso de microorganismos no incluidos en los paneles. Por otra parte, el desempeño observado es comparable con el reportado para otros métodos de extracción, ubicándose en niveles satisfactorios y con alta probabilidad de mejora en el caso de una implementación. Por lo anterior, los datos derivados de este trabajo podrían funcionar como base para una posible implementación que considere las optimizaciones correspondientes y según las capacidades de los servicios interesados.

Estos hallazgos presentan la oportunidad de incorporar un método de identificación rápida y precisa de los agentes causantes de infecciones del torrente sanguíneo en la rutina de un laboratorio de Microbiología Clínica que reúna las condiciones óptimas de funcionamiento; incluyendo personal calificado en tres jornadas laborales que emiten resultados de identificaciones y PSA de forma inmediata, donde se trabaja en la mejora continua en todos los pasos preanalíticos, que cuente buenos sistemas de comunicación entre los médicos y el laboratorio y con un equipo PROA con gestión y actualización de la epidemiología local de forma periódica. Según lo reportado por los estudios supra citados esto podría tener un impacto muy positivo en el manejo de los pacientes que presentan estas infecciones, además de tener efecto en la epidemiología local y posiblemente amortiguar la creciente problemática de la resistencia a los antimicrobianos al prevenir la utilización innecesaria de antibióticos de amplio espectro. Genera además, un panorama optimista sobre la implementación y aprovechamiento de las tecnologías modernas de las que ya se dispone y sus ventajas aún en el contexto de laboratorios de países subdesarrollados.

Se debe considerar que a pesar de sus grandes ventajas, los métodos rápidos son en general complementarios a los métodos estándar y que sus resultados deben de manejarse en estrecha comunicación con los médicos y los equipos PROA, de forma que los recursos y las ventajas de estos sean realmente aprovechados; todo orientado a la mejora continua en

la atención a los pacientes; ya que el hemocultivo se mantiene como el estándar de oro para el diagnóstico de estas infecciones (Özenci y Rossolini, 2019; Özenci y Strålin, 2019).

## 10. Referencias

- Almuhayawi, M., Altun, O., Stralin, K. y Ozenci, V. (2014). Identification of microorganisms by FilmArray and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry prior to positivity in the blood culture system. *J Clin Microbiol*; 52:3230–3236.
- Altun, O., Almuhayawi, M., Ullberg, M. y Ozenci, V. (2013). Clinical evaluation of the FilmArray blood culture identification panel in identification of bacteria and yeasts from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol*; 51:4130–4136.
- Altun, O., Almuhayawi, M., Ullberg, M. y Özenci, V. (2015). Rapid identification of microorganisms from sterile body fluids by use of FilmArray. *J Clin Microbiol*; 53(2):710–712.
- Angus, D.C. y van der Poll, T. (2013). Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*; 369:840–851.
- Anson, L.W., Chau, K., Sanderson, N., Hoosdally, S., Bradley, P. et al. (2018). DNA extraction from primary liquid blood cultures for bloodstream infection diagnosis using whole genome sequencing. *J Med Microbiol*; 67:347–357.
- Ashikawa, S. et al. (2018). Rapid identification of pathogens from positive blood culture bottles with the MinION nanopore sequencer. *Journal of Medical Microbiology*; 67:1589–1595.
- Barnini, S., Ghelardi, E., Brucculeri, V., Morici, P. y Lupetti, A. (2015). Rapid and reliable identification of Gram-negative bacteria and Gram-positive cocci by deposition of bacteria harvested from blood cultures onto the MALDI TOF plate. *BMC Microbiol*.;15:124.
- Bazzi, A.M. et al. (2016). Comparison among four proposed direct blood culture microbial identification methods using MALDI-TOF MS. *J Infect Public Health* (2016).

- Bloos, F., Sachse, S., Kortgen, A., Pletz, M.W., Lehmann, M. 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.
- Buehler, S. S. et al. (2016). Effectiveness of Practices to Increase Timeliness of Providing Targeted Therapy for Inpatients with Bloodstream Infections: A Laboratory Medicine Best Practices Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Microbiol Rev*; 29: 59–103.
- Cao, M.D., Ganesamoorthy, D., Elliott, A.G., Zhang, H., Cooper, M.A. et al. (2016). Streaming algorithms for identification of pathogens and antibiotic resistance potential from real-time MinION(TM) sequencing. *Gigascience*; 5:32.
- Cassini, A. et al. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis*; 19, 56–66.
- Cattoir, L., Coorevits, L., Leroux-Roels, I., Claeys, G., Verhasselt, B. y Boelens, J. (2018). Improving timelines in reporting results from positive blood cultures: simulation of impact of rapid identification on therapy on a real-life cohort. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 37(12):2253–2260.
- Cawcutt, K.A. y Peters, S.G. (2014). Severe sepsis and septic shock: clinical overview and update on management. *Mayo Clin Proc*; 89:1572–1578.
- Chen, J.H., Ho, P.L., Kwan, G.S., She, K.K., Siu, G.K., Cheng, V.C., et al. (2013). Direct bacterial identification in positive blood cultures by Use of Two commercial matrixassisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems. *J Clin Microbiol.*; 51(6):1733–9.
- Christner, M., Rohde, H., Wolters, M., Sobottka, I., Wegscheider, K. y Aepfelbacher, M. (2010). Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by Use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. *J Clin Microbiol.*;48(5):1584–91

- Clerc, O., Prod'hom, G., Vogne, C., Bizzini, A., Calandra, T. y Greub, G. (2013). Impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with gram-negative bacteremia: a prospective observational study. *Clin Infect Dis.*; 56(8):1101–7.
- De Carolis, E., Vella, A., Vaccaro, L., Torelli, R., Spanu, T., Fiori, B. et al. (2014). Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *J Infect Dev Ctries*; 8(9):1081–1088.
- De Groote, M.A. y Huitt, G. (2006). Infections due to rapidly growing mycobacteria. *Clin Infect Dis*; 42:1756–1763.
- Demirev, P.A. y Fenselau, C. (2008). Mass spectrometry for rapid characterization of microorganisms. *Annu Rev Anal Chem.*; 1:71–93.
- Di Gaudio, F., Indelicato, S., Indelicato, S., Tricoli, M.R., Stampone, G. y Bongiorno, D. (2018). Improvement of a rapid direct blood culture microbial identification protocol using MALDI-TOF MS and performance comparison with SepsiTyper kit. *Journal of Microbiological Methods*; 155: 1–7.
- Emonet, S., Charles, P.G., Harbarth, S., Stewardson, A.J., Renzi, G., Uckay, I., et al. (2016). Rapid molecular determination of methicillin resistance in staphylococcal bacteraemia improves early targeted antibiotic prescribing: a randomized clinical trial. *Clin Microbiol Infect*; 22:946 e9ee15.
- Faron, M.L., Buchan, B.W. y Ledebor, N.A. (2017). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for use with positive blood cultures: methodology, performance, and optimization. *J Clin Microbiol*; 55(12):3328–3338.
- Fenollar, F. y Raoult, D. (2007). Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents*; 30 (1), S7–15.
- Ferroni, A., Suarez, S., Beretti, J.L., Dauphin, B., Bille, E., Meyer, J. et al. (2010). Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*; 48(5):1542–1548.

- Fleischmann, C. et al. (2016). Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med* 193, 259–272.
- Fothergill, A., Kasinathan, V., Hyman, J., Walsh, J., Drake, T., y Wang, Y. F. (2013). Rapid identification of bacteria and yeasts from positive-blood-culture bottles by using a lysis-filtration method and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum analysis with the SARAMIS database. *J. Clin. Microbiol.*; 51: 805–809.
- Fox, G.E., Wisotzkey, J.D. y Jurtshuk, P. (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol*; 42:166–1790.
- Goto, M. y Al-Hasan, M.N. (2013) Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in North America and Europe. *Hawiger*
- Hawiger, J., Veach, R.A. y Zienkiewicz, J. (2015) New paradigms in sepsis: from prevention to protection of failing microcirculation. *J Thromb Haemost*;13(10):1743—56.
- Hayakawa, K., Mezaki, K., Kobayakawa, M., Yamamoto, K., Mutoh, Y. et al. (2017). A prospective study of community-onset bacteremia in a tertiary hospital in Japan. *PLoS One*; 12:e0181548.
- Hong, S. K., Chang, B. K., Song, S. H., y Kim, E. C. (2014). Use of MALDI-TOF MS technique for rapid identification of bacteria from positive blood cultures. *Indian journal of medical microbiology*, 32(4), 419–422.
- Huang, A.M., Newton, D., Kunapuli, A., Gandhi, T.N., Washer, L.L., Isip, J., et al. (2013). Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. *Clin Infect Dis.*;57(9):1237–45.

- Idelevich, E.A., Seifert, H., Sundqvist, M., Scudeller, L., Amit, S., Balode, A., et al. (2019). Microbiological diagnostics of bloodstream infections in Europe-an ESGBIES survey. *Clin Microbiol Infect*; 25:1399e407
- Jakovljević, A. y Bergh, K. (2015). Development of a rapid and simplified protocol for direct bacterial identification from positive blood cultures by using matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Jakovljević and Bergh BMC Microbiology*; 15:258.
- Juiz, P.M., Almela, M., Melción, C., Campo, I., Esteban, C., Pitart, C., et al. (2012). A comparative study of two different methods of sample preparation for positive blood cultures for the rapid identification of bacteria using MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 31:1353–8.
- Kayin, M., Mert, B., Aydemir, S. y Özenci, V. (2019). Comparison of rapid BACpro® II, Sepsityper® kit and in-house preparation methods for direct identification of bacteria from blood cultures by MALDI-TOF MS with and without Sepsityper® module analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 38: 2133–2143.
- Kissoon, N. y Carapetis, J. (2015). Pediatric sepsis in the developing world. *J Infect*; 5(71 Suppl. 1):S21—6.
- Kok, J., Thomas, L.C., Olma, T., Chen, S.C.A. y Iredell, J.R. (2011). Identification of bacteria in blood culture broths using matrix assisted laser desorption-ionization Sepsityper™ and time of flight mass spectrometry. *PLOS ONE*; 6(8):e23285.
- Krishnamurthy, T. y Ross, P.L. (1996). Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid Commun Mass Spectrom*; 10(15):1992–1996.
- Kumar, A., Ellis, M. P., Arabi, Y., Roberts, D., Light, B., Parrillo, J.E., et al. (2009). Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest*; 136(5):1237—48.
- 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(6): 1589—96.
- Lagacé-Wiens, P.R., Adam, H.J., Karlowsky, J.A., Nichol, K.A., Pang, P.F., Guenther, J. et al (2012). Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: analysis of performance, cost, and turnaround time. *J Clin Microbiol*; 50 (10):3324–3328.
- Lamy, B. et al. (2020). Bloodstream infections e Standard and progress in pathogen diagnostics. *Clinical Microbiology and Infection*; 26: 142–150.
- Lucignano, B., Ranno, S., Liesenfeld, O., Pizzorno, B., Putignani, L., Bernaschi, P., Menichella, D., (2011). Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. *J. Clin. Microbiol.*; 49 (6), 2252–2258.
- Martinez, R.M. y Wolk, D.M. (2016). Bloodstream infections. *Microbiol Spectrum* 4(4): DMIH2-0031-2016.
- Martiny, D. et al. (2013). Impact of rapid microbial identification directly from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry on patient management. *Clin Microbiol Infect*; 19:568–581.
- Martiny, D., Debaugnies, F., Gateff, D., Gérard, M., Aoun, M., Martin, C., et al. (2013). Impact of rapid microbial identification directly from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry on patient management. *Clin Microbiol Infect.*;19:E568–81.
- Martiny, D., Dediste, A. y Vandenberg, O. (2012). Comparison of an in-house method and the commercial Sepsityper™ kit for bacterial identification directly from positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 31: 2269–2281.
- Meex,C., Neuville, F., Descy, J., Huynen, P., Hayette, M.P., De Mol, P. et al. (2012). Direct identification of bacteria from BacT/ALERT anaerobic positive blood

- cultures by MALDI-TOF MS: MALDI Sepsityper kit versus an in-house saponin method for bacterial extraction. *J Med Microbiol.*;61:1511–6.
- Morgenthaler, N.G. y Kostrzewa, M. (2015). Rapid identification of pathogens in positive blood culture of patients with sepsis: review and meta-analysis of the performance of the Sepsityper kit. *Int J Microbiol.*:827416.
- Moussaoui, W., Jaulhac, B., Hoffmann, A. M., Ludes, B., Kostrzewa, M., Riegel, P., et al. (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clin. Microbiol. Infect.*; 16: 1631–1638.
- Moussaoui, W., Jaulhac, B., Hoffmann, A.M., Ludes, B., Kostrzewa, M., Riegel, P. et al. (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90 % of bacteria directly from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect.*;16:1631–8.
- Nguyen, H.B., Rivers, E.P., Knoblich, B.P., Jacobsen, G., Muzzin, A., Ressler, J.A. y Tomlanovich, M.C. (2004). Early lactate clearance is associated with improved outcome in severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*; 32:1637–1642.
- NORM/NORM-VET (2013). Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. Tromsø / Oslo 2014. ISSN:1502–2307 (print)/ 1890–9965 (electronic). This report is available at [www.vetinst.no](http://www.vetinst.no) and [www.antibiotikaresistens.no](http://www.antibiotikaresistens.no)
- Opota, O., Croxatto, A., Prod'hom, G. y Greub, G. (2015). Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: State of the art. *Clin. Microbiol. Infect.*: 21, 313–322.
- Oviaño, M., Ingebretsen, A., Steffensen, A.K., Croxatto, A., Prod'hom, G., Quiroga, L., Bou, G., Greub, G., Rodríguez-Temporal, D. y Rodríguez-Sánchez, B. (2021). Multicenter Evaluation of Rapid BACpro® II for the Accurate Identification of Microorganisms Directly from Blood Cultures Using MALDI-TOF MS. *Diagnostics*, 11, 2251.

- Özenci, V. y Rossolini, G.M. (2019). Rapid microbial identification and antimicrobial susceptibility testing to drive better patient care: an evolving scenario. *J Antimicrob Chemother*, 74(1):i2–i5.
- Özenci, V. y Strålin, K. (2019). Clinical implementation of molecular methods in detection of microorganisms from blood with a special focus on PCR electrospray ionization mass spectrometry. *Expert Rev Mol Diagn*; 19(5):389–395.
- Paauw, A., Caspers, M.P., Schuren, F.H., Leverstein-van Hall, M.A., Delétoile, A., Montijn, R.C., Verhoef, J. y Fluit, A.C. (2008). Genomic Diversity Within the Enterobacter cloacae Complex. *PLoS ONE*, 3, e3018.
- Palmer, H. R., Palavecino, E. L., Johnson, J. W., Ohl, C. A. y Williamson, J. C. (2013). Clinical and microbiological implications of time-topositivity of blood cultures in patients with Gram-negative bacilli bacteremia. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*; 32: 955–959.
- Pan, H., Li, W., Li, R., Li, Y., Zhang, Y. y Sun, E. (2018). Simple Sample Preparation Method for Direct Microbial Identification and Susceptibility Testing From Positive Blood Cultures. *Front. Microbiol.* 9:481.
- Pavlovic, M., Huber, I., Konrad, R. y Busch, U. (2013). Application of MALDI-TOF MS for the Identification of Food Borne Bacteria. *The Open Microbiology Journal*, 7, 135-141.
- Pliakos, E.E., Andreatos, N., Shehadeh, F., Ziakas, P.D., Mylonakis, E. (2018). The cost effectiveness of rapid diagnostic testing for the diagnosis of bloodstream infections with or without antimicrobial stewardship. *Clin Microbiol Rev*;31.
- Prod'hom, G., Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J. y Greub, G. (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization –time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol.*;48(4):1481–83.
- Quick, J., Ashton, P., Calus, S., Chatt, C., Gossain, S. et al. (2015). Rapid draft sequencing and real-time nanopore sequencing in a hospital outbreak of Salmonella. *Genome Biol*; 16:114.

- Ramphal, R. (2004). Changes in the etiology of bacteremia in febrile neutropenic patients and the susceptibilities of the currently isolated pathogens. *Clin Infect Dis*; 39 (1):25–31.
- Reinhart, K. et al. (2017). Recognizing Sepsis as a Global Health Priority — A WHO Resolution. *New England Journal of Medicine*; 377, 414–417.
- Rhodes, A., Evans, L.E., Alhazzani, W., Levy, M.M., Antonelli, M., Ferrer, R., et al. (2016). Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock. *Intensive Care Med*; 43:304e77. 2017
- Robinson, A.M. y Ussher, J.E. (2016). Preparation of positive blood cultures for direct MALDI-ToF MS identification, *Journal of Microbiological Methods*; 127: 74-76.
- Rodriguez-Sanchez, B., Cercenado, E., Coste, A.T. y Greub, G. (2018). Review of the impact of MALDI-TOF MS in public health and hospital hygiene. *Euro Surveill.*; 24.
- Schieffer, K.M., Tan, K.E., Stamper, P.D., Somogyi, A., Andrea, S.B., Wakefield, T., Romagnoli, M., Chapin, K.C., Wolk, D.M. y Carroll, KC. (2014). Multicenter evaluation of the Sepsityper extraction kit and MALDI-TOF MS for direct identification of positive blood culture isolates using the BD BACTEC™ FX and VersaTREK® diagnostic blood culture systems. *J Appl Microbiol*; 116:934–941.
- Schubert, S., Weinert, K., Wagner, C., Gunzl, B., Wieser, A., Maier, T., y Kostrzewa, M. (2011). Novel, improved sample preparation for rapid, direct identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *The Journal of molecular diagnostics: JMD*, 13(6), 701–706.
- Sharma, S. y Kumar, A. (2008). Antimicrobial management of sepsis and septic shock. *Clin Chest Med*; 29:677–687. ix
- Stathopoulos, P.B., Scholz, G.A., Hwang, Y.M., Rumfeldt, J.A., Lepock, J.M. y Meiering, E.M. (2004). Sonication of proteins causes formation of aggregates that resemble amyloid. *Protein Sci.* 11, 3017–3027.

- Stevenson, L. G., Drake, S. K. y Murray, P. R. (2010). Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*; 48: 444–447.
- Stevenson, L.G., Drake, S.K. y Murray, P.R. (2010). Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.*;48(2):444–447.
- Taxt, A.M., Avershina, E., Frye, S.A., Naseer, U. y Ahmad, R. (2020). Rapid identification of pathogens, antibiotic resistance genes and plasmids in blood cultures by nanopore sequencing. *Scientific Reports Nature Research*; 10:762.
- Timbrook, T.T., Morton, J.B., McConeghy, K.W., Caffrey, A.R., Mylonakis, E. y LaPlante, K.L. (2017). The effect of molecular rapid diagnostic testing on clinical outcomes in bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*; 64:15e23.
- Timbrook TT, Morton JB, McConeghy KW, Caffrey AR, Mylonakis E, LaPlante KL. (2017). The effect of molecular rapid diagnostic testing on clinical outcomes in bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2017;64:15e23.
- Trung, N.T., Hien, T.T., Huyen, T.T., Quyen, D.T., van Son, T. et al. (2016). Enrichment of bacterial DNA for the diagnosis of blood stream infections. *BMC Infect Dis*;16:235.
- Unno, H., Inada, M., Nakamura, A., Hashimoto, M., Ito, K. et al. (2015). Improved rapid and efficient method for *Staphylococcus aureus* DNA extraction from milk for identification of mastitis pathogens. *J Vet Med Sci*; 77:1007–1009.
- Van Veen, S.Q., Claas, E.C. y Kuijper, E.J. (2010). High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*;48(3):900—7.
- Vlek, A.L., Bonten, M.J. y Boel, C.H. (2012). Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *PLoS ONE*; 7: e32589.

- Wang, W., Xi, H., Huang, M., Wang, J., Fan, M., Chen, Y., et al. (2014). Performance of mass spectrometric identification of bacteria and yeasts routinely isolated in a clinical microbiology laboratory using MALDI-TOF MS. *J Thorac Dis*;6(5):524—33.
- Wimmer, J. L., Long, S. W., Cernoch, P., Land, G. A., Davis, J. R., Musser, J. M., et al. (2012). Strategy for rapid identification and antibiotic susceptibility testing of gram-negative bacteria directly recovered from positive blood cultures using the Bruker MALDI Biotyper and the BD Phoenix system. *J. Clin. Microbiol*; 50: 2452–2454.
- Yonezawa, T., Watari, T., Ashizawa, K., Hanada, D., Yanagiya, T., Watanabe, N., et al (2018). Development of an improved rapid BACpro® protocol and a method for direct identification from blood-culture-positive bottles using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Microbiol Methods*; 148: 138–144.