



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

**Departamento de Anatomía Patológica, Microbiología, Medicina
Preventiva y Salud Pública, y Medicina Legal y Forense**

TESIS DOCTORAL

**NUEVOS PROTOCOLOS BASADOS EN
ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y CITOMETRÍA DE FLUJO
PARA UN DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO RÁPIDO**

Presentada por D. Gabriel Alberto March Rosselló para optar
al grado de Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Miguel Ángel Bratos Pérez y Raúl Ortiz de Lejarazu Leonardo



Universidad de Valladolid

Departamento de Anatomía Patológica,
Microbiología, Medicina Preventiva y Salud
Pública, y Medicina Legal y Forense

D. Miguel Ángel Bratos Pérez, Profesor Titular de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, y

D. Raúl Ortiz de Lejarazu Leonardo, Profesor Titular de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid,

HACEN CONSTAR:

Que D. Gabriel Alberto March Rosselló, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado “Nuevos protocolos basados en espectrometría de masas y citometría de flujo para un diagnóstico microbiológico rápido” y que hallándose concluido autorizan su presentación para que pueda ser juzgado por la Comisión correspondiente y el autor aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Valladolid.

Lo que certificamos en Valladolid a 25 de abril de 2014

Prof. Miguel Ángel Bratos Pérez

Prof. Raúl Ortiz de Lejarazu Leonardo

AGRADECIMIENTOS

En el momento de escribir los agradecimientos de esta tesis doctoral me he dado cuenta de la gran ayuda que he recibido de tanta gente, sin la cual este trabajo no habría llegado a finalizarse. Intentaré resumir, en unas líneas, la gratitud que siento hacia todas las personas que, de una forma u otra, me han acompañado en este camino.

A los codirectores de esta tesis, Dr. Bratos, por todo el tiempo y esfuerzo que me ha dedicado y Dr. Ortiz de Lejarazu, por su apoyo y consejos, y por haberme transmitido su visión y entusiasmo por del mundo de la investigación. Les agradezco que hayan creído en mí y que me hayan dado la posibilidad de poder investigar. Sin la inestimable ayuda de ambos no hubiera sido posible realizar esta tesis.

Al Dr. Eiros, por su constante ánimo y afecto mostrados desde el inicio de mi residencia. A todos los adjuntos del servicio de Microbiología del HCUV, Dr. Orduña, Dra. Álvarez, Dra. Rojo, Dra. Nocito, Dra. Merino, Dra. Tejero, Dra. Barrio, Dra. Gobernado y Dra. Nogueira. Gracias a todos ellos gracias por sus útiles consejos y apoyo. A la Dra García-Loygorri por el apoyo incondicional, resistencia, aguante y ayuda ofrecida.

Al personal del laboratorio de Microbiología del HCUV, por todo el tiempo y la paciencia con que me han enseñado el funcionamiento de los distintos instrumentos y metodologías del laboratorio. Sin su aportación y colaboración durante los cuatro años de mi residencia no habría sido posible completar mi formación. Quería agradecer especialmente a Epi por compartir conmigo “esos truquillos” que tanto me facilitaron el trabajo, y a la supervisora Ana Montoya por su eficiencia y disposición para atender las necesidades que me han ido surgiendo a lo largo de la realización de este trabajo.

A todo el personal del laboratorio de Urgencias del HCUV, quienes me han proporcionado una información muy valiosa acerca de diferentes técnicas instrumentales y siempre se han preocupado por el estado de la tesis doctoral.

A todos mis compañeros residentes, especialmente Anita, Cristina, Mar, Lisbeth e Iván por prestarme generosamente su tiempo, haber estado ahí para ayudarme cuando lo he necesitado y por todos esos buenos ratos que hemos pasado juntos que han hecho más llevadera la tarea.

Al equipo de la Unidad de Investigación del HCUV, formado por el Dr. Bermejo, la Dra. Almansa y la Dra. Muñoz, por su apoyo y sus aportaciones en la parte estadística del trabajo.

A la Dra. Gutiérrez y a la Dra. Simarro por su ayuda en la realización del trabajo experimental.

A mi padre y a Amparo por estar siempre ahí para resolver mis dudas y ayudarme con afecto y paciencia en la revisión de los cálculos analíticos.

A mi madre y a Abdi, por comprenderme y animarme en los momentos difíciles a seguir adelante con cariño y buen humor.

Y por último a mi familia, a mis amigos, y a todos los que de una u otra manera me han acompañado animándome y apoyándome en esta difícil labor que supone la elaboración de una tesis doctoral.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	5
ÍNDICE	7
INTRODUCCIÓN	11
TÉCNICAS ANALÍTICAS EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA	18
Espectrometría de masas (MALDI-TOF)	18
Citometría de flujo	22
TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN MICROBIANA EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA	25
Identificación microbiana directa	27
ANTIBIOGRAMA RÁPIDO EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA	32
Antibiograma directo	41
OBJETIVOS	47
MATERIAL Y MÉTODOS	51
IDENTIFICACIÓN MICROBIANA DIRECTA MEDIANTE MALDI-TOF	53
Identificación microbiana directa a partir de muestras de orina monomicrobianas	53
Identificación microbiana directa a partir de muestras de orina monomicrobianas preincubadas en caldo de enriquecimiento	56
Identificación microbiana directa a partir de medios de enriquecimiento	58
Identificación microbiana directa a partir de frascos de hemocultivo crecidos	59
Análisis mediante el equipo MALDI-TOF	61
ANTIBIOGRAMA RÁPIDO A PARTIR DEL FRASCO DEL HEMOCULTIVO CRECIDO	64
Diseño del sistema	64
Validación del sistema	67
RESULTADOS	71
IDENTIFICACIÓN MICROBIANA DIRECTA MEDIANTE EL SISTEMA MALDI-TOF	73
Identificación microbiana directa a partir de muestras de orina monomicrobianas	73
Identificación microbiana directa a partir de muestras de orina monomicrobianas preincubadas en caldo de enriquecimiento	79
Identificación microbiana directa a partir de medios de enriquecimiento	82
Identificación microbiana directa a partir de frascos de hemocultivo crecidos	84
ANTIBIOGRAMA RÁPIDO A PARTIR DEL FRASCO DE HEMOCULTIVO CRECIDO	86
Determinación del inóculo	86
Determinación del criterio de interpretación de susceptibilidad	87

Validación del sistema	94
DISCUSIÓN	101
IDENTIFICACIÓN MICROBIANA DIRECTA MEDIANTE EL SISTEMA MALDI-TOF	103
Identificación microbiana directa a partir de muestras de orina monomicrobianas	103
Identificación microbiana directa a partir de muestras de orina monomicrobianas preincubadas en caldo de enriquecimiento	108
Identificación microbiana directa a partir de medios de enriquecimiento	111
Identificación microbiana directa a partir de frascos de hemocultivo crecidos	112
ANTIBIOGRAMA RÁPIDO A PARTIR DEL FRASCO DE HEMOCULTIVO CRECIDO	116
CONCLUSIONES	125
BIBLIOGRAFÍA	131
ANEXOS	147

INTRODUCCIÓN

A medida que aumenta la esperanza de vida y se incrementan los tratamientos agresivos e intervenciones terapéuticas, el número de pacientes susceptibles a padecer infecciones va aumentando. Paralelamente a esta situación se observa un importante aumento de las resistencias a los antibióticos por parte de los microorganismos que causan las infecciones, hecho que dificulta en gran medida la elección del antibiótico más adecuado para el tratamiento de estos pacientes [21]. La temprana administración de antibióticos adecuados conlleva una serie de importantes ventajas, como un aumento de la supervivencia de los pacientes que sufren infecciones graves y una considerable disminución del gasto sanitario dado que a los pacientes que reciben un tratamiento antimicrobiano rápido y adecuado se les realiza un menor número de analíticas y de técnicas invasivas, además de precisar estancias hospitalarias más cortas [7]. Asimismo, la temprana administración del antibiótico adecuado conlleva un retraso en la selección de cepas bacterianas resistentes; en este sentido, el cambio del tratamiento antimicrobiano empírico de amplio espectro a una terapia dirigida tan pronto como sea posible es una de las pocas medidas que se pueden adoptar, dado que la investigación sobre nuevos antibióticos está muy ralentizada. Durante los 14 años de este siglo XXI, la investigación en dicha área ha sido escasa; se han introducido en el mercado algunos agentes antibacterianos para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias grampositivas, como el linezolid en el año 2000, la daptomicina en el año 2003, la ceftarolina en el año 2010 y la fidaxomicina en el año 2012. Sin embargo, el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias gramnegativas resistentes a los antibióticos resulta a veces complicado por el limitado número de antimicrobianos disponibles en el mercado [121].

Una de las dificultades que deben superar los laboratorios de Microbiología Clínica es el dilatado tiempo que se requiere para emitir un informe con la identificación y la susceptibilidad a los antimicrobianos del microorganismo causante de la infección. Los métodos habituales precisan el crecimiento de los microorganismos en las placas

de aislamiento para poder proporcionar una información precisa y útil para el tratamiento del paciente. Como consecuencia, en muchos casos, los resultados microbiológicos están disponibles, como mínimo, a las 48 -72 horas de la llegada de las muestras al laboratorio.

Con el fin de disminuir los tiempos de respuesta y aumentar la fiabilidad de los resultados informados, los laboratorios de Microbiología van implantando progresivamente, nuevas metodologías analíticas más rápidas, además de automatizar diferentes procedimientos. Una de las primeras metodologías introducidas para llevar a cabo un diagnóstico microbiológico rápido son las técnicas de detección de antígenos específicos aplicadas directamente a diferentes muestras, como por ejemplo el líquido cefalorraquídeo [48]. Otras técnicas son: la cromatografía líquido-gas, con las que se realiza una identificación bacteriana mediante un análisis de lípidos de bacterias [25]; las técnicas de biología molecular, que realizan el estudio del material genético [123]; la citometría de flujo, técnica instrumental con la que se realiza un análisis óptico de las células individuales [2]; la espectrometría de masas, que permite la medición de iones derivados de proteínas de las bacterias [30]; los *microarrays*, sistemas utilizados para la identificación de genes con una expresión diferencial bajo condiciones distintas [29]; o la secuenciación masiva, técnica mediante la cual es posible secuenciar el genoma completo de microorganismos [167]. Por otra parte, los métodos automatizados se han aplicado, por ejemplo, en la determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos, en la siembra de las placas de aislamiento a partir de las muestras y en el procesamiento de los hemocultivos.

Las infecciones del tracto urinario (ITU) constituyen una de las patologías infecciosas más frecuentes, tanto en la comunidad como en el ámbito hospitalario [50]. La prevalencia de las ITU varía según la edad y el sexo de los pacientes: al menos un 20 % de las mujeres van a padecer una ITU con síntomas clínicos a lo largo de su vida, aproximadamente un 10 % de hombres y un 20 % de mujeres mayores de 65 años van a presentar episodios de bacteriuria, durante la edad pediátrica aproximadamente un 5 % de las niñas y un 2 % de los niños van a padecer una ITU; además, el 25 % de los procesos agudos tienden a desarrollar recurrencias [5, 153]. Aparte, existen factores

predisponentes como pueden ser la actividad sexual o la presencia de catéteres urinarios que son frecuentemente colonizados a los cinco días de su colocación [190].

Las ITU presentan un amplio espectro de síndromes clínicos, que van desde una bacteriuria asintomática hasta la sepsis, sepsis grave y shock séptico [184]. Así, se observa que en el 20 - 30 % de pacientes con sepsis, el foco de la misma es urinario [23]. A los pacientes con sepsis, inmediatamente después de la recogida de muestras de orina y de sangre, se les debe administrar una terapia antimicrobiana de amplio espectro por vía parental, dado que un adecuado tratamiento antibiótico administrado de forma precoz es un factor clave que contribuye a la evolución favorable [45]. Además, la administración de un antibiótico inadecuado en infecciones del tracto urinario graves conlleva un aumento de la tasa de mortalidad y está demostrado que los pacientes hospitalizados con bacteriuria tienen una mayor mortalidad que aquellos que no la presentan [55].

Las ITUs no complicadas adquiridas en la comunidad pueden ser tratadas empíricamente, no siendo necesaria la realización de un urocultivo. Sin embargo, en las ITUs recurrentes o nosocomiales se debe realizar un urocultivo; además, en el último caso, el tratamiento empírico debe ser realizado teniendo en cuenta la epidemiología propia del hospital y finalmente, el tratamiento debe ser modificado o no en función de las pruebas de susceptibilidad que se obtengan [142, 168]. Por lo tanto, con el fin de facilitar la correcta administración de antibióticos en estas infecciones, el laboratorio de Microbiología debe hacer un esfuerzo dirigido a reducir, al mínimo, el tiempo necesario para emitir un informe con la identificación, el recuento microbiano y la susceptibilidad del microorganismo causante de la infección.

La bacteriemia se define como la presencia de bacterias viables en la sangre. Los signos y los síntomas son muy variables o incluso inexistentes, como es el caso de las bacteriemias transitorias, que tienen lugar cuando las bacterias penetran en la sangre a través de un trauma mínimo de las membranas, como ocurre, por ejemplo, durante el cepillado de los dientes. Por otra parte, las bacteriemias pueden ser primarias o secundarias. En las primarias, las bacterias que colonizan el paciente pasan al torrente circulatorio y producen una infección sistémica. Un ejemplo de éstas es la coloniza-

ción de las fosas nasales por *Staphylococcus aureus* que, en situaciones de vulnerabilidad del paciente, puede pasar a sangre. Las bacteriemias secundarias son consecuencia de una infección en un tejido u órgano del paciente, como por ejemplo las bacteriemias por *Streptococcus pneumoniae* que ocurren en el contexto de una neumonía causada por este microorganismo. En cualquier caso, el paso de un microorganismo al torrente circulatorio siempre implica un aumento de la gravedad de la infección y por tanto un peor pronóstico de la misma [190].

Las bacteriemias se han convertido en una causa importante de morbi-mortalidad; el *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* muestra un incremento anual del 6,4 % de los episodios de bacteriemia en Europa durante los últimos años, además de un preocupante aumento del aislamiento de bacterias resistentes en la sangre, hecho que limita las opciones terapéuticas de estas infecciones [42]. La *Agency for Healthcare Research and Quality* observa que la tasa de mortalidad en pacientes con bacteriemia es ocho veces mayor que la de pacientes sin esta patología [56], pudiendo alcanzar hasta el 80 % [191]. Además, un tratamiento antimicrobiano empírico inadecuado es un importante factor predictor de muerte en este grupo de pacientes [100].

Por otra parte, la sepsis se define como un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica acompañado de un foco infeccioso demostrado o sospechado [110]. Los pacientes que sufren una sepsis suelen requerir el ingreso en unidades de cuidados intensivos y frecuentemente presentan bacteriemia [6]. La incidencia de sepsis ha aumentado en los últimos años, de tal forma que en Europa se estima en 90,4 casos por cada 100.000 habitantes [74]; además, su mortalidad es del 20 % al 50 %, convirtiéndose así en la segunda causa de muerte de los pacientes ingresados en las unidades de cuidados intensivos [132]. Diferentes autores concluyen que en los pacientes con sepsis, la pronta administración de antibióticos adecuados conlleva un aumento de la supervivencia. Se ha observado que un retraso de más de dos horas en la administración de la primera dosis de antibiótico desde la detección del shock séptico conduce a un aumento de la mortalidad [107]. También se ha notado que la administración de antibioterapia en la primera hora tras la hipotensión se asocia a una supervivencia del

79,9 %, y cada hora de retraso en la administración del antibiótico supone un descenso en la supervivencia del 7,6 % [104]. Además, la administración de un antimicrobiano durante la primera hora de la aparición de la sepsis conlleva una disminución de mortalidad, desde el 33,2 % entre los pacientes que no reciben un tratamiento durante esta primera hora hasta el 19,5 % entre los pacientes que sí lo reciben [70].

De lo expuesto se desprende que el hemocultivo es una de las armas diagnósticas más valiosas con las que cuenta el laboratorio de Microbiología Clínica. En las pasadas décadas se han producido numerosos avances en el manejo de los hemocultivos, desde la introducción de medios enriquecidos, pasando por la agitación continua de los frascos de cultivo y el desarrollo de programas que permiten una detección más rápida de crecimiento bacteriano [199]. Sin embargo, a pesar de estos avances tecnológicos, el éxito de esta prueba está directamente relacionado con el procedimiento utilizado para recoger la muestra de sangre. Uno de los factores más importantes para llegar al diagnóstico correcto es el volumen de sangre procesado. Está demostrado que se produce un incremento del 40 % en la tasa de hemocultivos positivos cuando se cultivan 20 ml de sangre en lugar de 10 ml. Este hecho es debido a que más de la mitad de los pacientes septicémicos portan menos de un microorganismo por ml de sangre [127]. Otro factor a tener en cuenta es la capacidad que tienen los diferentes frascos de hemocultivo comercializados para secuestrar el antibiótico presente en la sangre dado que, en los pacientes graves, se suele administrar la terapia antimicrobiana antes de la toma de muestras para la realización de los hemocultivos. Esta circunstancia dificulta el crecimiento de los microorganismos en el frasco de hemocultivo, de tal forma que incluso se puede dar el caso de que los microorganismos no crezcan. Con el fin de evitar esta situación, los diferentes fabricantes han incorporado a los frascos de hemocultivo varios productos que secuestran los antibióticos. De este modo, se ha observado que los frascos de hemocultivo de unas marcas comerciales muestran una mayor capacidad de recuperación de microorganismos y proporcionan lecturas positivas más precozmente que los de otras [199].

En síntesis, se puede afirmar que para los laboratorios de Microbiología Clínica es importante optimizar, en la medida de lo posible, los procedimientos de los hemo-

cultivos, además de realizar esfuerzos para adelantar los resultados de identificación y susceptibilidad a los antibióticos de los microorganismos crecidos en los mismos, por las evidentes ventajas que de ello se deriva.

TÉCNICAS ANALÍTICAS EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

Espectrometría de masas (MALDI-TOF)

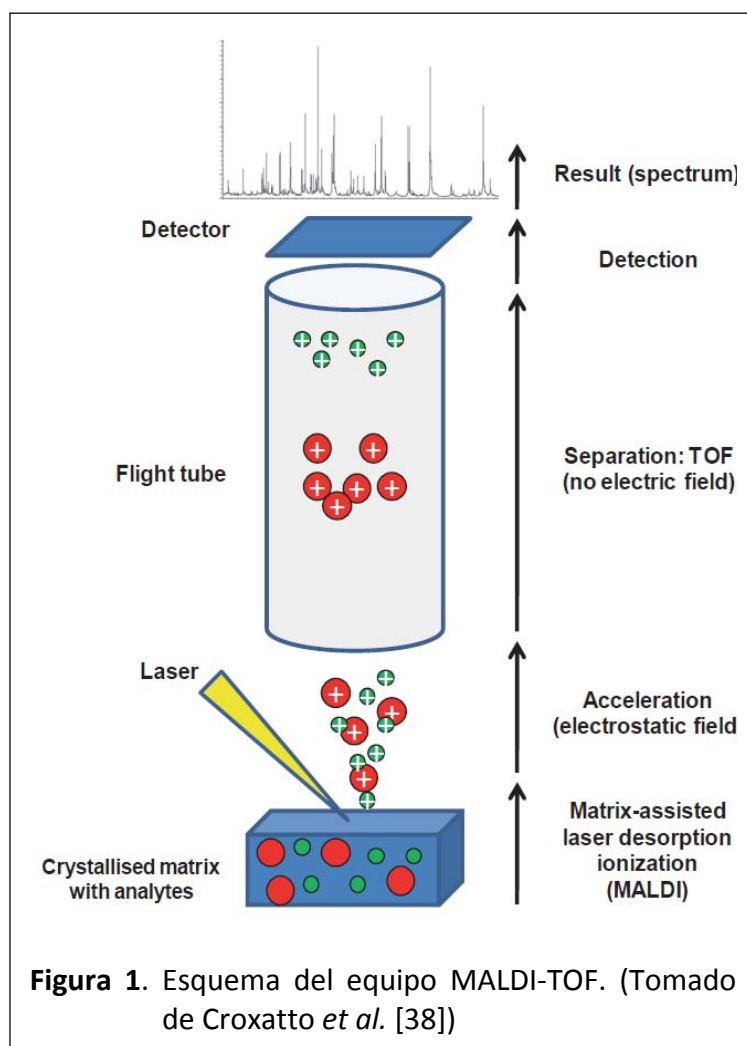
La espectrometría de masas es una técnica instrumental recientemente introducida en los laboratorios de Microbiología Clínica que presenta una alta sensibilidad, y es capaz de analizar cualitativa y cuantitativamente mezclas complejas de diversas sustancias. Asimismo, esta técnica también permite determinar la masa molecular de un compuesto, y la de los diversos fragmentos que resultan de la rotura del mismo, proporcionando una información muy valiosa sobre la estructura del compuesto inicial [27]. El sistema MALDI-TOF es una herramienta basada en la espectrometría de masas que permite obtener en unos minutos la identificación de microorganismos tales como bacterias (incluyendo micobacterias), levaduras y hongos filamentosos [73]. La denominación “MALDI” proviene de *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* y “TOF” alude al analizador de iones que se acopla al MALDI, que es del tipo de tiempo de vuelo (*Time of Flight*). Su desarrollo se remonta a finales de la década de los 80, cuando se observó que utilizando una fuente de láser ultravioleta y embebiendo la muestra en una matriz formada por moléculas aromáticas se conseguía una ionización blanda, proporcionando la fragmentación adecuada para la identificación de moléculas lábiles como proteínas, péptidos, azúcares y oligonucleótidos [38]. El desarrollo de la espectrometría de masas MALDI-TOF ha revolucionado la identificación de agentes infecciosos dado que es una técnica fácil de manejar, rápida, de bajo coste y muy eficiente que está desplazando la identificación basada en los métodos bioquímicos [164]. No obstante, la adquisición de un equipo MALDI-TOF requiere una relativamente importante inversión inicial.

Actualmente se han comercializado tres espectrómetros de masas MALDI-TOF que permiten la identificación de microorganismos, el MALDI BioTyper (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania), Vitek MS (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Francia) y el

MALDI micro MX (Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU.). Estos equipos tienen un precio que oscila entre 100.000 € y 200.000 €. Sin embargo, considerando los reactivos a utilizar y el mantenimiento del equipo, el coste de la identificación se ha establecido en 1,43 €, mientras que la identificación bioquímica convencional tiene un coste que oscila entre 4,60 € y 8,23 € [164], y la identificación mediante la secuenciación del ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) 16S puede llegar a 137 € [68].

En la Figura 1 se muestra un esquema del equipo MALDI-TOF. Los espectrómetros de masas están formados por tres elementos básicos. En primer lugar, la fuente de iones, donde a partir de la muestra se forma un haz de iones en estado gaseoso. En segundo término, el analizador de masas o tubo de vuelo, que separa los iones formados en función de su relación masa/carga (m/z) y en tercera instancia, el detector de los iones previamente separados [38].

Para realizar el análisis mediante MALDI-TOF es necesario que las proteínas de los microorganismos se ionicen. Para ello, las colonias de microorganismos que se pretenden identificar se depositan sobre la placa portamuestras y, a continuación, sobre esa muestra se deposita una disolución matriz que contiene moléculas con anillos aromáticos en su estructura. Se deja evaporar el disolvente a temperatura ambiente, produciéndose la co-cristalización de la muestra y de la matriz, y así, las moléculas a analizar quedan incorporadas dentro de la estructura de los cristales de la matriz. A continuación, la placa es introducida en la cámara de alto vacío, donde la superficie cristalina de la muestra es expuesta a disparos de un láser de longitud de onda en la zona ultravioleta del espectro, con lo que las moléculas orgánicas aromáticas de la matriz absorben una gran cantidad de energía por excitación de los electrones π (electrones de dobles y triples enlaces) produciéndose la sublimación del analito y de la matriz previamente depositados sobre la placa. Ya en fase gaseosa, la estabilización de estas moléculas aromáticas tiene lugar mediante la liberación de protones que, en parte, son captados por las proteínas de las bacterias, generándose fragmentos de proteínas con carga positiva. Mediante un electrodo, situado a unos pocos milímetros frente a la placa portamuestras, se genera un campo eléctrico que acelera los iones formados desde las proximidades de la muestra hacia el analizador de masas. De esta forma, los



iones entran en un tubo (de uno a cuatro metros de longitud) con la misma energía cinética y siguiendo una trayectoria lineal. Así, el tiempo que tardan los iones en recorrer el tubo es proporcional a la relación masa/carga (m/z) de los mismos. Es decir, a menor relación m/z de los iones, menor es el tiempo necesario para recorrer la longitud del tubo, o lo que es lo mismo, los iones de menor m/z "vuelan" más rápido hacia la salida del tubo. En última instancia está el detector de los iones previamente separados. Si la carga (z) es igual a uno, como es habitual en la ionización blanda de la técnica MALDI-TOF, el espectro de masas es la representación de la intensidad frente a la masa de los iones formados [38, 60].

El sistema MALDI-TOF realiza la identificación rápida de microorganismos mediante el método de la "huella peptídica". En este método, las proteínas del microorganismo a identificar son hidrolizadas en pequeños péptidos y se obtiene el correspondiente espectro de masas del hidrolizado, que se conoce con el nombre de

huella peptídica. Esta huella, que es única para cada microorganismo, es comparada con las huellas de microorganismos conocidos presentes en la base de datos, de tal forma que la huella problema se puede asociar con la huella más semejante y obtener así la identificación del microorganismo [47, 96]. En las condiciones de trabajo del equipo MALDI-TOF, las proteínas que conforman la huella peptídica de cada microorganismo son las ribosomales debido a que se comportan como proteínas estructurales y a que mantienen una estructura altamente conservada a lo largo del tiempo [37]. Asimismo, cambiando las condiciones de trabajo del equipo, es posible crear bases de datos propias en las que las proteínas que conforman la huella peptídica sean, además de las ribosomales, otras como por ejemplo las de membrana y las intracelulares. De este modo, es posible identificar microorganismos que no están incluidos en las bases de datos comerciales o realizar una identificación mucho más específica. Finalmente, una vez realizado el análisis de proteínas, el software del fabricante proporciona un listado de microorganismos como identificaciones más probables [38].

Además de llevar a cabo una identificación rápida de microorganismos, el sistema MALDI-TOF presenta un gran número de aplicaciones en Microbiología Clínica. Por una parte, se trata de una herramienta útil para realizar una clasificación taxonómica basada en rasgos fenotípicos de expresión proteica. Es posible realizar una identificación a nivel de subespecie realizando un tratamiento previo de la muestra y aplicando un método estadístico para el procesamiento de los espectros de masas obtenidos [38]; en este sentido, Vargha *et al.* [183] concluyen que el sistema MALDI-TOF ofrece un mayor poder para la clasificación de las subespecies de *Arthrobacter* que la secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S. Otro ejemplo de la versatilidad del MALDI-TOF es que permite discriminar entre cepas bacterianas productoras y no productoras de toxinas, como en el caso de cepas de *Staphylococcus aureus* productoras de la leucocidina de Pantón-Valentine [15]; esta aplicación del sistema MALDI-TOF resulta de gran utilidad dado que permite realizar un estudio epidemiológico de las cepas identificadas, constituyendo así un arma valiosa en el control de la infección y en la vigilancia epidemiológica [38]. Finalmente, el sistema MALDI-TOF permite llevar a cabo la identificación directamente a partir de diferentes muestras y realizar un antibiograma rápido, tal y como veremos más adelante.

Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular en la que las células pasan, de forma lineal dentro de un flujo, a través de una celda con una intensidad de 500 - 4.000 partículas/segundo. De esta forma es posible realizar la medición simultánea de múltiples características de una sola célula, además de caracterizar, separar y cuantificar las diferentes subpoblaciones celulares [135]. La clasificación de las células se basa en propiedades funcionales, inmunológicas y físico-químicas. Los métodos funcionales utilizan características tales como afinidad y adherencia. La clasificación inmunológica se basa en la utilización de anticuerpos dirigidos frente a epítopos celulares. En la práctica, las propiedades físico-químicas son las más utilizadas para la clasificación celular, e incluyen parámetros como tamaño, volumen, densidad, propiedades de dispersión de la luz, potencial de membrana, pH, carga eléctrica o contenido de diferentes compuestos como ácidos nucleicos, enzimas u otras proteínas [134].

El principio general de la citometría de flujo se esquematiza en la Figura 2. Para alinear las células, el sistema de flujo del instrumento incorpora un tubo capilar por el interior del cual se hace pasar un líquido isotónico, que actúa a modo de funda, a una velocidad y presión constante, generando así un flujo laminar (sin turbulencia). Al mismo tiempo, por el centro del capilar se hace pasar la suspensión de células a una presión mayor que la del flujo transportador, asegurándose así que las células permanecen centradas y viajan una tras otra en el chorro de inyección. Este fenómeno recibe el nombre de enfoque hidrodinámico y permite realizar un análisis individual de las partículas ya que la luz de la fuente emisora incide sobre cada célula a analizar. Cuando el haz de luz de la fuente incide perpendicularmente sobre cada partícula se produce su dispersión; la luz dispersa se detecta en dos posiciones diferentes: en el mismo sentido que la radiación incidente (en inglés *forward scattered light*, FSC), y en un ángulo de 90 grados (en inglés *side scattered light*, SSC). Con el fin de obtener más información sobre las células, éstas pueden ir marcadas con un fluoróforo que cuando capta la energía de la luz de la fuente emite una señal fluorescente de menor energía que el rayo incidente que se detecta también en un ángulo de 90 grados. Esta luz dispersa atraviesa unos filtros ópticos que seleccionan una longitud de onda específica. La luz filtrada, monocromática, llega a los detectores que suelen ser del tipo fotomultiplica-

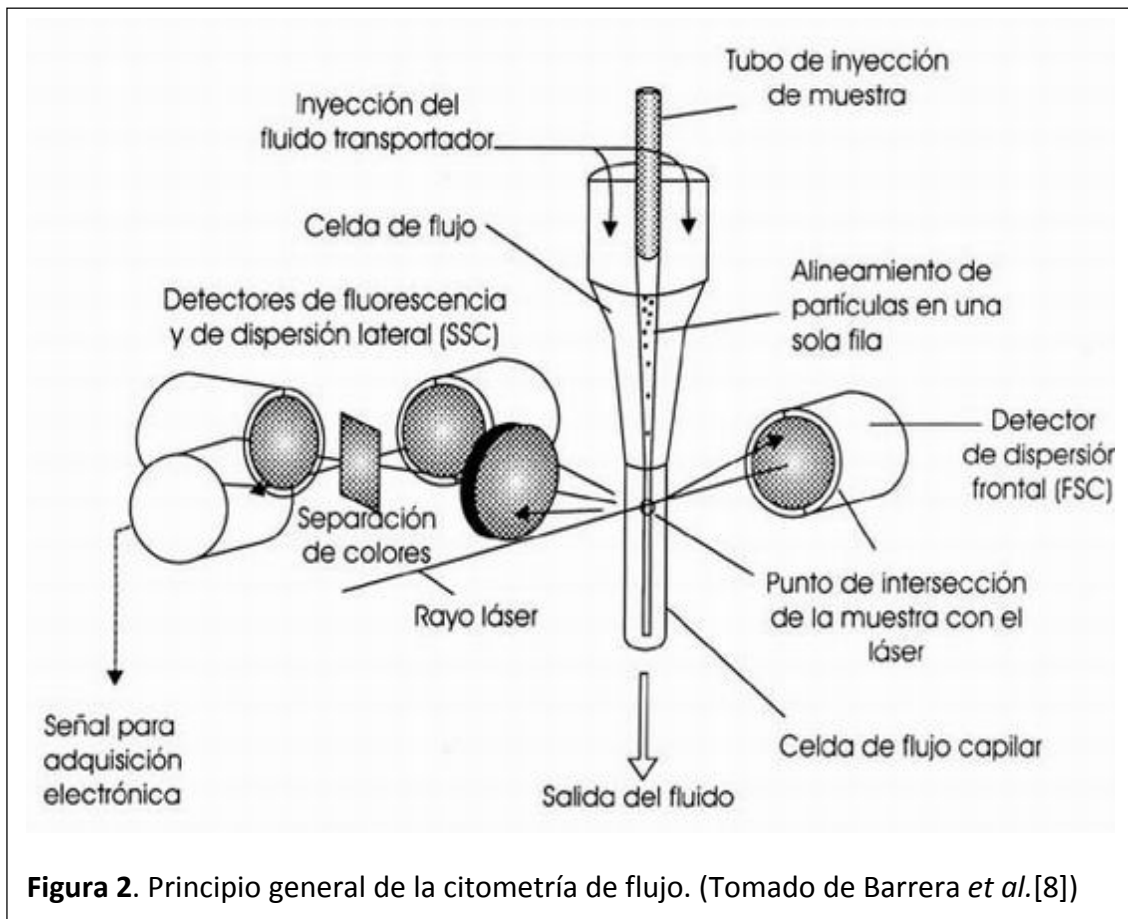


Figura 2. Principio general de la citometría de flujo. (Tomado de Barrera *et al.*[8])

dores, que detectan y amplifican la señal, la cual se transmite al sistema electrónico que se encarga del procesamiento de los datos. Así, la luz que incide sobre los detectores se transforma en pulsos eléctricos y se generan histogramas, generalmente biparamétricos, es decir, gráficas en las que se representan dos parámetros (en inglés *dot plot* o *counter plot*). En estas gráficas, la luz dispersa hacia adelante se relaciona con el tamaño de la partícula y la luz dispersa en un ángulo de 90 grados proporciona información sobre la estructura interna de la célula (granularidad y morfología celular) [2, 8].

La citometría de flujo se utiliza principalmente en los laboratorios de Microbiología Clínica para realizar un cribado de las muestras de orina, para la detección de productos amplificados en las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y para la monitorización de las subpoblaciones linfocitarias en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

Para realizar el cribado de las muestras de orina se han comercializado diferentes equipos. Uno de ellos es el Sysmex UF-1000i (Sysmex Corporation, Kobe, Japón). Este equipo se basa en la citometría de flujo fluorescente y permite cuantificar, en unos minutos, analitos tales como bacterias, levaduras, hematíes, leucocitos, además de otros componentes presentes en la orina, tiñendo estas partículas con colorantes fluorescentes y analizando posteriormente la impedancia, la dispersión y la fluorescencia [141].

Para la detección de los virus que causan patología respiratoria se ha comercializado una PCR que utiliza una tecnología denominada XMAP® (Luminex, Austin, TX, EE.UU.), en la que los productos de amplificación son marcados con biotina y posteriormente detectados mediante microesferas conjugadas con estreptavidina con un instrumento basado en la citometría de flujo [28].

En la infección por VIH, la cuantificación en sangre periférica de los linfocitos CD4+ y CD8+ se lleva a cabo para el diagnóstico y el pronóstico [59].

Otra aplicación de la citometría de flujo es la cuantificación de bacterias viables pero no cultivables. A título de ejemplo, Khan *et al.* [97] cuantifican las bacterias vivas, cultivables y no cultivables, y las muertas presentes en un caldo. Para ello usan dos fluorocromos, uno denominado SYTO que tiñe tanto las vivas como las muertas, y el yoduro de propidio que sólo tiñe las muertas. De este modo, con el SYTO se determina el número total de bacterias (vivas y muertas) y con el yoduro de propidio el número de bacterias muertas. El número de bacterias vivas (cultivables y no cultivables) se calcula restando al número calculado con el SYTO el número calculado con el yoduro de propidio. Finalmente, el número de bacterias viables pero no cultivables se halla restando al valor de las bacterias vivas el recuento obtenido en placa.

Además, la citometría de flujo permite la detección y caracterización de esporas bacterianas. En este sentido, Schumacher *et al.* [162] marcan las esporas de *Bacillus* spp. con dos moléculas, un anticuerpo que detecta el antígeno protector, que es un marcador de virulencia específico localizado en la superficie de las esporas de *Bacillus anthracis*, y un péptido marcado con un fluorocromo que se une a las esporas del

género *Bacillus*. Estudiando los histogramas obtenidos con la combinación de estas dos señales estos autores consiguen discriminar, en unas pocas horas, entre esporas de *Bacillus anthracis* de otras esporas de *Bacillus* spp. y su virulencia. Finalmente, la citometría de flujo también permite realizar una identificación rápida de microorganismos y un antibiograma rápido, tal y como se expondrá más adelante.

TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN MICROBIANA EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

La identificación de microorganismos patógenos humanos es una de las principales funciones que desarrollan los laboratorios de Microbiología Clínica. La identificación bacteriana convencional se basa en la realización de las pruebas fenotípicas de los microorganismos crecidos en las placas de aislamiento. Estos métodos, además de requerir un tiempo prolongado para su realización, presentan una serie de inconvenientes: no todas las cepas de una misma especie muestran una característica específica y una misma cepa puede generar diferentes resultados en ensayos repetidos [17].

Para realizar una identificación microbiana con certeza se debe recurrir a los métodos moleculares, que se basan principalmente en la amplificación y secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S [17]. De entre todas las técnicas moleculares utilizadas, la PCR es la que ha adquirido un mayor valor diagnóstico, permitiendo la detección de agentes infecciosos, además de caracterizar sus genotipos de virulencia y de resistencia [123]. El primer paso de la PCR consiste en una extracción del material genético, seguido de la desnaturalización térmica del ácido desoxirribonucleico (ADN) que se va a usar como molde, el anillamiento de cebadores sintéticos y la extensión catalizada por la ADN polimerasa de los oligonucleótidos anillados que actúan como cebadores. Este proceso de tres pasos se repite un número determinado de veces (de 25 a 35), duplicándose cada vez el número de moléculas de producto. Esta amplificación exponencial tiene como resultado un gran número de copias de la secuencia de ADN, lo que le confiere una elevada sensibilidad [145].

La identificación mediante métodos moleculares en los laboratorios de Microbiología Clínica se aplica principalmente a cepas cuya identificación mediante métodos

fenotípicos resulta imposible o difícil, como es el caso de microorganismos no cultivables presentes en muestras clínicas, microorganismos cuyas características bioquímicas no se adaptan a las de ningún género o especie reconocido, microorganismos para los cuales la caracterización fenotípica sea sustancialmente deficiente, microorganismos fastidiosos a consecuencia de sus requerimientos nutricionales, y microorganismos de crecimiento lento [151].

Tal y como se ha dicho anteriormente, el sistema MALDI-TOF es una herramienta capaz de proporcionar la identificación de microorganismos en unos minutos. Las bases de datos de bacterias y levaduras proporcionadas por los fabricantes son muy amplias y permiten la identificación de un gran número de microorganismos. Además, no es necesario realizar procedimientos laboriosos de preparación de la muestra. La identificación (de bacterias y levaduras) obtenida mediante MALDI-TOF presenta una elevada reproducibilidad y fiabilidad dado que, en los casos en los que se han observado discrepancias entre la identificación obtenida mediante MALDI-TOF y la obtenida mediante métodos bioquímicos, el resultado obtenido mediante secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S ha confirmado la identificación obtenida mediante MALDI-TOF en la gran mayoría de casos, tanto para levaduras, como para bacterias gramnegativas, grampositivas y anaerobias [13, 87, 130, 163, 181]. Una limitación del sistema MALDI-TOF en la identificación de bacterias consiste que las bases de datos comerciales no permiten la identificación de especies muy próximas ya que éstas generan espectros de identificación muy similares [164]. Para solventar, al menos en parte, este problema se ha propuesto la elaboración de bases de datos propias. Para la identificación de micobacterias se han publicado diversos tratamientos de la muestra que incluyen una extracción de proteínas para obtener espectros de mayor calidad. Además, para lograr la identificación ha sido necesario, en muchos casos, crear bases de datos propias [54, 81, 165]. La misma circunstancia se observa en la identificación de hongos filamentosos, donde la mayoría de trabajos publicados han logrado la identificación elaborando una base de datos propia y realizando, además, un pretratamiento de la muestra [1, 80]. En síntesis, para lograr la identificación de micobacterias y hongos filamentosos es necesario ampliar las bases de datos y diseñar protocolos de tratamiento de las muestras con el fin de obtener espectros de mayor calidad [38].

La citometría de flujo, junto con el uso de anticuerpos marcados con fluorocromos, permite realizar la identificación de diferentes bacterias con una elevada sensibilidad, dado que es posible detectar concentraciones del orden de 100 bacterias/ml [2]. Además, con el uso de anticuerpos marcados con fluorocromos también se pueden identificar serotipos de diferentes microorganismos, como es el caso de *Candida albicans* [124] y de *Salmonella* spp., tanto en cultivo puro como en cultivo mixto [122]. La citometría de flujo es también una herramienta útil para el diagnóstico de la onicomicosis [140], habiéndose observado que tiñendo los microorganismos obtenidos a partir del cultivo de la uña con diferentes fluorocromos se logra caracterizar una “huella” que sirve para realizar la identificación de hongos filamentosos y levaduras.

Identificación microbiana directa

El sistema MALDI-TOF permite llevar a cabo la identificación rápida de microorganismos directamente a partir de diferentes muestras, como por ejemplo, orinas, frascos de hemocultivo crecidos en el momento que el sistema de incubación proporciona una lectura positiva o medios líquidos de enriquecimiento en los que se incuban muestras de exudados, líquidos biológicos, drenajes, etc. De las diversas publicaciones sobre la identificación microbiana mediante MALDI-TOF a partir de muestra directa se desprende que hay dos puntos clave que condicionan el éxito de la identificación. El primero de ellos consiste en eliminar las interferencias analíticas generadas por células, proteínas, cristales, etc., que pueden estar presentes en la muestra, y el segundo consiste en conseguir un extracto suficientemente enriquecido en el microorganismo, ya que la cantidad de microorganismos que se deposita sobre la placa portamuestras, que a su vez depende de la concentración microbiana de la muestra, condiciona la calidad y el éxito de las identificaciones [41]. Por lo tanto, cuando se realizan las identificaciones microbianas mediante MALDI-TOF a partir de muestra directa pueden darse una serie de situaciones que disminuyen la calidad de los resultados de tal forma que, si se aplicara un criterio de validación estricto, muchas identificaciones se darían por fallidas, cuando en realidad, se podría rebajar el nivel de exigencia del criterio aplicado, manteniendo la fiabilidad de las identificaciones. En este sentido, se han publicado distintos criterios de validación para las identificaciones directas en los que se ha reducido la puntuación crítica de identificación, aumentando así la utilidad clínica del MAL-

DI-TOF [105, 126, 161, 175]. La identificación directa mediante MALDI-TOF presenta una limitación; la identificación a partir de muestras polimicrobianas suele generar espectros de identificación que no se pueden emparejar con los registrados en las bases de datos y, por lo tanto, muchas de ellas proporcionan resultados negativos [38].

En la detección directa de bacterias mediante citometría de flujo, Saito *et al.* [157] publican un trabajo en el que analizan 318 muestras de diferentes líquidos biológicos y obtienen una sensibilidad del 84,4 % y una especificidad del 86,0 %. Mansour *et al.* [117] publican un trabajo en el que, utilizando bromuro de etidio como fluorocromo, logran detectar, en muestras de sangre, niveles de hasta 10 bacterias/ml. En la identificación directa de parásitos mediante citometría de flujo, Flores *et al.* [65] publican un trabajo donde se apunta que, mediante el uso de anticuerpos monoclonales y su detección por citometría de flujo en una muestra de tejido procedente de una biopsia cerebral, es posible efectuar un diagnóstico diferencial entre *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba* sp. También se ha apuntado la utilidad clínica para el diagnóstico de malaria, habiéndose descrito métodos para la detección y cuantificación de la parasitemia [182], y para la detección de antígenos de *Plasmodium falciparum* expresados en la superficie del eritrocito [89].

Identificación microbiana directa a partir de la muestra de orina

Recientemente, dentro de los métodos moleculares, ha aparecido una PCR a tiempo real que realiza la identificación directa y cuantificación de microorganismos presentes en la muestra de orina. El tiempo requerido para esta metodología es de cuatro horas y, tomando como *gold standard* un recuento en placa $\geq 1 \cdot 10^5$ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml, presenta una sensibilidad del 97 % y especificidad del 80 % [78].

Para la identificación microbiana directa a partir de las muestras de orina también se ha aplicado el sistema MALDI-TOF. Para eliminar las interferencias analíticas y concentrar los microorganismos se ha usado únicamente la centrifugación diferencial [61, 99]. Este procedimiento incluye una centrifugación a baja velocidad para sedimentar las células y otras partículas grandes, y así obtener un sobrenadante más limpio

que seguidamente se centrifuga a alta velocidad con el fin de forzar la sedimentación de los microorganismos que se pretenden identificar. Los resultados de identificación directa obtenidos mediante MALDI-TOF muestran que las orinas que presentan recuentos en placa $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml proporcionan elevados porcentajes de identificación directa aceptables, mientras que las que presentan recuentos en placa $< 1 \cdot 10^5$ UFC/ml proporcionan bajos porcentajes de identificación [61, 99] dado que, tal y como se ha dicho anteriormente, en la identificación microbiana directa mediante MALDI-TOF, la cantidad de microorganismos que se deposita sobre la placa portamuestras, que a su vez depende de la concentración microbiana de la muestra, condiciona la calidad y el éxito de las identificaciones [41].

El criterio clásico descrito por Kass [93] considera que los recuentos bacterianos $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml son indicativos de ITU. Sin embargo, se ha demostrado que en determinados casos, como el aislamiento de levaduras o recuentos bacterianos $< 1 \cdot 10^5$ UFC/ml, pueden ser también indicativos de infección urinaria. Colodner *et al.* [36] observan que más de la mitad de los pacientes que presentan recuentos $< 1 \cdot 10^5$ UFC/ml de *Enterococcus* spp. y leucocituria acababan desarrollando una ITU. También, Hummers-Pradier *et al.* [84] observan que en un grupo de hombres con síntomas de infección urinaria hay un 23 % de orinas en las que el recuento bacteriano es $< 1 \cdot 10^5$ UFC/ml y concluyen que en varones estos recuentos deben ser considerados indicativos de infección urinaria. Tomando como base estos y otros trabajos, la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) propone que en varones, en los que la obtención de orina es menos susceptible de contaminarse con microbiota uretral, los recuentos $\geq 1 \cdot 10^3$ UFC/ml son significativos [3]. Arav-Boger *et al.* [4] demuestran que el 48 % de mujeres con síntomas de infección urinaria y recuentos entre $1 \cdot 10^2$ y $1 \cdot 10^4$ UFC/ml, terminan presentando, tras 48 horas sin tratamiento antimicrobiano, una ITU con recuentos $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml. Por otra parte, Rushton [156] concluye que recuentos $< 1 \cdot 10^5$ UFC/ml en niños pueden ser indicativos de infección urinaria y por lo tanto deben ser confirmados. Finalmente, todos los autores están de acuerdo en que en las orinas obtenidas por punción suprapúbica o que proceden del riñón, cualquier recuento es indicativo de infección, y en las orinas obtenidas por sondaje vesical se conside-

ran como recuentos significativos los $\geq 1 \cdot 10^3$ UFC/ml de cualquier microorganismo que se presente en cultivo puro [3].

De lo expuesto anteriormente se deduce que sería de utilidad mejorar los resultados de la identificación directa mediante MALDI-TOF en orinas con recuentos en placa $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml, pero sobre todo en las que presentan recuentos en placa $< 1 \cdot 10^5$ UFC/ml.

Identificación microbiana directa a partir del frasco de hemocultivo crecido

El procesamiento convencional de los hemocultivos, una vez son marcados como positivos por los diferentes sistemas de incubación, incluye la realización de una tinción de Gram y el subcultivo en diferentes placas de aislamiento. Una vez crecidas las colonias, se realiza la identificación y las pruebas de susceptibilidad. Este procedimiento requiere un tiempo de 24 - 48 horas. Dado que el diagnóstico de bacteriemia constituye una de las prioridades del laboratorio de Microbiología Clínica [44], con el fin de adelantar la identificación de la bacteria presente en el hemocultivo, se han aplicado diferentes metodologías como son la hibridación fluorescente *in situ*, las técnicas moleculares, la espectrometría de masas, algunas pruebas fenotípicas y diversos métodos empleados en la rutina para realizar la identificación y la determinación de la susceptibilidad a partir del cultivo. Todas estas técnicas permiten adelantar los resultados de forma considerable dado que es posible llevar a cabo la identificación de la bacteria presente en el hemocultivo sin la necesidad de realizar el subcultivo.

Dentro de las técnicas moleculares cabe destacar el sistema Prove-it Sepsis (Mobidiag, Helsinki, Finlandia), que consiste en una PCR múltiple que detecta un gran número de especies bacterianas (grampositivas y gramnegativas) y levaduras en unas cinco horas, y presenta una sensibilidad del 94,7 % y una especificidad del 98,9 % [137]. Por otra parte, se han comercializado escasas PCRs para ser aplicadas a partir de la muestra de sangre extraída del paciente. El SepsitTest (Molzym, Bremen, Alemania) es una PCR múltiple que detecta 345 especies microbianas; requiere un tiempo de ocho horas, presenta un complejo procedimiento, y muestra una sensibilidad del 87,0 % y una especificidad del 85,8 % [185]. La técnica SeptiFast (Roche Diagnostics,

Mannheim, Alemania) detecta los principales microorganismos causantes de bacteriemias. Lamentablemente, el SeptiFast ha mostrado unas características operacionales que hacen que no pueda ser utilizado en la práctica clínica [109].

Las plataformas de amplificación-espectrometría de masas de tipo *electrospray* (PCR/ESI-MS) permiten identificar un gran número de microorganismos a partir del frasco de hemocultivo crecido. En primer lugar se realiza una PCR, y los productos resultantes de ésta son analizados mediante espectrometría de masas de tipo *electrospray*, que mide la relación masa/carga (m/z) de los amplicones. Mediante este análisis se puede deducir la composición de los nucleótidos del producto resultante de la PCR. Para realizar la identificación bacteriana, la composición de nucleótidos obtenida es comparada con una base de datos que contiene la composición de nucleótidos de microorganismos conocidos. El sistema PLEX-ID (Abbott Molecular Diagnostics, Des Plaines, IL, EE.UU.) requiere un tiempo de seis a ocho horas y muestra una concordancia en la identificación a nivel de género del 94,0 % al 98,7 %, y a nivel de especie del 86,0 % al 96,6 % [88, 92].

La hibridación fluorescente *in situ* con sondas de ácido nucleico peptídico (FISH PNA) es otra metodología que realiza la identificación a partir del frasco de hemocultivo crecido. En este ensayo se utilizan sondas específicas diseñadas para hibridar con el ARNr de la especie bacteriana presente en el frasco de hemocultivo crecido. Cuando esto ocurre se produce una señal fluorescente característica que puede ser observada en unos 90 minutos. Existen pocos ensayos comercializados, y además éstos permiten la identificación de escasos microorganismos. A título de ejemplo, se ha comercializado un ensayo para detectar *Staphylococcus aureus* y estafilococos coagulasa negativos, otro para *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, otro para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, y otro para levaduras. Las sensibilidades y especificidades de estos ensayos van del 94,0 % al 100 % y del 86,9 % al 100 %, respectivamente [43, 77, 79, 125].

En la identificación directa mediante MALDI-TOF se han publicado varios métodos para lograr la eliminación de las células presentes en los frascos de hemocultivo crecidos. Uno de éstos se basa en la inducción de la lisis celular, que puede llevarse a

cabo mediante el tratamiento de la muestra con un tensioactivo, como el dodecilsulfato sódico [119], la saponina [64] o el Tween 80 [169], con sales como cloruro de amonio [146, 175] y también mediante el uso de un kit comercial (MALDI sepsityper, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) [90, 161, 198]. Otros métodos para lograr la eliminación de las células se basan en un tubo con gel separador de suero y con activador de la coagulación [126, 175] o en la aplicación de un protocolo de centrifugación diferencial [41, 63, 90, 105, 160, 161].

Una vez que el microorganismo ha sido concentrado se puede continuar, bien utilizando parte del sedimento para realizar la identificación, y en el caso de que ésta resulte inválida, el análisis puede mejorarse realizando una extracción de proteínas [62, 146], o bien efectuando directamente una extracción de proteínas utilizando todo el sedimento [41, 63, 105, 119, 126, 160, 161, 169, 175, 198]. De este modo, aplicando diversos métodos de procesamiento de los hemocultivos y diferentes criterios de validación, se obtienen resultados de identificación directa aceptables para bacterias que oscilan entre el 76,4 % y el 94,5 % [41, 63, 90, 105, 126, 146, 161, 175].

También se han aplicado diferentes pruebas fenotípicas, con algunas variaciones en el procedimiento, para la identificación de bacterias a partir del frasco de hemocultivo crecido. Para la identificación de *Staphylococcus aureus* se puede realizar el test de la coagulasa y el test DNasa. El test de la coagulasa proporciona resultados en dos horas y presenta una sensibilidad del 79,5 % al 96,0 % y una especificidad del 100 %. El test DNasa requiere entre una y dos horas, y presenta una sensibilidad del 85 % al 100 % y una especificidad del 93 % al 100 %. Para la identificación de *Streptococcus pneumoniae*, el test de solubilidad en bilis requiere unas horas y presenta una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 98,9 % [137].

ANTIBIOGRAMA RÁPIDO EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

Junto con la identificación microbiana, la determinación de la susceptibilidad de los microorganismos a los antibióticos es una de las tareas de mayor impacto en el manejo del paciente infectado. Los métodos utilizados para la determinación de la susceptibilidad se basan en un estudio fenotípico, observando el crecimiento bacte-

rriano de la cepa incubada en presencia del antibiótico a estudiar. Estas técnicas incluyen dilución en agar, macrodilución en caldo, tiras con un gradiente de antibiótico, difusión en disco-placa y microdilución en caldo. Esta última es la técnica utilizada por los diversos sistemas automatizados comerciales como el MicroScan Walkaway (Siemens, New York, EE.UU.), Phoenix (BD Diagnostics, Sparks, MD, EE.UU.) o VITEK (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) [108].

Para la interpretación de los resultados de susceptibilidad obtenidos mediante las técnicas anteriormente citadas se siguen las normas del antibiograma publicadas por diversos organismos como el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) [31] y el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) [58]. En la rutina de trabajo, todas estas técnicas se aplican a partir de las colonias crecidas en las placas de aislamiento; los métodos Phoenix y VITEK, que son los más rápidos, requieren un tiempo medio mínimo de nueve horas para obtener los resultados [53].

Para llevar a cabo la determinación de la susceptibilidad de forma rápida a partir de las colonias crecidas en las placas de aislamiento se han aplicado diversas técnicas instrumentales como espectrometría de masas, citometría de flujo, nefelometría, quimioluminiscencia, métodos colorimétricos, técnicas moleculares, *microarrays*, microfluidos, métodos basados en la rotura celular o secuenciación del genoma completo.

Los importantes avances en el conocimiento de las bases genéticas de la resistencia a antibióticos ha permitido que las metodologías basadas en los métodos moleculares puedan detectar, en unas horas, la presencia de genes de resistencia a una gran variedad de antibióticos para un gran número de especies bacterianas [147]. Además, la PCR a tiempo real ha sido utilizada para monitorizar el crecimiento bacteriano mediante la detección de los genes de resistencia cuando las bacterias han sido incubadas en presencia del antibiótico a ensayar [9, 20].

La metodología de los *microarrays* permite la detección de un gran número de genes de resistencia en un solo ensayo, caso contrario de lo que ocurre en las técnicas moleculares. Los *microarrays* identifican miles de secuencias específicas de ácidos nu-

cleicos mediante el uso de oligonucleótidos complementarios que están ensamblados en soportes sólidos muy próximos. De este modo, en bacterias gramnegativas es posible detectar, en unas horas, un gran número de genes que codifican para diferentes β -lactamasas [35, 128, 139].

Los avances en nanotecnología han posibilitado la miniaturización de los ensayos usados para la detección de las resistencias a los antibióticos. De este modo, se han desarrollado plataformas o chips que utilizan volúmenes muy pequeños de muestra y de reactivos. Mediante el estudio de microfluidos, es posible obtener información sobre el cultivo bacteriano, la amplificación e hibridación de ácidos nucleicos y la rotura de células. Esta metodología permite obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) en unas horas [40, 178].

Otra metodología para la determinación de la susceptibilidad consiste en la detección de la lisis bacteriana. Para ello, la bacteria es incubada con la presencia del antibiótico a la concentración deseada; seguidamente la bacteria se inmoviliza en un microgel de agarosa y es expuesta a una disolución de lisis que produce la liberación del ADN. Posteriormente, la preparación es incubada con sondas de ADN marcadas con fluorocromos y mediante observación al microscopio de fluorescencia es posible estudiar la integridad del ADN. Esta metodología requiere menos de dos horas y ha sido aplicada a bacterias gramnegativas [158, 177].

Otra técnica disponible consiste en la secuenciación del genoma completo. Ésta se aplica para el estudio de determinantes genéticos de resistencias a antibióticos [83, 133].

Las diferentes metodologías basadas en procedimientos colorimétricos requieren unas seis horas para poder informar la susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos. La resazurina es un compuesto que cuando se añade a un cultivo bacteriano en medio líquido resistente al antibiótico con el que es incubado, es reducida por la actividad metabólica de la bacteria. En cambio, si la bacteria es sensible al antibiótico se detiene su metabolismo, con lo que la resazurina permanece en su forma oxidada. Dado que la forma reducida de resazurina es estable y de color azul, y fotométrica-

mente distinguible de la forma oxidada, que es de color rojo, la viabilidad celular puede ser monitorizada mediante espectrofotometría. Utilizando este compuesto se ha determinado la susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* a meticilina y vancomicina [32, 33]. Asimismo ha permitido estudiar el carácter bactericida o bacteriostático de diferentes antibióticos frente *Staphylococcus aureus* [101]. Otro método colorimétrico consiste en la medición de la actividad de la enzima nitrato reductasa bacteriana. Cuando se incuba la bacteria en presencia de iones NO_3^- y antibiótico, si la bacteria es resistente al antibiótico se van a generar iones NO_2^- que con los reactivos de Gries originan un compuesto de color rojo. Con este método se ha determinado la susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* a meticilina y vancomicina [32, 33]. Del mismo modo, la resazurina y el ensayo de la nitrato reductasa han sido aplicados a micobacterias. Dixit *et al.* [49] estudian la susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a rifampicina, isoniazida, esptreptomina, y etambutol, y obtienen, en un tiempo de 8 a 14 días, una sensibilidad y especificidad que van del 83,6 % al 100 % respecto al método de las proporciones.

La nefelometría es otra técnica analítica basada en la dispersión de luz que permite realizar un antibiograma rápido. El sistema UroQuick o HBandL™ (Alifax, Padova, Italia), diseñado para realizar un cribado de muestras de orina, detecta la presencia de microorganismos en un tubo que contiene un medio de enriquecimiento dado que el crecimiento de éstos causa una desviación de la luz medible mediante los correspondientes detectores. Las señales obtenidas son procesadas por un software que monitoriza las curvas de crecimiento. De este modo, este sistema es capaz de informar la concentración microbiana de la muestra, pero no permite realizar la identificación del microorganismo [85]. La sensibilidad del sistema, expresada en UFC/ml, depende del tiempo de análisis, de tal forma que si se pretende detectar $1 \cdot 10^5$ UFC/ml se requiere un tiempo de incubación de 180 minutos, y si se pretende cuantificar niveles $< 1 \cdot 10^3$ UFC/ml la incubación debe prolongarse hasta seis horas [66]. Este equipo ha sido aplicado con éxito para realizar la detección fenotípica de diversos mecanismos de resistencia de cepas caracterizadas genéticamente o fenotípicamente, requiriendo 24 horas para bacterias grampositivas y ocho horas para bacterias gramnegativas [154].

La quimioluminiscencia es un proceso de relajación radiante que tiene lugar cuando en una reacción química se genera una especie química excitada electrónicamente. Estas moléculas excitadas cuando vuelven a su estado fundamental emiten fotones. Se denomina bioluminiscencia a la forma de quimioluminiscencia que aparece como consecuencia de una reacción química que tiene lugar en los organismos vivos, como por ejemplo luciérnagas (insectos de la familia *Lampyridae*). En esta reacción química, la sustancia luminiscente luciferina es oxidada, en presencia de adenosín trifosfato (ATP), por la acción catalítica de la enzima luciferasa. El sistema bioluminiscente de las luciérnagas tiene muchas aplicaciones analíticas dado que la enzima luciferasa posee una gran especificidad por determinados sustratos y además, la cantidad de luz producida es directamente proporcional a la cantidad de ATP de la reacción [111].

Los trabajos realizados para la determinación de la susceptibilidad bacteriana mediante bioluminiscencia se fundamentan en la medida de los niveles de ATP bacteriano de origen intracelular, extracelular o total. Para calcular la CMI mediante bioluminiscencia se compara la señal de ATP obtenida a partir de microorganismos incubados sin la presencia de antibiótico (grupo control) con la señal obtenida a partir de microorganismos incubados en presencia de antibiótico a diferentes tiempos, formulando así diferentes criterios de sensibilidad [187, 188]. Si se mide el ATP intracelular, las cepas sensibles al antibiótico estudiado van a proporcionar una disminución de la señal de bioluminiscencia con respecto al grupo control [179]; si se mide el ATP extracelular, las cepas sensibles van a producir un aumento de la señal con respecto al grupo control [10] y si se mide el ATP total, las cepas sensibles van a proporcionar una disminución de la señal de ATP con respecto al grupo control [187, 188]. En cambio, si el microorganismo es resistente al antibiótico las medidas del grupo control serán prácticamente iguales que las obtenidas a partir de las cepas en estudio. Para determinar la susceptibilidad en bacterias se requieren unas cuatro horas y se obtienen unas CMIs muy similares a las obtenidas a partir de la dilución en medio sólido [10, 187, 188]. Para el caso de micobacterias, en un tiempo mínimo de cinco días, se obtiene una concordancia prácticamente del 100 % con respecto al método de las proporciones y a los métodos radiométricos [11, 12, 111, 131]. En la literatura se encuentran escasos trabajos de determinación de la susceptibilidad en levaduras mediante biolu-

miniscencia. En éstos se apunta que con una incubación de aproximadamente cinco horas se obtiene una concordancia del 100 % con respecto a la CMI obtenida mediante macrodilución [103]. También se ha demostrado que, mediante bioluminiscencia, es posible determinar la susceptibilidad a antibióticos monitorizando la actividad de la enzima adenilato quinasa. Para ello, se añade adenosín difosfato (ADP) a los cultivos bacterianos incubados con y sin antibiótico durante 6 horas; el ADP se transforma en ATP por acción de la enzima adenilato quinasa y finalmente éste se mide mediante bioluminiscencia. Si la cepa es sensible al antibiótico, la actividad de la enzima se verá disminuida y la señal obtenida a partir del ATP será menor que la obtenida a partir de las cepas incubadas sin antibiótico; si la cepa es resistente, la señal obtenida a partir del ATP será similar, tanto en las cepas incubadas con antibiótico como en las que no [106].

A diferencia de la bioluminiscencia, la quimioluminiscencia sólo requiere la adición de menadiona al cultivo del microorganismo, pudiendo prescindir de la rotura celular. La membrana bacteriana es permeable a esta molécula y, en el interior del microorganismo la menadiona es reducida, generándose diversos compuestos que difunden al medio extracelular, donde se dismutan y emiten fotones de luz [193, 196]. A finales de la década de los ochenta aparecen diversas publicaciones en las que se apunta que la quimioluminiscencia es una herramienta útil para el estudio de la viabilidad de células y microorganismos [26, 195]. Posteriormente, a partir del año 2000, aparecen numerosos trabajos en los que se realiza un antibiograma rápido mediante quimioluminiscencia. La viabilidad de los microorganismos se predice comparando la señal quimioluminiscente de cepas incubadas con antibióticos con la de cepas incubadas sin antibióticos a diferentes tiempos, proponiendo así diferentes criterios de sensibilidad [115, 129, 176, 197]. Lógicamente, si la cepa es sensible al antibiótico estudiado, se detectará una señal mucho menor que la obtenida a partir del cultivo sin antibiótico. Para bacterias, con una incubación de unas cuatro horas, se obtiene desde un 88 % hasta un 100 % de concordancia entre la CMI obtenida mediante quimioluminiscencia y la obtenida mediante macrodilución o microdilución en caldo [115, 129, 197]. Mediante quimioluminiscencia también es posible, con un tiempo de ocho horas, detectar cepas de *Staphylococcus aureus* intermedias y heterorresistentes a

vancomicina [176]. De igual forma, con esta metodología se ha observado que linezolid disminuye, a las cuatro horas de incubación, la intensidad de la señal de quimioluminiscencia por igual en cepas sensibles a linezolid que presentan diferentes susceptibilidades a vancomicina [102]. Finalmente, en micobacterias se ha observado que se necesita, como mínimo, cuatro días para poder llevar a cabo la determinación de la susceptibilidad [194].

Otra alternativa que permite realizar un antibiograma rápido es la basada en la técnica MALDI-TOF. Esta metodología permite predecir si las bacterias poseen enzimas que degradan los antibióticos. Para ello, los microorganismos deben ser incubados durante unas horas con el antibiótico. Posteriormente, con el análisis realizado mediante el sistema MALDI-TOF, se observa, en caso de que el microorganismo posea la enzima responsable de la degradación del antibiótico, la desaparición del pico correspondiente al antibiótico y la aparición de nuevos picos que corresponden a los metabolitos resultantes de la rotura del antibiótico. En caso que la bacteria no hidrolice el antibiótico se observa únicamente el pico correspondiente al antibiótico. Mediante este procedimiento ha sido posible detectar carbapenemasas [24, 82, 95]. También es posible predecir la resistencia a cloramfenicol y clindamicina mediante la detección de la metilación del ARNr 16S llevada a cabo por metiltransferasas [159]. Por otra parte, se ha observado que tanto las cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles a meticilina como las resistentes proporcionan unos picos de identificación específicos [52]. De esta forma, a partir de una base de datos, normalmente elaborada en el propio laboratorio, es posible diferenciar entre cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes y sensibles a meticilina [51]. De la misma manera, el sistema MALDI-TOF también permite discriminar entre cepas de enterococos resistentes y sensibles a vancomicina [75]. Finalmente, es posible estudiar la susceptibilidad mediante la incubación de microorganismos con antibiótico en un medio con isótopos marcados. Si el microorganismo es resistente, éste incorporará el isótopo que posteriormente podrá ser detectado mediante el sistema MALDI-TOF [46].

En el año 1982 aparecen los primeros estudios en los que se demuestra la aplicación de la citometría de flujo fluorescente en la determinación de la susceptibilidad

de bacterias [120, 173]. Posteriormente se han utilizado otros fluorocromos con el fin de obtener información sobre diversos parámetros metabólicos bacterianos, como el potencial de membrana, el tamaño celular, la cantidad de ADN o la actividad enzimática [144]. Ramani y Chaturvedi [149] determinan la susceptibilidad de distintas especies de levaduras a anfotericina B y fluconazol. Al cabo de unas horas de incubación de las levaduras en presencia de los antifúngicos se añade yoduro de propidio junto con desoxicolato. El yoduro de propidio se intercala en la doble hebra del ADN y, además, es excluido en las células viables. De este modo sólo tiñe los microorganismos con alteraciones en la membrana y, por lo tanto, con deterioro celular. El uso de desoxicolato intensifica la penetración de yoduro de propidio en el interior de la célula, pudiendo obtener así resultados más tempranos. La CMI por citometría de flujo se define como la mínima concentración de antifúngico que proporciona un incremento del 50 % de la señal de fluorescencia comparada con la señal obtenida a partir de la disolución control (levadura incubada sin la presencia del antifúngico). Los resultados obtenidos de susceptibilidad mediante citometría de flujo son rápidos (6 horas como máximo, dependiendo de la cepa a estudiar), reproducibles y estadísticamente comparables con los obtenidos por el método de macrodilución en caldo, que es el método de referencia indicado por el CLSI [31]. Shrestha *et al.* [166] logran diferenciar, en cuatro horas, entre cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes y sensibles a metilicina mediante histogramas en los que se representa la luz dispersa en un ángulo de 90 grados (SSC) frente a la señal de fluorescencia. Broeren *et al.* [21] calculan la CMI de amoxicilina, gentamicina y piperacilina para los microorganismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* mediante el citómetro de flujo Sysmex UF-1000i; para ello parten de un inóculo de entre $5 \cdot 10^4$ y $2 \cdot 10^5$ bacterias/ml en diferentes disoluciones de caldo Mueller-Hinton con concentraciones crecientes de antibióticos equivalentes a las que se emplean para determinar la CMI por microdilución en los métodos estandarizados. Se efectúa la medición del número de bacterias de cada disolución de antibiótico a diferentes tiempos: 60, 90, 120, 180 y 240 minutos. También preparan un control (microorganismo incubado sin antibiótico) y un control negativo, y definen la CMI por citometría de flujo como la mínima concentración de antibiótico que proporciona una reducción del 80 % del recuento bacteriano a los 240 minutos de incubación comparado con el recuento del control sin antibiótico al mismo tiempo de incubación.

Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo concuerdan en un 100 % con los obtenidos mediante los sistemas comerciales VITEK 2, Etest y macrodilución en caldo.

En el caso de micobacterias, mediante citometría de flujo es posible informar, en unos días, un resultado de susceptibilidad, en lugar de las tres semanas que se requieren con otros sistemas, como el BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, Sparks, MD, EE.UU.). Esta información es de gran utilidad para el control de brotes y para la administración correcta de antituberculosos, sobre todo teniendo en cuenta el problema que supone el incremento, cada vez mayor, que se viene observando en el número de aislamientos de cepas resistentes [14]. Pina-Vaz *et al.* [143] determinan la susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a estreptomycin, isoniazida, rifampicina y etambutol. Después de tres días de incubación en presencia del antituberculoso en el sistema MGIT, los microorganismos se tiñen con el fluorocromo SYTO 16, que sólo penetra en las células con alteración de la membrana celular y, comparando la intensidad de la señal de fluorescencia obtenida a partir de estos microorganismos con la obtenida a partir de microorganismos incubados durante el mismo tiempo sin la presencia del antituberculoso, se puede diferenciar entre cepas sensibles, intermedias o resistentes, obteniendo unos resultados que muestran una excelente concordancia con los obtenidos mediante una incubación de unas tres semanas en el sistema BACTEC MGIT 960. Kirk *et al.* [98] determinan la susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* estudiando la habilidad de la micobacteria para hidrolizar, mediante esterases, el sustrato diacetato de fluoresceína que pasa a fluoresceína, compuesto que emite fluorescencia cuando se excita con luz de longitud de onda adecuada. Si la micobacteria es sensible al antituberculoso, la capacidad hidrolítica de la micobacteria disminuye y, por lo tanto, la señal de fluorescencia detectada también disminuye. Comparando las señales de fluorescencia y de luz dispersa a 90 grados, detectadas mediante citometría de flujo, obtenidas a partir de micobacterias sin contacto con el antituberculoso con las señales obtenidas a partir de micobacterias con una incubación de tan solo 24 horas con isoniazida, etambutol o rifampicina obtienen concordancias del 95 %, 92 % y 83 % respectivamente con respecto al antibiograma obtenido mediante el método de las proporciones.

Antibiograma directo

Ivancic *et al.* [86] realizan un antibiograma mediante bioluminiscencia en el que ensayan 85 muestras de orina monobacterianas y estudian los antibióticos ampicilina, cefalotina, ciprofloxacino, gentamicina, nitrofurantoína, trimetropim-sulfametoxazol y vancomicina. Para la realización del antibiograma primero es preciso eliminar el ATP presente en la orina de origen no bacteriano y después realizar la extracción del ATP bacteriano intracelular. Para estudiar la sensibilidad comparan la señal de ATP procedente de una alícuota de orina positiva sin antibiótico con la señal de ATP procedente de otra alícuota de la misma orina que ha estado incubada durante dos horas con antibiótico. De esta manera, logran un 91 % de concordancia con la CMI obtenida a partir de la colonia mediante dilución en caldo. También refieren que existe una relación directamente proporcional entre la luz emitida y la concentración bacteriana en la orina, pudiendo llegar a detectar concentraciones bacterianas $<1 \cdot 10^3$ UFC/ml.

La nefelometría también ha sido aplicada para la realización de un antibiograma directo a partir de muestra de orina. Ilki *et al.* [85] centrifugan los tubos del sistema UroQuick o HBandL™ que contienen las orinas incubadas que han sido marcados como positivos. A partir del sedimento obtenido se realiza la identificación y la determinación de la susceptibilidad mediante el sistema VITEK 2. Tomando como *gold standard* de identificación la obtenida a partir de la colonia mediante el sistema VITEK 2 y como *gold standard* de susceptibilidad la obtenida mediante difusión en disco-placa obtienen, con un tiempo de 11 horas, una concordancia >90 %. Por otra parte, Roveta *et al.* [155] introducen, de forma manual en el sistema UroQuick o HBandL™, una alícuota de la orina positiva junto con el antibiótico en los diferentes tubos que contienen un caldo de enriquecimiento. En cinco horas se puede predecir la susceptibilidad del microorganismo presente en la orina con una concordancia >90 % con respecto a los resultados de susceptibilidad obtenidos mediante difusión en disco-placa.

Por otra parte, se han utilizado las tiras comerciales con un gradiente de antibiótico para realizar un antibiograma directo a partir de muestras respiratorias. Para ello las muestras se siembran en placas de agar Mueller-Hinton y seguidamente se depositan las tiras con antibiótico. Las placas son incubadas durante 24 horas y, una

vez crecidas las colonias, la CMI puede ser calculada. Para expresar los resultados del antibiograma directo, éstos se clasifican, de acuerdo a la *Food and Drug Administration* (FDA) [67], como concordancias (*agreements*), errores menores (*minor errors*), errores importantes (*major errors*) y errores muy importantes (*very major errors*). Tomando como *gold standard* los resultados de susceptibilidad obtenidos mediante microdilución en caldo, Boyer *et al.* [19] obtienen un 88,9 % de concordancias, un 1,5 % de errores muy importantes y un 9,6 % de errores importantes, y Bouza *et al.* [18] obtienen un 96,44 % de concordancias, un 1,98 % de errores importantes y un 1,56 % de errores menores.

Cohen *et al.* [34] diseñan un procedimiento, mediante citometría de flujo, para la detección bacteriana y el estudio de la sensibilidad a amikacina a partir de muestra directa. Cuando aplican el procedimiento a 43 muestras clínicas, que incluyen líquidos biológicos y exudados, logran obtener, en menos de dos horas, una sensibilidad del 74 % y una especificidad del 88 % para la detección de bacterias y una concordancia del 92 % en la susceptibilidad a amikacina. Por otra parte, Gauthier *et al.* [71], realizan un antibiograma mediante citometría de flujo a partir de muestras de orina. Para ello, usan dos fluorocromos, el yoduro de propidio y el bis-(1,3-dibutilbarbiturato) trimetilnaoxonol o DiBAC4(3); éste último penetra en las células que presentan la membrana despolarizada y ambos aumentan la señal cuando la célula no es viable. Analizan 114 muestras de orina y realizan las mediciones de la señal fluorescente tras una incubación de dos horas en la presencia de los diferentes antibióticos. De este modo obtienen un 2 % de discrepancias con respecto a la susceptibilidad determinada mediante microdilución en caldo.

Antibiograma directo a partir del frasco de hemocultivo crecido

Dado que para la interpretación del antibiograma es imprescindible conocer la especie microbiana que se está estudiando, las técnicas que se describen a continuación permiten realizar también la identificación microbiana. Dentro de los ensayos moleculares basados en la amplificación/detección de ácidos nucleicos, para la detección de *Staphylococcus aureus* y su resistencia a meticilina se han comercializado varios sistemas como el GeneXpert MRSA/SA (Cepheid, Sunnyvale, CA, EE.UU.) o el Staph

ID/R Blood Culture Panel (Great Basin Diagnostics, Salt Lake City, UT, EE.UU.). Estos sistemas requieren una hora para realizar las determinaciones y presentan una sensibilidad y especificidad muy cercanas al 100 % [136, 171, 192]. El sistema GeneOhm Staph SR (Becton Dickinson, Maryland, EE.UU.) es otro sistema que permite la detección de *Staphylococcus aureus* y su resistencia a meticilina, también con una sensibilidad y especificidad muy cercanas al 100 %. Sin embargo, éste requiere dos horas [76, 172]. En la detección de bacterias grampositivas, el sistema Verigene BC-GP Blood Culture Nucleic Acid Test (Nanosphere, Northbrook, IL, EE.UU) es capaz de detectar estafilococos, estreptococos, enterococos, micrococos y *Listeria* spp., así como la resistencia a meticilina en estafilococos y a vancomicina en enterococos. Este sistema requiere tres horas para proporcionar un resultado y muestra una sensibilidad y especificidad muy cercanas al 100 % [137]. En la detección de bacterias (grampositivas y gramnegativas) y levaduras, el sistema FilmArray Blood Culture Identification panel (BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT, EE.UU.) realiza una PCR múltiple que permite detectar, en una hora, 15 géneros bacterianos, 11 especies bacterianas y cinco especies de levaduras, y además los genes de resistencia *mecA*, *vanA/B* y *bla_{KPC}*. La sensibilidad va del 83 % al 100 % y la especificidad es >99 %, dependiendo del patógeno estudiado [16]. Hyplex BloodScreen PCR ELISA (Amplex BioSystems, Giessen, Alemania) es un sistema que detecta varias especies bacterianas grampositivas y gramnegativas, además de la presencia del gen *mecA*. Esta metodología incluye una PCR en la que se amplifica el gen que codifica para el ARNr 16S; seguidamente, el producto de amplificación de la PCR es detectado mediante un ensayo enzimático del tipo del *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Este sistema requiere un tiempo de seis horas y presenta una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 92,5 % al 100 % para la detección de bacterias gramnegativas, una sensibilidad del 96,6 % al 100 % y una especificidad del 100 % para bacterias grampositivas, y una sensibilidad y especificidad del 100 % para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina [186].

Mediante el sistema MALDI-TOF es posible detectar la presencia de enzimas bacterianas que degradan antibióticos a partir de frascos de hemocultivo preparados artificialmente con cepas caracterizadas fenotípicamente o genéticamente del mismo modo descrito en el cultivo [170].

Para la realización de la identificación bacteriana y la obtención del antibiograma a partir del hemocultivo crecido se han utilizado diversos métodos comerciales empleados en la rutina de trabajo para la obtención de los mismos parámetros a partir de la colonia. Los resultados obtenidos directamente a partir del frasco de hemocultivo se muestran en la Tabla 1. Para la identificación bacteriana se requieren tres horas, con pobres resultados en bacterias grampositivas y aceptables en gramnegativas; sin embargo, para obtener el antibiograma se precisan 14 horas, obteniendo buenos resultados tanto en bacterias grampositivas como gramnegativas [22, 39, 69, 72, 112, 114, 148, 189].

Finalmente, se han aplicado pruebas inmunocromatográficas a partir del frasco de hemocultivo crecido. El test BinaxNOW PBP2a (Alere, Waltham, MA, EE.UU.), utilizado para la determinación de susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* a meticilina, requiere unos 30 minutos y muestra una sensibilidad del 95,4 % y una especificidad del 100 % [152]. El test Keypath MRSA/MSSA Blood Culture Test (MicroPhage, Longmont, CO, EE.UU.) permite la detección de *Staphylococcus aureus* y del gen *mecA*. Requiere unas cinco horas y presenta una sensibilidad y especificidad del 84 % al 100 % [137].

Ante la importancia del procesamiento de los hemocultivos en Microbiología Clínica, sería de notable interés diseñar un procedimiento mediante el cual se puedan identificar las bacterias presentes en el hemocultivo, además de poder ensayar los antibióticos de uso más común en la práctica clínica. De este modo, se podría emitir un informe con los resultados microbiológicos en pocas horas. Este procedimiento sería de interés vital para los pacientes que padecen infecciones graves dado que, según los datos de Kumar *et al.* [104], en la sepsis cada hora de retraso en la administración de antibióticos está ligada a una reducción de la supervivencia de casi el 8 %.

Tabla 1. Resultados de la identificación directa y de la determinación de la susceptibilidad a partir de frasco de hemocultivo crecido mediante sistemas comerciales

Autores [referencia]	Equipo utilizado	Grupo bacteriano estudiado	Porcentaje identificación	Porcentaje susceptibilidad	Tiempo requerido para la identificación (horas)	Tiempo requerido para la susceptibilidad (horas)
Bruins <i>et al.</i> [22]	VITEK 2	Enterobacterias <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	93	99,2	3	19
Funke <i>et al.</i> [69]	Phoenix	Bacilos gramnegativos	92,9	99	No publicado	No publicado
Ling <i>et al.</i> [112]	VITEK 2	Bacilos gramnegativos	82,2	97,6	3,3	17,5
Quesada <i>et al.</i> [148]	VITEK 2	Bacilos gramnegativos	96,5	99,2	6	8,2
	MicroScan		93,8	99,5	12	12
Lupetti <i>et al.</i> [114]	Phoenix	Cocos grampositivos	82	77	24	24
Wimmer <i>et al.</i> [189]	MALDI-TOF Phoenix	Bacilos gramnegativos	98	98,1	35,1	35,1
Chen <i>et al.</i> [39]	VITEK 2	Grampositivos	33,3	89,7	3	16,3
		Gramnegativos	87,9	94,6	2,5	11,3
Gherardi <i>et al.</i> [72]	VITEK 2	Grampositivos	75	96,2	7,7	13,8
		Gramnegativos	100	98,7	7,2	12,1
	Phoenix	Grampositivos	43,8	99,5	15,3	15,3
		Gramnegativos	92,3	99	14,9	14,9

OBJETIVOS

De lo expuesto en la Introducción se desprende la importancia del desarrollo de procedimientos rápidos en los laboratorios de Microbiología Clínica. En este contexto, el objetivo general de esta tesis doctoral es optimizar, especialmente en términos de tiempo de análisis, diferentes metodologías habituales en Microbiología Clínica, como son la identificación microbiana mediante MALDI-TOF y la determinación de la susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos. Este objetivo general, se concreta en los siguientes objetivos específicos:

1. Diseñar y evaluar un protocolo para la identificación microbiana directa mediante MALDI-TOF a partir de muestras de orina positivas monomicrobianas.
2. Diseñar y evaluar un protocolo de identificación bacteriana directa a partir de muestras de orina monomicrobianas con baja carga bacteriana mediante MALDI-TOF.
3. Diseñar y evaluar un protocolo para la identificación de bacterias a partir de medios de enriquecimiento mediante MALDI-TOF.
4. Diseñar y evaluar un protocolo para la identificación microbiana directa a partir de frascos de hemocultivo crecidos mediante MALDI-TOF.
5. Diseñar y evaluar un método para la realización de un antibiograma rápido a partir del frasco de hemocultivo crecido.

MATERIAL Y MÉTODOS

IDENTIFICACIÓN MICROBIANA DIRECTA MEDIANTE MALDI-TOF

Identificación microbiana directa a partir de muestras de orina monomicrobianas

Determinación del tamaño muestral

Asumiendo el denominador objeto de estudio como las orinas positivas con aislamientos bacterianos durante un año (3.272 en el año 2010 en el Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid) y aceptando un riesgo alfa de 0,95 para una precisión de $\pm 0,1$ unidades en un contraste bilateral para una proporción estimada de 0,5, para la validación del protocolo de centrifugación diferencial se precisó un tamaño del grupo de estudio formado por 95 orinas positivas monobacterianas con recuentos $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml. Se estimó una tasa de reposición del 0 %. Finalmente, en este estudio se procesaron 100 orinas. Todas las orinas incluidas en el estudio fueron recogidas mediante micción espontánea, instruyendo previamente a los pacientes para que recogiesen el chorro medio. Sólo se incluyeron las orinas monomicrobianas dado que más del 95 % de las infecciones urinarias están causadas por una sola especie bacteriana [168], considerándose como tales las que, además de una colonia mayoritaria con recuentos $\geq 1 \cdot 10^3$ UFC/ml en las placas de aislamiento, presentaron otras colonias con un recuento ≤ 100 UFC/ml [190].

Influencia de la carga bacteriana de la orina en la capacidad de identificación del sistema MALDI-TOF

Para estudiar la relación entre la concentración bacteriana en muestras de orina y la calidad de la identificación mediante MALDI-TOF a partir de muestra directa se procesaron, adicionalmente, 14 orinas con recuentos entre $5 \cdot 10^4$ y $1 \cdot 10^5$ UFC/ml, 17 orinas con recuentos entre $1 \cdot 10^4$ y $5 \cdot 10^4$ UFC/ml y seis orinas con recuentos $< 1 \cdot 10^4$

UFC/ml. Para estudiar la influencia de la carga microbiana en la identificación directa de levaduras en orina se procesaron cuatro muestras más, dos con un recuento $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml y dos con un recuento entre $1 \cdot 10^4$ y $5 \cdot 10^4$ UFC/ml.

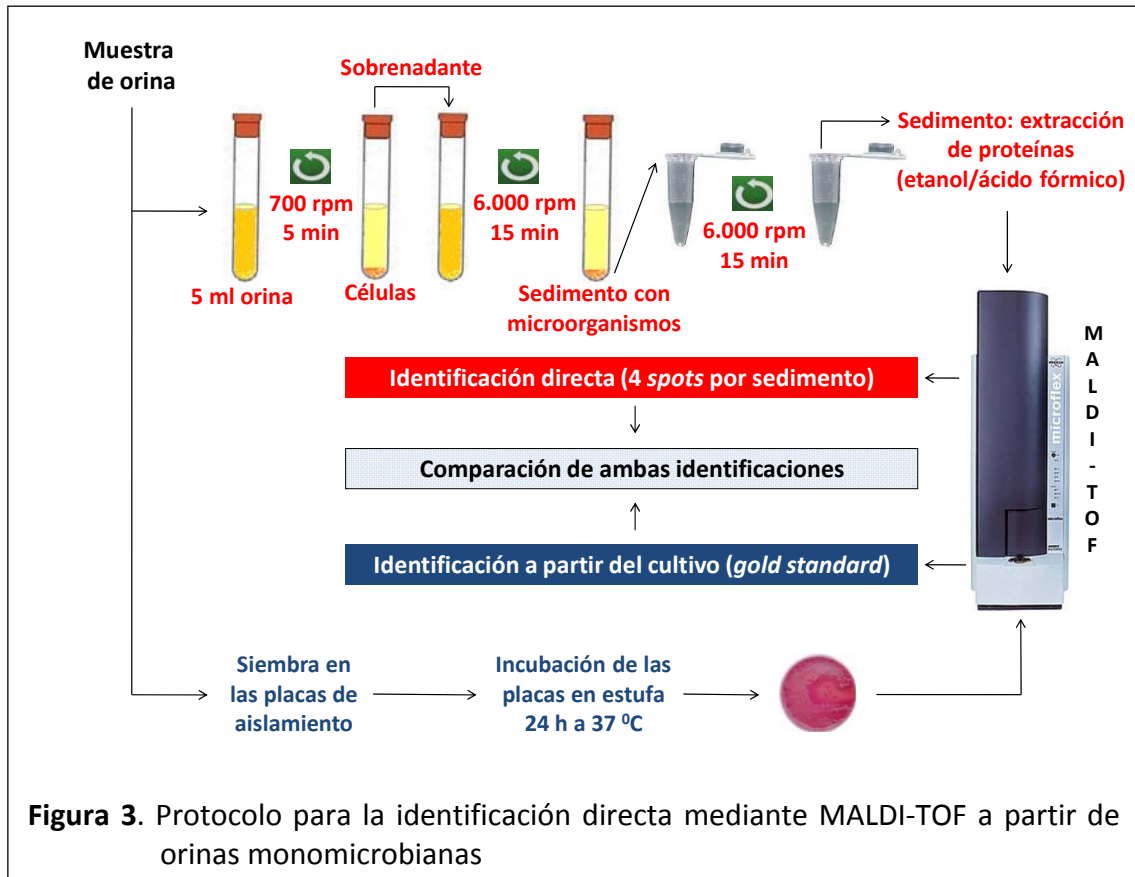
Procedimiento de trabajo

Las muestras de orina con un volumen superior a 5 ml se sembraron, con un asa calibrada, en placas de agar Columbia suplementado con 5 % sangre de carnero (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) y medio de MacConkey (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia); adicionalmente se añadió una placa de agar Sabouraud + Cloranfenicol (Difco, Sparks, MD, EE.UU.) en el caso que se solicitase el análisis de hongos. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas en atmósfera aerobia. Una vez crecidas las colonias se realizó la identificación mediante MALDI-TOF según la técnica descrita más adelante. Finalmente, las muestras que proporcionaron crecimiento de más de un tipo de microorganismo en las placas de aislamiento fueron rechazadas.

Para realizar la identificación directa las orinas se procesaron siguiendo el siguiente protocolo (Figura 3): la muestra se homogeneizó por agitación y se centrifugaron 5 ml de orina durante 5 minutos a 700 rpm con el fin de sedimentar las células y otras partículas grandes. El sobrenadante, que contiene los microorganismos a identificar, se transfirió a otro tubo de centrifuga que se centrifugó durante 15 minutos a 6.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril calidad *High-performance liquid chromatography* (HPLC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Este volumen se transfirió a un tubo *ependorf* que se centrifugó nuevamente durante 15 minutos a 6.000 rpm. Finalmente, tal y como se indica más adelante, con el sedimento obtenido se realizó una extracción de proteínas y a partir del sobrenadante obtenido se realizaron cuatro *spots* que fueron leídos mediante el sistema MALDI-TOF.

Procesamiento de los resultados

Los resultados de la identificación directa obtenidos se interpretaron de acuerdo con los criterios de validación descritos previamente por Moussaoui *et al.* [126], Schubert *et al.* [161], Stevenson *et al.* [175] y La Scola y Raoult [105]. En aquellos casos



en los que el criterio de los distintos autores se basa en una sola lectura se eligió la primera de las cuatro realizadas y las tres restantes se descartaron. Además, se valoraron distintas combinaciones de las puntuaciones obtenidas y se definió un nuevo criterio de validación. Para ello, se consideró una identificación directa como correcta cuando el resultado de tal identificación coincidió a nivel de especie con la obtenida mediante MALDI-TOF a partir de la colonia validada con los criterios del fabricante (*gold standard*).

Para la comparación de los resultados de las identificaciones obtenidos en función del criterio de validación aplicado utilizó la prueba de McNemar y para comparar la distribución de frecuencias de la población con la del grupo de estudio la prueba Chi-cuadrado.

Identificación microbiana directa a partir de muestras de orina monomicrobianas preincubadas en caldo de enriquecimiento

Se procesaron, de forma aleatoria, 200 orinas monomicrobianas que proporcionaron un valor $\geq 1 \cdot 10^5$ bacterias/ml en el citómetro de flujo Sysmex UF-1000i (Sysmex Corporation, Kobe, Japón). Las orinas incluidas en el estudio fueron recogidas mediante micción espontánea, instruyendo previamente a los pacientes para que recogiesen el chorro medio. En este caso también se consideraron como orinas monomicrobianas la que, además de una colonia mayoritaria con recuentos $\geq 1 \cdot 10^3$ UFC/ml en las placas de aislamiento, presentaron otras colonias con un recuento ≤ 100 UFC/ml [190].

En la Figura 4 se resume el esquema de trabajo seguido. Las muestras de orina que llegaron al laboratorio fueron analizadas mediante un citómetro de flujo Sysmex UF-1000i. Se seleccionaron las que proporcionaron valores $\geq 1 \cdot 10^5$ bacterias/ml, dado que este es el umbral del recuento microbiano utilizado en laboratorio de Microbiología Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valladolid para discriminar entre orinas positivas y negativas en el cribado. Este equipo utiliza 0,8 ml de muestra en modo manual y 1,2 ml en modo automático, y puede procesar hasta 100 muestras/hora. Cuando se introduce la muestra, ésta es teñida mediante colorantes de polimetina en dos canales analíticos separados, uno para las bacterias y otro para las otras partículas de la orina. A continuación, la muestra se transfiere a una celda de flujo, en la que, mediante el enfoque hidrodinámico, se alinean las partículas a analizar, consiguiendo así que el haz de láser incida sobre cada partícula. La luz dispersada por cada partícula se detecta en dos direcciones diferentes: la misma que el haz incidente y la que forma un ángulo de 90 grados con el mismo haz incidente. Combinando esta información, el equipo Sysmex UF-1000i puede clasificar y cuantificar bacterias, levaduras, hematíes, leucocitos, células epiteliales, células redondas pequeñas, cilindros, espermatozoides, cristales y moco [116, 141]. Para realizar el análisis cuantitativo de las bacterias el equipo utiliza, como estándares de calibración, microesferas o micropartículas que incorporan un marcador fluorescente, y compara la señal de estos estándares con las de la muestra. El fluorocromo utilizado es un derivado de la polime-

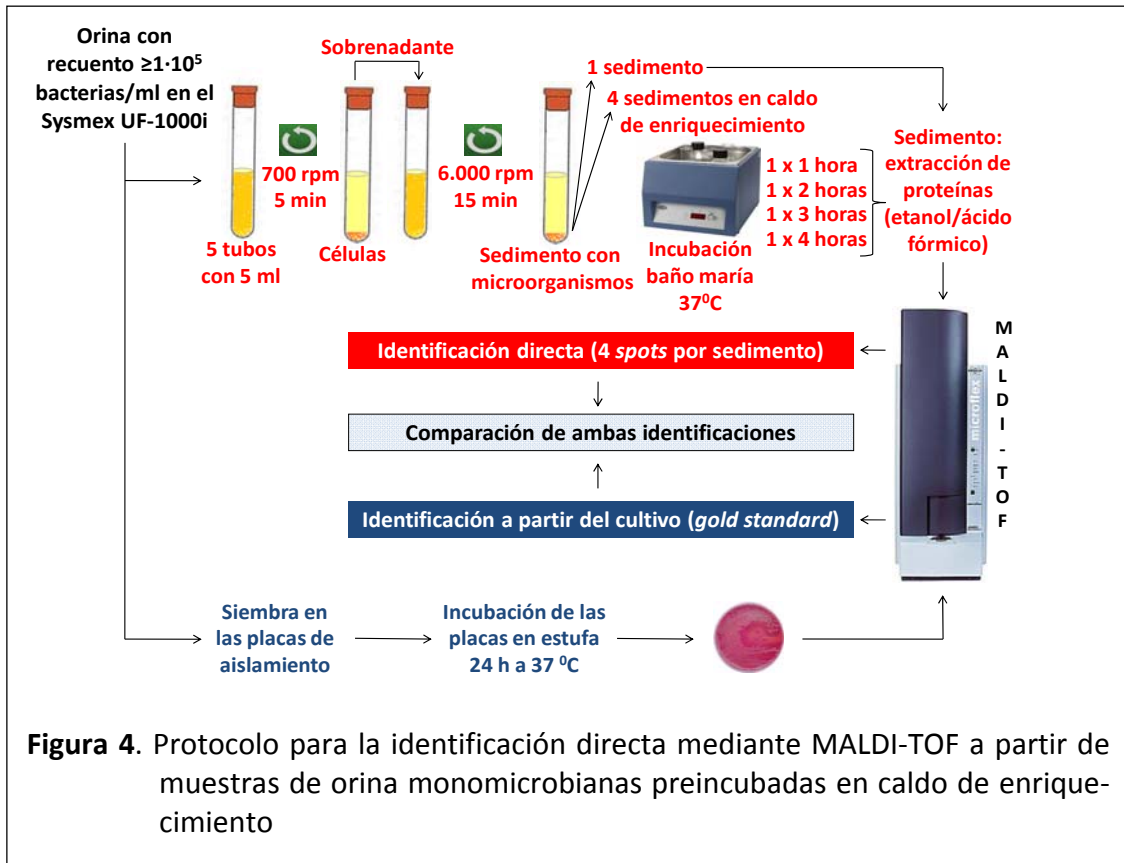


Figura 4. Protocolo para la identificación directa mediante MALDI-TOF a partir de muestras de orina monomicrobianas preincubadas en caldo de enriquecimiento

tina que tiñe tanto las bacterias vivas como las muertas [153]. El rango de linealidad para el recuento microbiano va de $1 \cdot 10^4$ UFC/ml a $1 \cdot 10^8$ UFC/ml [180].

En las orinas monomicrobianas seleccionadas se realizó la identificación directa y a partir de las colonias en las placas de aislamiento. Para realizar la identificación a partir del cultivo, las orinas se sembraron tal y como se ha indicado anteriormente. Una vez crecidas las colonias, se realizó la identificación mediante MALDI-TOF según la técnica descrita más adelante. Finalmente, los recuentos de la colonia mayoritaria fueron clasificados como $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml o $< 1 \cdot 10^5$ UFC/ml. Para realizar la identificación directa se procesaron 5 ml de orina tal y como se ha descrito anteriormente. Paralelamente, con el fin de aumentar la carga bacteriana hasta alcanzar una concentración suficiente para la identificación microbiana mediante MALDI-TOF, se procedió a una incubación previa en un medio de enriquecimiento. Para ello, la muestra se homogeneizó por agitación y se separaron 4 alícuotas de 5 ml. Cada alícuota se centrifugó durante 5 minutos a 700 rpm. El sobrenadante obtenido se transfirió a otro tubo de centrifuga que se centrifugó durante 15 minutos a 6.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y cada sedimento obtenido se inoculó en un tubo con 9 ml de caldo infusión

cerebro corazón (Difco, Sparks, MD, EE.UU.). Estos cuatro tubos se incubaron en baño de agua a 37 °C durante 1, 2, 3 y 4 horas respectivamente. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó cada tubo a 6.000 rpm durante cinco minutos. El sedimento obtenido se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril calidad HPLC y se transfirió a un tubo *ependorf* que se centrifugó a 6.000 rpm durante cinco minutos. Finalmente, tal y como se indica más adelante, con el sedimento obtenido se realizó una extracción de proteínas y a partir del sobrenadante obtenido se realizaron cuatro *spots* que fueron leídos mediante el sistema MALDI-TOF.

El procesamiento de los resultados se realizó del mismo modo descrito anteriormente con la diferencia que en este caso no se propuso ningún criterio de validación, sino que se aplicó, además de los criterios publicados, el propuesto en este trabajo.

Identificación microbiana directa a partir de medios de enriquecimiento

Se procesaron 100 medios de enriquecimiento, 82 caldos infusión de cerebro y corazón para bacterias aerobias y 18 medios de tioglicolato (Difco, Sparks, MD, EE.UU.) para bacterias anaerobias. Estos medios correspondían a 76 exudados de herida, 15 drenajes, cinco líquidos biológicos y cuatro muestras de biopsias que habían proporcionado crecimiento negativo en las placas de aislamiento.

Para llevar a cabo la identificación directa mediante MALDI-TOF se centrifugaron 4 ml de medio durante 5 minutos a 6.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y con el sedimento obtenido se realizó una extracción de proteínas y la identificación mediante MALDI-TOF.

Finalmente, los resultados de la identificación directa obtenidos se interpretaron de acuerdo con el nuevo criterio propuesto en esta tesis, considerando como *gold standard* la identificación obtenida mediante MALDI-TOF a partir de la colonia utilizando los criterios de validación del fabricante.

Identificación microbiana directa a partir de frascos de hemocultivo crecidos

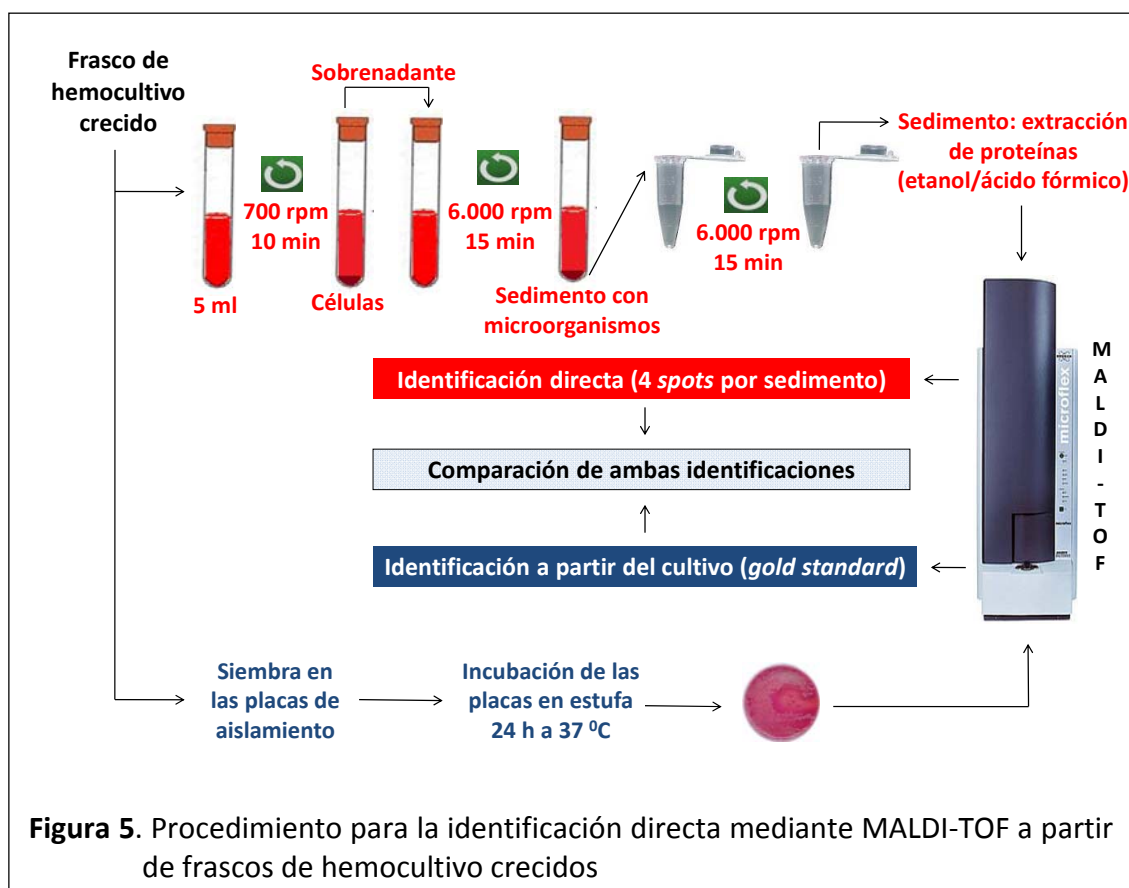
Determinación del tamaño muestral

Asumiendo el denominador objeto de estudio como los hemocultivos positivos de un año (1.718 en el año 2010, datos del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid). Aceptando un riesgo alfa de 0,95 para una precisión de $\pm 0,1$ unidades en un contraste bilateral para una proporción estimada de 0,5 para la validación del protocolo de centrifugación diferencial aplicado a hemocultivos, se precisó una muestra aleatoria de 92 sujetos. Se estimó una tasa de reposición del 0 %. Finalmente, se procesaron 100 frascos de hemocultivo monobacterianos.

Procedimiento de trabajo

Los frascos de hemocultivo BD BACTEC™ Plus Aerobic/F Culture Vials y BACTEC™ Plus Anaerobic/F Culture Vials, procedentes de pacientes, se incubaron en el sistema Bactec (Becton Dickinson, Sparks, MD, EE.UU.). Con el fin de procesar únicamente los frascos de hemocultivo monobacterianos, en el momento que el sistema proporcionó una lectura positiva se comprobó la presencia de un único tipo de microorganismo mediante un examen microscópico en fresco con contraste de fases y tinción de Gram.

Con el fin de lograr la identificación directa mediante MALDI-TOF se aplicó el protocolo de centrifugación diferencial resumido en la Figura 5. Se transfirieron 5 ml del contenido del frasco de hemocultivo monobacteriano homogeneizado a un tubo de centrifuga y se centrifugaron durante 10 minutos a 700 rpm con el fin de sedimentar las células y otras partículas grandes. El sobrenadante obtenido, que contenía los microorganismos a identificar, se transfirió a otro tubo de centrifuga y se centrifugó a 6.000 rpm durante 15 minutos para forzar la sedimentación de los microorganismos. Seguidamente el sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril calidad HPLC. Este volumen se transfirió a un tubo *ependorf* que se centrifugó nuevamente durante 15 minutos a 6.000 rpm. Finalmente, tal y como se indica más adelante, con el sedimento obtenido se realizó una extracción de proteínas



y a partir del sobrenadante obtenido se realizaron cuatro *spots* que fueron leídos mediante el sistema MALDI-TOF.

Además, los frascos se procesaron de acuerdo con el protocolo que se sigue en el laboratorio: los frascos de hemocultivos aerobios se sembraron en placas de agar Columbia suplementado con 5 % sangre de carnero, medio de MacConkey, agar chocolate suplementado con PolyVitex (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Francia) y los frascos de hemocultivos anaerobios se sembraron en placas de agar chocolate suplementado con PolyVitex y medio de Schaedler (Difco, Sparks, MD, EE.UU.). Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C en atmósfera aerobia con 5 % CO₂ excepto el medio de Schaedler, que se incubó a 37 °C en anaerobiosis. Con las colonias obtenidas se realizó la identificación mediante MALDI-TOF, tal y como se indica más adelante.

Procesamiento de los resultados

Los resultados de la identificación directa obtenidos se interpretaron de acuerdo con los criterios de validación descritos previamente por Moussaoui *et al.* [126],

Schubert *et al.* [161], Stevenson *et al.* [175] y La Scola y Raoult [105]. En aquellos casos en los que el criterio de los distintos autores se basó en una sola lectura se eligió la primera de las cuatro realizadas y las tres restantes no se consideraron. Además, se valoraron distintas combinaciones de las puntuaciones obtenidas y se definió un nuevo criterio de validación. Para ello, se consideró una identificación directa como correcta cuando el resultado de tal identificación coincidió a nivel de especie con la obtenida mediante MALDI-TOF a partir de la colonia validada con los criterios del fabricante (*gold standard*).

Para la comparación de los resultados de las identificaciones obtenidas en función del criterio de validación aplicado se utilizó la prueba de McNemar y para comparar la distribución de frecuencias de la población con la del grupo de estudio se utilizó la prueba Chi-cuadrado.

Análisis mediante el equipo MALDI-TOF

Extracción de proteínas (técnica de etanol/ácido fórmico)

Para la extracción de proteínas los sedimentos obtenidos a partir de la orina, así como los del procesamiento de frascos de hemocultivos crecidos y de los medios de enriquecimiento se mezclaron con 300 µl de agua destilada estéril calidad HPLC y 900 µl de etanol absoluto (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), agitándose en vórtex hasta obtener una suspensión homogénea. La mezcla se centrifugó 2 minutos a 13.000 rpm y se eliminó el sobrenadante. A continuación se añadieron 25 µl de ácido fórmico al 70 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en agua destilada estéril calidad HPLC y 25 µl de acetonitrilo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), se agitó en vórtex y se centrifugó 1 minuto a 13.000 rpm. Con el sobrenadante obtenido se realizaron cuatro *spots* de 1 µl cada uno en cuatro puntos distintos de la tarjeta de metal portamuestras. Se dejaron secar a temperatura ambiente y se añadió 1 µl de la disolución de matriz sobre cada *spot* a analizar. Se dejó secar y, finalmente, se procedió a la lectura de los cuatro *spots* de cada muestra.

La matriz utilizada para llevar a cabo la identificación mediante el equipo MALDI-TOF consistió en una disolución de ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinámico en acetonitri-

lo al 50 % y ácido trifluoroacético al 2,5 %. Para prepararla se añadió a 2,5 mg de ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinámico (Fluka Analytical, St. Louis, MO, EE.UU.) 250 µl de disolvente orgánico, se agitó en vórtex hasta su disolución y se separaron alícuotas de 100 µl que se conservaron congeladas a -80 °C. Para preparar 1 ml de disolvente orgánico se mezcló 475 µl de agua destilada estéril calidad HPLC, 500 µl de acetonitrilo y 25 µl de ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.).

Identificación microbiana a partir del cultivo

Para realizar la identificación a partir de las colonias del cultivo se depositó, con un asa, cierta cantidad de una colonia sobre un punto de la placa portamuestras, se añadió 1 µl de la disolución de matriz. Finalmente, se dejó secar y se procedió a la lectura de los *spots* realizados.

Lectura mediante el equipo MALDI-TOF

El análisis de proteínas se llevó a cabo mediante un espectrómetro de masas MALDI Microflex LT (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) con el software FLEX-Control v. 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania). El espectro de masas se obtuvo en modo positivo lineal (frecuencia y longitud de onda del láser N₂: 60 Hz y 337 nm, voltaje de la fuente de iones I:20 kV, voltaje de la fuente de iones II:16,7 kV; rango de masas del detector: 2.000 - 20.137 Da).

El equipo fue calibrado diariamente siguiendo las normas del fabricante. Para ello se utilizó el producto Bruker Bacterial Standard (BTS) (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) constituido por un extracto de la cepa *Escherichia coli* DH5 alpha y dos proteínas adicionales (RNasa A y mioglobina). Para prepararlo se introdujeron 50 µl del disolvente orgánico descrito anteriormente a un tubo que contenía BTS liofilizado y se pipeteó 20 veces para lograr la completa disolución. Se dejó reposar cinco minutos a temperatura ambiente y se volvió a pipetear 20 veces. Finalmente, el tubo se centrifugó 1 minuto a 13.000 rpm y se separaron alícuotas de 10 µl que se congelaron a -20 °C.

Las muestras se procesaron mediante la realización de “proyectos”, que son el conjunto de identificaciones que se realizan en un mismo lote junto con el control interno. El control interno utilizado es una alícuota de BTS que debe proporcionar una identificación de *Escherichia coli* con una puntuación $\geq 2,000$. Una vez obtenida la huella de masas de péptidos del microorganismo a identificar, ésta se compara con las huellas de los microorganismos conocidos presentes en la base de datos de tal forma que la huella problema se puede asociar, mediante el programa Maldi Biotyper 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania), con la huella más semejante y realizar así la identificación del microorganismo. Actualmente, la base de datos del MALDI-TOF incorpora 5151 entradas que se corresponden con 440 géneros y 2642 especies de bacterias incluyendo micobacterias, levaduras y hongos.

Una vez realizado el análisis de proteínas el software proporciona un listado de diez microorganismos ordenados de mayor a menor puntuación. Esta puntuación corresponde a un nivel de identificación de tal forma que puntuaciones entre:

- 0,000 y 1,699 indican una identificación poco fiable.
- 1,700 y 1,999 indican una identificación probable de género.
- 2,000 y 2,299 indican una identificación segura de género e identificación probable de especie.
- 2,300 y 3,000 indican una identificación segura de género y alta probabilidad de identificación de especie.

Según estos criterios se pueden aceptar como identificaciones válidas aquellas en las que se obtiene una puntuación $\geq 2,000$ en el primer microorganismo del listado. El software también elabora un índice de consistencia. Éste es un dato que informa sobre la calidad de la identificación que no afecta a la validez de los resultados, y se establece en función de la concordancia a nivel de especie o de género que existe entre los diez microorganismos propuestos para cada identificación.

ANTIBIOGRAMA RÁPIDO A PARTIR DEL FRASCO DEL HEMOCULTIVO CRECIDO

Diseño del sistema

En la preparación de los hemocultivos positivos artificiales se utilizaron cinco cepas de colección que poseen una susceptibilidad conocida: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 33853, *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Estas cepas son las que se recomienda utilizar en el control de calidad de los antibiogramas. Los hemocultivos positivos se prepararon introduciendo, en cada frasco de hemocultivo BD BACTEC™ Plus Aerobic blood culture bottles/F Culture Vials, 150 µl de una suspensión bacteriana con una turbidez equivalente al 0,5 McFarland en agua destilada estéril de cada una de las cepas a estudiar y 5 ml de sangre humana procedente de donantes voluntarios sanos. Los frascos se incubaron en el sistema Bactec. En el momento que el sistema de incubación proporcionó una lectura positiva y se comprobó, mediante examen microscópico en fresco con contraste de fases y tinción de Gram, la presencia de un único tipo de microorganismo se procedió al estudio de la susceptibilidad a los antimicrobianos.

Preparación de los antibióticos a ensayar

Se prepararon 50 ml de disolución madre de cada uno de los siguientes antibióticos: vancomicina, oxacilina, ceftazidima, amikacina, colistina, ampicilina, cefotaxima y ciprofloxacino, de concentración 5.120 µg/ml siguiendo los procedimientos descritos por el CLSI [31]. Todos los antibióticos fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Para la preparación de las soluciones de vancomicina, oxacilina, amikacina, colistina, cefotaxima y ciprofloxacino se utilizó agua destilada como disolvente y para la disolución de ampicilina un tampón fosfato 0,1 M pH 8,0. Posteriormente, las disoluciones se esterilizaron mediante filtración con un filtro MILLEX GS de 0,22 µm (EMD® Millipore Corporation, Billerica, MA, EE.UU.) y se congelaron en alícuotas de 4 ml a -80 °C hasta su utilización. Los antibióticos ensayados con las correspondientes cepas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Antibióticos y microorganismos utilizados en el diseño del antibiograma

Microorganismo	Antibiótico	Concentraciones ensayadas ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Ampicilina	8; 16
	Vancomicina	4; 8; 16; 32
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Amikacina	16; 32; 64
	Cefotaxima	8; 16; 32; 64
	Vancomicina	2; 4; 8; 16
	Oxacilina	2; 4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 33853	Ceftazidima	8; 16; 32
	Amikacina	16; 32; 64
	Colistina	2; 4; 8
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	Ampicilina	8; 16; 32
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Amikacina	16; 32; 64
	Cefotaxima	1; 2; 4
	Ciprofloxacino	1; 2; 4

A partir de la disolución madre se prepararon, extemporáneamente, diluciones de concentraciones 640 $\mu\text{g/ml}$ del antibiótico, tal y como indica el CLSI [31]. Para vancomicina, oxacilina, amikacina, colistina, cefotaxima, ciprofloxacino y ceftazidima se utilizó agua como diluyente y para ampicilina se empleó un tampón fosfato 0,1 M pH 6,0.

Las concentraciones mencionadas en la Tabla 2 se prepararon en un volumen final de 30 ml a partir de las soluciones de antibiótico de 640 $\mu\text{g/ml}$. El medio de cultivo utilizado fue caldo Mueller-Hinton (Difco, Sparks, MD, EE.UU.), con los cationes ajustado y suplementado con 1 % Pluronic® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Además, para cada cepa estudiada se preparó un control sin antibiótico del mismo medio de cultivo. Para preparar el caldo de Mueller-Hinton se suspendieron 22 g del polvo en un litro de agua destilada. Se dejó reposar durante cinco minutos, se calentó con agitación hasta su completa disolución y se dejó hervir durante un minuto. Para ajustar los cationes se añadió, a 1 litro de caldo Mueller-Hinton, 0,1 ml de la disolución madre de CaCl_2 0,25 M preparada por pesada de 3,68 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y disolución en 100 ml de agua destilada, y 0,1 ml de la disolución madre de MgCl_2 0,41 M preparada por pesada de 8,36 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y disolución en 100 ml de agua destilada. Seguidamente

el caldo se transfirió a frascos de vidrio para ser esterilizados a 121°C durante 15 minutos. Finalmente, los frascos que contenían el caldo esterilizado se guardaron a 4 °C hasta su utilización.

Determinación del inóculo

Mediante el citómetro de flujo Sysmex UF-1000i se calculó el inóculo del tubo control sin antibiótico que proporcionaba recuentos microbianos, en el momento de la inoculación (T_0) y a las tres horas de incubación (T_3), que estuvieran dentro del rango de linealidad del equipo. Para ello se añadieron alícuotas de 50 μ l de cada frasco hemocultivo crecido preparado por nosotros a un tubo con 30 ml de medio de cultivo y se determinó la concentración microbiana a los tiempos T_0 y T_3 . De esta forma se estableció la concentración inicial para cada grupo bacteriano a estudiar.

Determinación del criterio de interpretación de susceptibilidad

Los tubos con las distintas concentraciones de los antibióticos, así como los controles sin antibióticos, se sembraron utilizando el inóculo determinado según el apartado anterior. Una vez realizada la lectura de la concentración bacteriana a T_0 , los tubos con las diferentes concentraciones de antibiótico a ensayar junto con el tubo del control sin antibiótico se incubaron en baño de agua a 35 °C y se realizaron tres lecturas, a una, dos y tres horas de incubación (T_1 , T_2 , y T_3 respectivamente).

Para definir el criterio de sensibilidad/resistencia de una cepa frente al antibiótico ensayado se compararon, mediante curvas Características Operativas del Receptor (COR), las lecturas de los recuentos microbianos de las cepas estudiadas obtenidas en cada concentración de antibiótico a diferentes tiempos con las lecturas de los recuentos del control sin antibiótico realizadas a los mismos tiempos de incubación.

Comprobación de los resultados

Los frascos de hemocultivo preparados artificialmente se sembraron en placas de agar Columbia suplementado con 5 % sangre de carnero, medio de MacConkey y agar chocolate suplementado con PolyVitex. Las placas se incubaron en estufa a 37 °C

con 5 % CO₂ durante 24 horas. Una vez crecidas las colonias se realizó la identificación bacteriana mediante MALDI-TOF y se realizó el estudio de la sensibilidad a los antibióticos mediante los métodos comerciales E-test (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia), VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) y MicroScan (Siemens, New York, EE.UU.).

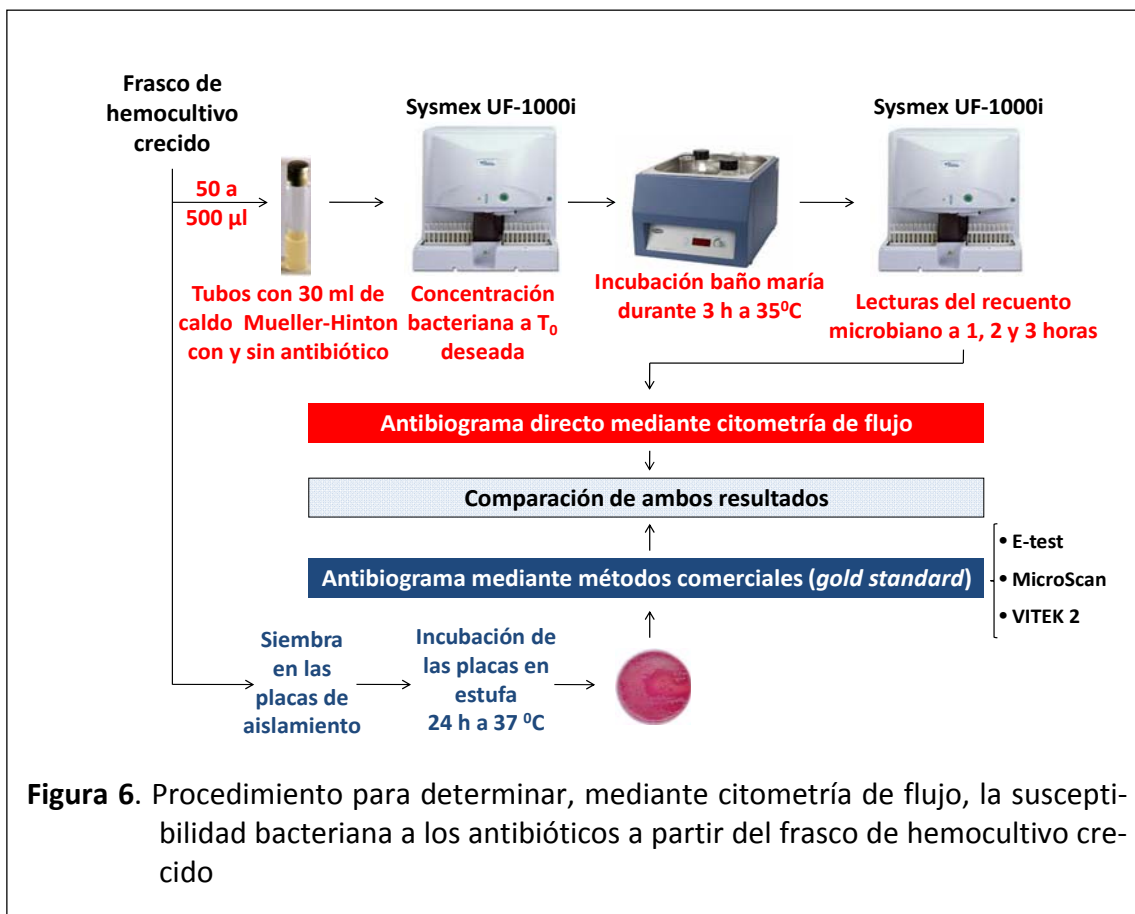
Validación del sistema

Determinación del tamaño muestral

Para la determinación del tamaño de la muestra a estudiar se asumió que el denominador objeto de estudio estaba formada por los hemocultivos positivos de un año (1.256 en el año 2012, datos del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, España). Aceptando un riesgo alfa de 0,95 para una precisión de 0,1 unidades en un contraste bilateral para una proporción estimada de 0,5 para la validación del antibiograma aplicado a hemocultivos se precisó una muestra aleatoria de 92 sujetos. Se estimó una tasa de reposición del 0 %. Finalmente, se procesaron 100 frascos de hemocultivo monobacterianos.

Procedimiento de validación

En la Figura 6 se describe el procedimiento seguido. Para la validación de la metodología diseñada se procesaron 100 frascos de hemocultivo positivos monobacterianos procedentes de pacientes del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. En primer lugar se comprobó la presencia de un único tipo de microorganismo mediante examen microscópico en fresco con contraste de fases y tinción de Gram. A continuación, siguiendo el protocolo descrito anteriormente, se procedió a la identificación del microorganismo crecido mediante MALDI-TOF. Una vez realizada la identificación directa se procedió a ensayar un antibiótico para cada cepa presente en cada hemocultivo del mismo modo descrito en el procesamiento de los hemocultivos elaborados artificialmente. Los antibióticos ensayados y las cepas estudiadas se muestran en la Tabla 3.



Comprobación de los resultados

Los frascos de hemocultivo de pacientes se sembraron del mismo modo descrito anteriormente. Una vez crecidas las colonias se realizó la identificación bacteriana mediante MALDI-TOF y se realizó el estudio de la sensibilidad a los antibióticos mediante los métodos comerciales E-test, VITEK 2 y MicroScan, interpretando las CMI obtenidas de acuerdo con los criterios publicados por el CLSI [31]. Los resultados de susceptibilidad obtenidos con estos métodos comerciales se consideraron como *gold standard* y se compararon con los obtenidos mediante citometría de flujo según recomienda la FDA [67]; para ello los resultados fueron clasificados como concordancias (cuando se obtiene la misma susceptibilidad), errores muy importantes (cuando se informa un microorganismo como sensible cuando realmente es resistente al antibiótico ensayado), errores importantes (cuando se informa un microorganismo como resistente cuando realmente es sensible al antibiótico ensayado), o errores menores (cuando se informa un microorganismo como sensible o resistente cuando realmente

es intermedio al antibiótico ensayado). Finalmente, se calculó el índice de concordancia Kappa para analizar el grado de acuerdo con la prueba *gold standard*.

Todos los cálculos estadísticos de este trabajo fueron realizados mediante el programa SPSS v.20.0.

Tabla 3. Antibióticos y microorganismos estudiados en la validación del antibiograma

Bacteria	Número de cepas	Antibiótico	Concentraciones ensayadas (µg/ml)		
<i>Enterococcus faecalis</i>	8	Ampicilina	8; 16		
<i>Enterococcus faecium</i>	2				
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	Vancomicina	4; 8; 16; 32		
<i>Staphylococcus hominis</i>	4				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3				
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1				
<i>Staphylococcus aureus</i>	1				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6	Oxacilina	0,25; 0,5		
<i>Staphylococcus hominis</i>	4				
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1				
<i>Staphylococcus aureus</i>	2				
<i>Escherichia coli</i>	4	Ciprofloxacino	1; 2; 4		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2				
<i>Enterobacter kobei</i>	2				
<i>Serratia marcescens</i>	2				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1				
<i>Enterobacter cloacae</i>	1				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3			Amikacina	16; 32; 64
<i>Staphylococcus hominis</i>	2				
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1				
<i>Staphylococcus aureus</i>	1				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1				
<i>Escherichia coli</i>	2				
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1				
<i>Enterobacter kobei</i>	1				
<i>Enterobacter cloacae</i>	1				
<i>Serratia marcescens</i>	1				
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	Cefotaxima	8; 16; 32; 64		
<i>Staphylococcus hominis</i>	2				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2				
<i>Escherichia coli</i>	3				
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2				
<i>Enterobacter kobei</i>	2				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	Ceftazidima	8; 16; 32		
<i>Serratia marcescens</i>	1				
<i>Enterobacter cloacae</i>	1				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5				
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1				
<i>Pseudomonas putida</i>	1				
<i>Acinetobacter baumannii</i>	6	Colistina	2; 4		
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	1				
<i>Acinetobacter ursingii</i>	1				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5				
<i>Pseudomonas putida</i>	1				

RESULTADOS

IDENTIFICACIÓN MICROBIANA DIRECTA MEDIANTE EL SISTEMA MALDI-TOF

Identificación microbiana directa a partir de muestras de orina monomicrobianas

Cuando se compararon los aislamientos obtenidos en el grupo de estudio formado por 100 orinas monomicrobianas con recuentos en placa $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml con los obtenidos en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid durante el año 2010 (Tabla 4) no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Además, las cuatro especies bacterianas más frecuentemente aisladas en la población lo fueron también en el grupo de estudio; éstas son, por orden de mayor a menor prevalencia, *Escherichia coli* con porcentajes de aislamiento del 55,9 % en la población y del 51 % en la muestra, *Enterococcus faecalis* con porcentajes del 17,8 % y 11 % respectivamente, *Klebsiella pneumoniae* con porcentajes del 7,9 % y 11 % respectivamente, y *Proteus mirabilis* con porcentajes del 4,5 % y 4 % respectivamente.

De las 100 orinas que formaron el grupo de estudio 63 procedieron de mujeres y 37 de varones. La edad de los pacientes estaba comprendida entre 4 y 94 años con una mediana de 69 años; y finalmente 23 de ellas provenían de pacientes ingresados.

Las orinas con recuentos en placa $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml proporcionaron elevadas puntuaciones de identificación directa mediante MALDI-TOF (próximas o superiores a 2,000) en la gran mayoría de los casos. En cambio, las puntuaciones de las identificaciones directas de las orinas con recuentos $< 1 \cdot 10^5$ UFC/ml fueron más bajas, de tal forma que las identificaciones con puntuaciones $< 1,400$ se correspondieron a microorganismos raramente causantes de infección urinaria y, en numerosas ocasiones, en una o más lecturas de las cuatro realizadas a partir de una misma muestra, no se obtuvieron picos. Por otra parte, cuando las puntuaciones fueron $\geq 1,400$, en ocasiones, las

Tabla 4. Distribución de los microorganismos aislados en muestras de orina e identificados mediante MALDI-TOF

Grupo bacteriano	Orinas positivas en el año 2010 (N=3.272)	Grupo de estudio (N=100)
<i>Enterobacteriaceae</i>	68,0 %	76 %
BGNF*	7,9 %	4 %
<i>Staphylococcus</i> spp.	6,5 %	4 %
<i>Streptococcus</i> spp.	3,9 %	5 %
<i>Enterococcus</i> spp.	13,2 %	11 %
Otros microorganismos	0,5 %	0 %

*BGNF: bacilos gramnegativos no fermentadores

propuestas de identificación de cada una de las cuatro lecturas eran diferentes, a pesar de que los microorganismos propuestos estaban incluidos entre los que frecuentemente causan una infección urinaria, de tal forma que la puntuación no era criterio suficiente para determinar la identificación de la bacteria ya que, en muchos casos, la propuesta con mayor puntuación no coincidía con la identificación obtenida a partir de la colonia. De esta forma, se observó que tomando como válida la identificación repetida como mínimo en dos de las cuatro determinaciones realizadas se obtenía una concordancia del 100 % con respecto a las identificaciones realizadas a partir de la colonia (datos no mostrados). En base a estos datos se propone un criterio nuevo de validación: un microorganismo se identifica correctamente mediante MALDI-TOF cuando realizadas cuatro lecturas de una misma muestra se obtienen, como mínimo, dos lecturas con la misma propuesta de identificación a nivel de especie en el primer microorganismo del listado, y ambas con una puntuación $\geq 1,400$.

Los resultados de las identificaciones obtenidos en el total de orinas procesadas en función del criterio de validación adoptado se exponen en la Tabla 5. Cuando se compararon los resultados de la identificación obtenidos en las orinas que forman el grupo de estudio aplicando el nuevo criterio propuesto en este trabajo con los obtenidos aplicando los criterios de validación de los distintos autores, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). En cambio, cuando se compararon los resultados de la identificación obtenidos a partir de las 37 orinas con recuentos $< 1 \cdot 10^5$ UFC/ml aplicando el nuevo criterio propuesto en este trabajo sí que se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los resultados obtenidos

Tabla 5. Porcentajes de identificaciones correctas obtenidas mediante MALDI-TOF a partir de 137 orinas monobacterianas en función del criterio de validación adoptado

Autores [referencia], tipo de criterio	Identificaciones correctas en las 100 orinas del grupo de estudio	Identificaciones correctas en 37 orinas con recuentos $<1 \cdot 10^5$ UFC/ml n (%)
Moussaoui <i>et al.</i> [126], puntuación e índice de consistencia	84 %	1 (2,7)
Schubert <i>et al.</i> [161], puntuación e índice de consistencia	84 %	1 (2,7)
Stevenson <i>et al.</i> [175], puntuación	84 %	1 (2,7)
La Scola y Raoult [105], puntuación	86 %	2 (5,4)
Nuevo criterio propuesto, puntuación	90 %	7 (18,9)

con los criterios de Moussaoui *et al.* [126] ($p < 0,05$), Schubert *et al.* [161] ($p < 0,05$) y Stevenson *et al.* [175] ($p < 0,05$); sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) cuando se aplica el criterio de La Scola y Raoult [105].

Los resultados de las identificaciones bacterianas obtenidos mediante MALDI-TOF a partir de 137 orinas aplicando el nuevo criterio de validación propuesto en esta tesis se exponen en la Tabla 6. En el grupo formado por 100 orinas monobacterianas con recuentos $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml se obtuvieron 76 aislamientos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. De las 51 muestras en las que se identificó *Escherichia coli* a partir de las colonias, sólo hubo una identificación fallida a partir de la orina. Los once aislados de *Klebsiella pneumoniae*, los cuatro de *Proteus mirabilis* y de *Klebsiella oxytoca*, los tres de *Citrobacter freundii*, el de *Enterobacter aerogenes* y el de *Serratia marcescens*, identificados a partir del cultivo mediante MALDI-TOF, fueron correctamente identificados a partir de la orina. Finalmente, de las dos orinas en las que se aisló *Enterobacter cloacae*, se obtuvo una identificación correcta en una de ellas. De cuatro orinas en las que se identificaron BGNNF (dos orinas con *Pseudomonas aeruginosa*, una con *Acine-*

Tabla 6. Resultados de las identificaciones bacterianas mediante MALDI-TOF a partir de muestra directa de orina en función de la concentración bacteriana obtenida mediante recuento en la placa

Grupo bacteriano	Recuentos $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml		Recuentos entre $5 \cdot 10^4$ y $1 \cdot 10^5$ UFC/ml		Recuentos entre $1 \cdot 10^4$ y $5 \cdot 10^4$ UFC/ml		Recuentos $< 1 \cdot 10^4$ UFC/ml	
	Identificaciones válidas n/N (%)*	Puntuación media	Identificaciones válidas n/N (%)	Puntuación media	Identificaciones válidas n/N (%)	Puntuación media	Identificaciones válidas n/N (%)	Puntuación media
Gramnegativas	77/80 (96,3)	2,063	3/10 (30)	1,650	3/11 (27,3)	1,456	0/6 (0)	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	74/76 (97,4)	2,070	3/8 (37,5)	1,650	3/8 (37,5)	1,456	-	-
BGNNF	3/4 (75)	1,809	0/2 (0)	-	0/3 (0)	-	-	-
Grampositivas	13/20 (65)	1,885	1/4 (25)	1,608	0/6 (0)	-	-	-
<i>Staphylococcus</i> spp.	1/4 (25)	1,528	-	-	0/1 (0)	-	-	-
<i>Streptococcus</i> spp.	2/5 (40)	1,536	0/1 (0)	-	0/4 (0)	-	-	-
<i>Enterococcus</i> spp.	10/11 (90,9)	1,985	1/3 (33,3)	1,608	0/1 (0)	-	-	-
Total	90/100 (90)	2,037	4/14 (28,6)	1,640	3/17 (17,6)	1,456	0/6 (0)	-

*n/N (%): número de identificaciones directas válidas/número de orinas procesadas (porcentaje)

tobacter baumannii y una con *Acinetobacter genomospecies 3*), sólo hubo una identificación fallida en un caso a partir de una orina que contenía *Pseudomonas aeruginosa*. En resumen, de 80 orinas en las que se aislaron bacterias gramnegativas se logró una identificación correcta en 77 de ellas. De cuatro orinas en las que identificaron microorganismos del género *Staphylococcus* (dos orinas con *Staphylococcus aureus*, una con *Staphylococcus epidermidis* y una con *Staphylococcus saprophyticus*), sólo se logró una identificación correcta de una de las dos muestras con *Staphylococcus aureus*. En diez de las once orinas en las que se cultivó *Enterococcus faecalis* se obtuvo una identificación correcta a partir de la orina, y del mismo modo en dos de las cinco con *Streptococcus agalactiae*. En resumen, de 20 orinas en las que se identificaron bacterias grampositivas, se logró la identificación correcta en 13 de ellas. Finalmente, de las 100 orinas que conformaron el grupo de estudio, se logró la identificación a partir muestra directa en 90 de ellas, obteniendo una sensibilidad del 90 % (intervalo de confianza del 95 %: 81,96 – 94,84).

En las 14 orinas con recuentos entre $5 \cdot 10^4$ y $1 \cdot 10^5$ UFC/ml, hubo diez con aislamientos de bacterias gramnegativas. Éstas proporcionaron tres identificaciones correctas, habiéndose identificado dos aislados de *Escherichia coli* y uno de *Klebsiella pneumoniae*. No se identificaron a partir de la orina tres aislados de *Escherichia coli*, uno de *Proteus mirabilis* y uno de *Morganella morganii*. Por otra parte, de las cuatro orinas con aislamientos de bacterias grampositivas (dos orinas con aislamiento de *Enterococcus faecalis*, una con *Enterococcus faecium* y una con *Streptococcus agalactiae*), sólo se logró la identificación de una cepa de *Enterococcus faecalis*. Por lo tanto, de 14 orinas monobacterianas con recuentos entre $5 \cdot 10^4$ y $1 \cdot 10^5$ UFC/ml, se logró la identificación en cuatro de ellas.

En las 17 orinas con recuentos entre $1 \cdot 10^4$ y $5 \cdot 10^4$ UFC/ml, hubo 11 con aislamientos de bacterias gramnegativas que proporcionaron tres identificaciones correctas de *Escherichia coli* a partir de muestra directa; no se identificaron tres aislados de *Escherichia coli*, dos de *Proteus mirabilis* y tres de *Pseudomonas aeruginosa*. En las seis orinas con aislamientos de bacterias grampositivas no se obtuvo ninguna identificación correcta. Las cepas identificadas a partir del cultivo fueron una de *Staphylococcus au-*

reus, cuatro de *Enterococcus faecalis* y una de *Streptococcus agalactiae*. En resumen, de 17 orinas con recuentos entre $1 \cdot 10^4$ y $5 \cdot 10^4$ UFC/ml sólo se logró la identificación correcta en tres de ellas.

En las seis orinas procesadas con recuentos $<1 \cdot 10^4$ UFC/ml no se obtuvo ninguna identificación válida. A partir del cultivo se identificaron cinco cepas de *Escherichia coli* y una de *Proteus mirabilis*.

En las 14 orinas con recuentos entre $5 \cdot 10^4$ y $1 \cdot 10^5$ UFC/ml, ha habido diez con aislamientos de bacterias gramnegativas. Éstas proporcionaron tres identificaciones correctas, habiéndose identificado dos aislados de *Escherichia coli* y uno de *Klebsiella pneumoniae*. No se identificaron a partir de la orina tres aislados de *Escherichia coli*, uno de *Proteus mirabilis* y uno de *Morganella morganii*. Por otra parte, de las cuatro orinas con aislamientos de bacterias grampositivas (dos orinas con aislamiento de *Enterococcus faecalis*, una con *Enterococcus faecium* y una con *Streptococcus agalactiae*), sólo se logró la identificación de una cepa de *Enterococcus faecalis*. Por lo tanto, de 14 orinas monobacterianas con recuentos entre $5 \cdot 10^4$ y $1 \cdot 10^5$ UFC/ml, se logró la identificación en cuatro de ellas.

En las 17 orinas con recuentos entre $1 \cdot 10^4$ y $5 \cdot 10^4$ UFC/ml, hubo 11 con aislamientos de bacterias gramnegativas que proporcionaron tres identificaciones correctas de *Escherichia coli* a partir de muestra directa; no se identificaron tres aislados de *Escherichia coli*, dos de *Proteus mirabilis* y tres de *Pseudomonas aeruginosa*. En las seis orinas con aislamientos de bacterias grampositivas no se obtuvo ninguna identificación correcta. Las cepas identificadas a partir del cultivo fueron una de *Staphylococcus aureus*, cuatro de *Enterococcus faecalis* y una de *Streptococcus agalactiae*. En resumen, de 17 orinas con recuentos entre $1 \cdot 10^4$ y $5 \cdot 10^4$ UFC/ml sólo se logró la identificación correcta en tres de ellas.

En las seis orinas procesadas con recuentos $<1 \cdot 10^4$ UFC/ml no se obtuvo ninguna identificación válida. A partir del cultivo se identificaron cinco cepas de *Escherichia coli* y una de *Proteus mirabilis*.

Los resultados obtenidos del estudio de la relación entre concentración microbiana de la orina y la capacidad de identificación directa del sistema MALDI-TOF (Tabla 6) indicaron que a medida que disminuyó la concentración bacteriana de la muestra, los porcentajes de identificación y las puntuaciones medias obtenidas también disminuyeron. Para cada concentración bacteriana, el grupo de las enterobacterias fue el que presentó mayor porcentaje de identificación y mayor puntuación media. Finalmente, para cada concentración bacteriana, el porcentaje de identificación y la puntuación media en bacterias gramnegativas fueron superiores a los de las bacterias grampositivas.

En la identificación directa de levaduras mediante MALDI-TOF a partir de cuatro muestras de orina, la especie identificada a partir del cultivo ha sido *Candida albicans*. En las dos orinas con recuentos $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml se logró la identificación con una puntuación media de 1,989, y en las dos con recuentos entre $1 \cdot 10^4$ y $5 \cdot 10^4$ UFC/ml no se obtuvo ninguna identificación válida.

Identificación microbiana directa a partir de muestras de orina monomicrobianas preincubadas en caldo de enriquecimiento

Al interpretar los resultados de las identificaciones directas obtenidos a partir de las orinas con recuentos $\geq 1 \cdot 10^7$ bacterias/ml en el Sysmex UF-1000i con el nuevo criterio propuesto en esta tesis y con los publicados previamente, se obtuvieron, para cada criterio, las mismas identificaciones válidas, tanto a partir de las muestras sin incubación previa en caldo infusión cerebro corazón como en las muestras incubadas durante 1, 2, 3 y 4 horas. Dentro de este grupo, al excluir las orinas polimicrobianas, se obtuvieron 80 muestras monobacterianas. Aplicando a estas 80 muestras monobacterianas el criterio de Moussaoui *et al.* [126] se obtuvieron un 80,0 % de identificaciones directas válidas; con el de Schubert *et al.* [161] un 81,3%; con el de Stevenson *et al.* [175] un 82,5 %; con el de La Scola y Raoult [105] un 85,0 % y con el nuevo criterio propuesto por nosotros un 87,5 %. Al comparar los resultados obtenidos aplicando el criterio propuesto con los obtenidos aplicando el resto de criterios no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Los resultados de las identificaciones directas obtenidos aplicando el criterio nuevo se muestran en la Tabla 7. De las 80

Tabla 7. Resultados de la identificación bacteriana mediante MALDI-TOF obtenidos directamente a partir de muestras de orina monomicrobianas con recuentos $\geq 1 \cdot 10^7$ bacterias/ml en el Sysmex UF-1000i

Grupo bacteriano	Identificaciones válidas n/N (%)*	Puntuación media
Gramnegativos	67/76 (88,2)	2,052
<i>Enterobacteriaceae</i>	66/75 (88,0)	2,055
BGNMF	1/1 (100)	1,858
Grampositivos	3/4 (75,0)	1,779
<i>Staphylococcus</i> spp.	2/3 (66,7)	1,747
<i>Enterococcus</i> spp.	1/1 (100)	1,842
Total	70/80 (87,5)	2,040

*n/N (%): número de identificaciones directas válidas/número de orinas procesadas (porcentaje)

orinas monomicrobianas con recuentos $\geq 1 \cdot 10^7$ bacterias/ml en el Sysmex UF-1000i, hubo diez que proporcionaron una identificación directa fallida. No se identificaron siete cepas de *Escherichia coli*, una de *Klebsiella oxytoca*, una de *Citrobacter koseri* y una de *Staphylococcus scheli*. Por otra parte, dentro de la familia *Enterobacteriaceae* se identificaron correctamente a partir de la orina, 53 cepas de *Escherichia coli*, ocho de *Klebsiella pneumoniae*, dos de *Enterobacter cloacae*, dos de *Enterobacter aerogenes* y una de *Klebsiella ornithinolytica*. La única cepa de *Pseudomonas aeruginosa* también fue correctamente identificada a partir de la orina. En resumen, de 76 aislamientos de bacterias gramnegativas identificadas mediante cultivo, 67 lo fueron correctamente de forma directa. En las bacterias grampositivas se identificaron, de forma directa, tres de los cuatro aislamientos obtenidos: un *Staphylococcus aureus*, un *Staphylococcus epidermidis* y un *Enterococcus faecalis*. Por lo tanto, de las 80 orinas monomicrobianas con recuentos $\geq 1 \cdot 10^7$ bacterias/ml en el Sysmex UF-1000i se logró la identificación correcta en 70 de ellas sin haber realizado una incubación previa de la muestra de orina en caldo infusión cerebro corazón.

En las orinas que proporcionaron recuentos entre $1 \cdot 10^5$ y $1 \cdot 10^7$ bacterias/ml en el Sysmex UF-1000i se obtuvieron pobres resultados, tanto en las identificaciones realizadas directamente a partir de las muestras sin incubación en caldo infusión cerebro

corazón, como en los caldos incubados 1, 2 ó 3 horas, con independencia del criterio aplicado (datos no mostrados). Sin embargo, los resultados obtenidos después de las cuatro horas de incubación, con independencia del criterio aplicado, fueron sustancialmente mejores. Con una preincubación de 4 horas, aplicando el criterio de Mousaoui *et al.* [126] y Schubert *et al.* [161] se obtuvieron un 87,5 % de identificaciones válidas; aplicando el de Stevenson *et al.* [175] y el de La Scola y Raoult [105] un 89,6 % y aplicando el criterio propuesto un 91,7 %. En este caso tampoco se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) al comparar los resultados obtenidos aplicando el criterio nuevo con los obtenidos aplicando los criterios de los otros autores. Los resultados obtenidos a partir de las orinas con recuentos entre $1 \cdot 10^5$ y $1 \cdot 10^7$ bacterias/ml en el Sysmex UF-1000i con una preincubación de 4 horas y aplicando el nuevo criterio propuesto se resumen en la Tabla 8. Dentro de este conjunto de orinas se obtuvieron 48 muestras monomicrobianas, y no se logró identificar una cepa de cada uno de los siguientes microorganismos: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus mitis*. Por otro lado, dentro de la familia *Enterobacteriaceae* se identificaron correctamente a partir de muestra de orina, 18 cepas de *Escherichia coli*, tres de *Proteus mirabilis*, dos de *Klebsiella pneumoniae* y una de *Enterobacter aerogenes*. Dentro del grupo de BGNNF se identificaron de forma directa dos de las tres cepas de *Pseudomonas aeruginosa* identificadas a partir del cultivo. En resumen, de 28 aislamientos de bacterias gramnegativas identificadas mediante cultivo, 26 lo fueron de forma directa. En las bacterias grampositivas se identificaron de forma directa 17 cepas de las 19 obtenidas a partir del cultivo: una cepa de *Staphylococcus epidermidis*, una de *Staphylococcus haemolyticus*, dos de *Streptococcus agalactiae* y 13 de *Enterococcus faecalis*. La única cepa de *Candida albicans* fue correctamente identificada a partir de la muestra directa de orina. Por lo tanto, de las 48 orinas monomicrobianas con recuentos entre $1 \cdot 10^5$ y $1 \cdot 10^7$ bacterias/ml en el Sysmex UF-1000i se logró la identificación correcta en 44 de ellas, habiéndose realizado una preincubación de la orina de cuatro horas en caldo infusión cerebro corazón.

Tabla 8. Resultados de la identificación bacteriana mediante MALDI-TOF obtenidos directamente a partir de muestras de orina monomicrobianas con recuentos entre $1 \cdot 10^5$ y $1 \cdot 10^7$ bacterias/ml en el Sysmex UF-1000i con preincubación de 4 horas

Grupo bacteriano	Identificaciones válidas n/N (%) [*]	Puntuación media
Gramnegativos	26/28 (92,9)	2,252
<i>Enterobacteriaceae</i>	24/25 (96,0)	2,273
BGNF	2/3 (66,7)	2,008
Grampositivos	17/19 (89,5)	2,233
<i>Staphylococcus</i> spp.	2/3 (66,7)	2,039
<i>Streptococcus</i> spp.	2/3 (66,7)	2,205
<i>Enterococcus</i> spp.	13/13 (100)	2,269
<i>Candida albicans</i>	1/1 (100)	1,691
Total	44/48 (91,7)	2,232

^{*}n/N (%): número de identificaciones directas válidas/número de orinas procesadas (porcentaje)

Identificación microbiana directa a partir de medios de enriquecimiento

De los 82 caldos infusión de cerebro y corazón, siete proporcionaron crecimiento de dos microorganismos. Aplicando el nuevo criterio propuesto, en cinco de ellos se identificaron correctamente uno de los dos microorganismos presentes (dos cepas de *Enterococcus faecalis*, una de *Staphylococcus epidermidis*, una de *Acinetobacter baumannii* y una de *Streptococcus anginosus*). Los otros dos caldos no proporcionaron picos de identificación, por lo que la identificación fue fallida. Los resultados de los 75 caldos corazón monomicrobianos se muestran en la Tabla 9. Se obtuvieron 10 aislamientos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* que, aplicando el nuevo criterio propuesto en este trabajo, fueron correctamente identificados directamente mediante MALDI-TOF a partir del caldo infusión cerebro corazón. En el subcultivo se aislaron tres cepas de *Enterobacter cloacae*, tres cepas de *Escherichia coli*, dos cepas de *Proteus mirabilis*, y una cepa de *Klebsiella oxytoca*. Los cuatro aislamientos de BGNF (dos cepas de *Acinetobacter baumannii* y dos cepas de *Pseudomonas aeruginosa*) también fueron correctamente identificadas a partir del caldo. Así, los 14 aislamientos de bacterias gramnegativas fueron identificados directamente a partir del

Tabla 9. Resultado de las identificaciones bacterianas mediante MALDI-TOF a partir de caldos infusión de cerebro y corazón monobacterianos

Grupo bacteriano	Identificaciones válidas n/N (%) [*]	Puntuación media
Bacilos gramnegativos	14/14 (100)	2,298
<i>Enterobacteriaceae</i>	10/10 (100)	2,321
BGNMF	4/4 (100)	2,239
Gram positivos	53/58 (91,4)	2,045
<i>Staphylococcus</i> spp.	30/31 (96,8)	2,026
<i>Streptococcus</i> spp.	2/6 (33,3)	1,701
<i>Enterococcus</i> spp.	20/20 (100)	2,121
Bacilos grampositivos	1/1 (100)	1,853
Levaduras	3/3 (100)	2,112
Total	70/75 (93,3)	2,098

^{*}n/N (%): número de identificaciones directas válidas/número de caldos procesados (porcentaje)

caldo. En las bacterias grampositivas, de 31 cepas pertenecientes al género *Staphylococcus* identificadas a partir del cultivo (16 cepas de *Staphylococcus epidermidis*, ocho de *Staphylococcus hominis*, seis de *Staphylococcus capitis* y una de *Micrococcus luteus*) sólo hubo una cepa de *Staphylococcus epidermidis* que no fue identificada a partir del caldo infusión cerebro corazón. En el género *Streptococcus* se identificaron correctamente, a partir del caldo infusión cerebro corazón, dos cepas de *Streptococcus salivarius*; por otra parte, hubo dos cepas de *Streptococcus mitis* y dos de *Streptococcus oralis* identificadas erróneamente de forma directa como *Streptococcus pneumoniae*. En el género *Enterococcus* hubo 14 aislamientos de *Enterococcus faecalis* y seis de *Enterococcus faecium* que fueron correctamente identificados de forma directa. El único aislamiento de un bacilo grampositivo, *Dermabacter hominis*, también fue identificado correctamente. En resumen, de 58 aislamientos pertenecientes a bacterias grampositivas identificados mediante cultivo, 53 lo fueron a partir del caldo infusión cerebro corazón. Finalmente, los tres aislados de levaduras (dos aislados de *Candida tropicalis* y uno de *Candida albicans*) fueron identificados directamente. Por lo tanto, de los 75 aislados obtenidos a partir del cultivo, 70 lo fueron de forma directa.

Finalmente, de los 18 tubos con medio tioglicolato, todos ellos monomicrobianos, sólo se logró una identificación directa correcta de una cepa de *Enterobacter cloacae*.

Identificación microbiana directa a partir de frascos de hemocultivo crecidos

En la identificación microbiana directa mediante MALDI-TOF a partir de los frascos de hemocultivo positivos no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) cuando se compararon los aislamientos obtenidos en la muestra con todos los obtenidos en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid durante el año 2010 (Tabla 10), que también se identificaron mediante MALDI-TOF.

Del mismo modo que en las orinas, de las distintas combinaciones de las puntuaciones obtenidas a partir de los frascos de hemocultivo estudiadas (datos no mostrados), el criterio de validación de los resultados que proporcionó un mayor número de identificaciones válidas es el que estableció que un microorganismo es identificado correctamente mediante MALDI-TOF cuando realizadas cuatro lecturas de una misma muestra se obtienen, como mínimo, dos lecturas con la misma propuesta de identificación a nivel de especie en el primer microorganismo del listado y ambas con una puntuación $\geq 1,400$.

Los resultados de las identificaciones obtenidas mediante MALDI-TOF a partir de la muestra de 100 frascos de hemocultivo crecidos se muestran en la Tabla 11. Aplicando el nuevo criterio propuesto en esta tesis, se identificaron correctamente de forma directa los 27 aislamientos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Se aislaron 12 cepas de *Escherichia coli*, cuatro de *Klebsiella oxytoca*, tres de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter asburiae*, y una de *Salmonella* sp. y de *Serratia liquefaciens*. De ocho frascos de hemocultivo con aislamientos de BGNNF (tres *Acinetobacter baumannii* y cinco *Pseudomonas aeruginosa*) sólo hubo una identificación discordante de un aislado de *Acinetobacter baumannii* en un frasco aerobio. Dentro del grupo de otros bacilos gramnegativos se incluyeron dos aislamientos de dos especies anaerobias, *Bacteroides uniformis* y *Bacteroides thetaiotaomicron*, que fueron correctamente identificados a partir del frasco de hemocultivo. En resumen, de 37

Tabla 10. Resultados de las identificaciones bacterianas obtenidos mediante MALDI-TOF en los hemocultivos positivos en el año 2010 y en la muestra de 100 hemocultivos

Grupo bacteriano	Hemocultivos	
	Año 2010 (N=1.718)	Muestra estudiada (N=100)
<i>Enterobacteriaceae</i>	25,5 %	27 %
BGNF	9,8 %	8 %
Otros bacilos gramnegativos	1,8 %	2 %
<i>Staphylococcus</i> spp.	52,3 %	49 %
<i>Streptococcus</i> spp.	5,8 %	7 %
<i>Enterococcus</i> spp.	4 %	6 %
Bacilos grampositivos	0,8 %	1 %

aislamientos de bacterias gramnegativas identificadas mediante cultivo, 36 lo fueron correctamente de forma directa. En las bacterias grampositivas, de 49 cepas pertenecientes al género *Staphylococcus* identificadas a partir del cultivo (16 cepas de *Staphylococcus epidermidis*, 15 de *Staphylococcus hominis*, 13 de *Staphylococcus aureus*, tres de *Staphylococcus capitis* y dos de *Staphylococcus haemolyticus*) sólo hubo una cepa de *Staphylococcus epidermidis* que no se identificó de forma directa en el frasco de hemocultivo. En el género *Enterococcus* hubo cuatro aislamientos de *Enterococcus faecalis* y dos de *Enterococcus faecium* que fueron correctamente identificados a partir del frasco de hemocultivo, y en el género *Streptococcus* hubo seis aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* y uno de *Streptococcus parasanguinis*, que también fueron correctamente identificados en el frasco de hemocultivo. El único aislamiento de un bacilo grampositivo, *Corynebacterium argenteratense*, también fue identificado correctamente de forma directa. En resumen, de 63 aislamientos pertenecientes a bacterias grampositivas identificados mediante cultivo, 62 lo fueron de forma correcta a partir del frasco de hemocultivo. Por lo tanto, en los 100 frascos de hemocultivo que forman el grupo de estudio se logró la identificación correcta en 98 de ellos.

Tabla 11. Resultados de las identificaciones bacterianas mediante MALDI-TOF a partir de la muestra de 100 frascos de hemocultivo

Grupo bacteriano	Identificaciones válidas n/N (%)*	Puntuación media
Gramnegativos	36/37 (97,3)	2,038
<i>Enterobacteriaceae</i>	27/27 (100)	2,108
BGGNF	7/8 (87,5)	1,888
Otros bacilos gramnegativos	2/2 (100)	1,611
Grampositivos	62/63 (98,4)	1,867
<i>Staphylococcus</i> spp.	48/49 (98)	1,882
<i>Streptococcus</i> spp.	7/7 (100)	1,749
<i>Enterococcus</i> spp.	6/6 (100)	1,884
Bacilos grampositivos	1/1 (100)	1,921
Total	98/100 (98)	1,930

* n/N (%): número de identificaciones directas válidas/número de orinas procesadas (porcentaje)

Cuando aplicamos a nuestros resultados los criterios de Moussaoui *et al.*[126] y de Schubert *et al.* [161] se obtuvieron, en ambos casos, un 89 % de identificaciones válidas a partir del frasco de hemocultivo; con el de Stevenson *et al.* [175] un 91 % y, con el de La Scola y Raoult [105] un 92 %. El criterio de validación de los resultados aquí propuesto presentó una sensibilidad del 98 % (intervalo de confianza del 95 %: 95,2 - 100), de tal forma que cuando se compararon los distintos criterios de validación con el propuesto en este trabajo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

ANTIBIOGRAMA RÁPIDO A PARTIR DEL FRASCO DE HEMOCULTIVO CRECIDO

Determinación del inóculo

Los resultados de los distintos ensayos realizados para el cálculo del inóculo mostraron que para enterococos y enterobacterias las concentraciones bacterianas que a tiempo cero proporcionaron un recuento dentro del rango de linealidad, durante las tres horas de incubación, estaban entre $4 \cdot 10^4$ y $9 \cdot 10^4$ bacterias/ml. Con estas concentraciones iniciales cada hora de incubación supuso un aumento del orden de una

unidad logarítmica. De este modo, a las tres horas de incubación la concentración microbiana era del orden de $1 \cdot 10^8$ bacterias/ml, que es el límite superior del rango de linealidad del Sysmex UF-1000i. Para estafilococos y BGNNF se partió de un inóculo mayor - $5 \cdot 10^5$ a $9 \cdot 10^5$ bacterias/ml – ya que estos grupos bacterianos presentaron una menor velocidad de crecimiento. De esta forma se alcanzó, a las tres horas de incubación, una concentración similar a la de enterococos y enterobacterias. Además, concentraciones iniciales superiores a las anteriormente citadas proporcionaron un recuento microbiano, a las tres horas de incubación, que estaba fuera del rango de linealidad del equipo. Para obtener el inóculo deseado se utilizó, en todos los casos, un volumen del frasco de hemocultivo crecido entre 50 y 500 μ l.

Determinación del criterio de interpretación de susceptibilidad

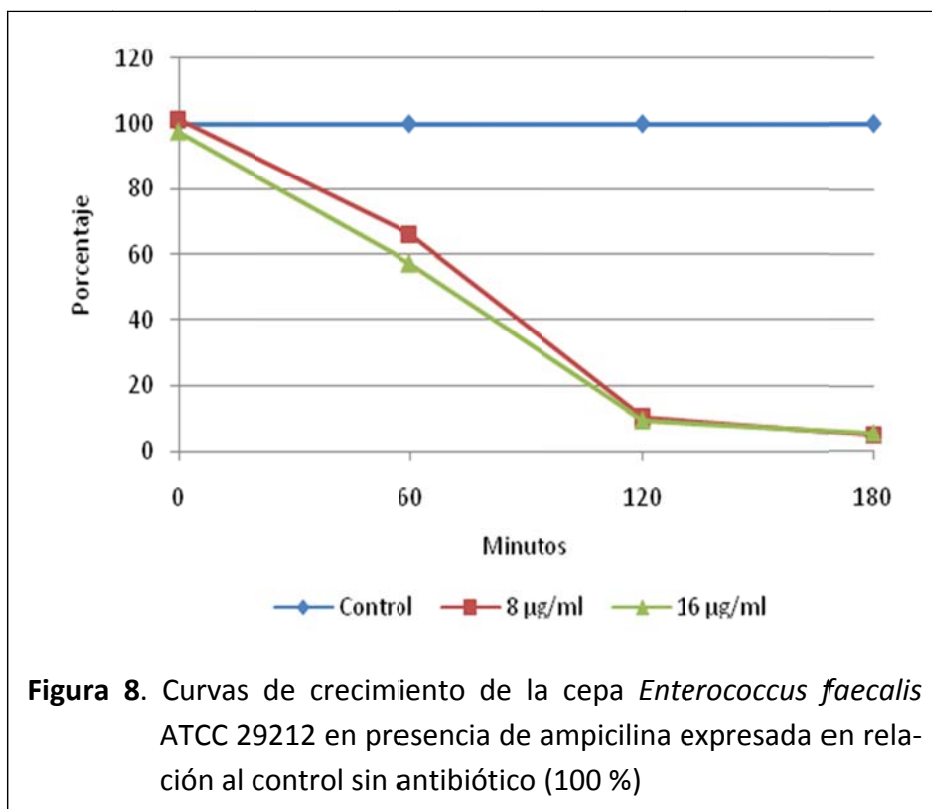
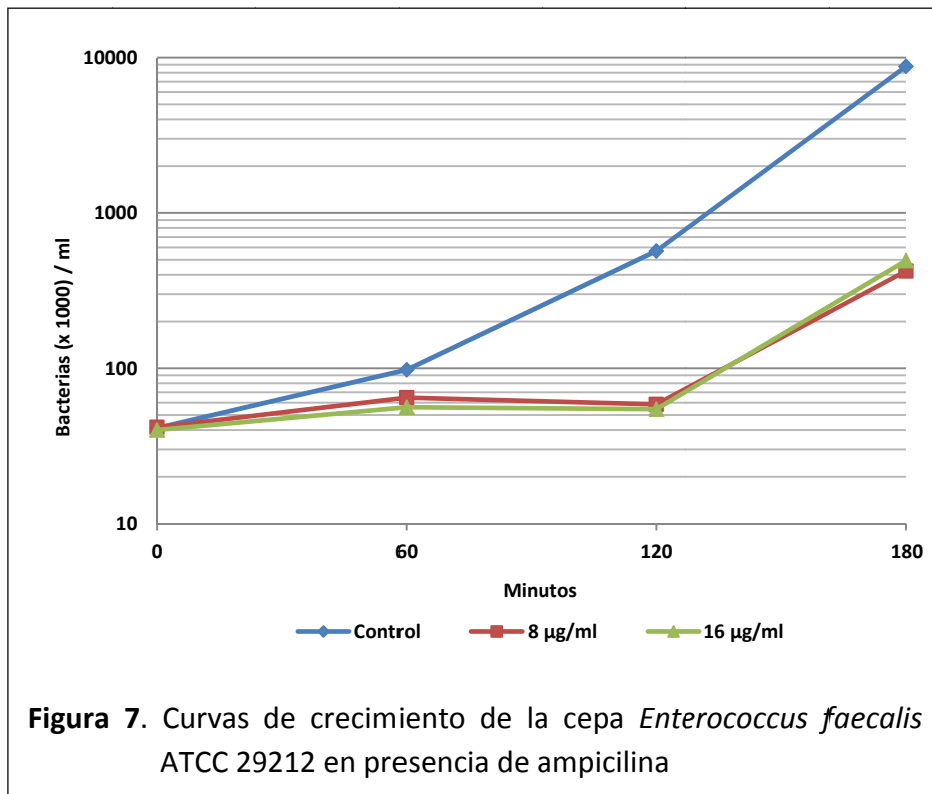
En la curva de crecimiento de la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 obtenida en el tubo control sin antibiótico se observó que el recuento microbiano aumentaba del orden de una unidad logarítmica en cada hora de incubación. Sin embargo, cuando esta cepa sensible a ampicilina se incubó en presencia de este antibiótico se observó que los recuentos permanecieron constantes o con ligeras variaciones a lo largo de la incubación (Figura 7). Cuando se consideraron los recuentos bacterianos del tubo control sin antibiótico en los diferentes tiempos de incubación como el 100 %, el recuento bacteriano a los 60 minutos de incubación del cultivo con ampicilina mostró una reducción significativa, y en las lecturas posteriores a los 120 y 180 minutos esta reducción fue incrementándose (Figura 8 y Tabla 12). Esta misma circunstancia se observó en las curvas de crecimiento de las cepas *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 33853 y *Escherichia coli* ATCC 25922, que eran sensibles a los antibióticos ensayados (Tabla 12). Es decir, en todas estas cepas se observó que a los 60 minutos de incubación ya se obtuvieron reducciones significativas del recuento microbiano con respecto al del control sin antibiótico al mismo tiempo de incubación.

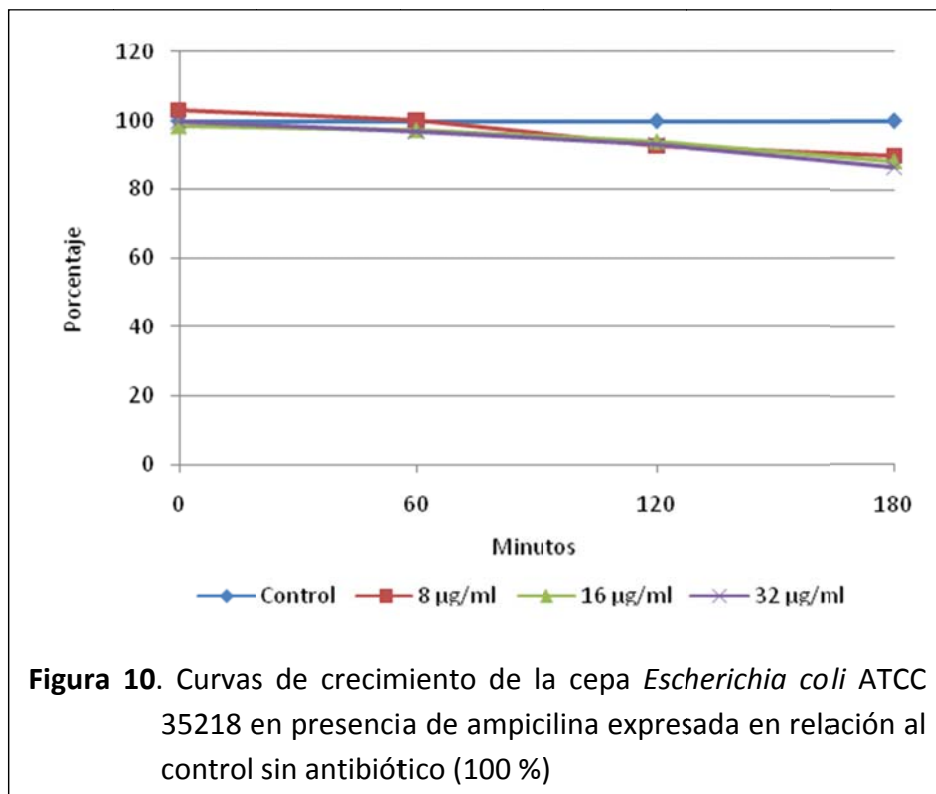
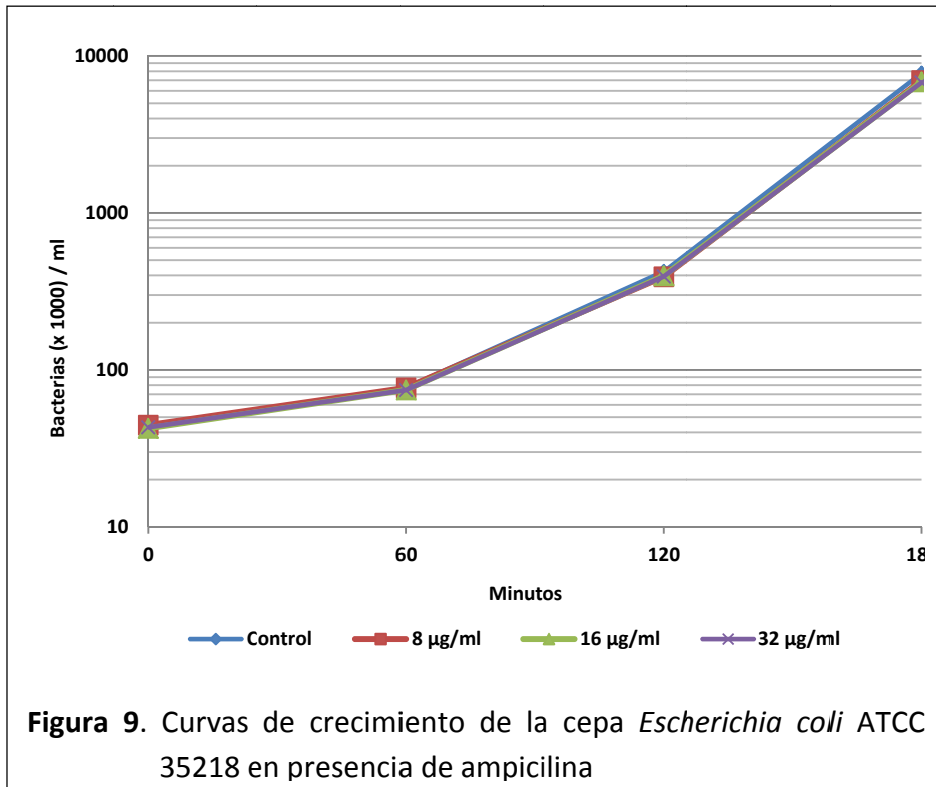
Tabla 12. Recuentos bacterianos obtenidos a partir de las cepas utilizadas en el diseño del método para determinar la susceptibilidad a los antibacterianos expresados como porcentaje con respecto a los controles sin antibiótico (100%) después de diferentes tiempos de incubación

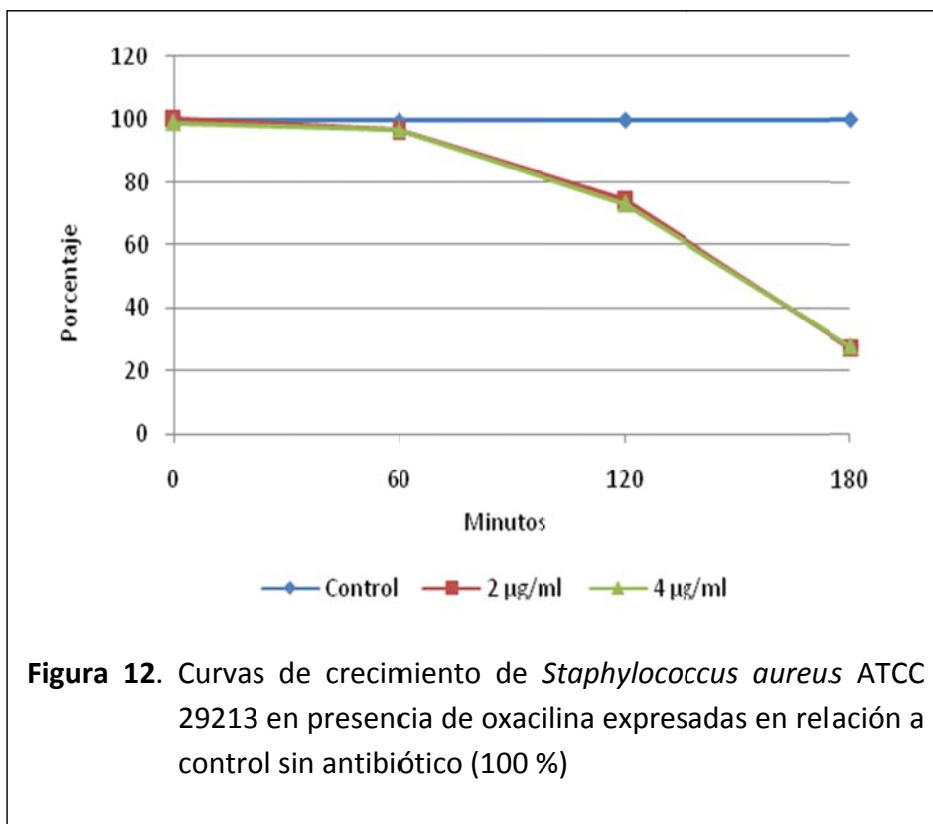
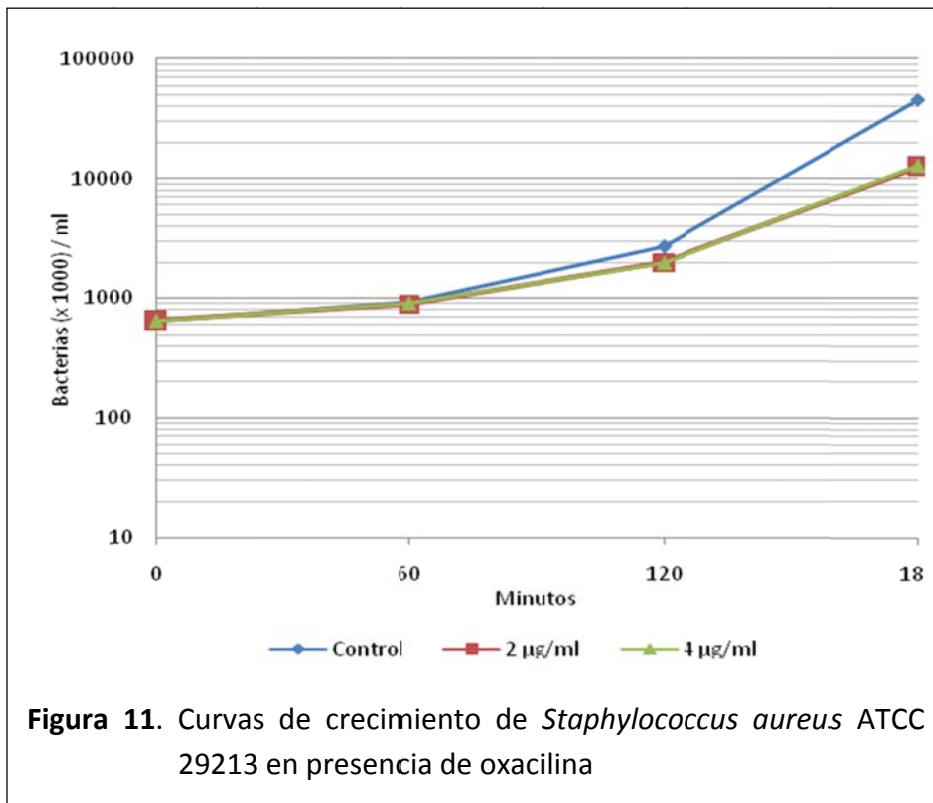
Cepa estudiada	Antibiótico ensayado	Susceptibilidad (CMI: µg/ml) aceptable en el control de calidad del antibiograma	Tiempos de incubación												Interpretación mediante citometría de flujo
			0 minutos			60 minutos			120 minutos			180 minutos			
			S*	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Ampicilina	Sensible (0,5 -2)	101,2	-	97,8	66,1	-	57,3	10,3	-	9,6	4,8	-	5,6	Sensible
	Vancomicina	Sensible (1-4)	100,5	99,4; 98,7**	102,5	71,2	72,5; 70,5	65,9	54,6	51,0; 47,6	43,4	11,5	9,7; 8,6	7,2	Sensible
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Amikacina	Sensible (1-4)	99,7	102,3	101,2	91,6	92,1	92,8	44,4	41,7	48,5	10,7	8,6	10,0	Sensible
	Cefotaxima	Sensible (1-4)	98,5	99,4; 98,8	99,1	94,4	96,0; 96,2	95,9	57,9	60,2; 63,2	59,5	25,1	24,3; 23,9	30,0	Sensible
	Vancomicina	Sensible (0,5-2)	102,2	98,5; ; 99,9	101,6	95,2	96,1; 97,9	96,9	76,5	72,6; 71,1	70,6	18,2	20,0; 21,2	19,9	Sensible
	Oxacilina	Sensible (0,12-0,5)	100,4	-	99,1	96,6	-	96,9	74,4	-	73,3	27,4	-	28,1	Sensible
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Ceftazidima	Sensible (1-4)	98,7	103,6	100,4	75,9	76,2	73,5	33,7	32,0	31,7	13,6	13,3	10,2	Sensible
	Amikacina	Sensible (1-4)	103,4	100,9	104,1	72,5	68,5	69,6	25,3	24,2	21,5	7,2	5,3	4,8	Sensible
	Colistina	Sensible (0,5-4)	98,4	102,7	97,7	74,4	75,2	73,8	44,4	43,9	43,1	19,4	18,8	17,5	Sensible
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	Ampicilina	Resistente (>32)	103,2	98,4	99,9	95,6	97,3	96,9	92,7	94,0	93,2	89,9	88,3	86,5	Resistente
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Amikacina	Sensible (0,5-4)	97,3	98,0	99,7	72,2	73,6	73,9	15,5	14,9	14,0	0,1	0,2	2,1	Sensible
	Cefotaxima	Sensible (0,03-0,12)	102,8	99,1	98,4	50,8	52,0	49,3	5,6	4,3	3,8	0,1	0,1	0,1	Sensible
	Ciprofloxacino	Sensible (0,005-0,015)	98,3	99,4	102,7	75,4	74,9	74,2	27,6	25,5	24,9	9,7	10,5	7,9	Sensible

*S, I y R: concentraciones de punto de corte de sensibilidad, intermedio y resistencia

**Resultados obtenidos con las concentraciones más baja y más alta del punto de corte de intermedio







La única cepa resistente ensayada ha sido *Escherichia coli* ATCC 35218 frente a ampicilina; las curvas de crecimiento obtenidas en presencia del antibiótico presentaron recuentos bacterianos prácticamente similares a los obtenidos en el grupo control (Figura 9). De esta forma, a lo largo del tiempo de incubación, no se observaron reducciones significativas de los recuentos microbianos con respecto al del control sin antibiótico (Figura 10 y Tabla 12).

En las curvas de crecimiento de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, sensible a los antibióticos ensayados, se observó que en la lectura realizada a los 60 minutos, el recuento microbiano de la cepa incubada con antibiótico resultó ser superior al inicial (T_0) en las diferentes concentraciones ensayadas de estos antibióticos. Además, estos recuentos fueron similares a los observados en el control sin antibiótico al mismo tiempo de lectura. Sin embargo, en las lecturas a los 120 y 180 minutos se observaron reducciones significativas con respecto al control sin antibiótico (Tabla 12). Como ejemplo, en las Figuras 11 y 12 se muestran las curvas de crecimiento de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 con y sin oxacilina.

Para poder interpretar el antibiograma en el menor tiempo posible se estudiaron, mediante curvas COR, los datos de las cepas *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 33853, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* ATCC 35218 obtenidos a los 60 minutos de incubación, y los de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 obtenidos a los 120 minutos de incubación (Tabla 12). De este modo, se observó que el punto de corte para discriminar entre cepas sensibles y resistentes de una reducción del recuento bacteriano del 14 % con respecto al control sin antibiótico proporcionaba una sensibilidad y especificidad del 100 % (Índice kappa: 0,932; $p < 0,05$) (Tabla 13 y Figura 13).

Tabla 13. Coordenadas de la curva COR generadas por el software SPSS a partir de recuentos microbianos* para discriminar entre sensibilidad y resistencia

Recuentos bacterianos hipotéticos expresados como porcentaje con respecto a los recuentos bacterianos de los controles sin antibiótico (100%)	Sensibilidad	Especificidad
43,1000	1,000	0,000
47,4500	1,000	0,083
54,3500	1,000	0,167
58,2500	1,000	0,250
64,9000	1,000	0,333
71,7000	1,000	0,427
72,3500	1,000	0,500
73,4500	1,000	0,583
74,9000	1,000	0,750
75,6500	1,000	0,833
76,2000	1,000	0,917
86,0500	1,000	1,000
96,6000	0,000	1,000

* Datos de la Tabla 12

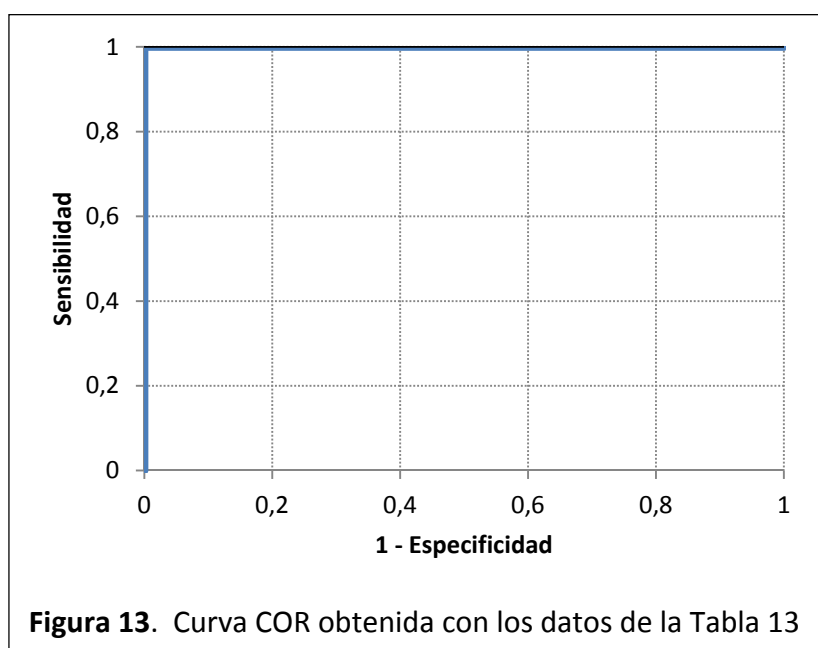


Figura 13. Curva COR obtenida con los datos de la Tabla 13

Por consiguiente, para la interpretación del antibiograma en enterobacterias, enterococos y BGNNF se propusieron los siguientes criterios:

- **Sensible**, si a los 60 minutos de incubación con antibiótico a concentraciones menores o iguales a la del punto de corte de sensibilidad, se obtiene una reducción en el número de bacterias de al menos un 14 % con respecto al recuento del control sin antibiótico al mismo tiempo de incubación.
- **Resistente**, si se necesitan concentraciones de antibiótico iguales o mayores a la del punto de corte de resistencia para obtener, a los 60 minutos de incubación, una reducción del recuento microbiano de al menos un 14 % con respecto al recuento del control sin antibiótico al mismo tiempo de incubación.
- **Intermedio**, si no se cumplen ni el criterio de sensibilidad ni el de resistencia.

Para los estafilococos se propusieron los mismos criterios de interpretación pero utilizando las lecturas del recuento bacteriano obtenidas a los 120 minutos de incubación de los cultivos.

Aplicando estas definiciones, en las cepas ATCC estudiadas se obtuvo un 100 % de concordancia entre la susceptibilidad obtenida mediante citometría de flujo y la obtenida mediante los métodos comerciales VITEK 2, MicroScan y E-test (Tabla 12).

Validación del sistema

Las identificaciones directas realizadas mediante el sistema MALDI-TOF a partir de los frascos de hemocultivo crecidos de pacientes coincidieron en un 100 % con las realizadas a partir de las colonias obtenidas en el subcultivo. Además, los resultados de los tests de susceptibilidad realizados mediante los métodos comerciales (VITEK 2, MicroScan, E-test) a partir de las colonias obtenidas en el subcultivo de los hemocultivos de pacientes mostraron un 100 % de concordancia entre sí. En el antibiograma realizado mediante citometría de flujo a partir de 25 frascos de hemocultivo que contenían cepas de BGNNF (Tabla 14), 14 frascos de hemocultivo que contenían cepas de entero-

cocos (Tabla 15) y 31 frascos de hemocultivo que contenían cepas de estafilococos (Tabla 16) se obtuvo una concordancia del 100 % con respecto a los resultados de la susceptibilidad obtenidos mediante los métodos comerciales. En el antibiograma realizado a partir de los hemocultivos que contenían enterobacterias se obtuvo un 96,7 % de concordancia entre los resultados de los tests de susceptibilidad obtenidos mediante citometría de flujo y los obtenidos mediante los métodos comerciales dado que, en una de las nueve cepas sensibles a cefotaxima ensayadas se observó un único error importante (Tabla 17). Esta discrepancia fue debida a una cepa de *Escherichia coli* que presentó una interpretación de sensible mediante los métodos comerciales con una CMI de 0,12 µg/ml y una interpretación de resistente mediante citometría de flujo. Por lo tanto, en el antibiograma realizado a partir de 100 frascos de hemocultivo positivos se observó un 99 % de concordancia entre citometría de flujo y los métodos comerciales, de tal forma que al calcular el índice Kappa se obtuvo un valor de 0,9668 (intervalo de confianza del 95 %: 0,9022 – 1,0000) ($p < 0,001$).

Tabla 14. Recuentos bacterianos obtenidos a partir de BGNNF aislados en hemocultivos de pacientes expresados como porcentaje con respecto a los recuentos bacterianos de los controles sin antibiótico (100 %) a los 60 minutos de incubación

Número de cepa	Bacteria estudiada	Antibiótico ensayado	Susceptibilidad mediante métodos comerciales (CMI: µg/ml)	Concentraciones ensayadas			Interpretación mediante citometría de flujo
				S*	I	R	
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Amikacina	Sensible (2)	76,5	49,4	24,5	Sensible
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Amikacina	Sensible (1)	65,4	32,6	18,4	Sensible
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Amikacina	Sensible (2)	77,1	40,7	20,0	Sensible
4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Cefotaxima	Sensible (0,06)	44,4	28,9	13,5	Sensible
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ceftazidima	Sensible (0,5)	75,0	54,5	32,7	Sensible
6	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Ceftazidima	Sensible (1,5)	77,3	57,2	27,0	Sensible
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ceftazidima	Sensible (1,5)	70,5	43,1	19,9	Sensible
8	<i>Pseudomonas putida</i>	Ceftazidima	Sensible (0,75)	73,3	60,7	46,6	Sensible
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ceftazidima	Sensible (2)	67,6	34,3	17,3	Sensible
10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ceftazidima	Sensible (6)	71,4	34,7	16,9	Sensible
11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ceftazidima	Intermedio (16)	89,3	62,0	41,1	Intermedio
12	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Colistina	Resistente (>256)	97,9	-	99,0	Resistente
13	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Colistina	Sensible (0,38)	48,5	-	1,3	Sensible
14	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Colistina	Sensible (0,25)	64,8	-	52,2	Sensible
15	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Colistina	Sensible (0,25)	52,7	-	48,2	Sensible
16	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Colistina	Sensible (0,094)	60,3	-	57,9	Sensible
17	<i>Acinetobacter ursingii</i>	Colistina	Sensible (0,064)	58,1	-	56,2	Sensible
18	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Colistina	Sensible (0,38)	24,4	-	20,6	Sensible
19	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Colistina	Sensible (0,25)	39,9	-	34,7	Sensible
20	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colistina	Sensible (2)	13,7	2,1	1,1	Sensible
21	<i>Pseudomonas putida</i>	Colistina	Sensible (2)	31,8	3,3	0,8	Sensible
22	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colistina	Sensible (2)	36,3	18,4	1,5	Sensible
23	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colistina	Sensible (2)	24,4	8,3	0,7	Sensible
24	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colistina	Intermedio (4)	88,3	54,2	23,7	Intermedio
25	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colistina	Sensible (2)	18,5	9,4	0,9	Sensible

*S, I y R: concentraciones de punto de corte de sensibilidad, intermedio y resistencia.

Tabla 15. Recuentos bacterianos obtenidos a partir de enterococos aislados en hemocultivos de pacientes expresados como porcentaje con respecto a los recuentos de los controles sin antibiótico (100 %) a los 60 minutos de incubación

Número de cepa	Bacteria estudiada	Antibiótico ensayado	Susceptibilidad mediante métodos comerciales (CMI: µg/ml)	Concentraciones ensayadas			Interpretación mediante citometría de flujo
				S*	I	R	
26	<i>Enterococcus faecalis</i>	Ampicilina	Sensible (1)	58,6	-	57,3	Sensible
27	<i>Enterococcus faecalis</i>	Ampicilina	Sensible (0,5)	37,7	-	39,9	Sensible
28	<i>Enterococcus faecalis</i>	Ampicilina	Sensible (1)	51,2	-	47,4	Sensible
29	<i>Enterococcus faecalis</i>	Ampicilina	Sensible (1)	56,9	-	57,5	Sensible
30	<i>Enterococcus faecium</i>	Ampicilina	Resistente (>256)	98,0	-	102,6	Resistente
31	<i>Enterococcus faecium</i>	Ampicilina	Resistente (>256)	92,1	-	88,1	Resistente
32	<i>Enterococcus faecalis</i>	Ampicilina	Sensible (0,5)	54,8	-	53,1	Sensible
33	<i>Enterococcus faecalis</i>	Ampicilina	Sensible (0,5)	56,9	-	55,3	Sensible
34	<i>Enterococcus faecalis</i>	Ampicilina	Sensible (1)	60,9	-	58,8	Sensible
35	<i>Enterococcus faecalis</i>	Ampicilina	Sensible (1)	38,5	-	37,6	Sensible
36	<i>Enterococcus faecalis</i>	Vancomicina	Sensible (2)	71,2	72,5; 70,5**	66,9	Sensible
37	<i>Enterococcus faecalis</i>	Vancomicina	Sensible (2)	66,5	67,9; 64,1	55,0	Sensible
38	<i>Enterococcus faecalis</i>	Vancomicina	Sensible (2)	54,4	52,2; 51,9	48,5	Sensible
39	<i>Enterococcus faecalis</i>	Vancomicina	Sensible (0,5)	63,0	61,4; 60,6	58,2	Sensible

*S, I y R: concentraciones de punto de corte de sensibilidad, intermedio y resistencia

**Resultados obtenidos con las concentraciones más baja y más alta del punto de corte de intermedio

Tabla 16. Recuentos bacterianos obtenidos a partir de estafilococos aislados en hemocultivos de pacientes expresados como porcentaje con respecto a los recuentos de los controles sin antibiótico (100 %) a los 120 minutos de incubación

Número de cepa	Bacteria estudiada	Antibiótico ensayado	Susceptibilidad mediante métodos comerciales (CMI: µg/ml)	Concentraciones ensayadas			Interpretación mediante citometría de flujo
				S*	I	R	
40	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Oxacilina	Sensible (0,25)	41,5	-	38,2	Sensible
41	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Oxacilina	Resistente (>256)	102,0	-	102,3	Resistente
42	<i>Staphylococcus aureus</i>	Oxacilina	Sensible (0,5)	73,8	-	74,4	Sensible
43	<i>Staphylococcus hominis</i>	Oxacilina	Sensible (0,32)	21,1	-	19,8	Sensible
44	<i>Staphylococcus aureus</i>	Oxacilina	Sensible (0,5)	55,4	-	54,1	Sensible
45	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Oxacilina	Resistente (>256)	89,8	-	90,1	Resistente
46	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Oxacilina	Resistente (>256)	107,9	-	107,0	Resistente
47	<i>Staphylococcus hominis</i>	Oxacilina	Sensible (0,12)	43,7	-	40,0	Sensible
48	<i>Staphylococcus hominis</i>	Oxacilina	Resistente (8)	94,4	-	93,3	Resistente
49	<i>Staphylococcus hominis</i>	Oxacilina	Resistente (8)	102,6	-	101,9	Resistente
50	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Oxacilina	Resistente (4)	88,3	-	87,4	Resistente
51	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Oxacilina	Resistente (8)	97,4	-	97,1	Resistente
52	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Oxacilina	Resistente (>256)	104,1	-	104,7	Resistente
53	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Vancomicina	Sensible (2)	66,4	56,8; 50,9**	40,1	Sensible
54	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Vancomicina	Sensible (2)	79,4	59,5; 49,0	45,1	Sensible
55	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Vancomicina	Sensible (2)	29,1	26,1; 24,8	27,8	Sensible
56	<i>Staphylococcus hominis</i>	Vancomicina	Sensible (1)	53,3	47,6; 45,0	44,4	Sensible
57	<i>Staphylococcus hominis</i>	Vancomicina	Sensible (1)	42,9	40,6; 33,9	23,9	Sensible
58	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Vancomicina	Sensible (2)	19,8	16,6; 15,7	13,1	Sensible
59	<i>Staphylococcus aureus</i>	Vancomicina	Sensible (2)	6,9	5,8; 5,7	5,5	Sensible
60	<i>Staphylococcus hominis</i>	Vancomicina	Sensible (1)	34,3	31,5; 30,7	25,9	Sensible
61	<i>Staphylococcus hominis</i>	Vancomicina	Sensible (1)	77,2	54,4; 53,3	32,8	Sensible
62	<i>Staphylococcus aureus</i>	Amikacina	Sensible (2)	21,3	18,2	11,7	Sensible
63	<i>Staphylococcus hominis</i>	Amikacina	Sensible (0,5)	32,6	30,0	18,8	Sensible
64	<i>Staphylococcus hominis</i>	Amikacina	Sensible (1)	43,8	35,2	21,1	Sensible
65	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Amikacina	Sensible (2)	38,9	25,5	11,3	Sensible
66	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Amikacina	Sensible (1)	65,4	61,0	56,5	Sensible
67	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cefotaxima	Resistente (>32)	89,6	92,1; 98,5	98,3	Resistente
68	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cefotaxima	Sensible (2)	37,9	33,0; 19,8	21,8	Sensible
69	<i>Staphylococcus hominis</i>	Cefotaxima	Sensible (2)	45,7	40,2; 42,8	44,3	Sensible
70	<i>Staphylococcus hominis</i>	Cefotaxima	Resistente (>32)	91,5	93,8; 92,1	89,8	Resistente

*S, I y R: concentraciones de punto de corte de sensibilidad, intermedio y resistencia

**Resultados obtenidos con las concentraciones más baja y más alta del punto de corte de intermedio

Tabla 17. Recuentos bacterianos obtenidos a partir de enterobacterias aisladas en hemocultivos de pacientes expresados como porcentaje con respecto a los recuentos de los controles sin antibiótico (100 %) a los 60 minutos de incubación

Número de cepa	Bacteria estudiada	Antibiótico ensayado	Susceptibilidad mediante métodos comerciales (CMI: µg/ml)	Concentraciones ensayadas			Interpretación mediante citometría de flujo
				S*	I	R	
71	<i>Escherichia coli</i>	Amikacina	Sensible (4)	83,0	63,7	48,1	Sensible
72	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Amikacina	Sensible (1)	71,7	30,4	10,5	Sensible
73	<i>Enterobacter kobei</i>	Amikacina	Sensible (2)	36,4	17,0	11,6	Sensible
74	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Amikacina	Sensible (2)	14,0	4,8	3,6	Sensible
75	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Amikacina	Sensible (1)	24,6	19,9	17,0	Sensible
76	<i>Serratia marcescens</i>	Amikacina	Sensible (2)	25,1	10,7	5,9	Sensible
77	<i>Escherichia coli</i>	Amikacina	Sensible (1)	32,6	22,0	10,8	Sensible
78	<i>Enterobacter cloacae</i>	Amikacina	Sensible (2)	68,7	44,0	25,4	Sensible
79	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cefotaxima	Sensible (0,06)	38,8	25,1	14,2	Sensible
80	<i>Escherichia coli</i>	Cefotaxima	Sensible (0,12)	100,6	98,8	92,9	Resistente
81	<i>Escherichia coli</i>	Cefotaxima	Sensible (0,12)	59,1	48,3	20,5	Sensible
82	<i>Enterobacter kobei</i>	Cefotaxima	Sensible (0,25)	45,7	39,9	38,2	Sensible
83	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cefotaxima	Sensible (0,5)	63,0	56,5	41,9	Sensible
84	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cefotaxima	Sensible (0,06)	71,7	67,5	53,7	Sensible
85	<i>Serratia marcescens</i>	Cefotaxima	Sensitive (0,5)	32,8	30,1	26,9	Sensible
86	<i>Enterobacter kobei</i>	Cefotaxima	Sensible (0,12)	75,3	73,8	69,0	Sensible
87	<i>Escherichia coli</i>	Cefotaxima	Resistente (>32)	101,6	98,8	97,4	Resistente
88	<i>Enterobacter cloacae</i>	Cefotaxima	Sensible (0,12)	29,0	23,3	22,1	Sensible
89	<i>Escherichia coli</i>	Ciprofloxacino	Resistente (>32)	100,4	121,6	125,4	Resistente
90	<i>Escherichia coli</i>	Ciprofloxacino	Sensible (0,008)	48,9	48,0	18,6	Sensible
91	<i>Escherichia coli</i>	Ciprofloxacino	Resistente (4)	92,0	90,5	91,2	Resistente
92	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Ciprofloxacino	Sensible (0,015)	30,5	9,5	6,2	Sensible
93	<i>Enterobacter kobei</i>	Ciprofloxacino	Sensible (0,015)	58,3	46,4	34,9	Sensible
94	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Ciprofloxacino	Sensible (0,015)	76,5	74,0	63,7	Sensible
95	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ciprofloxacino	Resistente (4)	89,9	88,4	91,2	Resistente
96	<i>Serratia marcescens</i>	Ciprofloxacino	Sensible (0,06)	51,3	38,6	25,2	Sensible
97	<i>Enterobacter kobei</i>	Ciprofloxacino	Sensible (0,015)	19,6	13,3	11,8	Sensible
98	<i>Escherichia coli</i>	Ciprofloxacino	Resistente (4)	101,7	97,6	94,2	Resistente
99	<i>Serratia marcescens</i>	Ciprofloxacino	Intermedio (2)	90,0	69,5	45,1	Intermedio
100	<i>Enterobacter cloacae</i>	Ciprofloxacino	Sensible (0,008)	12,5	10,6	8,2	Sensible

*S, I y R: concentraciones de punto de corte de sensibilidad, intermedio y resistencia

DISCUSIÓN

IDENTIFICACIÓN MICROBIANA DIRECTA MEDIANTE EL SISTEMA MALDI-TOF

Identificación microbiana directa a partir de muestras de orina monomicrobianas

En la identificación microbiana directa mediante MALDI-TOF se decidió realizar la precipitación y extracción de las proteínas previa al análisis porque con este procedimiento se incrementan, tanto las identificaciones realizadas a partir de las colonias [174], como las realizadas directamente a partir de diferentes muestras [62]. Además, requiere un tiempo de realización corto (15 minutos) y su complejidad es escasa.

En la identificación directa mediante MALDI-TOF a partir de muestras de orina se incluyeron las orinas monomicrobianas con recuentos $\geq 1 \cdot 10^3$ UFC/ml y se aceptaron recuentos de contaminación ≤ 100 UFC/ml. Esto es debido a que en las orinas recogidas por micción espontánea mediante la técnica del chorro medio, más del 95 % de las infecciones urinarias están causadas por un solo microorganismo [168] y recuentos $\geq 1 \cdot 10^3$ UFC/ml pueden ser significativos en determinados casos [3]. Además, estas orinas suelen presentar, en la gran mayoría de los casos, bacterias de contaminación. Una de las razones de este hecho es el arrastre de bacterias de la microbiota normal presente en la mucosa uretral que ocurre durante la micción. De este modo, en orinas obtenidas por micción se aceptan recuentos bacterianos de contaminación de hasta 100 UFC/ml [190].

Los criterios de validación de las identificaciones microbianas obtenidas a partir de muestra directa mediante MALDI-TOF pueden ser de dos tipos: los que tienen en cuenta la puntuación y el índice de consistencia y los que tienen en cuenta únicamente la puntuación. Así, pertenecientes al primer tipo se han publicado dos propuestas:

- Moussaoui *et al.* [126] establecieron que una identificación era válida si se obtenía una puntuación $\geq 1,400$ en el primer microorganismo y la especie coincidía en las cuatro primeras propuestas de identificación del listado.
- Schubert *et al.* [161] propusieron que una identificación era válida si se obtenía una puntuación $\geq 1,500$ en el primer microorganismo y la especie coincidía en las tres primeras propuestas de identificación del listado.

En cuanto a los criterios del segundo tipo, que únicamente tienen en cuenta la puntuación obtenida en la primera identificación del listado, se han publicado los siguientes:

- Stevenson *et al.* [175] establecieron que en una identificación una puntuación $\geq 2,000$ indicaba una identificación a nivel de especie, una puntuación entre 1,700 y 1,900 indicaba una identificación a nivel de género y una puntuación $< 1,700$ se consideraba una identificación fallida. Posteriormente, este criterio fue utilizado por Prod'hom *et al.* [146], Juiz *et al.* [90] y Ferreira *et al.* [61, 63].
- La Scola y Raoult [105] establecieron que un microorganismo era identificado correctamente mediante MALDI-TOF cuando, realizadas cuatro identificaciones de una misma muestra, la especie bacteriana con mayor puntuación (la primera de la lista) coincidía en todas ellas y como mínimo en dos identificaciones se obtenía una puntuación $\geq 1,900$, o en las cuatro se alcanzaba una puntuación $\geq 1,200$.

En la identificación directa a partir de muestras de orina, los criterios que tenían en cuenta la puntuación y el índice de consistencia no fueron los idóneos para la validación de las orinas con baja puntuación de identificación dado que éstos proporcionaron muchas identificaciones fallidas. Este hecho fue debido a que no hubo concordancia a nivel de especie en el listado de los diez microorganismos propuestos por el software del fabricante, pese a que la primera opción del listado sí que, a menu-

do, coincidió con la identificación obtenida a partir del cultivo. El criterio de La Scola y Raoult [105], que es el que utiliza puntuaciones más bajas de todos los publicados hasta la fecha, propone sustituir el índice de consistencia que se obtenía en una lectura por la concordancia a nivel de especie que se obtenía en la primera identificación de las cuatro lecturas realizadas a partir de una misma muestra; es decir, este criterio se basó en la puntuación y en la reproducibilidad del equipo. Una limitación de este criterio consiste en que, al proponer identificaciones válidas a partir de puntuaciones muy bajas ($\geq 1,200$), no puede ser aplicado para la validación de los resultados obtenidos a partir de muestra directa de orina con baja carga bacteriana ya que se observó que puntuaciones $< 1,400$ proponen microorganismos que rara vez son agentes etiológicos de infección urinaria. Para solucionar estos problemas en este trabajo se propone un nuevo criterio: un microorganismo se identifica correctamente mediante MALDI-TOF cuando realizadas cuatro lecturas de una misma muestra se obtienen, como mínimo, dos lecturas con la misma propuesta de identificación a nivel de especie en el primer microorganismo del listado, y ambas con una puntuación $\geq 1,400$. Con este criterio, la mayor puntuación de identificación obtenida en una de las cuatro lecturas realizadas a partir de una misma muestra no es determinante, ya que si hubiese una identificación con mayor puntuación que cualquiera de las repetidas sería descartada. De este modo se reduce el peso de la puntuación para la validación de los resultados, de tal forma que cuando se interpretaron los resultados con los diferentes criterios de validación se observó que el nuevo criterio propuesto proporcionó mejores resultados que los que se obtendrían aplicando los criterios publicados anteriormente por otros autores (Tabla 5).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los aislamientos obtenidos en el grupo de estudio formado por 100 orinas monomicrobianas con recuentos en placa $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml con los obtenidos en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid durante el año 2010 (Tabla 4). Por lo tanto, la muestra estudiada puede considerarse representativa de la población.

Las orinas con recuentos $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml de bacterias gramnegativas y *Enterococcus* spp. generaron elevadas puntuaciones de identificación (cerca de 2,000) y por

lo tanto proporcionaron elevados porcentajes de identificación con independencia del criterio de validación utilizado. Sin embargo, orinas con recuentos $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml de *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp., y orinas con recuentos $< 1 \cdot 10^5$ UFC/ml proporcionaron puntuaciones de identificación bajas (cerca de 1,400) y como consecuencia, bajos porcentajes de identificación. En estas orinas con baja puntuación, el porcentaje de identificación obtenido dependió del criterio utilizado para la validación de los resultados. Aun así, el nuevo criterio propuesto es el que presentó mayores porcentajes de identificación directa aceptables con independencia de la concentración bacteriana en la orina (Tabla 5).

El hecho de procesar 1 μ l de orina para el cultivo, debido a la baja concentración de las bacterias de contaminación, no garantiza ni el procesamiento ni la exclusión de éstas. De hecho, sólo se observó la presencia de colonias de contaminación en algunas placas de aislamiento. Sin embargo, cuando se procesan 5 ml de orina, se recoge una mayor cantidad de estas bacterias de contaminación que puede interferir en la identificación directa llevada a cabo mediante MALDI-TOF. Así, es posible que muchas identificaciones fallidas en este estudio pudieran ser debidas a bacterias de contaminación que no se observaron en las placas de aislamiento y estaban presentes en la orina. Este mismo comentario puede ser aplicado al grupo de orinas que se preincubaron en un caldo de enriquecimiento.

Todas las orinas en las que se obtuvieron identificaciones directas fallidas no mostraron colonias de contaminación en el cultivo. Además de ésta, otra causa posible de la identificación directa fallida puede residir en el volumen de muestra procesado y su correspondiente carga bacteriana. Cuando se procesaron 5 ml de orina con recuentos $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml de *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp. o con recuentos $< 1 \cdot 10^5$ UFC/ml la carga bacteriana fue insuficiente para lograr la identificación microbiana mediante MALDI-TOF a partir de muestra directa, lo cual nos sugiere que para llevar a cabo tal identificación sería conveniente procesar mayores volúmenes de muestra para recoger así una mayor cantidad de bacterias.

Utilizando el protocolo propuesto en esta tesis, para la identificación microbiana directa a partir de orinas con recuentos $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml se obtuvo un porcentaje de

identificaciones válidas del 90 %, similar al 91,8 obtenido por Ferreira *et al.* [61], de tal modo que al comparar ambos porcentajes no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Para orinas con recuentos $<1 \cdot 10^5$ UFC/ml, el nuevo criterio propuesto proporcionó un porcentaje de identificaciones aceptables del 18,9 %, mientras que Ferreira *et al.* [61] obtuvieron un 6,6 % de identificaciones aceptables. Pese a no observarse diferencias estadísticamente significativas, con el criterio de validación propuesto se incrementó el porcentaje de identificaciones aceptables en orinas con recuentos $<1 \cdot 10^5$ UFC/ml. Aun así, este porcentaje sigue siendo muy bajo comparado con el porcentaje de identificaciones aceptables en orinas con recuentos $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml.

Kohling *et al.* [99] también observaron que orinas con recuentos $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml proporcionaban mayores porcentajes de identificación aceptables que las orinas con recuentos $<1 \cdot 10^5$ UFC/ml. Sus resultados no se pueden comparar con los obtenidos en este trabajo dado que dicho grupo utilizó un equipo MALDI-TOF que funcionaba con un software diferente.

Los resultados obtenidos en orinas concuerdan con los publicados por Christner *et al.* [41], que apuntaron que a mayor concentración bacteriana de la muestra, mayor era la cantidad de microorganismos que se depositaba sobre la placa portamuestras y por tanto mayor la puntuación obtenida. Además, para cada concentración bacteriana la puntuación media obtenida de bacterias gramnegativas era superior a la de grampositivas; estos datos concuerdan con los publicados por Schubert *et al.* [161], que afirmaron que la capacidad del sistema MALDI-TOF para la identificación de bacterias gramnegativas era superior a la de grampositivas.

Aunque el número de muestras estudiadas con aislamiento de levaduras es muy pequeño, la relación de los resultados obtenidos con la concentración microbiana de la muestra coincidió con la observada en las orinas positivas para bacterias con respecto a la concentración microbiana de la muestra; concretamente, las dos cepas de *Candida albicans* presentes en dos orinas con recuentos $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml fueron correctamente identificadas aplicando el nuevo criterio propuesto y las dos cepas aisladas en dos orinas con recuentos $<1 \cdot 10^5$ UFC/ml no lo fueron.

En pacientes que padecen infecciones graves, la identificación realizada mediante MALDI-TOF directamente a partir de la orina puede ser de gran utilidad para orientar el tratamiento, ya que con el procedimiento propuesto se consigue anticipar el resultado de la identificación microbiana, como mínimo, 24 horas con respecto a la identificación convencional de las muestras de orina mediante MALDI-TOF y 48 horas con respecto a la identificación bioquímica.

Identificación microbiana directa a partir de muestras de orina monomicrobianas preincubadas en caldo de enriquecimiento

Aparte de procesar un mayor volumen de muestra, tal y como se ha sugerido anteriormente, otra posibilidad para lograr la identificación directa a partir de orinas con independencia de la carga microbiana, consiste en discriminar entre orinas positivas que presentan una carga bacteriana suficiente para proceder a realizar la identificación microbiana directa mediante MALDI-TOF y orinas que contienen una baja carga microbiana, y que en consecuencia deben ser preincubadas en un caldo de enriquecimiento para conseguir una concentración microbiana susceptible de ser analizada mediante MALDI-TOF. Para ello, se observó que para realizar una identificación directa a partir de la orina utilizando los recuentos bacterianos proporcionados por el Sysmex UF-1000i, si se obtenían recuentos $\geq 1 \cdot 10^7$ bacterias/ml no era necesario realizar una preincubación en un caldo de enriquecimiento. Por el contrario, si la orina proporcionaba un recuento en el Sysmex UF-1000i $< 1 \cdot 10^7$ bacterias/ml la muestra debía ser preincubada para conseguir aumentar la carga microbiana hasta alcanzar una concentración susceptible de ser analizada mediante MALDI-TOF.

Los resultados de las identificaciones obtenidos aplicando el nuevo criterio propuesto, tanto de las orinas preincubadas como las que no lo fueron, no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los resultados obtenidos cuando se aplicaron los criterios de validación de otros autores. Los diferentes criterios mostraron porcentajes de identificación muy similares porque todas las orinas tenían una elevada concentración bacteriana y por lo tanto proporcionaron elevadas puntuaciones de identificación. Aun así, el nuevo criterio propuesto fue el que proporcionó un mayor número de identificaciones aceptables (Tablas 7 y 8).

Los resultados obtenidos a partir de las orinas con recuentos $\geq 1 \cdot 10^7$ bacterias/ml en el Sysmex UF-1000i que no se preincubaron (Tabla 7) concuerdan con los descritos por Schubert *et al.* [161], que observaron mayor puntuación media y mayor porcentaje de identificación en bacterias gramnegativas que en grampositivas. Sin embargo, es interesante señalar que el grupo de orinas monobacterianas preincubadas con recuentos en el Sysmex UF-1000i entre $1 \cdot 10^5$ y $1 \cdot 10^7$ bacterias/ml (Tabla 8) proporcionaron mayor puntuación media y mayor porcentaje de identificación que el grupo de orinas con recuentos en el Sysmex UF-1000i $\geq 1 \cdot 10^7$ bacterias/ml. Esto es debido a que con la incubación previa de la muestra en caldo infusión cerebro corazón se aumentó la cantidad de microorganismos que se depositó sobre la placa portamuestras, incrementado así la puntuación media de bacterias grampositivas y gramnegativas y el porcentaje de identificaciones válidas. Este hecho ha sido descrito por Christner *et al.* [41], y ha sido señalado anteriormente en las orinas monomicrobianas.

Aplicando el criterio propuesto hubo diez identificaciones directas fallidas en el grupo de orinas con recuentos en el Sysmex UF-1000i $\geq 1 \cdot 10^7$ bacterias/ml (Tabla 7). Nueve de estas identificaciones resultaron ser bacterias gramnegativas y una grampositiva. Ante lo expuesto anteriormente, la causa del error en la identificación de la cepa grampositiva (*Staphylococcus scheli*) pudo ser debida al crecimiento, en baja proporción, de otro estafilococo en las placas de aislamiento. En las bacterias gramnegativas no se identificaron de forma directa siete cepas de *Escherichia coli*, una de *Klebsiella oxytoca* y una de *Citrobacter koseri*. En cuatro de las siete orinas en las que no se identificó de forma directa *Escherichia coli* se observó crecimiento en escasa proporción de un *Staphylococcus* sp. en tres de ellas, y de un *Proteus mirabilis* en la restante; y otra orina presentó un recuento en la placa de aislamiento $< 1 \cdot 10^5$ UFC/ml. El resto de orinas no mostraron crecimiento de colonias de contaminación en las placas de aislamiento.

Es interesante señalar que las orinas que presentaron aislamientos de un microorganismo en cultivo puro proporcionaron mayor puntuación de identificación directa que las orinas que en las placas de aislamiento mostraron además la presencia de otra bacteria con recuentos no significativos. De este modo, en diez orinas en las

que se aisló *Escherichia coli* junto con una reducida proporción de otros microorganismos se obtuvo una puntuación media de 1,891. En cambio, en las identificaciones realizadas a partir de las orinas con aislamiento de *Escherichia coli* en cultivo puro, se obtuvo una puntuación media $\geq 2,000$, que es el valor que propone el fabricante para validar de forma correcta las identificaciones. Este hecho puede ser debido a que los espectros obtenidos a partir de las identificaciones directas de orinas monomicrobianas son de mayor calidad que los que se generan a partir de orinas que presentan colonias de contaminación.

Los resultados de las identificaciones directas indicaron que recuentos en el Sysmex UF-1000i $\geq 1 \cdot 10^7$ bacterias/ml aseguraron una carga microbiana suficiente para identificar cualquier tipo de microorganismo a partir de muestra directa de orina ya que se obtuvieron los mismos resultados, tanto a partir de la muestra sin incubación en caldo infusión cerebro corazón como en las incubaciones a diferentes tiempos. Además, del total de orinas procesadas con estos recuentos, el 98 % proporcionaron recuentos en la placa $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml.

Hubo cuatro identificaciones directas fallidas en el grupo de orinas con recuentos en el Sysmex UF-1000i entre $1 \cdot 10^5$ y $1 \cdot 10^7$ bacterias/ml (Tabla 8). La cepa de *Streptococcus mitis* erróneamente identificada como *Streptococcus pneumoniae* se debió a una limitación del equipo ya que éste emite un aviso que advierte que *Streptococcus pneumoniae/mitis/oralis* están estrechamente relacionados y que el resultado debería ser confirmado con otro test, como por ejemplo sensibilidad a optoquina o el test de solubilidad en bilis. La cepa no identificada de *Pseudomonas aeruginosa* pudo deberse a la presencia de un *Staphylococcus* sp. en escasa proporción y la cepa no identificada de *Staphylococcus epidermidis* tuvo un recuento en placa $< 1 \cdot 10^5$ UFC/ml. Recuentos en el Sysmex UF-1000i entre $1 \cdot 10^5$ y $1 \cdot 10^7$ bacterias/ml no aseguran una carga suficiente para poder realizar la identificación directa habida cuenta de que sólo se obtuvieron buenos resultados de identificación a las cuatro horas de incubación en caldo infusión cerebro corazón. Asimismo, el 36 % de orinas procesadas con estos recuentos proporcionaron resultados negativos, tanto en placa de aislamiento como en la identificación

directa, y sólo el 30 % proporcionaron recuentos bacterianos en la placa de aislamiento $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml.

Al igual que Ferreira *et al.* [61] y Kohling *et al.* [99], se observó que orinas con recuentos $< 1 \cdot 10^5$ UFC/ml proporcionaron bajos porcentajes de identificación. Mediante la preincubación de las orinas en un caldo de enriquecimiento fue posible realizar la identificación microbiana a partir de la muestra directa con independencia de su concentración microbiana, lo cual resuelve el problema de identificación directa a partir de orinas con bajo recuento. Sin embargo, en el grupo de orinas preincubadas en un caldo de enriquecimiento, algunas identificaciones directas informadas podrían tener significación clínica y otras no, de modo que es posible realizar un sobrediagnóstico. Para la confirmación de la significación clínica de la identificación será necesario conocer el recuento de las colonias obtenidas en las placas de aislamiento. En cualquier caso, si la cantidad de microorganismos en la orina es nula o escasa, aunque la muestra haya sido preincubada, no se obtendrá ninguna identificación directa. En última instancia, es el clínico quien debe valorar la significación clínica de la identificación bacteriana directa y adoptar las medidas que crea oportunas.

Finalmente, la principal ventaja del sistema MALDI-TOF en la identificación directa a partir de muestras de orina frente a las técnicas de PCR consiste en que el MALDI-TOF es capaz de identificar un número de microorganismos considerablemente mayor. Sin embargo, la PCR permite la identificación directa en orinas polimicrobianas [78], mientras que el MALDI-TOF requiere principalmente muestras monomicrobianas.

Identificación microbiana directa a partir de medios de enriquecimiento

En la identificación directa mediante MALDI-TOF a partir de los caldos infusión cerebro corazón monomicrobianos en los que se incubaron diferentes muestras se ha obtenido un elevado porcentaje de identificación directa, casi del 94 % (Tabla 9), debido a que la concentración de los microorganismos es muy elevada. En este grupo ha habido dos cepas de *Streptococcus mitis* y dos de *Streptococcus oralis* identificadas erróneamente de forma directa como *Streptococcus pneumoniae*. Estas identificaciones fallidas son debidas a una limitación del equipo anteriormente citada. Por otra

parte, los resultados obtenidos también confirmaron que el sistema MALDI-TOF ofrece mejores resultados de identificación en bacterias gramnegativas que en grampositivas.

Mediante este procedimiento se consigue adelantar el resultado de la identificación microbiana, como mínimo, 24 horas con respecto a la identificación convencional mediante MALDI-TOF y 48 horas con respecto a la identificación bioquímica. Esta información puede ser muy útil para adecuar el tratamiento antimicrobiano en pacientes en los que para identificar la bacteria presente en muestras tan valiosas y en ocasiones difíciles de obtener, como líquidos pleurales, pericárdicos o peritoneales, se tiene que realizar el subcultivo del caldo de enriquecimiento.

No fue posible realizar la identificación a partir del medio de tioglicolato dado que este medio contiene cierta cantidad de agar que al centrifugar el medio hace que se forme un coágulo compacto que impide la separación de los microorganismos.

Identificación microbiana directa a partir de frascos de hemocultivo crecidos

Estudiando diferentes combinaciones de las puntuaciones de las identificaciones directas obtenidas mediante MALDI-TOF a partir de los frascos de hemocultivo crecidos se observó que el criterio que proporcionaba un mayor número de identificaciones aceptables era el mismo que para las orinas. La utilización del nuevo criterio aquí propuesto supuso una mejora significativa en el número de identificaciones aceptables a partir del frasco de hemocultivo crecido. Cuando se aplicaron, a los resultados obtenidos en este trabajo, los criterios de Moussaoui *et al.* [126] y de Schubert *et al.* [161] se obtuvieron, en ambos casos, un 89 % de identificaciones válidas; con el de Stevenson *et al.* [175] un 91 % y con el de La Scola y Raoult [105] un 92 %. El nuevo criterio de validación de los resultados propuesto proporcionó un 98 % de identificaciones aceptables, de tal forma que al comparar los resultados de las identificaciones obtenidas aplicando el nuevo criterio propuesto con los resultados obtenidos al aplicar los distintos criterios publicados previamente se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

El protocolo de centrifugación diferencial, junto con el nuevo criterio de validación propuesto, supuso una mejora de los resultados publicados previamente con

otros tratamientos de los frascos de hemocultivo. Así, cuando se aplicó este protocolo para el procesamiento de los hemocultivos se obtuvo un porcentaje de identificaciones válidas del 98 %, mientras que Ferreira *et al.* [63] obtuvieron un 71,2 %, Stevenson *et al.* [175] un 76,4 %, Prod'hom *et al.* [146] un 77,9 %, La Scola y Raoult [105] un 79,7 %, Schubert *et al.* [161] un 86,8 %, Moussaoui *et al.* [126] un 87,5 %, Juiz *et al.* [90] un 77,7 % y 94,1 % usando dos procedimientos diferentes, y, finalmente, Christner *et al.* [41] obtuvieron un 94,5 %, observándose diferencias estadísticamente significativas con respecto a los procedimientos de Ferreira *et al.* [63] ($p < 0,05$), Stevenson *et al.* [175] ($p < 0,05$), Prod'hom *et al.* [146] ($p < 0,05$), La Scola y Raoult [105] ($p < 0,05$), Schubert *et al.* [161] ($p < 0,05$), Moussaoui *et al.* [126] ($p < 0,05$) y al de Juiz *et al.* [90] ($p < 0,05$) cuando utilizó el procedimiento que proporcionó un 77,7 % de identificaciones válidas; en cambio, no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los de Juiz *et al.* [90] cuando utilizó el procedimiento que proporcionó un 94,1 % de identificaciones aceptables y Christner *et al.* [41]. Este incremento en el porcentaje de identificaciones válidas se debió a que se logró un mayor número de identificaciones en bacterias grampositivas. Este hecho puede ser debido, además del criterio de validación utilizado, a que se recogieron las bacterias presentes en cinco ml de muestra, mientras que en otros trabajos publicados [41, 63, 90, 105, 126, 146, 161, 175] siempre se partió de un volumen inferior de muestra, recogiéndose así una menor cantidad de bacterias y obteniendo, en consecuencia, una peor puntuación. Es interesante señalar que en este estudio la identificación a partir del frasco de hemocultivo se realizó en el momento que el sistema Bactec proporcionó una lectura positiva, mientras que otros autores, como Stevenson *et al.* [175], mantuvieron los frascos positivos durante tres a diez horas a temperatura ambiente para aumentar el número de bacterias y obtener mejores resultados; aun así, los resultados obtenidos supusieron una mejora sustancial en el porcentaje de identificaciones correctas (un 98 % frente a un 76,4 %).

La utilización de un protocolo de centrifugación diferencial para la eliminación de las interferencias analíticas presentes en el hemocultivo que impiden la identificación directa mediante MALDI-TOF presenta una serie de ventajas respecto a los otros métodos publicados. Es el método más sencillo y barato ya que no utiliza ningún reactivo, caso contrario de lo que ocurre en los métodos que para lograr la lisis celular

añaden un tensioactivo, como el dodecilsulfato sódico [119], la saponina [64] o el Tween 80 [169]; sales como el cloruro de amonio [146, 175]; o usan el kit comercial MALDI Sepsityper [90, 161, 198]. Otro método se basa en el uso de un gel separador de suero y con activador de la coagulación [126, 175]. Sin embargo, este método, para lograr la separación y concentración de los microorganismos, requiere un número de pasos mayor que un protocolo de centrifugación diferencial, que únicamente requiere dos, una centrifugación a baja velocidad para sedimentar las células y otra a alta velocidad para forzar la sedimentación de los microorganismos que se pretenden identificar. Además, no hay apenas diferencia de tiempo entre los diferentes métodos descritos para lograr la eliminación de las células y concentración de los microorganismos presentes en el hemocultivo; todos los métodos usados para lograr la identificación directa mediante MALDI-TOF requieren, aproximadamente, una hora para su aplicación.

Con el fin de conseguir un mayor número de identificaciones directas válidas, con las muestras que proporcionaron identificaciones con baja puntuación o que no presentaban picos, con el fin de acumular más cantidad de proteína, se depositaron 3 μ l de muestra sobre la placa de identificación de la siguiente forma: primero 1 μ l de muestra y se dejó secar, después otro y se dejó secar y por último 1 μ l más, y después 1 μ l de matriz. Lamentablemente esto no supuso ninguna mejora obteniéndose los mismos resultados que con 1 μ l de muestra.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los aislamientos obtenidos en el grupo de estudio formado por 100 frascos de hemocultivo positivos monobacterianos con los obtenidos en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid durante el año 2010 (Tabla 10). Por lo tanto, los resultados obtenidos en el grupo de estudio son extrapolables al conjunto de hemocultivos positivos. Dado que se obtuvo una sensibilidad del 98 % (intervalo de confianza del 95 %: 95,2 - 100), podemos afirmar que, mediante el protocolo propuesto para el procesamiento de los hemocultivos, es posible la identificación directa mediante MALDI-TOF de las bacterias que más comúnmente causan bacteriemias.

De las 100 identificaciones realizadas a partir de los frascos de hemocultivo (Tabla 11) sólo hubo dos de ellas que no coincidieron con la obtenida a partir de las colonias del subcultivo. Un aislado de *Acinetobacter baumannii* identificado a partir de la colonia que fue reconocido como *Acinetobacter genomospecies 3* a partir del frasco de hemocultivo. Esta discordancia posiblemente fue debida a la presencia en el cultivo de *Staphylococcus aureus* que no se observó en el examen microscópico del frasco de hemocultivo, o a una limitación del equipo ya que éste, en el caso de proponer una identificación perteneciente al género *Acinetobacter* el software advierte que los perfiles de este género son muy semejantes y por tanto la diferenciación a nivel de especie es muy difícil. Esta cepa de *Acinetobacter baumannii* también fue identificada como tal mediante los métodos bioquímicos tradicionales, como los sistemas comerciales API (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) y MicroScan. El otro resultado discordante fue una cepa de *Staphylococcus epidermidis* que no fue identificada a partir del frasco de hemocultivo. Esta identificación directa fallida pudo deberse a un error durante el procesamiento de la muestra o a un fenómeno que se observa algunas veces en la rutina de trabajo del laboratorio. En base a nuestra experiencia, algunas cepas del género *Staphylococcus* no son identificadas correctamente mediante MALDI-TOF a partir de la colonia obtenida en el cultivo de diferentes muestras, aunque se repita la identificación; en cambio, si se hace un pase de la colonia del estafilococo a otra placa de agar sangre y se incuba durante 24 horas se forman nuevas colonias a partir de las cuales sí que se obtiene una identificación correcta (observación personal).

Los datos de las puntuaciones medias de las identificaciones directas a partir de los frascos de hemocultivo crecido (Tabla 11) confirman lo expresado por otros autores [41], que afirmaron que la capacidad de identificación del sistema MALDI-TOF de bacterias gramnegativas era superior a la de bacterias grampositivas.

Mediante el sistema MALDI-TOF es posible obtener un porcentaje de identificación microbiana directa a partir del frasco de hemocultivo positivo prácticamente del 100 % de los casos porque la concentración bacteriana en el momento que el sistema de incubación proporciona una lectura positiva es de alrededor $5 \cdot 10^8$ UFC/ml [41]. Esta concentración permite procesar una cantidad de microorganismos suficiente para ob-

tener una identificación aceptable. En la orina, rara vez se alcanza esta concentración microbiana y, en consecuencia, se procesan, para un mismo volumen, una cantidad menor de microorganismos que en los hemocultivos. Por este motivo, los porcentajes de identificación directa en orinas son menores; además, las orinas suelen presentar bacterias de contaminación que dificultan la identificación microbiana directa mediante MALDI-TOF. Realizando la identificación directa a partir del frasco de hemocultivo crecido se consigue adelantar 24 horas con respecto a la identificación mediante MALDI-TOF a partir de la colonia y 48 horas con respecto a la identificación bioquímica convencional. Este acortamiento en tiempo resulta muy útil para adecuar el tratamiento para pacientes que padecen infecciones del torrente circulatorio.

La gran ventaja del sistema MALDI-TOF en la identificación directa a partir del frasco de hemocultivo crecido, frente a las técnicas moleculares y las de hibridación *in situ* fluorescente, radica en que permite la identificación de un gran número de microorganismos en un periodo de tiempo muy breve; además el procesamiento para alcanzar la identificación directa es más sencillo que en algunas PCRs.

ANTIBIOGRAMA RÁPIDO A PARTIR DEL FRASCO DE HEMOCULTIVO CRECIDO

Se han publicado numerosos trabajos en los que se ha mostrado que la citometría de flujo es una técnica útil para el estudio de la susceptibilidad a los antimicrobianos. Estos estudios se fundamentan en la observación de los efectos que ejercen estas moléculas sobre ciertos parámetros metabólicos de los microorganismos como por ejemplo la integridad de la membrana [149], la dispersión de la luz [166] o la actividad enzimática [98]. La mayoría de estos trabajos se han realizado a partir de las colonias crecidas en las placas de aislamiento. A partir de muestra directa se han publicado escasos artículos, solamente con exudados y líquidos biológicos [34, 71]. Sin embargo, ninguno de estos estudios fue realizado directamente a partir del frasco de hemocultivo crecido; además, ninguna de estas metodologías ha progresado debido a su complicado procedimiento y elevado coste.

El citómetro de flujo Sysmex UF-1000i es un equipo de fácil manejo que realiza mediciones rápidas, está ampliamente implantando en los laboratorios Clínicos para el cribado de orinas y, además, es capaz de cuantificar bacterias [116]. En el cribado de orinas realizado con el Sysmex UF-1000i, los falsos negativos pueden deberse a la formación de agregados bacterianos que son más frecuentes en cocos grampositivos que en bacilos gramnegativos. Este fenómeno conduce a un menor recuento de cocos grampositivos que bacilos gramnegativos [91]. Con el fin de disminuir la formación de agregados bacterianos, en el desarrollo del antibiograma rápido a partir del frasco de hemocultivo crecido se ha usado el tensioactivo Pluronic®. De este modo, en presencia de Pluronic®, se obtuvieron recuentos mayores que en su ausencia, tanto para bacterias grampositivas como para gramnegativas (datos no mostrados).

La interpretación del antibiograma realizado se llevó a cabo mediante la comparación entre el recuento bacteriano de cultivos incubados con y sin antibiótico. De esta forma, la metodología propuesta se fundamentó en el estudio del comportamiento fenotípico de las bacterias frente al antibiótico. El estudio fenotípico es mucho más determinante que el genotípico dado que, en última instancia, el fenotipo es la expresión del comportamiento de la bacteria en el organismo humano cuando a éste se le administra un antibiótico. Es decir, para observar el efecto que ejerce el antibiótico se necesita cierto tiempo para que la bacteria crezca o no en función de su sensibilidad al antimicrobiano. De este modo, las distintas cepas ensayadas presentaron diferente velocidad de crecimiento y como consecuencia de ello, después de 60 minutos de incubación de los cultivos, se observó una diferencia sustancial del recuento microbiano con respecto al recuento obtenido a tiempo cero. Este efecto fue observado primeramente en las cepas de colección, de tal forma que las cepas *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Escherichia coli* ATCC 25922 son las que presentaron mayor velocidad de crecimiento y como consecuencia de ello se requirió un inóculo menor para obtener recuentos microbianos dentro del rango de linealidad del Sysmex UF-1000i durante las tres horas de incubación. Asimismo, se comprobó que si se partía de una concentración de estas cepas $>1 \cdot 10^5$ bacterias/ml a tiempo cero (T_0), a las dos horas de incubación las lecturas ya estaban fuera del rango de linealidad del equipo, por lo que no eran fiables. Las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y

Staphylococcus aureus ATCC 29213 presentaron una menor velocidad de crecimiento; de este modo, la concentración a T_0 del control sin antibiótico fue mayor que la de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Escherichia coli* ATCC 25922 con el fin de poder obtener un mayor recuento microbiano a las tres horas de incubación que estuviese dentro del rango de linealidad del equipo.

Para cada antibiograma realizado, el volumen de hemocultivo positivo añadido a cada tubo para proporcionar la concentración adecuada a T_0 ha sido, en todos los casos, \leq a 500 μ l. Este volumen no es significativo con respecto a los 30 ml de volumen final del cultivo por lo que se puede considerar que el inóculo no altera significativamente ni la concentración del medio de cultivo ni la del antibiótico.

Durante la incubación de los controles sin antibiótico, las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Escherichia coli* ATCC 25922 aumentaron del orden de una unidad logarítmica con cada hora de incubación. En cambio, la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 presentó, a los 60 minutos de incubación, una concentración microbiana ligeramente superior a la obtenida a tiempo cero; y a los 120 y 180 minutos de incubación se observó un incremento en la concentración microbiana cercano a una unidad logarítmica. Como consecuencia, a los 60 minutos de incubación en presencia de antibióticos, las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Escherichia coli* ATCC 25922, sensibles a los antibióticos ensayados, ya presentaron una disminución sustancial del recuento microbiano con respecto al del control sin antibiótico obtenido al mismo tiempo de lectura. La cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, sensible a los antibióticos ensayados, cuando se incubó durante 60 minutos en presencia de antibiótico, proporcionó un recuento muy similar al del control sin antibiótico al mismo tiempo de lectura. En cambio, a los 120 minutos ya se observó una disminución sustancial del recuento microbiano de los cultivos incubados en presencia de antibióticos con respecto al control sin antibiótico al mismo tiempo de lectura. Además, en todas las cepas de colección sensibles a los antibióticos ensayados, la diferencia del recuento con respecto al del control sin antibiótico se fue incrementando con los tiempos de lectura y, a medida que aumentó la concentración de antibiótico ensayado,

el porcentaje de crecimiento con respecto al control sin antibiótico también disminuyó. De esta forma, al analizar, mediante curvas COR (Tabla 13 y Figura 13), los recuentos obtenidos de las cepas de colección incubadas en presencia de antibiótico con respecto a los controles sin antibiótico a los mismos tiempos de lectura (Tabla 12) con el objetivo de definir un criterio de sensibilidad/resistencia, se observó que en enterobacterias, enterococos y BGNNF, con el recuento obtenido a los 60 minutos de incubación ya se pudo determinar si una bacteria era sensible o resistente al antibiótico. En cambio, en estafilococos se requirieron dos horas de incubación para llegar al resultado de susceptibilidad. El punto de corte hallado mediante curvas COR (Tabla 13 y Figura 13) que discrimina entre cepas sensibles y resistentes es una disminución del 14% de la concentración bacteriana con respecto al control sin antibiótico. De este modo, la única cepa de colección resistente utilizada en el diseño del antibiograma, *Escherichia coli* ATCC 35218, ha mostrado, desde la primera hora de incubación con antibiótico, una reducción del recuento microbiano inferior al 14 % con respecto al control sin antibiótico, al contrario de lo que ocurre en las cepas de colección *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Escherichia coli* ATCC 25922 sensibles a los antibióticos estudiados. Estas cepas mostraron, desde la primera hora de incubación con antibiótico, una reducción del recuento microbiano como mínimo del 14 % con respecto al control sin antibiótico. Finalmente, la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 sensible a los antibióticos estudiados, mostró, desde los 120 minutos de incubación con antibiótico, una reducción del recuento microbiano como mínimo del 14 % con respecto al control sin antibiótico.

En el antibiograma realizado a partir de frascos de hemocultivo de pacientes, las identificaciones directas obtenidas mediante MALDI-TOF coincidieron en un 100 % con las obtenidas a partir del subcultivo. Estos resultados confirmaron las predicciones del método propuesto para la identificación directa a partir del frasco de hemocultivo crecido.

En el antibiograma realizado a partir de frascos de hemocultivo de pacientes, 78 cepas bacterianas analizadas fueron sensibles a los diferentes antibióticos estudiados (Tablas 14, 15, 16 y 17). En 70 de éstas, el recuento microbiano con respecto al

control sin antibiótico, para cada tiempo de lectura, disminuyó a medida que aumentó la concentración de antibiótico. Por otra parte, los estafilococos necesitaron más tiempo de incubación con los antibióticos estudiados que las bacterias gramnegativas y enterococos para obtener reducciones significativas en el recuento microbiano comparado con el control. Únicamente en dos cepas de estafilococos (Tabla 16) se observó una reducción significativa del recuento microbiano a los 60 minutos de incubación con la mayor concentración de vancomicina ensayada (32 µg/ml). Además, los cuatro antibióticos bactericidas ensayados (oxacilina, vancomicina, amikacina y cefotaxima) inhibieron el crecimiento de forma similar en la concentración crítica de sensibilidad a los 120 minutos de incubación. Sin embargo, en la concentración crítica de resistencia amikacina y vancomicina mostraron un efecto mayor que cefotaxima u oxacilina. Oxacilina mostró un efecto doble en estafilococos coagulasa negativos (SCN) que en *Staphylococcus aureus* pese a que las concentraciones ensayadas en *Staphylococcus aureus* son ocho veces superiores a las ensayadas en SCN. Vancomicina mostró un menor efecto en SCN que en *Staphylococcus aureus* pese a que las concentraciones ensayadas en *Staphylococcus aureus* fueron la mitad que en SCN. Los datos obtenidos en los antibiogramas realizados a partir de frascos de hemocultivo crecidos con enterococos (Tabla 15) concuerdan con lo reseñado en la literatura, en donde se ha descrito que vancomicina tiene menor efecto que ampicilina [150]. Los datos obtenidos en los antibiogramas realizados a partir de frascos de hemocultivo crecidos con BGNNF (Tabla 14) muestran que colistina disminuyó la concentración bacteriana del cultivo de forma muy sustancial en sólo 60 minutos, llegando a obtener reducciones del cultivo del 99 % con respecto al control sin antibiótico al mismo tiempo de lectura. Este resultado concuerda con el efecto bactericida rápido descrito previamente [94].

Cabe destacar que, en algunos casos, los recuentos microbianos obtenidos a partir del cultivo de cepas sensibles incubadas con antibióticos aumentaron a lo largo de las tres horas de incubación. Este fenómeno pudo deberse a que el fluorocromo usado por el Sysmex UF-1000i tiñe tanto las bacterias viables como las no viables. Sin embargo, estos recuentos bacterianos, cuando se compararon con los del control sin antibiótico, mostraron siempre reducciones superiores al 14 %.

Broeren *et al.*, [21] mediante el equipo Sysmex UF-1000i, determinaron la CMI a partir de las colonias crecidas en las placas y la definieron como la mínima concentración de antibiótico que proporciona una reducción del 80 % del número de bacterias con respecto al control sin antibiótico después de 240 minutos de incubación. Cuando acortaron el tiempo de incubación apuntaron que para *Escherichia coli* podían obtener un resultado válido a los 90 minutos y para *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* a los 120 minutos. En este trabajo, realizando el antibiograma a partir del frasco de hemocultivo crecido en el momento que el sistema de incubación proporcionó una lectura positiva, se requirió solamente una hora de incubación para obtener los resultados de susceptibilidad en enterococos, BGNNF y enterobacterias y dos horas en estafilococos. Estos tiempos son del mismo orden que los obtenidos por estos autores, pero en este trabajo se acorta el tiempo necesario para la obtención de colonias, que supone un promedio de 17 horas, habiendo encontrado solamente un error importante con respecto al *gold standard*. Este error fue debido a una cepa de *Escherichia coli* ensayada con cefotaxima (Tabla 17). Este antibiograma se repitió dos veces y se obtuvo el mismo resultado. Pese a esta discrepancia, se obtuvo un índice Kappa muy bueno, con un valor de 0,9668 (intervalo de confianza del 95 %: 0,9022 – 1,0000) con $p < 0,001$. Además, no obtuvimos ningún error muy importante, que son los que tendrían consecuencias graves para el paciente dado que se informaría un antibiótico como sensible cuando en realidad es resistente.

Como *gold standard* del antibiograma se eligieron tres métodos comerciales diferentes: E-test, VITEK 2 y MicroScan. La razón para seleccionar tres métodos es que los valores de la CMI obtenidos mediante estas técnicas pueden ser muy variables, de tal forma que se han llegado a observar diferencias de más de tres diluciones en las CMIs obtenidas para un mismo microorganismo y antibiótico [57, 113]. Dado que las cepas de colección usadas en el diseño del antibiograma a partir del frasco de hemocultivo crecido presentan una susceptibilidad definida, y por esta razón se emplean en el control del antibiograma, los resultados obtenidos mediante estos métodos comerciales a partir del subcultivo de los frascos de hemocultivo preparados artificialmente con estas cepas estuvieron dentro de lo esperado.

Otro método descrito para la determinación de la susceptibilidad a los antibióticos a partir del frasco de hemocultivo crecido son las técnicas de detección molecular. Estas técnicas presentan una serie de inconvenientes: son métodos analíticos que suelen identificar escasos genes de resistencia, algunas de ellas tienen mucha complejidad y realizan un estudio genotípico [137]. Por otra parte, las adaptaciones de los métodos bioquímicos y de aglutinación para obtener información sobre la identificación o la susceptibilidad, de forma directa, a partir del microorganismo presente en el frasco de hemocultivo crecido son baratas y fáciles de realizar. Sin embargo, estos métodos están limitados a un pequeño número de agentes infecciosos y tienen un bajo rendimiento, por lo que su uso no se ha implantado ampliamente en los laboratorios de Microbiología Clínica [137]. Cuando se han aplicado diversos métodos comerciales, empleados en la rutina de trabajo para la determinación de la susceptibilidad a partir de la colonia, para realizar una identificación y un antibiograma a partir del frasco de hemocultivo crecido se ha requerido un tiempo muy prolongado (Tabla 1) comparado con el tiempo requerido para realizar la identificación directa mediante MALDI-TOF y el antibiograma directo mediante citometría de flujo aquí propuestos.

La espectrometría de masas (MALDI-TOF) es una técnica que permite realizar un antibiograma rápido en base a diferentes procedimientos. Sin embargo, no es factible utilizar el sistema MALDI-TOF de rutina para la determinación de la susceptibilidad por diversos motivos; entre ellos, es necesario crear bases de datos propias (proceso complejo que requiere un mayor conocimiento del equipo), no es posible estudiar todos los grupos de antibióticos y no existe una metodología uniforme para la determinación de la susceptibilidad a los principales grupos de antibióticos.

La principal ventaja que aporta el sistema MALDI-TOF en el antibiograma es que permite identificar en unos minutos la especie microbiana que se está estudiando. Este hecho es imprescindible para poder interpretar los valores de la CMI obtenidos. Así, el sistema MALDI-TOF ha hecho posible que diferentes técnicas que permiten realizar un antibiograma rápido pero no la identificación, como son el sistema UroQuick, la bioluminiscencia y los métodos colorimétricos, puedan ser aplicadas en Microbiología

Clínica. Sin embargo estas metodologías no han sido aplicadas a partir del frasco de hemocultivo crecido.

Con el trabajo realizado sobre la identificación microbiana mediante MALDI-TOF a partir del frasco de hemocultivo crecido y otros estudios publicados [105, 118, 126, 161] se demuestra que es posible conocer la especie bacteriana presente en el hemocultivo en menos de una hora desde que el sistema de incubación proporciona una lectura positiva. Si inmediatamente después de identificar el microorganismo presente en el hemocultivo se realiza el antibiograma mediante el procedimiento propuesto se puede obtener el resultado de la identificación y susceptibilidad en menos de dos horas para bacterias gramnegativas y enterococos, y en menos de tres horas para estafilococos, siendo éste el menor tiempo descrito para la realización de la identificación y de las pruebas de susceptibilidad a partir del hemocultivo crecido. Esta metodología supone un ahorro muy importante de tiempo, ya que los métodos habituales precisan un mínimo de 48 a 72 horas para realizar la identificación bacteriana y el estudio de la susceptibilidad a los antibióticos desde que el sistema de incubación detecta un frasco de hemocultivo crecido. Otra ventaja del antibiograma propuesto es que permite seleccionar los antibióticos a estudiar de acuerdo a la clínica del paciente y microorganismo aislado; además, esta metodología también se podría aplicar a otras muestras monomicrobianas, como por ejemplo orinas y otros líquidos biológicos, y a las colonias crecidas en las placas de aislamiento sembradas a partir de cualquier muestra. De este modo, los resultados de la susceptibilidad se podrían adelantar de forma significativa.

La toma de hemocultivos antes de la administración de antibióticos, la administración de antibióticos de amplio espectro dentro de la primera hora del reconocimiento de sepsis y desescalar antibióticos cuando sea apropiado son algunas de las recomendaciones que se recogen en el *Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock* [45]. En este sentido, el laboratorio de Microbiología juega un papel muy importante en el procesamiento de los hemocultivos, pudiendo ofrecer una gran ayuda al clínico si es capaz de informar los resultados de identificación y susceptibilidad obtenidos a partir del frasco de hemocul-

tivo crecido con la mayor brevedad posible. De este modo, es posible hacer un uso más racional de los antibióticos dado que se podría administrar, dentro de los antibióticos sensibles, el más idóneo en cuanto a la patología y al microorganismo identificado. Además, la implantación de la metodología propuesta en esta tesis podría tener un gran impacto en la evolución clínica de los pacientes con sepsis dado que, según Kumar *et al.*, [104] en la sepsis cada hora de retraso en la administración de antibióticos está ligada a una reducción de la supervivencia del casi el 8 %, y también se lograría reducir de forma significativa los costes hospitalarios [138].

CONCLUSIONES

1. El criterio de validación de los resultados de MALDI-TOF tiene una gran influencia en la calidad de la identificación a partir de la muestra directa cuando la puntuación de identificación es baja (cerca de 1,400), mientras que si la puntuación es alta (cerca de 2,000) el criterio de validación apenas influye en la calidad de la identificación.
2. El nuevo criterio propuesto para la validación de los resultados obtenidos mediante MALDI-TOF: *un microorganismo se identifica correctamente mediante MALDI-TOF cuando realizadas cuatro lecturas de una misma muestra se obtienen, como mínimo, dos lecturas con la misma propuesta de identificación a nivel de especie en el primer microorganismo del listado, y ambas con una puntuación $\geq 1,400$* , proporciona un mayor número de identificaciones aceptables que los criterios publicados previamente, tanto en las identificaciones realizadas directamente a partir de la muestra de orina como a partir del frasco de hemocultivo crecido.
3. En orinas monomicrobianas con un recuento $\geq 1 \cdot 10^7$ bacterias/ml en el Sysmex UF-1000i, 5 ml poseen una cantidad de microorganismos suficiente para obtener una identificación bacteriana directa mediante MALDI-TOF.
4. En orinas monomicrobianas con un recuento entre $1 \cdot 10^5$ y $1 \cdot 10^7$ bacterias/ml en el Sysmex UF-1000i, 5 ml poseen una cantidad insuficiente de microorganismos para obtener una identificación directa mediante MALDI-TOF. Para lograr la identificación directa a partir de estas orinas es necesario realizar una incubación de la muestra durante cuatro horas en un caldo de enriquecimiento.

5. Mediante MALDI-TOF es posible realizar en menos de 15 minutos la identificación microbiana directamente a partir de medios de enriquecimiento, como caldo infusión cerebro corazón, en el que siembran diferentes muestras biológicas. Sin embargo, no es posible realizar la identificación directamente a partir del medio de tioglicolato.
6. La identificación microbiana directa mediante MALDI-TOF a partir del frasco de hemocultivo crecido se consigue procesando 5 ml de medio.
7. Mediante MALDI-TOF es posible identificar directamente las bacterias grampositivas y gramnegativas más frecuentemente productoras de bacteriemia en menos de una hora desde que el frasco es marcado como positivo por el sistema de monitorización de los hemocultivos.
8. Para bacilos gramnegativos y enterococos los criterios de interpretación del antibiograma validado en este estudio son:
 - Sensible: si a los 60 minutos de incubación con antibiótico a concentraciones menores o iguales a la del punto de corte de sensibilidad se obtiene una reducción en el número de bacterias de al menos un 14 % con respecto al recuento del control sin antibiótico para el mismo tiempo de incubación.
 - Resistente: si se necesitan concentraciones de antibiótico iguales o mayores a la del punto de corte de resistencia para obtener, a los 60 minutos de incubación, una reducción del recuento microbiano de al menos un 14 % con respecto al recuento del control sin antibiótico para el mismo tiempo de incubación.
 - Intermedio si no se cumplen ni el criterio de sensibilidad ni el de resistencia.
9. En el antibiograma diseñado y validado en este estudio los criterios de interpretación para estafilococos son los mismos que para gramnegativos y enterococos pero a las 2 horas de incubación.

10. Los resultados del antibiograma propuesto concuerdan casi en un 100 % con los obtenidos mediante métodos comerciales.

11. En dos horas es posible obtener mediante espectrometría de masas y citometría de flujo la identificación y susceptibilidad a los antibióticos de bacterias gramnegativas y enterococos a partir del frasco de hemocultivo crecido. Para obtener estos resultados en estafilococos se requieren tres horas.

12. La aplicación combinada de los procedimientos diagnósticos desarrollados en este trabajo permite una reducción muy importante del tiempo necesario para la emisión del informe microbiológico con la identificación bacteriana y la susceptibilidad a los antibióticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alanio A, Beretti JL, Dauphin B, Mellado E, Quesne G, Lacroix C, *et al.* 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Infect.* **17**: 750-755.
2. Alvarez-Barrientos A, Arroyo J, Canton R, Nombela C, and Sanchez-Perez M. 2000. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* **13**: 167-195.
3. Andreu A, Cacho J, Coira A, and Lepe JA. 2010. Procedimiento 14a. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. En Cercenado E, Canton R, editores. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia14a.pdf>. Fecha de consulta: 15/01/2012.
4. Arav-Boger R, Leibovici L, and Danon YL. 1994. Urinary tract infections with low and high colony counts in young women. Spontaneous remission and single-dose vs multiple-day treatment. *Arch Intern Med.* **154**: 300-304.
5. Baldassarre JS and Kaye D. 1991. Special problems of urinary tract infection in the elderly. *Med Clin North Am.* **75**: 375-390.
6. Balk RA. 2000. Severe sepsis and septic shock. Definitions, epidemiology, and clinical manifestations. *Crit Care Clin.* **16**: 179-192.
7. Barenfanger J, Drake C, and Kacich G. 1999. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* **37**: 1415-1418.
8. Barrera LM, Drago ME, Pérez J, Cecilia A, Gómez F, Sainz T, *et al.* 2004. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* **17**: 42-55.
9. Bartels MD, Boye K, Rohde SM, Larsen AR, Torfs H, Bouchy P, *et al.* 2009. A common variant of staphylococcal cassette chromosome mec type IVa in isolates from Copenhagen, Denmark, is not detected by the BD GeneOhm methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* assay. *J Clin Microbiol.* **47**: 1524-1527.
10. Barton AP. 1985. A rapid bioluminescent method for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonies. *J Antimicrob Chemother.* **15**: 61-67.
11. Beckers B, Lang HR, and Schimke D. 1983. Rapid drug susceptibility testing of *M. tuberculosis* H 37 Rv with bioluminescence. *Prax Klin Pneumol.* **37 Suppl 1**: 460-461.
12. Beckers B, Lang HR, Schimke D, and Lammers A. 1985. Evaluation of a bioluminescence assay for rapid antimicrobial susceptibility testing of mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol.* **4**: 556-561.
13. Benagli C, Rossi V, Dolina M, Tonolla M, and Petrini O. 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS One.* **6**: e16424.

14. Bermejo M, Clavera I, Michel de la Rosa F, and Marin B. 2007. Epidemiología de la tuberculosis. *An Sist Sanit Navar.* **30 Suppl 2:** 7-19.
15. Bittar F, Ouchenane Z, Smati F, Raoult D, and Rolain JM. 2009. MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin. *Int J Antimicrob Agents.* **34:** 467-470.
16. Blaschke AJ, Heyrend C, Byington CL, Fisher MA, Barker E, Garrone NF, *et al.* 2012. Rapid identification of pathogens from positive blood cultures by multiplex polymerase chain reaction using the FilmArray system. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **74:** 349-355.
17. Bou G, Fernandez-Olmos A, Garcia C, Saez-Nieto JA, and Valdezate S. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **29:** 601-608.
18. Bouza E, Torres MV, Radice C, Cercenado E, de Diego R, Sanchez-Carrillo C, *et al.* 2007. Direct E-test (AB Biodisk) of respiratory samples improves antimicrobial use in ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis.* **44:** 382-387.
19. Boyer A, Medrano J, Mzali F, Balick-Weber CC, Bessede E, Picard W, *et al.* 2012. Direct testing of bronchoalveolar lavages from ventilator-associated pneumonia patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **73:** 107-110.
20. Boyle-Vavra S and Daum RS. 2010. Reliability of the BD GeneOhm methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) assay in detecting MRSA isolates with a variety of genotypes from the United States and Taiwan. *J Clin Microbiol.* **48:** 4546-4551.
21. Broeren MA, Maas Y, Retera E, and Arents NL. 2013. Antimicrobial susceptibility testing in 90 min by bacterial cell count monitoring. *Clin Microbiol Infect.* **19:** 286-291.
22. Bruins MJ, Bloembergen P, Ruijs GJ, and Wolfhagen MJ. 2004. Identification and susceptibility testing of Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa by direct inoculation from positive BACTEC blood culture bottles into Vitek 2. *J Clin Microbiol.* **42:** 7-11.
23. Brun-Buisson C. 2000. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med.* **26 Suppl 1:** S64-74.
24. Burckhardt I and Zimmermann S. 2011. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol.* **49:** 3321-3324.
25. Butler WR and Kilburn JO. 1988. Identification of major slowly growing pathogenic mycobacteria and Mycobacterium gordonae by high-performance liquid chromatography of their mycolic acids. *J Clin Microbiol.* **26:** 50-53.
26. Campbell AK, Hallett MB, and Weeks I. 1985. Chemiluminescence as an analytical tool in cell biology and medicine. *Methods Biochem Anal.* **31:** 317-416.
27. Campos Hernández D. 2012. Aplicación de la espectrometría de masas en tandem en el tamiz neonatal de los errores innatos del metabolismo. *Acta bioquímica clínica latinoamericana.* **46:** 195-204.
28. Casas I, Eiros JM, Ortiz de Lejarazu R, Pérez P, Pozo F, Ruiz G, *et al.* 2008. Procedimiento 29. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por virus respiratorios. En: Eiros JM, editor. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/docume>

- ntoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia2
9.pdf. Fecha de consulta: 01/06/2009.
29. Cigudosa JC. 2004. La revolución de los microarrays en la investigación biosanitaria: tipos de plataformas, usos y perspectivas en oncología. *An Sist Sanit Navar.* **27**: 11-20.
 30. Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, and Gordon DB. 1996. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* **14**: 1584-1586.
 31. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Second Information Supplement. M100-S22. Vol32. No3.
 32. Coban AY. 2012. Rapid determination of methicillin resistance among *Staphylococcus aureus* clinical isolates by colorimetric methods. *J Clin Microbiol.* **50**: 2191-2193.
 33. Coban AY, Bozdogan B, Cihan CC, Cetinkaya E, Bilgin K, Darka O, *et al.* 2006. Two new colorimetric methods for early detection of vancomycin and oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* **44**: 580-582.
 34. Cohen CY and Sahar E. 1989. Rapid flow cytometric bacterial detection and determination of susceptibility to amikacin in body fluids and exudates. *J Clin Microbiol.* **27**: 1250-1256.
 35. Cohen Stuart J, Dierikx C, Al Naiemi N, Karczarek A, Van Hoek AH, Vos P, *et al.* 2010. Rapid detection of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae using ligation-mediated amplification with microarray analysis. *J Antimicrob Chemother.* **65**: 1377-1381.
 36. Colodner R, Eliasberg T, Chazan B, and Raz R. 2006. Clinical significance of bacteriuria with low colony counts of Enterococcus species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **25**: 238-241.
 37. Conway GC, Smole SC, Sarracino DA, Arbeit RD, and Leopold PE. 2001. Phyloproteomics: species identification of Enterobacteriaceae using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **3**: 103-112.
 38. Croxatto A, Prod'hom G, and Greub G. 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* **36**: 380-407.
 39. Chen JR, Lee SY, Yang BH, and Lu JJ. 2008. Rapid identification and susceptibility testing using the VITEK 2 system using culture fluids from positive Bact/ALERT blood cultures. *J Microbiol Immunol Infect.* **41**: 259-264.
 40. Choi J, Jung YG, Kim J, Kim S, Jung Y, Na H, *et al.* 2013. Rapid antibiotic susceptibility testing by tracking single cell growth in a microfluidic agarose channel system. *Lab Chip.* **13**: 280-287.
 41. Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K, and 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**: 1584-1591.
 42. de Kraker ME, Jarlier V, Monen JC, Heuer OE, van de Sande N, and Grundmann H. 2013. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clin Microbiol Infect.* **19**: 860-868.

43. Della-Latta P, Salimnia H, Painter T, Wu F, Procop GW, Wilson DA, *et al.* 2011. Identification of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa* in blood cultures: a multicenter performance evaluation of a three-color peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization assay. *J Clin Microbiol.* **49**: 2259-2261.
44. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, *et al.* 2008. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med.* **34**: 17-60.
45. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, *et al.* 2013. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med.* **39**: 165-228.
46. Demirev PA, Hagan NS, Antoine MD, Lin JS, and Feldman AB. 2013. Establishing drug resistance in microorganisms by mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* **24**: 1194-1201.
47. Demirev PA, Ho YP, Ryzhov V, and Fenselau C. 1999. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. *Anal Chem.* **71**: 2732-2738.
48. Dirks-Go SI and Zanen HC. 1978. Latex agglutination, counterimmunoelectrophoresis, and protein A co-agglutination in diagnosis of bacterial meningitis. *J Clin Pathol.* **31**: 1167-1171.
49. Dixit P, Singh U, Sharma P, and Jain A. 2012. Evaluation of nitrate reduction assay, resazurin microtiter assay and microscopic observation drug susceptibility assay for first line antitubercular drug susceptibility testing of clinical isolates of *M. tuberculosis*. *J Microbiol Methods.* **88**: 122-126.
50. Drekonja DM and Johnson JR. 2008. Urinary tract infections. *Prim Care.* **35**: 345-367, vii.
51. Du Z, Yang R, Guo Z, Song Y, and Wang J. 2002. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem.* **74**: 5487-5491.
52. Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, and Gordon DB. 2000. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol.* **49**: 295-300.
53. Eigner U, Schmid A, Wild U, Bertsch D, and Fahr AM. 2005. Analysis of the comparative workflow and performance characteristics of the VITEK 2 and Phoenix systems. *J Clin Microbiol.* **43**: 3829-3834.
54. El Khechine A, Couderc C, Flaudrops C, Raoult D, and Drancourt M. 2011. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice. *PLoS One.* **6**: e24720.
55. Elhanan G, Sarhat M, and Raz R. 1997. Empiric antibiotic treatment and the misuse of culture results and antibiotic sensitivities in patients with community-acquired bacteraemia due to urinary tract infection. *J Infect.* **35**: 283-288.
56. Elixhauser A, Friedman B, and Stranges E. 2006. Septicemia in U.S. Hospitals, 2009: Statistical Brief #122.
57. Endtz HP, Van Den Braak N, Van Belkum A, Goessens WH, Kreft D, Stroebel AB, *et al.* 1998. Comparison of eight methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *J Clin Microbiol.* **36**: 592-594.

58. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2014. Clinical breakpoints. Disponible en: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints. Fecha de consulta: 02/01/2014.
59. Fahey JL, Taylor JM, Detels R, Hofmann B, Melmed R, Nishanian P, *et al.* 1990. The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med.* **322**: 166-172.
60. Fenselau C and Demirev PA. 2001. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* **20**: 157-171.
61. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-Avila M, Cembrero-Fucinos D, Herrero-Hernandez A, Gonzalez-Buitrago JM, *et al.* 2010. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* **48**: 2110-2115.
62. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Munoz-Bellido JL, and Gonzalez-Buitrago JM. 2011. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Infect.* **17**: 1007-1012.
63. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Porrás-Guerra I, Garcia-Garcia MI, Garcia-Sanchez JE, Gonzalez-Buitrago JM, *et al.* 2011. Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* **17**: 546-551.
64. Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, 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**: 1542-1548.
65. Flores BM, Garcia CA, Stamm WE, and Torian BE. 1990. Differentiation of *Naegleria fowleri* from *Acanthamoeba* species by using monoclonal antibodies and flow cytometry. *J Clin Microbiol.* **28**: 1999-2005.
66. Fontana C, Favaro M, Minelli S, Bossa MC, Altieri A, and Favalli C. 2009. A novel culturing system for fluid samples. *Med Sci Monit.* **15**: BR55-60.
67. Food and Drug Administration (FDA). 1991. Guidance on Review Criteria for Assessment of Antimicrobial Susceptibility Devices. Disponible en: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/000109gd.pdf>. Fecha de consulta: 18/01/2012.
68. Fournier PE, Drancourt M, Colson P, Rolain JM, La Scola B, and Raoult D. 2013. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nat Rev Microbiol.* **11**: 574-585.
69. Funke G and Funke-Kissling P. 2004. Use of the BD PHOENIX Automated Microbiology System for direct identification and susceptibility testing of gram-negative rods from positive blood cultures in a three-phase trial. *J Clin Microbiol.* **42**: 1466-1470.
70. Gaieski DF, Mikkelsen ME, Band RA, Pines JM, Massone R, Furia FF, *et al.* 2010. Impact of time to antibiotics on survival in patients with severe sepsis or septic shock in whom early goal-directed therapy was initiated in the emergency department. *Crit Care Med.* **38**: 1045-1053.

71. Gauthier C, St-Pierre Y, and Villemur R. 2002. Rapid antimicrobial susceptibility testing of urinary tract isolates and samples by flow cytometry. *J Med Microbiol.* **51**: 192-200.
72. Gherardi G, Angeletti S, Panitti M, Pompilio A, Di Bonaventura G, Crea F, *et al.* 2012. Comparative evaluation of the Vitek-2 Compact and Phoenix systems for rapid identification and antibiotic susceptibility testing directly from blood cultures of Gram-negative and Gram-positive isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **72**: 20-31.
73. Giebel R, Worden C, Rust SM, Kleinheinz GT, Robbins M, and Sandrin TR. 2010. Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Adv Appl Microbiol.* **71**: 149-184.
74. Gonzalez-Castillo J, Candel FJ, and Julian-Jimenez A. 2013. [Antibiotics and timing in infectious disease in the emergency department]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **31**: 173-180.
75. Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Tilse MH, Urbanski T, *et al.* 2012. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol.* **50**: 2918-2931.
76. Grobner S, Dion M, Plante M, and Kempf VA. 2009. Evaluation of the BD GeneOhm StaphSR assay for detection of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from spiked positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* **47**: 1689-1694.
77. Hall L, Le Febvre KM, Deml SM, Wohlfel SL, and Wengenack NL. 2012. Evaluation of the Yeast Traffic Light PNA FISH probes for identification of *Candida* species from positive blood cultures. *J Clin Microbiol.* **50**: 1446-1448.
78. Hansen WL, van der Donk CF, Bruggeman CA, Stobberingh EE, and Wolffs PF. 2013. A real-time PCR-based semi-quantitative breakpoint to aid in molecular identification of urinary tract infections. *PLoS One.* **8**: e61439.
79. Hensley DM, Tapia R, and Encina Y. 2009. An evaluation of the advandx *Staphylococcus aureus*/CNS PNA FISH assay. *Clin Lab Sci.* **22**: 30-33.
80. Hettick JM, Green BJ, Buskirk AD, Kashon ML, Slaven JE, Janotka E, *et al.* 2008. Discrimination of *Aspergillus* isolates at the species and strain level by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Anal Biochem.* **380**: 276-281.
81. Hettick JM, Kashon ML, Slaven JE, Ma Y, Simpson JP, Siegel PD, *et al.* 2006. Discrimination of intact mycobacteria at the strain level: a combined MALDI-TOF MS and biostatistical analysis. *Proteomics.* **6**: 6416-6425.
82. Hrabak J, Walkova R, Studentova V, Chudackova E, and Bergerova T. 2011. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* **49**: 3222-3227.
83. Huang H, Yang ZL, Wu XM, Wang Y, Liu YJ, Luo H, *et al.* 2012. Complete genome sequence of *Acinetobacter baumannii* MDR-TJ and insights into its mechanism of antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother.* **67**: 2825-2832.
84. Hummers-Pradier E, Ohse AM, Koch M, Heizmann WR, and Kochen MM. 2004. Urinary tract infection in men. *Int J Clin Pharmacol Ther.* **42**: 360-366.
85. Ilki A, Bekdemir P, Ulger N, and Soyletir G. 2010. Rapid reporting of urine culture results: impact of the uro-quick screening system. *New Microbiol.* **33**: 147-153.

86. Ivancic V, Mastali M, Percy N, Gornbein J, Babbitt JT, Li Y, *et al.* 2008. Rapid antimicrobial susceptibility determination of uropathogens in clinical urine specimens by use of ATP bioluminescence. *J Clin Microbiol.* **46**: 1213-1219.
87. Jamal WY, Shahin M, and Rotimi VO. 2013. Comparison of two matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry methods and API 20AN for identification of clinically relevant anaerobic bacteria. *J Med Microbiol.* **62**: 540-544.
88. Jeng K, Gaydos CA, Blyn LB, Yang S, Won H, Matthews H, *et al.* 2012. Comparative analysis of two broad-range PCR assays for pathogen detection in positive-blood-culture bottles: PCR-high-resolution melting analysis versus PCR-mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* **50**: 3287-3292.
89. Jouin H, Goguet de la Salmoniere YO, Behr C, Huyin Qan Dat M, Michel JC, Sarthou JL, *et al.* 1995. Flow cytometry detection of surface antigens on fresh, unfixed red blood cells infected by Plasmodium falciparum. *J Immunol Methods.* **179**: 1-12.
90. Juiz PM, Almela M, Melcion 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**: 1353-1358.
91. Kadkhoda K, Manickam K, Degagne P, Sokolowski P, Pang P, Kontzie N, *et al.* 2011. UF-1000i flow cytometry is an effective screening method for urine specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **69**: 130-136.
92. Kaleta EJ, Clark AE, Johnson DR, Gamage DC, Wysocki VH, Cherkaoui A, *et al.* 2011. Use of PCR coupled with electrospray ionization mass spectrometry for rapid identification of bacterial and yeast bloodstream pathogens from blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* **49**: 345-353.
93. Kass EH. 1956. Asymptomatic infections of the urinary tract. *Trans Assoc Am Physicians.* **69**: 56-64.
94. Kaye KS and Kaye D. 2005. Capítulo 30. Polimixinas (polimixina B y colistina). En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editores. Mandell, Douglas, and Bennett's. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. 6ª ed. Nueva York: Elsevier. p 435-436.
95. Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel JM, Drissi M, *et al.* 2012. Rapid detection of carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One.* **7**: e31676.
96. Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, Wells G, Lunt M, McKenna T, *et al.* 2004. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect Genet Evol.* **4**: 221-242.
97. Khan MM, Pyle BH, and Camper AK. 2010. Specific and rapid enumeration of viable but nonculturable and viable-culturable gram-negative bacteria by using flow cytometry. *Appl Environ Microbiol.* **76**: 5088-5096.
98. Kirk SM, Schell RF, Moore AV, Callister SM, and Mazurek GH. 1998. Flow cytometric testing of susceptibilities of Mycobacterium tuberculosis isolates to ethambutol, isoniazid, and rifampin in 24 hours. *J Clin Microbiol.* **36**: 1568-1573.
99. Kohling HL, Bittner A, Muller KD, Buer J, Becker M, Rubben H, *et al.* 2012. Direct identification of bacteria in urine samples by matrix-assisted laser

- desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and relevance of defensins as interfering factors. *J Med Microbiol.* **61**: 339-344.
100. Kollef MH and Fraser VJ. 2001. Antibiotic resistance in the intensive care unit. *Ann Intern Med.* **134**: 298-314.
101. Komatsu M, Tajima Y, Ito T, Yamashiro Y, and Hiramatsu K. 2008. Time-suppression test using a colorimetric probe (AlamarBlue) that measures bacterial metabolic activity. *Biomed Res.* **29**: 171-173.
102. Komatsu M, Tajima Y, Ito T, Yamashiro Y, and Hiramatsu K. 2009. Use of a sensitive chemiluminescence-based assay to evaluate the metabolic suppression activity of linezolid on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* showing reduced susceptibility to vancomycin. *J Microbiol Biotechnol.* **19**: 734-742.
103. Kretschmar M, Nichterlein T, Kuntz P, and Hof H. 1996. Rapid detection of susceptibility to fluconazole in *Candida* species by a bioluminescence assay of intracellular ATP. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **25**: 117-121.
104. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, *et al.* 2006. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* **34**: 1589-1596.
105. La Scola B and Raoult D. 2009. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One.* **4**: e8041.
106. Lafond M, Vidal N, Letourneux Y, and Brunel JM. 2010. A comparison of three rapid and accurate bioluminescent antibiotic susceptibility tests. *J Pharmacol Toxicol Methods.* **61**: 16-19.
107. Larche J, Azoulay E, Fieux F, Mesnard L, Moreau D, Thiery G, *et al.* 2003. Improved survival of critically ill cancer patients with septic shock. *Intensive Care Med.* **29**: 1688-1695.
108. Leclercq R, Canton R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, *et al.* 2013. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect.* **19**: 141-160.
109. Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoelt A, *et al.* 2008. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol.* **197**: 313-324.
110. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, *et al.* 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* **31**: 1250-1256.
111. Limb DI, Wheat PF, Spencer RC, Harris GS, Rayner AB, and Watt B. 1993. Comparison of techniques for antimicrobial susceptibility testing of mycobacteria. *J Clin Pathol.* **46**: 403-407.
112. Ling TK, Liu ZK, and Cheng AF. 2003. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid direct identification and susceptibility testing of gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J Clin Microbiol.* **41**: 4705-4707.
113. Lo-Ten-Foe JR, de Smet AM, Diederens BM, Kluytmans JA, and van Keulen PH. 2007. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, e-test, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**: 3726-3730.

114. Lupetti A, Barnini S, Castagna B, Capria AL, and Nibbering PH. 2010. Rapid identification and antimicrobial susceptibility profiling of Gram-positive cocci in blood cultures with the Vitek 2 system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **29**: 89-95.
115. Manome I, Ikedo M, Saito Y, Ishii KK, and Kaku M. 2003. Evaluation of a novel automated chemiluminescent assay system for antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* **41**: 279-284.
116. Manoni F, Fornasiero L, Ercolin M, Tinello A, Ferrian M, Hoffer P, *et al.* 2009. Cutoff values for bacteria and leukocytes for urine flow cytometer Sysmex UF-1000i in urinary tract infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **65**: 103-107.
117. Mansour JD, Robson JA, Arndt CW, and Schulte TH. 1985. Detection of *Escherichia coli* in blood using flow cytometry. *Cytometry.* **6**: 186-190.
118. March-Rossello GA, Munoz-Moreno MF, Garcia-Loygorri-Jordan de Urries MC, and Bratos-Perez MA. 2013. A differential centrifugation protocol and validation criterion for enhancing mass spectrometry (MALDI-TOF) results in microbial identification using blood culture growth bottles. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **32**: 699-704.
119. Marinach-Patrice C, Fekkar A, Atanasova R, Gomes J, Djamdjian L, Brossas JY, *et al.* 2010. Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry. *PLoS One.* **5**: e8862.
120. Martinez OV, Gratzner HG, Malinin TI, and Ingram M. 1982. The effect of some beta-lactam antibiotics on *Escherichia coli* studied by flow cytometry. *Cytometry.* **3**: 129-133.
121. Maseda E, Mensa J, Valia JC, Gomez-Herreras JI, Ramasco F, Samsó E, *et al.* 2013. Bugs, hosts and ICU environment: Countering pan-resistance in nosocomial microbiota and treating bacterial infections in the critical care setting. *Rev Esp Quimioter.* **26**: 312-331.
122. McClelland RG and Pinder AC. 1994. Detection of low levels of specific *Salmonella* species by fluorescent antibodies and flow cytometry. *J Appl Bacteriol.* **77**: 440-447.
123. Mendez-Alvarez S and Perez-Roth E. 2004. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **22**: 183-191; quiz 192.
124. Mercure S, Senechal S, Auger P, Lemay G, and Montplaisir S. 1996. *Candida albicans* serotype analysis by flow cytometry. *J Clin Microbiol.* **34**: 2106-2112.
125. Morgan MA, Marlowe E, Novak-Weekly S, Miller JM, Painter TM, Salimnia H, *et al.* 2011. A 1.5 hour procedure for identification of *Enterococcus* Species directly from blood cultures. *J Vis Exp.*
126. Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, 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.
127. Murray PR, Rosenthal KS, and Pfaller MA. 2006. Capítulo 21. Diagnóstico de laboratorio de las enfermedades bacterianas. En: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, editores. *Microbiología Médica*. 5ª ed. Madrid: Elsevier. p 213-219.
128. Naas T, Cuzon G, Bogaerts P, Glupczynski Y, and Nordmann P. 2011. Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases. *J Clin Microbiol.* **49**: 1608-1613.

129. Nagasawa Z, Manome I, and Nagayama A. 2004. A rapid antimicrobial susceptibility test based on chemiluminescence assay and its application to screening of genotypes in vancomycin-resistant enterococci. *J Infect Chemother.* **10**: 220-226.
130. Nagy E, Maier T, Urban E, Terhes G, and Kostrzewa M. 2009. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* **15**: 796-802.
131. Nilsson LE, Hoffner SE, and Ansehn S. 1988. Rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by bioluminescence assay of mycobacterial ATP. *Antimicrob Agents Chemother.* **32**: 1208-1212.
132. Nobre V, Sarasin FP, and Pugin J. 2007. Prompt antibiotic administration and goal-directed hemodynamic support in patients with severe sepsis and septic shock. *Curr Opin Crit Care.* **13**: 586-591.
133. O'Neill CE, Seth-Smith HM, Van Der Pol B, Harris SR, Thomson NR, Cutcliffe LT, *et al.* 2013. *Chlamydia trachomatis* clinical isolates identified as tetracycline resistant do not exhibit resistance in vitro: whole-genome sequencing reveals a mutation in *porB* but no evidence for tetracycline resistance genes. *Microbiology.* **159**: 748-756.
134. Orfao A and Ruiz-Arguelles A. 1996. General concepts about cell sorting techniques. *Clin Biochem.* **29**: 5-9.
135. Parks DR and Herzenberg LA. 1984. Fluorescence-activated cell sorting: theory, experimental optimization, and applications in lymphoid cell biology. *Methods Enzymol.* **108**: 197-241.
136. Parta M, Goebel M, Matloobi M, Stager C, and Musher DM. 2009. Identification of methicillin-resistant or methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in blood cultures and wound swabs by GeneXpert. *J Clin Microbiol.* **47**: 1609-1610.
137. Pence MA, McElvania TeKippe E, and Burnham CA. 2013. Diagnostic assays for identification of microorganisms and antimicrobial resistance determinants directly from positive blood culture broth. *Clin Lab Med.* **33**: 651-684.
138. Perez KK, Olsen RJ, Musick WL, Cernoch PL, Davis JR, Land GA, *et al.* 2013. Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. *Arch Pathol Lab Med.* **137**: 1247-1254.
139. Peter H, Berggrav K, Thomas P, Pfeifer Y, Witte W, Templeton K, *et al.* 2012. Direct detection and genotyping of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases from urine by use of a new DNA microarray test. *J Clin Microbiol.* **50**: 3990-3998.
140. Pierard GE, Arrese JE, De Doncker P, and Pierard-Franchimont C. 1996. Present and potential diagnostic techniques in onychomycosis. *J Am Acad Dermatol.* **34**: 273-277.
141. Pieretti B, Brunati P, Pini B, Colzani C, Congedo P, Rocchi M, *et al.* 2010. Diagnosis of bacteriuria and leukocyturia by automated flow cytometry compared with urine culture. *J Clin Microbiol.* **48**: 3990-3996.
142. Pigrau C and Andreu A. 2005. Capítulo 127: Infecciones urinarias. En: Ausina V, Moreno S, editores. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2on ed. Buenos Aires: Medica Panamericana. p 1229-1241.
143. Pina-Vaz C, Costa-de-Oliveira S, and Rodrigues AG. 2005. Safe susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by flow cytometry with the fluorescent nucleic acid stain SYTO 16. *J Med Microbiol.* **54**: 77-81.

144. Pore RS. 1994. Antibiotic susceptibility testing by flow cytometry. *J Antimicrob Chemother.* **34**: 613-627.
145. Prats G. 2005. Capítulo 9. Técnicas genéticas. En: Prats G, editor. *Microbiología Clínica*. 1ª ed. Madrid: Medica panamericana. p 187-202.
146. Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, and 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**: 1481-1483.
147. Pulido MR, Garcia-Quintanilla M, Martin-Pena R, Cisneros JM, and McConnell MJ. 2013. Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* **68**: 2710-2717.
148. Quesada MD, Gimenez M, Molinos S, Fernandez G, Sanchez MD, Ravelo R, *et al.* 2010. Performance of VITEK-2 Compact and overnight MicroScan panels for direct identification and susceptibility testing of Gram-negative bacilli from positive FAN BacT/ALERT blood culture bottles. *Clin Microbiol Infect.* **16**: 137-140.
149. Ramani R and Chaturvedi V. 2000. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test. *Antimicrob Agents Chemother.* **44**: 2752-2758.
150. Robert C and Moellering JR. 2005. Capítulo 198. Género *Enterococcus*, grupo *Streptococcus bovis* y género *Leuconostoc*. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editores. *Mandell, Douglas, and Bennett's. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica*. 6ª ed. Nueva York: Elsevier. p 2411-2421.
151. Rodicio Mdel R and Mendoza Mdel C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **22**: 238-245.
152. Romero-Gomez MP, Quiles-Melero I, Navarro C, Pano-Pardo JR, Gomez-Gil R, and Mingorance J. 2012. Evaluation of the BinaxNOW PBP2a assay for the direct detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* from positive blood culture bottles. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **72**: 282-284.
153. Ronald AR and Pattullo AL. 1991. The natural history of urinary infection in adults. *Med Clin North Am.* **75**: 299-312.
154. Roveta S, Marchese A, and Debbia EA. 2004. Evaluation of the Uro-Quick, a new rapid automated system, for the detection of well-characterized antibiotic-resistant bacteria. *J Chemother.* **16**: 107-118.
155. Roveta S, Marchese A, and Debbia EA. 2006. Antibiotic susceptibility tests directly on urine samples using Uro-Quick, a rapid automated system. *J Chemother.* **18**: 12-19.
156. Rushton HG. 1997. Urinary tract infections in children. Epidemiology, evaluation, and management. *Pediatr Clin North Am.* **44**: 1133-1169.
157. Saito T, Linuma Y, Takakura S, Fujihara N, Inoue J, Hamaguchi Y, *et al.* 2005. Feasibility of flow cytometry for the detection of bacteria from body fluid samples. *J Infect Chemother.* **11**: 220-225.
158. Santiso R, Tamayo M, Gosalvez J, Bou G, Fernandez Mdel C, and Fernandez JL. 2011. A rapid in situ procedure for determination of bacterial susceptibility or resistance to antibiotics that inhibit peptidoglycan biosynthesis. *BMC Microbiol.* **11**: 191.
159. Savic M, Lovric J, Tomic TI, Vasiljevic B, and Conn GL. 2009. Determination of the target nucleosides for members of two families of 16S rRNA methyltransferases

- that confer resistance to partially overlapping groups of aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Res.* **37**: 5420-5431.
160. Schmidt V, Jarosch A, Marz P, Sander C, Vacata V, and Kalka-Moll W. 2012. Rapid identification of bacteria in positive blood culture by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **31**: 311-317.
161. Schubert S, Weinert K, Wagner C, Gunzl B, Wieser A, Maier T, *et al.* 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. *J Mol Diagn.* **13**: 701-706.
162. Schumacher WC, Storozuk CA, Dutta PK, and Phipps AJ. 2008. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* spores by multiparameter flow cytometry. *Appl Environ Microbiol.* **74**: 5220-5223.
163. Sendid B, Ducoroy P, Francois N, Lucchi G, Spinali S, Vagner O, *et al.* 2013. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of medically-important yeasts in the clinical laboratories of Dijon and Lille hospitals. *Med Mycol.* **51**: 25-32.
164. Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, and Raoult D. 2010. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol.* **5**: 1733-1754.
165. Shitikov E, Ilina E, Chernousova L, Borovskaya A, Rukin I, Afanas'ev M, *et al.* 2012. Mass spectrometry based methods for the discrimination and typing of mycobacteria. *Infect Genet Evol.* **12**: 838-845.
166. Shrestha NK, Scalera NM, Wilson DA, and Procop GW. 2011. Rapid differentiation of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* by flow cytometry after brief antibiotic exposure. *J Clin Microbiol.* **49**: 2116-2120.
167. Snitkin ES, Zelazny AM, Thomas PJ, Stock F, Henderson DK, Palmore TN, *et al.* 2012. Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing. *Sci Transl Med.* **4**: 148ra116.
168. Sobel JD and Kaye D. 2005. Capítulo 66. Infecciones del tracto urinario. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editores. Mandell, Douglas, and Bennett's. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. 6ª ed. Nueva York: Elsevier. p 881-889.
169. Spanu T, Posteraro B, Fiori B, D'Inzeo T, Campoli S, Ruggeri A, *et al.* 2012. Direct maldi-tof mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories. *J Clin Microbiol.* **50**: 176-179.
170. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, and Kostrzewa M. 2012. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against beta-lactam antibiotics. *J Clin Microbiol.* **50**: 927-937.
171. Spencer DH, Sellenriek P, and Burnham CA. 2011. Validation and implementation of the GeneXpert MRSA/SA blood culture assay in a pediatric setting. *Am J Clin Pathol.* **136**: 690-694.
172. Stamper PD, Cai M, Howard T, Speser S, and Carroll KC. 2007. Clinical validation of the molecular BD GeneOhm StaphSR assay for direct detection of *Staphylococcus*

- aureus and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in positive blood cultures. *J Clin Microbiol.* **45**: 2191-2196.
173. Steen HB, Boye E, Skarstad K, Bloom B, Godal T, and Mustafa S. 1982. Applications of flow cytometry on bacteria: cell cycle kinetics, drug effects, and quantitation of antibody binding. *Cytometry.* **2**: 249-257.
174. Steensels D, Verhaegen J, and Lagrou K. 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts in a clinical microbiological laboratory: a review. *Acta Clin Belg.* **66**: 267-273.
175. Stevenson LG, Drake SK, and Murray PR. 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.
176. Tajima Y, Komatsu M, Ito T, and Hiramatsu K. 2007. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* strains having reduced susceptibility to vancomycin using a chemiluminescence-based drug-susceptibility test. *J Microbiol Methods.* **70**: 434-441.
177. Tamayo M, Santiso R, Gosalvez J, Bou G, and Fernandez JL. 2009. Rapid assessment of the effect of ciprofloxacin on chromosomal DNA from *Escherichia coli* using an in situ DNA fragmentation assay. *BMC Microbiol.* **9**: 69.
178. Tang Y, Zhen L, Liu J, and Wu J. 2013. Rapid antibiotic susceptibility testing in a microfluidic pH sensor. *Anal Chem.* **85**: 2787-2794.
179. Thore A, Nilsson L, Hojer H, Ansehn S, and Brote L. 1977. Effects of ampicillin on intracellular levels of adenosine triphosphate in bacterial cultures related to antibiotic susceptibility. *Acta Pathol Microbiol Scand B.* **85**: 161-166.
180. van der Zwet WC, Hessels J, Canbolat F, and Deckers MM. 2010. Evaluation of the Sysmex UF-1000i(R) urine flow cytometer in the diagnostic work-up of suspected urinary tract infection in a Dutch general hospital. *Clin Chem Lab Med.* **48**: 1765-1771.
181. van Veen SQ, Claas EC, and Kuijper EJ. 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**: 900-907.
182. van Vianen PH, van Engen A, Thaithong S, van der Keur M, Tanke HJ, van der Kaay HJ, et al. 1993. Flow cytometric screening of blood samples for malaria parasites. *Cytometry.* **14**: 276-280.
183. Vargha M, Takats Z, Konopka A, and Nakatsu CH. 2006. Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates. *J Microbiol Methods.* **66**: 399-409.
184. Wagenlehner FM, Pilatz A, Naber KG, and Weidner W. 2008. Therapeutic challenges of urosepsis. *Eur J Clin Invest.* **38 Suppl 2**: 45-49.
185. Wellinghausen N, Kochem AJ, Disque C, Muhl H, Gebert S, Winter J, et al. 2009. Diagnosis of bacteremia in whole-blood samples by use of a commercial universal 16S rRNA gene-based PCR and sequence analysis. *J Clin Microbiol.* **47**: 2759-2765.
186. Wellinghausen N, Wirths B, Essig A, and Wassill L. 2004. Evaluation of the Hyplex BloodScreen Multiplex PCR-Enzyme-linked immunosorbent assay system for direct identification of gram-positive cocci and gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J Clin Microbiol.* **42**: 3147-3152.

187. Wheat PF, Hastings JG, and Spencer RC. 1988. Rapid antibiotic susceptibility tests on Enterobacteriaceae by ATP bioluminescence. *J Med Microbiol.* **25**: 95-99.
188. Wheat PF, Spencer RC, and Hastings JG. 1989. A novel luminometer for rapid antimicrobial susceptibility tests on gram-positive cocci by ATP bioluminescence. *J Med Microbiol.* **29**: 277-282.
189. Wimmer JL, Long SW, Cernoch P, Land GA, Davis JR, Musser JM, *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.
190. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, *et al.* 2006. Capítulo 2: Introducción a la microbiología. Parte 2: Guías para la recolección, el transporte, el procesamiento, el análisis y el informe de los cultivos a partir de las muestras de localizaciones específicas. En: Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL, editores. Koneman. Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas en color. 6a ed. Buenos Aires: Medica panamericana. p 66-109.
191. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, and Edmond MB. 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis.* **39**: 309-317.
192. Wolk DM, Struelens MJ, Pancholi P, Davis T, Della-Latta P, Fuller D, *et al.* 2009. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in wound specimens and blood cultures: multicenter preclinical evaluation of the Cepheid Xpert MRSA/SA skin and soft tissue and blood culture assays. *J Clin Microbiol.* **47**: 823-826.
193. Yamashoji S. 1998. Characterization of extracellular menadion-catalyzed H₂O₂ production by NIH/3T3 cells. *Biochem Mol Biol Int.* **44**: 555-563.
194. Yamashoji S. 2002. Menadione-catalyzed luminol chemiluminescent assay for viability of *Mycobacterium bovis*. *Microbiol Immunol.* **46**: 571-573.
195. Yamashoji S, Ikeda T, and Yamashoji K. 1989. Chemiluminescent assay for determination of viable cell density of yeast, mammalian, and plant cells. *Anal Biochem.* **181**: 149-152.
196. Yamashoji S, Ikeda T, and Yamashoji K. 1991. Extracellular generation of active oxygen species catalyzed by exogenous menadione in yeast cell suspension. *Biochim Biophys Acta.* **1059**: 99-105.
197. Yamashoji S and Takeda M. 2001. Menadione-catalyzed luminol chemiluminescent assay for the viability of *Escherichia coli* ATCC 25922. *Microbiol Immunol.* **45**: 737-741.
198. Yan Y, He Y, Maier T, Quinn C, Shi G, Li H, *et al.* 2011. Improved identification of yeast species directly from positive blood culture media by combining Sepsityper specimen processing and Microflex analysis with the matrix-assisted laser desorption ionization Biotyper system. *J Clin Microbiol.* **49**: 2528-2532.
199. Zadroga R, Williams DN, Gottschall R, Hanson K, Nordberg V, Deike M, *et al.* 2013. Comparison of 2 blood culture media shows significant differences in bacterial recovery for patients on antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis.* **56**: 790-797.

ANEXOS

A differential centrifugation protocol and validation criterion for enhancing mass spectrometry (MALDI-TOF) results in microbial identification using blood culture growth bottles

G. A. March–Rosselló · M. F. Muñoz–Moreno ·
M. C. García-Loygorri–Jordán de Urriés ·
M. A. Bratos–Pérez

Received: 9 October 2012 / Accepted: 3 December 2012 / Published online: 30 December 2012
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abstract Matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) is a widely used tool in clinical microbiology for rapidly identifying microorganisms. This technique can be applied directly on positive blood cultures without the need for its culturing, thereby, reducing the time required for microbiological diagnosis. The present study proposes an innovative identification protocol applied to positive blood culture bottles using MALDI-TOF. We have processed 100 positive blood culture bottles, of which 36 of 37 Gram-negative bacteria (97.3 %) were correctly identified directly with 100 % of *Enterobacteriaceae* and other Gram-negative rods and 87.5 % of non-fermenting Gram-negative rods. We also correctly identified directly 62 of 63 of Gram-positive bacteria (98.4 %) with 100 % of *Streptococcus*, *Enterococcus*, and Gram-positive bacilli and 98 % of *Staphylococcus*. Applying the differential centrifugation protocol at the moment the automatic blood culture incubation system gives a positive reading together with the proposed validation criterion offers 98 % sensitivity (95 % confidence interval: 95.2–100 %). The MALDI-TOF system, thus, provides a rapid and reliable system for identifying microorganisms from blood culture growth bottles.

Introduction

Microbial identification based on protein analysis using mass spectrometry matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight (MALDI-TOF) has led to considerable improvements in the working routines of clinical microbiology laboratories. One major improvement is a significant saving in the time required for microbial identifications from colonies. One possible application of MALDI-TOF in day-to-day laboratory work is microbial identification based on various samples such as blood culture growth bottles, speeding up microbial identification results by 48/72 h compared to conventional biochemical identification (the incubation takes at least 24 h [1] and, for the biochemical identification, typically, a period of 24 h is needed [2]) and by 24 h compared to identification using MALDI-TOF based on colonies obtained in the subculturing of blood culture because MALDI-TOF needs a few minutes to provide a identification [3].

In clinical terms, this reduction in the time required to conduct species-level microbiological diagnosis means increased survival in patients with sepsis displaying reported bacteremia, since the correct administration of antibiotics in such patients is key to ensuring a favorable outcome [4] and each hour of delay in applying treatment being linked to a reduction in survival of almost 8 % [5].

Recent publications on MALDI-TOF based microbial identification using blood culture bottles have highlighted two key elements impacting successful identification. The first is the removal of analytical interference caused by cells, proteins, crystals, and so on which might be present in the sample. The second involves securing a sufficiently enriched extract in the microorganism, since the amount of microorganisms deposited on the sample plate, which, in turn, depends on the microbial concentration of the sample, determines the quality and success of identification [6].

G. A. March–Rosselló (✉) · M. A. Bratos–Pérez
Department of Microbiology and Parasitology, University Clinic
Hospital of Valladolid, Ramón y Cajal Avenue, Number 3,
Valladolid 47003, Spain
e-mail: gmr810@hotmail.com

M. F. Muñoz–Moreno
Biomedical Research Unit,
University Clinic Hospital of Valladolid, Valladolid, Spain

M. C. García-Loygorri–Jordán de Urriés
Department of Microbiology and Parasitology,
Medina del Campo Hospital, Medina del Campo, Spain

Several techniques for the successful removal of the cells present in blood cultures have been reported. One is based on inducing cell lysis, which may be performed by treating the sample with a detergent, sodium dodecyl sulfate [7], saponin [8] or Tween 80 [9], salts such as ammonium chloride [10, 11], and, finally, by using the commercial kit MALDI Sepsityper[®] (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) [12–14]. Another method for removing cells involves using a tube with a gel-separating serum and a clot activator [11, 15]. Finally, one further technique is to apply a differential centrifugation protocol; in other words, performing low-speed centrifugation to sediment the cells and other large particles, thus, obtaining debris-free supernatant, which is then centrifuged at high speed to induce sedimentation of the microorganisms to be identified [6, 12, 14, 16–18]. Once the microorganism is concentrated, the procedure may go ahead, either by using part of the sediment to conduct identification and, should this prove ineffectual, improving analysis by extracting proteins [10, 19], or by directly extracting proteins using the whole of the sediment [6, 7, 9, 11–13, 15–18]. Once protein analysis has been carried out, the manufacturer's software provides a list of microorganisms ranked in descending order so that this score corresponds to the level of accuracy in identification.

However, when conducting microbial identification using MALDI-TOF from blood culture bottles without prior subculturing, a number of factors may reduce the quality of the results, such that, if strict validation criterion were applied, many identifications would prove negative, when, in fact, the requirement level of the standards may be lowered, whilst maintaining identification reliability. In this sense, various validation standards have been published, ranging between 76.4 and 94.5 % of acceptable identifications [6, 10–12, 14–17]. The goal of the present work is to establish a protocol for processing blood culture bottles which provides optimal results for identifying the most frequent bacteria isolated from blood using the MALDI-TOF technique.

Materials and methods

Determining the sample size

In order to determine the size of the sample to be studied, the population is assumed to comprise positive blood cultures in a given year (1,718 in 2010; data provided by the Microbiology Service at the University Clinic Hospital of Valladolid, Spain). Accepting an alpha risk of 0.95 for an accuracy of 0.1 units in a bilateral contrast for an estimated proportion of 0.5, validating the differential centrifugation protocol applied to blood cultures requires a random sample of 92 subjects. A replacement rate of 0 % is estimated. One

hundred bottles of blood culture were processed to facilitate calculation.

Working procedure

Both the BD BACTEC[™] Plus Aerobic/F culture vials and BACTEC[™] Plus Anaerobic/F Culture Vials are incubated in the BACTEC system (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). At the same time that the system gives a positive reading and the presence of a single type of microorganism is confirmed via microscope examination through Gram staining and fresh preparation, identification is performed using MALDI-TOF. For this, the following protocol is applied: 5 ml of the homogenized content of the blood culture bottle is transferred to a centrifuge tube and centrifuged for 10 min at 700 rpm. The supernatant is transferred to another centrifuge tube and centrifuged for 15 min at 6,000 rpm. The sediment is suspended in 1 ml of high-performance liquid chromatography (HPLC)-quality distilled water and transferred to an Eppendorf tube, which is, again, centrifuged for 15 min at 6,000 rpm. With the sediment obtained, protein extraction is performed using the ethanol/formic acid method. In order to conduct this extraction, the sediment is mixed with 300 μ l of HPLC-quality distilled water and 900 μ l of absolute ethanol, and shaken in a vortex until a homogeneous suspension is obtained. The mixture is centrifuged for 2 min at 13,000 rpm and the supernatant is removed. Finally, 25 μ l of 70 % formic acid and 25 μ l of acetonitrile are added, and the mixture is shaken in a vortex and centrifuged for 1 min at 13,000 rpm. Using the supernatant obtained, four 1- μ l spots were placed on four different areas of the metal sample plate (MSP 96 target polished steel plate, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). This was allowed to dry and 1 μ l of the matrix solution was added (saturated solution of cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50 % acetonitrile with 2.5 % trifluoroacetic acid) to each of the spots to be analyzed. These were allowed to dry, and a reading was taken of the four spots of each sample. All chemicals were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

The bottles of aerobic blood cultures are subcultured on plates of Columbia agar supplemented with 5 % sheep blood (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), MacConkey's medium (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), and PolyVitek chocolate agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). The anaerobic blood culture bottles were subcultured on PolyVitek agar chocolate plates (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and Schaedler medium (Difco, Sparks, MD, USA). All plates except for Schaedler medium (Difco, Sparks, MD, USA) are incubated for 24 h at 37 °C in an aerobic environment with 5 % CO₂. Schaedler medium (Difco, Sparks, MD, USA) is incubated at 37 °C in anaerobiosis. With the colonies obtained, identification is carried out using the MALDI-TOF technique.

Protein analysis is performed with a MALDI Microflex LT (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) mass spectrometer using FlexControl v.3.0 software (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Spectra were recorded in the linear positive mode (N_2 laser frequency and wavelength: 60 Hz and 337 nm; ion source voltage 1: 20 kV; ion source voltage 2: 16.7 kV; mass range of the detector: 2,000–20,137 Da). Before the specimens were processed, the positive control Bruker bacterial test standard (BTS) was measured for the calibration of the instrument. In order to perform microbial identification, the peptide mass fingerprinting obtained, which is unique to each microorganism, is compared to the fingerprinting of the known microorganisms present in the database such that, via the MALDI Biotyper 3.0 program (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), the problem fingerprinting may be linked to the most similar fingerprinting, thus, enabling the microorganism to be identified [20, 21].

Once protein analysis has been obtained, the software provides a list of ten microorganisms ranked from the highest to the lowest score. This score corresponds to a level of identification such that scores between 0.000 and 1.699 indicate unreliable identification, scores between 1.700 and 1.999 indicate probable identification of the genus, scores between 2.000 and 2.299 indicate definite identification of the genus and probable identification of the species, and scores between 2.300 and 3.000 indicate certain identification of the genus and high probability of the species identification. Adopting these criteria, valid identifications may be deemed as those in which a score of ≥ 2.000 is obtained in the first microorganism in the list. The software also offers a consistency index, which provides information concerning the quality of the identification that does not affect the validity of the results.

The results proposed by the manufacturer's software are interpreted in accordance with the previously published validation criteria. In cases where the standards of the various authors are based on a single reading, the first of the four performed is always chosen and the remaining three are discarded. Moreover, different combinations of the scores obtained are applied and a validation criterion is defined, taking a direct identification to be correct when the result coincides at the species level with that performed with MALDI-TOF based on the colony growth on plates; this identification has been considered to be the gold standard in this work.

All the statistical calculations were performed using the SPSS v.15.0 program. A non-parametric binomial test was carried out in order to compare results.

Results

The isolates obtained in the sample are representative of those obtained at the University Clinic Hospital of Valladolid,

Spain, in 2010 due to the high degree of agreement existing between both (Table 1).

Of the various combinations studied, the standard providing the best results was the one establishing that a microorganism is correctly identified using MALDI-TOF when, after having taken four readings of the same sample, at least two offer the same identification proposal at the species level in the first microorganism in the list, both with a score ≥ 1.400 .

The results of the identifications obtained using MALDI-TOF from the sample of 100 blood culture bottles are shown in Table 2. A total of 27 isolates belonging to the *Enterobacteriaceae* family were obtained, which, applying the standard proposed in the present work, were correctly identified using MALDI-TOF from the blood culture bottles. Twelve strains of *Escherichia coli*, four *Klebsiella oxytoca*, three *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, and *Enterobacter asburiae*, and one *Salmonella* sp. and *Serratia liquefaciens* were identified. Of eight blood culture bottles with isolates of non-fermenting Gram-negative rods (three with isolates of *Acinetobacter baumannii* and five with *Pseudomonas aeruginosa*), there was only one discordant identification of an isolate of *Acinetobacter baumannii*. The group of other Gram-negative bacilli included two isolates of two anaerobic species, *Bacteroides uniformis* and *Bacteroides thetaiotaomicron*, which were correctly identified from the blood culture bottle. In summary, of 37 isolates of Gram-negative bacteria identified using cultures, 36 were correctly identified directly.

In regard to Gram-positive bacteria, of 49 strains belonging to the genus *Staphylococcus* identified from blood cultures (16 strains of *Staphylococcus epidermidis*, 15 of *Staphylococcus hominis*, 13 of *Staphylococcus aureus*, three of *Staphylococcus capitis*, and two of *Staphylococcus haemolyticus*), only one strain of *Staphylococcus epidermidis* was not directly identified in the blood culture bottle. The four isolates of *Enterococcus faecalis* and two of

Table 1 Results of the identifications obtained using MALDI-TOF in positive blood cultures in 2010 and in 100 blood cultures

	Blood cultures	
	Year 2010 (N=1,718)	Sample studied (N=100)
<i>Enterobacteriaceae</i>	25.5 %	27 %
NFGNR	9.8 %	8 %
Other GNR	1.8 %	2 %
<i>Staphylococcus</i>	52.3 %	49 %
<i>Streptococcus</i>	5.8 %	7 %
<i>Enterococcus</i>	4 %	6 %
Gram-positive bacilli	0.8 %	1 %

NFGNR non-fermenting Gram-negative rods; GNR Gram-negative rods

Table 2 Results of bacterial identifications using MALDI-TOF based on colonies and on a sample of 100 blood culture bottles

	Identification on colonies (N=100)	Identification on blood culture bottles, n/N (%)	Half-punctuation	
Gram-negative bacteria	37 %	36/37 (97.3)	2.038	
<i>Enterobacteriaceae</i>	27 %	27/27 (100)	2.108	
NFGNR	8 %	7/8 (87.5)	1.888	
Other GNR	2 %	2/2 (100)	1.611	
Gram-positive bacteria	63 %	62/63 (98.4)	1.867	
<i>Staphylococcus</i>	49 %	48/49 (98)	1.882	
<i>Streptococcus</i>	7 %	7/7 (100)	1.749	
<i>Enterococcus</i>	6 %	6/6 (100)	1.884	
NFGNR non-fermenting Gram-negative rods; GNR	GPB	1 %	1/1 (100)	1.921
Gram-negative rods; GPB	Total	100 %	98/100 (98)	1.930
Gram-positive bacilli				

Enterococcus faecium were correctly identified from the blood culture bottles. The six isolates of *Streptococcus pneumoniae* and one of *Streptococcus parasanguinis* were also correctly identified in the blood culture bottles. The single isolate of a Gram-positive bacillus, *Corynebacterium argentoratense*, was also correctly identified. In brief, of 63 isolates belonging to Gram-positive bacteria identified, 62 were identified correctly from the blood culture bottles. Therefore, from the 100 blood culture bottles that comprised the study group, 98 were correctly identified directly.

When we applied the Moussaoui et al. [15] and Schubert et al. [12] criteria to our results, we obtained 89 % valid identifications from blood culture bottles in both cases; with the Stevenson et al. [11] criteria, the result was 91 % valid identifications and it was 92 % with the La Scola and Raoult [16] criterion. The validation criterion of the results proposed in our work reflects a sensitivity of 98 % (95 % confidence interval of: 95.2–100 %) with 100 % concordance with the results obtained from colonies and we have obtained statistically significant differences when comparing the various validation standards with the standard proposed in the present work ($p < 0.05$).

Applying the differential centrifugation protocol to the blood culture bottles at the moment the BACTEC system gives a positive reading together with the validation criterion proposed in this work, we can achieve the identification using MALDI-TOF of the Gram-positive and Gram-negative bacteria that most frequently cause bacteremia.

Discussion

We decided to precipitate and extract the proteins prior to analysis, since this technique requires only a short period (15 min) to do it and it is relatively straightforward. The main reason, however, is that performing extraction ensures a greater percentage of valid identifications, since applying

this procedure enables a higher number of identifications both from colonies [22] and from blood culture bottles [19].

Two kinds of validation criteria for results are described in the literature. One takes into account the score and consistency index obtained in each reading, with the other only taking account of the score for the first microorganism in the list. Two proposals are included in the first kind; Moussaoui et al. [15], who establish that an identification is valid if a score of ≥ 1.400 is obtained in the first microorganism and the species is the same in the first four identification proposals in the list, and Schubert et al. [12], who advocate that an identification is valid if a score of ≥ 1.500 is obtained in the first microorganism and the species is the same in the first three identification proposals in the list. There are two criteria which only take into account the score obtained in the first identification in the list given by the software. The first is the standard proposed by Stevenson et al. [11] and, subsequently, by Prod'hom et al. [10], Juiz et al. [14], and Ferreira et al. [17], establishing that a score of ≥ 2.000 in an identification indicates a species-level identification, a score between 1.700 and 1.900 indicates a genus-level identification, and a score of < 1.700 indicates non-identification. Finally, the standard proposed by La Scola and Raoult [16] establishes that a microorganism is identified correctly using MALDI-TOF when, after having performed four identifications of a single sample, the bacterial species with the highest score (the first in the list) coincides in all of them and a score of ≥ 1.900 is obtained in at least two identifications, or when a score of ≥ 1.200 is obtained in all four identifications.

The criterion put forward in this work takes the value proposed by Moussaoui et al. [15] as a threshold and, like that of La Scola and Raoult [16], uses several readings of the same sample. However, on many occasions, in one or more of the four readings taken from a single sample, no peaks were obtained, or if the score was < 1.400 , identification proposals were obtained which were discordant with the

microorganisms most frequently isolated from blood. It was, thus, seen that, by choosing the identifications repeated in two of the four readings taken with a score of ≥ 1.400 , the other two readings could be ignored, thereby, obtaining 100 % concordance vis-à-vis identifications carried out from subculture colonies. Comparing the results of the identifications obtained in our samples when applying this method with those which would be obtained if the various previously published standards were applied to the same samples, the method proposed in our work can be seen to provide a greater number of acceptable identifications.

The differential centrifugation protocol used in this work, together with the proposed validation standard, has meant an improvement on the results published previously with other treatments of blood culture bottles. Thus, applying this protocol when processing blood cultures yields a 98 % valid identification rate, whereas Ferreira et al. [17] obtained 71.2 %, Stevenson et al. [11] 76.4 %, Prod'hom et al. [10] 77.9 %, La Scola and Raoult [16] 79.7 %, Schubert et al. [12] 86.8 %, Moussaoui et al. [15] 87.5 %, Juiz et al. [14] 77.7 % and 94.1 % using two different procedures, and, finally, Christner et al. [6] obtained 94.5 %. We obtained statistically significant differences when we compared our results to the procedures of Ferreira et al. [17] ($p < 0.05$), Stevenson et al. [11] ($p < 0.05$), Prod'hom et al. [10] ($p < 0.05$), La Scola and Raoult [16] ($p < 0.05$), Schubert et al. [12] ($p < 0.05$), Moussaoui et al. [15] ($p < 0.05$), and Juiz et al. [14] ($p < 0.05$, when using the procedure with the 77.7 % value). By contrast, no statistically significant differences were observed compared to Juiz et al. [14] ($p > 0.05$, when using the procedure with the 94.1 % value) and Christner et al. [6] ($p > 0.05$). The higher percentage of valid identifications is because of the greater number of Gram-positive bacteria identifications. Apart from the validation standard adopted, this may be because bacteria were taken from 5 ml of the sample, whereas in other published works [6, 10–12, 14–17], a smaller volume of the sample was used, meaning a smaller amount of bacteria was collected and, therefore, a lower score obtained. It is interesting to note that, in our case, identification from blood culture bottles was performed at the moment the BACTEC system gave a positive reading, whereas other authors such as Stevenson et al. [11] kept positive bottles at ambient temperature for 3 to 10 h, so as to increase the number of bacteria and, thus, be able to achieve better results. Even so, the results reported in the present work reflect an improvement in the percentage of correct identifications (98 % compared to 76.4 %).

In an effort to obtain a larger direct number of valid identifications, using the samples which gave low-score identifications or which failed to provide peaks, in order to accumulate a larger amount of protein, 3 μ l of the sample were deposited on the identification plate as follows: first, we made a spot of 1 μ l of sample which was allowed to dry,

then we spotted another 1 μ l of sample over the previous spot which was allowed to dry, and, finally, a further 1 μ l in the same manner, and then 1 μ l of matrix. Unfortunately, this did not lead to any improvement, as the same results as with 1 μ l of sample were obtained.

Of the 100 identifications performed from blood culture bottles, only two did not agree with that obtained from the subculture colonies. The first was an isolate of *Acinetobacter baumannii* identified from the colony but recognized as *Acinetobacter genomospecies 3* from the blood culture bottle. This lack of concurrence may have been due to the presence of *Staphylococcus aureus* in the blood culture, which was not observed during the microscope examination, or to limitations in the equipment, since, when proposing identification belonging to the genus *Acinetobacter*, the software warns “the profiles of said genus are very similar and, therefore, that species level differentiation is extremely difficult”. This strain of *Acinetobacter baumannii* was also identified as such when applying conventional biochemical techniques such as API (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France) and MicroScan (Siemens, Tarrytown, NY, USA) commercial systems. The other discordant result was a strain of *Staphylococcus epidermidis* which was not identified from the blood culture bottles, probably due to a technical error during sample processing.

Finally, data on the mean scores of direct identifications (Table 2) confirm what has been reported by other authors that the MALDI-TOF system can identify Gram-negative bacteria better than Gram-positive bacteria [12].

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Prats G (2005) Técnicas y medios de cultivo. In: Medica panamericana (ed) Microbiología clínica, 1st edn. Madrid, Spain, pp 25
2. Prats G (2005) Medios y pruebas de identificación. In: Medica panamericana (ed) Microbiología clínica, 1st edn. Madrid, Spain, pp 47
3. Pasternak J (2012) New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. *Einstein (Sao Paulo)* 10(1):118–119
4. Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, Dodek P, Wood G, Kumar A, Simon D, Peters C, Ahsan M, Chateau D; Cooperative Antimicrobial Therapy of Septic Shock Database Research Group (2009) Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest* 136(5):1237–1248. doi:10.1378/chest.09-0087
5. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M (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):1589–1596. doi:10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9

6. Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K, 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):1584–1591. doi:10.1128/JCM.01831-09
7. Marinach-Patrice C, Fekkar A, Atanasova R, Gomes J, Djamdjian L, Brossas JY, Meyer I, Buffet P, Snounou G, Detry A, Hennequin C, Golmard JL, Mazier D (2010) Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry. *PLoS One* 5(1):e8862. doi:10.1371/journal.pone.0008862
8. Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, Dauphin B, Bille E, Meyer J, Bougnoux ME, Alanio A, Berche P, Nassif X (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. doi:10.1128/JCM.02485-09
9. Spanu T, Posteraro B, Fiori B, D’Inzeo T, Campoli S, Ruggeri A, Tumbarello M, Canu G, Treccarichi EM, Parisi G, Tronci M, Sanguinetti M, Fadda G (2012) Direct MALDI-TOF mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 50(1):176–179. doi:10.1128/JCM.05742-11
10. Prod’homme G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, 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):1481–1483. doi:10.1128/JCM.01780-09
11. Stevenson LG, Drake SK, Murray PR (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. doi:10.1128/JCM.01541-09
12. Schubert S, Weinert K, Wagner C, Gunzl B, Wieser A, Maier T, 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. *J Mol Diagn* 13(6):701–706. doi:10.1016/j.jmoldx.2011.07.004
13. Yan Y, He Y, Maier T, Quinn C, Shi G, Li H, Stratton CW, Kostrzewa M, Tang YW (2011) Improved identification of yeast species directly from positive blood culture media by combining Sepsityper specimen processing and Microflex analysis with the matrix-assisted laser desorption ionization Biotyper system. *J Clin Microbiol* 49(7):2528–2532. doi:10.1128/JCM.00339-11
14. Juiz PM, Almela M, Melción C, Campo I, Esteban C, Pitart C, Marco F, Vila J (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(7):1353–1358. doi:10.1007/s10096-011-1449-x
15. Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, Ludes B, Kostrzewa M, Riegel P, Prévost G (2010) Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect* 16(11):1631–1638. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03356.x
16. La Scola B, Raoult D (2009) Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 4(11):e8041. doi:10.1371/journal.pone.0008041
17. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Porras-Guerra I, García-García MI, García-Sánchez JE, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL (2011) Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 17(4):546–551. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03257.x
18. Schmidt V, Jarosch A, März P, Sander C, Vacata V, Kalka-Moll W (2012) Rapid identification of bacteria in positive blood culture by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31(3):311–317. doi:10.1007/s10096-011-1312-0
19. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Muñoz-Bellido JL, González-Buitrago JM (2011) Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Infect* 17(7):1007–1012. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03339.x
20. Demirev PA, Ho YP, Ryzhov V, Fenselau C (1999) Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. *Anal Chem* 71(14):2732–2738
21. Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, Wells G, Lunt M, McKenna T, McDowall M, Shah HN (2004) Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect Genet Evol* 4(3):221–242. doi:10.1016/j.meegid.2004.02.004
22. Steensels D, Verhaegen J, Lagrou K (2011) Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts in a clinical microbiological laboratory: a review. *Acta Clin Belg* 66(4):267–273

Procedure for microbial identification based on Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry from screening-positive urine samples

GABRIEL A. MARCH ROSSELLÓ,¹ MARÍA P. GUTIÉRREZ RODRÍGUEZ,² RAÚL ORTIZ DE LEJARAZU LEONARDO,^{1,2} ANTONIO ORDUÑA DOMINGO^{1,2} and MIGUEL A. BRATOS PÉREZ^{1,2}

¹Service of Microbiology, University Clinic Hospital of Valladolid, Valladolid; and ²Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Valladolid, Valladolid, Spain

March Rosselló GA, Gutiérrez Rodríguez MP, de Lejarazu Leonardo RO, Orduña Domingo A, Bratos Pérez MA. Procedure for microbial identification based on Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry from screening-positive urine samples. APMIS 2013.

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry is a widely used proteomic technique in clinical microbiology laboratories, and enables microbial identification directly from clinical samples. This study seeks to establish a protocol for bacterial identification from monomicrobial urine samples that have tested positive in the screening with Sysmex UF-1000i (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). Sysmex UF-1000i counts $\geq 1 \times 10^7$ bacteria/mL indicate a sufficient bacterial concentration to allow direct identification from urine, with 87.5% sensitivity. Microbial identification from urine with Sysmex UF-1000i counts between 1×10^5 and 1×10^7 bacteria/ml requires preincubation to obtain the adequate amount of bacteria needed for analysis, and 91.7% sensitivity thus being achieved.

Key words: MALDI-TOF; direct identification; urine.

Gabriel A. March Rosselló, Área de Microbiología, Facultad de Medicina, Ramón y Cajal 7, 47005 Valladolid, Spain.
e-mail: gmr810@hotmail.com

Urine samples for urine cultures are those most commonly processed in clinical microbiology laboratories. Given that around 60–80% of samples are negative, to reduce the time for analysis and technical staff workload, the use of automatic analyzers for screening urine samples is recommended (1). Some of these devices, such as the Sysmex UF-1000i (Sysmex Corporation, Kobe, Japan), are based on flow cytometry and allow quantitation of different particles such as bacteria, yeasts, red blood cells, and leukocytes. In this way, many samples may be reported as negatives shortly after being received, without the need for any other subsequent processing, and just positive urine samples have to be cultured on appropriate media for microbial diagnosis (2).

In recent years, for microbial identification, the technique Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) based on protein analysis has been implemented because it provides a fast microbial identification. One possible application of MALDI-TOF is to perform microbial identification directly from urine samples. For this purpose, at least a minimum amount of the microorganism or protein needs to be deposited on the metal target plate to enable the device to perform the required analysis. This amount deposited on the target correlates with the sample's bacterial concentration. In such way, MALDI-TOF provides a high rate of direct identification of samples with counts $\geq 1 \times 10^5$ CFU/mL on the culture plate. By contrast, counts $< 1 \times 10^5$ CFU/mL yield low identification rates (3, 4).

In 20–30% of septic patients, the infection focus is localized in the urogenital tract (5). In these

patients, an adequate initial antibiotic therapy is essential to ensure a favorable outcome. Moreover, in septic patients as a consequence of nosocomial UTI, this empirical therapy depends on the bacteria present in the urine and the specific resistance patterns in the hospital (6). In addition, inappropriate antimicrobial therapy in severe UTI is linked to a higher mortality rate (7). Given that counts $<1 \times 10^5$ CFU/mL might indicate a urine infection in both men and women, as well as in children, adults, and the elderly (8–11), microbial identification from direct urine sample regardless of their microbial concentration is a matter of real interest because it implies an evident advantage for the clinicians and for the outcome of patients as the correct antibiotic can be administered sooner.

To accomplish identification directly from urine sample, microbial counts provided by the Sysmex UF-1000i (Sysmex Corporation) might be used to distinguish whether positive urine samples evidence sufficient bacterial load to warrant direct identification by MALDI-TOF or whether samples displaying a low microbial load should be incubated in enrichment broth to increase the number of microorganisms until a high enough concentration is obtained for MALDI-TOF analysis. This study seeks to establish a protocol to allow microbial identification using MALDI-TOF from positive urine samples in the screening.

MATERIAL AND METHODS

Determining the size of the urine study group

To determine the size of the sample to be studied, the population was assumed to comprise positive urine samples in a given year (3324 in 2011 at the Microbiology Service of the Valladolid University Clinical Hospital, Spain) and assuming a 0.95 alpha risk for an accuracy of ± 0.1 units in a bilateral contrast for an estimated proportion of 0.5, the study group must comprise at least 95 positive monobacterial urine samples. To ensure that this number is achieved, 200 positive urine samples in the screening obtained through midstream clean catch were randomly processed because a considerable percentage are polymicrobial, or tested negative in the culture plates. Samples that provided bacterial counts >1000 CFU/mL of a single strain with bacterial counts of contamination up to 100 CFU/mL on the culture plates were considered as monobacterial urines (12).

Urine sample processing

The urine samples that arrived at the laboratory were processed using a Sysmex UF-1000i (Sysmex Corporation) analyser. This equipment analyzes 0.8–1.2 mL of sample in batch by combining flow cytometry with fluorimetry. It allows the quantitation of bacteria, yeasts, red blood cells, leukocytes, epithelial cells, small round cells, cylinders, spermatozooids, crystals, and mucus (13).

Samples that gave counts $\geq 1 \times 10^5$ bacteria/mL in the analyzer were inoculated, with a calibrated loop to determine the number of CFU/mL present in the urine, on 5% sheep blood Columbia agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), MacConkey medium (bioMérieux), and Sabouraud + Cloramphenicol agar (Difco, Burlington, NC, USA) in cases where fungal analysis was requested. After incubation at 37 °C for 24 h, MALDI-TOF identification was performed with the colony grown on plates.

For direct identification from urine, 5 mL of homogenized urine was centrifuged for 5 min at 850 g to sediment the cells. The supernatant obtained was centrifuged for 15 min at 6200 g. The sediment obtained was again suspended in 1 mL HPLC quality distilled water and transferred to an eppendorf tube for protein extraction as described below.

At the same time, to increase bacteria load until a sufficiently high concentration is obtained to enable direct identification through MALDI-TOF, a preincubation was performed using an enrichment medium. For this purpose, four urine aliquots of 5 mL urine were centrifuged for 5 min at 850 g and the supernatant obtained was centrifuged for 15 min at 6200 g. Each one of the sediments obtained was inoculated in a tube containing 9 mL of Brain Heart Infusion (BHI) (Difco). These four tubes were incubated in a water bath at 37 °C for 1, 2, 3, and 4 h, respectively. Once incubation was concluded, each tube was centrifuged at 6200 g for 5 min. The sediment obtained was suspended in 1 mL HPLC quality distilled water and transferred to an eppendorf tube for protein extraction as described below.

Protein extraction and analysis

Protein extraction was carried out using the ethanol/formic acid technique. The eppendorf tube was centrifuged at 15 700 g for 5 min. The sediment was mixed with 300 μ L HPLC quality distilled water and 900 μ L absolute ethanol, and shaken in a vortex until even suspension was obtained. This was centrifuged for 2 min at 15 700 g and the supernatant was removed. Finally, 25 μ L of 70% formic acid and 25 μ L of acetonitrile were added. It is then shaken in a vortex and centrifuged for 1 min at 15 700 g. The supernatant obtained was then subjected to spectrometric analysis. Four 1 μ L spots were deposited in four separate areas of the metal target plate (MSP 96 target polished steel; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Each spot was left to dry and 1 μ L of the matrix solution (saturated solution of cyano-4-hydroxy cinnamic acid in 50% acetonitrile with 2.5% trifluoroacetic acid) was added to each deposit to be analyzed. This was left to dry and the readings of the four spots in each sample were taken. All chemicals were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Protein analysis was performed with the MALDI Microflex LT mass spectrometer using FlexControl v. 3.0 software (Bruker Daltonik GmbH). The spectrum was obtained in the linear positive mode (N_2 laser frequency and wavelength: 60 Hz and 337 nm, ion source voltage I: 20 Kv, ion source voltage II: 16.7 Kv; mass range of the detector: 2,000–20,137 Da). Once the mass spectrum of the microorganism to be identified was obtained, it was compared with the spectra of known microorganisms contained at the database, such that the problem spectrum

may be linked to the spectrum of the most similar microorganism (14) and the software provided a list of 10 microorganisms as the most likely identifications as well as a numerical evaluation thereof. This score corresponds to a level of identification, such that scores between 0.000 and 1.699 indicate unreliable identification, scores between 1.700 and 1.999 indicate probable identification of the genus, scores between 2.000 and 2.299 indicate definite identification of the genus and probable identification of the species, and scores between 2.300 and 3.000 indicate certain identification of the genus and high probability of the species identification. Adopting these manufacturer's criteria, valid identifications may be deemed as those in which a score ≥ 2.000 is obtained in the first microorganism of the list.

The results obtained from direct identification provided by the manufacturer's software were interpreted in accordance with our previous criterion published, which advocated that a microorganism was considered correctly identified directly by MALDI-TOF when having performed the readings of the four spots of a single sample; at least two readings with the same identification proposal at species level in the first microorganism of the list were obtained, both with a score of ≥ 1.400 (15). In addition, the results obtained from direct identification were also interpreted in accordance with the previously published validation criterion for urine samples, described by Ferreira et al. (4), which establishes that an identification in the first microorganism of the list with a score of ≥ 2.000 indicates an identification at species level, a score of between 1.700 and 1.900 indicates an identification at genus level, and a score of < 1.700 indicates a non-identification. For this purpose, the first of the four readings performed from a same sample was always chosen and the remaining three were discarded. Finally, to validate the direct identification, MALDI-TOF identification of colonies grown on the culture according to the manufacturer's criteria was considered the gold standard.

RESULTS

Results obtained from urine samples with counts $\geq 1 \times 10^7$ bacteria/mL in Sysmex UF-1000i were the same both in the identifications performed from samples with no previous BHI incubation and in

identifications obtained with those incubated for 1, 2, 3, or 4 h. Within this group, after excluding polymicrobial urine samples, 80 monobacterial samples were obtained. Results of direct identifications obtained applying our criterion (15) are shown in Table 1. Of these 80 urine samples, 10 of them failed to give direct identification: seven strains of *Escherichia coli*, one *Klebsiella oxytoca*, one *Citrobacter koseri*, and one *Staphylococcus scheli* were not identified directly. On the other hand, in the *Enterobacteriaceae* family, 53 strains of *E. coli*, eight *Klebsiella pneumoniae*, two *Enterobacter cloacae*, two *Enterobacter aerogenes*, and one *Raoultella ornithinolytica* were correctly identified from urine samples. The only strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the group of non-fermenting gram-negative rods (NFGNR) was also correctly identified from urine. In sum, of 76 gram-negative bacteria isolates identified through culture, 67 were correctly identified directly. In the gram-positive bacteria, three of the four isolates obtained were identified directly: one *Staphylococcus aureus*, one *Staphylococcus epidermidis*, and one *Enterococcus faecalis*. Therefore, of the 80 monomicrobial urine samples that had Sysmex UF-1000i counts $\geq 1 \times 10^7$ bacteria/mL, applying our criterion, 70 were correctly identified without the urine sample having been preincubated in BHI. When the criterion of Ferreria et al. (4) was applied to these urine samples, a direct identification was achieved in 66 of them (Table 1); 41 identifications were achieved at species level and 15 at genus level. Eight strains of *E. coli*, one *K. oxytoca*, one *C.*, one *S. scheli*, one *S. aureus*, and one *S. epidermidis* were not identified directly.

Urine samples with Sysmex UF-1000i counts between 1×10^5 and 1×10^7 bacteria/mL gave poor results in identifications carried out from both non-BHI incubated samples and urine samples incubated during 1, 2, and 3 h (data not shown). Results obtained after 4-h incubation were, however, significantly better and are summarized in

Table 1. Results of direct identification obtained by MALDI-TOF from 80 monobacterial urine samples without a preincubation in BHI with Sysmex UF-1000i counts $\geq 1 \times 10^7$ bacteria/mL

Bacterial group	Mean Score	Results of direct identification according to	
		March et al. (15) n/N (%) ¹	Ferreira et al. (4) n/N (%) ¹
Gramnegative	2.052	67/76 (88.2)	66/76 (86.8)
<i>Enterobacteriaceae</i>	2.055	66/75 (88.0)	65/75 (86.6)
NFGNR ²	1.858	1/1 (100)	1/1 (100)
Grampositive	1.779	3/4 (75.0)	1/4 (25.0)
<i>Staphylococcus</i> spp.	1.747	2/3 (66.7)	0/3 (0)
<i>Enterococcus</i> spp.	1.842	1/1 (100)	1/1 (100)
Total	2.040	70/80 (87.5)	67/80 (82.5)

¹n/N (%): number of correct direct identifications obtained/number of urine processed (percentage of direct identification achieved).

²NFGNR: non-fermenting gram-negative rods.

Table 2. Within this group of urine samples, 48 were monomicrobial samples. Applying our criterion (15), it was not possible to identify one strain of each of the following microorganisms: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, and *Streptococcus mitis*. Within the *Enterobacteriaceae* family, 18 strains of *E. coli*, three *Proteus mirabilis*, two *K. pneumoniae*, and one *E. aerogenes* were correctly identified directly from urine. In the NFGNR group, two of the three *P. aeruginosa* strains obtained from culture were identified directly. In sum, of 28 gram-negative bacteria isolates identified via culture, 26 were identified directly. In the gram-positive bacteria, 17 of the 19 strains obtained from culture were identified directly: one strain of *S. epidermidis*, one *Staphylococcus haemolyticus*, two *Streptococcus agalactiae*, and 13 *E. faecalis*. The only strain of *Candida albicans* was correctly identified from the direct urine sample. Forty-four of the 48 monomicrobial urine samples with Sysmex UF-1000i counts between 1×10^7 and 1×10^5 bacteria/mL were thus correctly identified having performed urine preincubation in BHI during 4 h. When the criterion of Ferreria *et al.* (4) was applied to these urine samples, direct identification was accomplished in 43 of them (Table 2); 37 identifications were achieved at species level and six at genus level. One strain of each of the following microorganisms was not identified directly: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *S. mitis*, and *C. albicans*.

DISCUSSION

In this study, only monomicrobial samples that provided bacterial counts >1000 CFU/mL with bacterial counts of contamination up to 100 CFU/mL on the culture plates were included because with urines obtained through midstream clean catch more than 95% UTIs are caused by single bacterial

specie and counts >1000 may have clinical significance (6, 8–11). Moreover, these urines can present microorganisms of contamination in most cases with very low amount for various reasons. One of them is the drag of the normal bacterial flora present in the urethral mucosa that occurs during urination. Thus, in urines properly collected that are monobacterial in the culture, contamination bacterial counts up to 100 CFU/mL are accepted (12).

The quality of the identification obtained by MALDI-TOF is determined by the score provided by the software when the spectrum of unknown bacteria to identify is compared with spectra from known bacteria stored in the database. In this way, the manufacturer only accepts identifications with high scoring. However, when an identification directly from direct sample (urine samples and blood culture growth bottles) is performed, it is frequent to obtain lower identification scores than those obtained in the identifications from colonies grown on isolation plates. This circumstance is possibly due to analytical interferences, which could not be removed during sample preparation. Thus, various criteria have been published for validating results in which the critical scores of identification have been lowered to accept a higher rate of identification (4, 15, 16). In this way, it is possible to enhance the clinical utility of MALDI-TOF, given that many identifications that should be rejected if manufacturer's criteria were applied can be accepted without decreasing the quality of identification. For urine samples, a previous published criterion is proposed by Ferreira *et al.* (4); when this criterion was applied to our results, lower percentage of identification was obtained than those obtained applying our criterion (Tables 1 and 2), and this suggests that our criterion was more reliable.

The results obtained from urine samples with Sysmex counts $\geq 1 \times 10^7$ bacteria/mL, which were not

Table 2. Results of direct identification obtained by MALDI-TOF from 48 monobacterial urine samples after 4 hours of preincubation in BHI with Sysmex UF-1000i counts between 1×10^5 and 1×10^7 bacteria/mL

Bacterial group	Mean Score	Results of direct identification according to	
		March <i>et al.</i> (15) n/N (%) ¹	Ferreira <i>et al.</i> (4) n/N (%) ¹
Gram-negative	2.252	26/28 (92.9)	26/28 (92.9)
<i>Enterobacteriaceae</i>	2.273	24/25 (96.0)	24/25 (96.0)
NFGNR ²	2.008	2/3 (66.7)	2/3 (66.7)
Gram-positive	2.233	17/19 (89.5)	17/19 (89.5)
<i>Staphylococcus</i> spp.	2.039	2/3 (66.7)	2/3 (66.7)
<i>Streptococcus</i> spp.	2.205	2/3 (66.7)	2/3 (66.7)
<i>Enterococcus</i> spp.	2.269	13/13 (100)	13/13 (100)
<i>Candida albicans</i>	1.691	1/1 (100)	0/1 (0)
Total	2.232	44/48 (91.7)	43/48 (89.6)

¹n/N (%): number of correct direct identifications obtained/number of urine processed (percentage of direct identification achieved).

²NFGNR: non-fermenting gram-negative rods.

preincubated (Table 1), concur with those described by Schubert et al. (17) who reported a higher mean score and a higher identification rate in gram-negative bacteria than in gram-positive. However, it is interesting to note that the group of preincubated monobacterial urine samples, which had Sysmex counts between 1×10^5 and 1×10^7 bacteria/mL (Table 2), gave a higher mean score and a higher identification rate than the group of urine samples that had Sysmex counts $\geq 1 \times 10^7$ bacteria/mL. This is because BHI preincubation of the sample increases the number of microorganisms deposited on the target plate, thus increasing the rate of valid identifications. The mean score of both gram-positive and gram-negative bacteria also increases. This has been described by Christner et al. (18) who reported that the higher the number of microorganisms processed, the higher the identification score obtained.

Applying our criterion (15), there were 10 incorrect direct identifications in the group of urine samples that had Sysmex UF-1000i counts $\geq 1 \times 10^7$ bacteria/mL (Table 1). Nine identifications proved to be gram-negative bacteria and one gram-positive. Identification error of the *Staphylococcus scheli* might have been caused by a small growth of another *Staphylococcus* sp., which was observed on the culture plates. In gram-negative bacteria, seven strains of *E. coli*, one *K. oxytoca*, and one *C. koseri* were not identified directly. In four of the seven urine samples in which *E. coli* was not identified in the sample directly, limited *Staphylococcus* sp. growth was observed in three, *P. mirabilis* in another one, and other urine sample gave a count of $< 1 \times 10^5$ CFU/mL in the culture plate. Applying our criterion (15), there were four incorrect direct identifications in the group of urine samples that had Sysmex UF-1000i counts between 1×10^5 and 1×10^7 bacteria/mL (Table 2). The *S. mitis* strain incorrectly identified as *Streptococcus pneumoniae* might have been due to equipment limitations, as this warns that *Streptococcus pneumoniae/mitis/oralis* are closely related and that the result must be confirmed with a further test, such as optochin sensitivity or bile solubility. The *P. aeruginosa* strain that was not identified might have been due to the presence of a limited amount of *Staphylococcus* sp. on the culture plates. The *S. epidermidis* strain that was not identified displayed a plate count of $< 1 \times 10^5$ CFU/mL. One interesting point is that the urine samples that evidence just one microorganism isolated in pure culture gave a higher direct identification score than urine samples that evidenced some other bacteria with non-significant counts in the culture plates. Thus, in 10 urine samples in which *E. coli* was isolated together with a scant number of other microorganisms, a mean

score of 1.891 was obtained. By contrast, in identifications performed with urines in which *E. coli* was isolated in pure culture, a mean score of ≥ 2.000 was obtained. This is the value proposed by the manufacturer to validate identifications correctly. Furthermore, to process 1 μ L of urine sample for culture cannot guarantee neither processing nor exclusion of the bacteria of contamination present in the urine sample because of their low concentration. Thus, only in some plates, the colonies of contamination can be observed. However, when 5 mL of urine was processed, a considerable amount of bacteria of contamination was recollected. This amount might interfere with the direct identification performed by MALDI-TOF. In this way, it is possible that many failed identifications obtained in this study were due to bacterial contamination that has not been observed on the isolation plates and that were present in the urine sample.

Results of direct identifications indicated that Sysmex UF-1000i counts $\geq 1 \times 10^7$ bacteria/mL ensured sufficient microbial load to identify all kind of microorganisms from direct urine samples as the matching results have been obtained both from non-BHI incubated samples and incubations carried out over various times. Moreover, of all the urine samples processed with these counts, 98% gave counts $\geq 1 \times 10^5$ CFU/mL in the isolation plates.

Sysmex UF-1000i counts between 1×10^5 and 1×10^7 bacteria/mL do not guarantee a sufficient load for performing direct identification as good identification results were only obtained after 4 hours of incubation in BHI. Likewise, 36% of urine samples processed with these counts in the Sysmex gave negative results, both on the isolation plates and in direct identification, and only 30% gave counts $\geq 1 \times 10^5$ CFU/mL on the isolation plates. In this group of urine samples, through a preincubation, some direct bacterial identifications reported will have clinical significance and others not, thereby producing an overdiagnose. For confirmation of the clinical significance, it will be required to know the count of the colonies obtained on the culture plates. In any case, if the amount of bacteria present in the urine is nil or scarce, a direct identification by MALDI-TOF will not be obtained, although the sample was preincubated. Finally, the clinician must assess the clinical significance of direct bacterial identification and adopt appropriate measures for antimicrobial therapy.

The procedure described enables microbial identification directly from the urine sample regardless of the sample's microbial concentration. In this way, we overcame the problems posited by Kohling et al. (3) and Ferreira et al. (4), who reported that $< 1 \times 10^5$ CFU/mL urine samples yielded low

identification rates. In this way, patients with urine counts $<1 \times 10^5$ CFU/mL can be benefited from the direct identification from urine sample, thus receiving the proper antibiotic.

In summary, when conducting direct identification from urine, if Sysmex UF-1000i counts $\geq 1 \times 10^7$ CFU/mL are obtained, no preincubation is required. By contrast, if the urine gives a Sysmex UF-1000i counts $<1 \times 10^7$ CFU/mL count, the sample should be preincubated to increase the microbial load until a high enough concentration is obtained to enable MALDI-TOF analysis. This identification facilitates the correct choice of antibiotic in nosocomial infections (19). In these cases, empirical treatment must be administrated taking into account the isolated microbial species and specific resistance patterns at the hospital, and finally the treatment must be adapted in function of the antimicrobial susceptibility test obtained (6).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Brilha S, Proenca H, Cristino JM, Hanscheid T. Use of flow cytometry (Sysmex) UF-100 to screen for positive urine cultures: in search for the ideal cut-off. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:289–92.
2. De Rosa R, Grosso S, Bruschetta G, Avolio M, Stano P, Modolo ML, et al. Evaluation of the Sysmex UF1000i flow cytometer for ruling out bacterial urinary tract infection. *Clin Chim Acta* 2010;411:1137–42.
3. Kohling HL, Bittner A, Muller KD, Buer J, Becker M, Rubben H, et al. Direct identification of bacteria in urine samples by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and relevance of defensins as interfering factors. *J Med Microbiol* 2012;61(Pt 3):339–44.
4. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-Avila M, Cembrero-Fucinos D, Herrero-Hernandez A, Gonzalez-Buitrago JM, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010;48:2110–5.
5. Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med* 2000;26 (Suppl 1):S64–74.
6. Sobel JD, Kaye D. Urinary tract infections. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and Practice of Infectious*, 6th edn, New York: Elsevier Inc, 2007:881–89.
7. Elhanan G, Sarhat M, Raz R. Empiric antibiotic treatment and the misuse of culture results and antibiotic sensitivities in patients with community-acquired bacteraemia due to urinary tract infection. *J Infect* 1997;35:283–8.
8. Arav-Boger R, Leibovici L, Danon YL. Urinary tract infections with low and high colony counts in young women. Spontaneous remission and single-dose vs multiple-day treatment. *Arch Intern Med* 1994;154:300–4.
9. Colodner R, Eliasberg T, Chazan B, Raz R. Clinical significance of bacteriuria with low colony counts of *Enterococcus* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006;25:238–41.
10. Hummers-Pradier E, Ohse AM, Koch M, Heizmann WR, Kochen MM. Urinary tract infection in men. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004;42:360–6.
11. Rushton HG. Urinary tract infections in children. Epidemiology, evaluation, and management. *Pediatr Clin North Am* 1997;44:1133–69.
12. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, et al. Chapter 2: Introduction to Microbiology, Part 2: Guidelines for the Collection, Transport, Processing, Analysis, and Reporting of Cultures from Specific Specimen Sources. In: Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL, editors. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Buenos Aires: Medica panamericana, 2006;66–109.
13. Pieretti B, Brunati P, Pini B, Colzani C, Congedo P, Rocchi M, et al. Diagnosis of bacteriuria and leukocyturia by automated flow cytometry compared with urine culture. *J Clin Microbiol* 2010;48:3990–3996.
14. Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, Wells G, Lunt M, McKenna T, et al. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect Genet Evol* 2004;4:221–42.
15. March-Rossello GA, Munoz-Moreno MF, Garcia-Loygorri-Jordan de Urries MC, Bratos-Perez MA. A differential centrifugation protocol and validation criterion for enhancing mass spectrometry (MALDI-TOF) results in microbial identification using blood culture growth bottles. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013;32:699–704.
16. La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE* 2009;25:4.
17. Schubert S, Weinert K, Wagner C, Gunzl B, Wieser A, Maier T, et al. 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. *J Mol Diagn* 2011;13:701–6.
18. Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K, Aepfelbacher M. 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* 2010;48:1584–91.
19. Pigrau C, Andreu A. Infecciones urinarias. In: Ausina V, Moreno S, editors. *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Madrid: Médica Panamericana, 2005;1229–41.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

New procedure for rapid identification of microorganisms causing urinary tract infection from urine samples by mass spectrometry (MALDI-TOF)

Gabriel Alberto March Rosselló^{a,*}, María Purificación Gutiérrez Rodríguez^a,
Raúl Ortiz de Lejarazu Leonardo^{a,b}, Antonio Orduña Domingo^{a,b}, Miguel Ángel Bratos Pérez^{a,b}

^a Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid, Spain

^b Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 December 2013

Accepted 28 February 2014

Available online xxx

Keywords:

MALDI-TOF

Direct identification

Urine

ABSTRACT

Introduction: Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry is widely established as a technique in clinical microbiology laboratories for the identification of microorganisms. Using this technique, it is also possible to obtain the identification of microorganisms from untreated urine samples.

Methods: In this study, a differential centrifugation protocol and a criterion for validation of the results in order to achieve microbial identification from untreated urine samples are proposed. Additionally, the sensitivity of the analytical procedure in urine samples with an individual bacteria has been evaluated. **Results:** A 90% sensitivity (confidence interval of 81.96%–94.84%) was obtained in urine samples with bacterial counts of $\geq 1 \times 10^5$ CFU/ml, and it was possible to improve the percentages of direct identifications from urine samples with bacterial counts of $< 1 \times 10^5$ CFU/ml.

Conclusion: It is concluded that the MALDI-TOF system is both fast and reliable in the identification of individual microorganisms from untreated urine samples with counts of $\geq 1 \times 10^5$ CFU/ml.

© 2013 Elsevier España, S.L. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Nuevo procedimiento para la identificación rápida en muestras de orina de organismos causantes de infecciones del tracto urinario por espectrometría de masas (MALDI-TOF)

RESUMEN

Introducción: El uso de la espectrometría de masas Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) es una técnica implantada en los laboratorios de Microbiología Clínica que permite llevar a cabo la identificación de microorganismos. Una de las aplicaciones de esta técnica es la identificación a partir de muestra directa de orina.

Métodos: En este estudio se propone un protocolo de centrifugación diferencial y un criterio de validación de los resultados para alcanzar la identificación microbiana a partir de muestra directa de orina. Adicionalmente se estudia la sensibilidad del procedimiento analítico en muestras de orina monomicrobianas.

Resultados: Las orinas con recuentos $\geq 1 \times 10^5$ UFC/ml mostraron un 90% de sensibilidad (Intervalo de Confianza de 81.96%–94.84%) y se logró mejorar los porcentajes de identificación directa a partir de orinas con recuentos bacterianos $< 1 \times 10^5$ UFC/ml.

* Corresponding author.

E-mail address: gmr810@hotmail.com (G.A.M. Rosselló).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2014.02.022>

0213-005X/© 2013 Elsevier España, S.L. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Conclusiones: La espectrometría de masas MALDI-TOF es un sistema rápido y fiable para la identificación de microorganismos a partir de orinas monomicrobianas con recuentos $\geq 1 \times 10^5$ UFC/ml.

© 2013 Elsevier España, S.L. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
Todos los derechos reservados.

Introduction

Urinary tract infections (UTIs) can manifest in a wide clinical range from bacteriuria with limited clinical symptoms to sepsis, severe sepsis or septic shock¹. In 20–30% of all septic patients the infection focus is localized in the urogenital tract² and an adequate initial antibiotic therapy is essential since it ensures improved outcome³. Moreover, inappropriate antimicrobial therapy in severe UTI is linked to a higher mortality rate⁴. For election of the empiric treatment in these cases, identification directly from urine samples of bacteria causing infection can be useful.

Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) technology is a technique which allows microbial identification in clinical microbiology laboratories based on microbial protein profiles⁵. A promising application of the MALDI-TOF technique consists of carrying out identification from direct urine samples, without the need to cultivate them. In this way, a result at microbiological species level can be obtained in less than one hour.

Validation criteria of the results indicated by the manufacturers are restrictive, such that only high scoring identification is accepted. On the other hand, when microbial identification is carried out by MALDI-TOF from direct samples, the identification scores obtained are lower than scores obtained from culture, as a result of possible analytical interferences, which were not eliminated. So, in order to accept a higher rate of identification, the required level of validation criterion from the manufacturer should be lowered. In fact, various criteria have been published for validation of results that provided different rates of acceptable direct identifications^{6–9}.

The objectives of this study were (i) to develop a differential centrifugation protocol which allows the identification of microorganisms by MALDI-TOF from direct urine samples, (ii) to propose a new validating criterion for the results that allows to increase the number of acceptable direct identifications, and (iii) to examine the influence of bacterial concentration in urine on the accuracy of direct identification by MALDI-TOF.

Material and methods

Determination of sample size

Assuming that the population was made up of positive urine samples in the period of one year (3272 in 2010 at Microbiology Service at the University Clinic Hospital of Valladolid, Spain) and accepting an alpha risk of 0.95 giving a precision of ± 0.1 units in bilateral contrast to a proportion estimated at 0.5, for the validation of the differential centrifugation protocol, the study group would need to be made up of 95 monobacterial positive urine samples with counts of $\geq 1 \times 10^5$ CFU/ml. A hundred samples were randomly processed to facilitate calculation. The samples were obtained through midstream clean catch and only monobacterial samples were selected because more than 95% UTIs are caused by single bacterial species¹⁰.

In order to study the relationship between bacterial concentration in urine samples and the accuracy of identification by MALDI-TOF from direct samples, 37 urines with counts of $< 1 \times 10^5$ CFU/ml were processed (14 samples with counts between 5×10^4 and 1×10^5 CFU/ml, 17 samples with counts

between 1×10^4 and 5×10^4 CFU/ml, and six samples with counts $< 1 \times 10^4$ CFU/ml). Additionally, four samples with yeast were processed. Briefly, a total of 141 monomicrobial positive urine samples were processed.

Working procedure

In order to obtain direct identification, the urine samples were processed as follows: samples were homogenized by agitation, and 5 ml was centrifuged for 5 min at 700 rpm. The supernatant obtained was centrifuged for 15 min at 6000 rpm. The sediment was resuspended in 1 ml of HPLC quality distilled water and was centrifuged again for 15 min at 6000 rpm. The proteins of the sediment were extracted using the ethanol/formic acid technique. In order to carry out this extraction the sample was mixed with 300 μ l of HPLC quality distilled water and 900 μ l of absolute ethanol, and vortexed until a homogeneous suspension was achieved. The mixture was centrifuged for 2 min at 13,000 rpm and the supernatant was eliminated. Finally, 25 μ l of 70% formic acid and 25 μ l of acetonitrile were added, vortexed and centrifuged for 1 min at 13,000 rpm. Using the supernatant obtained, four 1 μ l spots were dropped on four different areas of the metal sample plate (MSP 96 target polished steel; Bruker, Bremen, Germany). They were allowed to dry and 1 μ l of the matrix solution (saturated solution of cyano-4-hydroxy cinnamic acid in 50% acetonitrile with 2.5% trifluoroacetic acid) was added to each spot to be analyzed. They were allowed to dry again and then, a reading of the four spots from each sample was taken. All chemicals were supplied by Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

Furthermore, at the same time, urine samples were plated, using a calibrated loop so as to determine the number of CFU/ml present in the urine, on Columbia agar plates supplemented with 5% sheep's blood (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and MacConkey medium (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France); in addition a Sabouraud + Chloramphenicol agar plate (Difco, Maryland, USA) was added in those cases where fungal analysis was requested. The plates were incubated at 37 °C/24 h in aerobic atmosphere and identification was done by MALDI technique. Samples showing growth of two or more microorganisms were not included in the study.

Protein analysis was carried out using a mass spectrometer MALDI Microflex LT (BrukerDaltonik GmbH, Bremen, Germany) with FlexControl v. 3.0 software (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). The spectrum was obtained in linear mode (N₂ laser frequency and wavelength: 60 Hz and 337 nm, voltage of the ion source I: 20 kV, voltage of the ion source II: 16.7 kV; detector mass range: 2000–20,137 Da) and 240 shots from different positions of the metal sample plate were recorded. Once the association is completed, the Biotyper v.3.0 software (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) suggests a list of ten most likely microorganism identifications, each with a score that indicates its accuracy^{11,12}. Adopting the manufacturer's criteria, valid identifications may be deemed as those in which a score of ≥ 2.000 is obtained for the first microorganism on the list. The software also offered a consistency index, which provides information concerning the quality of the identification that does not affect the validity of the results. This consistency index depends on the concordance of the microbial identification obtained on the ten microorganisms on the list.

Table 1

Results of identification obtained by MALDI-TOF from culture of positive urine samples from 2010 and from culture in the study group of 100 urine samples.

	Positive urines year 2010 (N = 3272) (%)	Study group (N = 100) (%)
Enterobacteriaceae	68	76
NFGNR ^a	7.9	4
<i>Staphylococcus</i> spp.	6.5	4
<i>Streptococcus</i> spp.	3.9	5
<i>Enterococcus</i> spp.	13.2	11
Other microorganisms	0.5	0

^a NFGNR: non-fermenting Gram-negative rods.

Results of the identification were interpreted in accordance with previously published criteria⁶⁻⁹; in those cases in which the criteria of the different authors were based on a single reading, the first of the four replicates carried out was chosen and the remaining three replicates were rejected. For this, urine samples were divided into two subgroups, one including the study group of 100 monobacterial samples with counts of $\geq 1 \times 10^5$ CFU/ml, and another including the 37 urine samples with counts of $< 1 \times 10^5$ CFU/ml. Moreover, for each urine sample, MALDI-TOF scores from direct sample and from colonies grown on plates were compared and, taking the identification obtained by MALDI-TOF from culture using the criteria of the manufacturer as the gold standard, a validation criterion for direct identification was defined.

In order to compare the identification results obtained using the different validation criteria, the McNemar test was used. In order to compare the frequency distribution in the population of the study group, the Chi-squared test was used. All these calculations were carried out using the SPSS software v. 15.0.

Results

No statistically significant difference was observed ($p > 0.05$) when comparing isolates obtained from the study group with those from the University Clinic Hospital of Valladolid (Spain) during 2010 (Table 1). Moreover, the four species most frequently isolated in the urine samples from the Hospital were the same as those in the study group; these were, in order of greater to lesser prevalence, *Escherichia coli* with isolate percentages of 56% in the Hospital and 51% in the study group, *Enterococcus faecalis* with percentages of 18% and 11% respectively, *Klebsiella pneumoniae* with percentages of 7.9% and 11% respectively and *Proteus mirabilis* with percentages of 4.5% and 4% respectively. Of the 100 urine samples that comprised the study group, 63 were from women and 37 from men. The age of the patients was between 4 and 94 years, with an average age of 69 years; and 23 of them were hospitalized.

Urine samples with counts of $\geq 1 \times 10^5$ CFU/ml produced higher identification scores (close to or above 2.000) in the majority of cases. On the other hand, the identification scores from urine with counts of $< 1 \times 10^5$ CFU/ml were lower, such that identifications with scores < 1.400 corresponded with microorganisms which are rarely etiological agents of urinary infection and, in numerous occasions, in one or more determinations of the four microorganisms carried out from the samples no peaks were obtained. Moreover, when scores were ≥ 1.400 , despite the fact that the proposed microorganisms were included among the frequent UTIs source, and the identification proposed for each spot was different, the score was not a sufficient criterion for determining the identification of the bacteria, given that, in many cases, the suggestion with a higher score did not coincide with the identification obtained from culture. In this way, we observed that taking as valid the identification that was repeated at least in two of the four spots with counts of ≥ 1.400 , we obtained 100% concordance in respect of the identifications carried out from culture.

Table 2

Frequency of microorganisms identified by MALDI-TOF from 137 monobacterial urine samples related with the validation criterion adopted.

Author (reference), kind of criterion	Correct identifications in 100 urines that form the study group (%)	Correct identifications in 37 urines with counts of $< 1 \times 10^5$ CFU/ml n (%)
Moussaoui et al. ¹¹ , score and consistency index	84	1 (2.7)
Schubert et al. ¹² , score and consistency index	84	1 (2.7)
Stevenson et al. ¹³ , score	84	1 (2.7)
La Scola and Raoult ¹⁴ , score	86	2 (5.4)
Criterion proposed, score	90	7 (18.9)

Based on these data, we proposed the following validation criterion: a microorganism was correctly identified using MALDI-TOF when, after having taken four readings of the same sample, at least two readings offer the same identification proposal at species level for the first microorganism in the list, both with a score of ≥ 1.400 .

Identification results obtained from all urine samples processed in accordance with the validation criteria adopted are shown in Table 2. When the identification results obtained from the study group by applying the criterion proposed in this study were compared with those obtained by applying the validation criteria of different authors⁶⁻⁹, no statistically significant differences were observed ($p > 0.05$). On the other hand, when the identification results from the 37 urine samples with counts of $< 1 \times 10^5$ CFU/ml by applying the criterion proposed in this study were compared, we obtained statistically significant differences with respect to those obtained using the criteria of Moussaoui et al.⁶ ($p < 0.05$), Schubert et al.⁷ ($p < 0.05$) and Stevenson et al.⁸ ($p < 0.05$); however, no statistically significant differences were observed ($p > 0.05$) with respect to the criterion of La Scola and Raoult⁹.

Bacterial identification results obtained by MALDI-TOF from 137 urine samples by applying the validation criterion proposed in this study are shown in Table 3. Of the 51 samples with counts of $\geq 1 \times 10^5$ CFU/ml in which *E. coli* was identified from culture, there was only one failed identification from direct urine. The eleven isolates of *K. pneumoniae*, the four of *P. mirabilis* and *Klebsiella oxytoca*, the three of *Citrobacter freundii*, and the one of *Enterobacter aerogenes* and *Serratia marcescens* identified from culture were correctly identified from urine. Finally, of the two samples in which *Enterobacter cloacae* was isolated, correct identification was obtained in one of them. Of the four samples in which non-fermenting Gram-negative rods (NFGNR) were identified (two urine samples with *Pseudomonas aeruginosa*, one with *Acinetobacter baumannii* and one with *Acinetobacter genomospecies 3*), there was only one failed identification, which corresponded to a urine with *P. aeruginosa*. *Staphylococci* were isolated in four samples (two urine samples with *Staphylococcus aureus*, one with *Staphylococcus epidermidis* and one with *Staphylococcus saprophyticus*); in this set of four samples, only one correct direct identification was obtained, which corresponded to one isolate of *S. aureus*. *E. faecalis* was isolated from eleven samples, and from ten of them correct identification was obtained from urine directly. In the same way, two correct identifications were obtained from a set of five samples with *Streptococcus agalactiae*. In this way, a 90% sensitivity was obtained (confidence interval of 95%: 81.96-94.84).

Of the 37 urine samples with counts of $< 1 \times 10^5$ CFU/ml direct identification was achieved in seven of them. Of the 14 urine

Table 3
Frequency of microorganisms identified by MALDI-TOF from direct urine samples related with bacterial concentration applying the criterion proposed in this study.

	Counts of $\geq 1 \times 10^5$ CFU/ml		Counts between 5×10^4 and 1×10^5 CFU/ml		Counts between 1×10^4 and 5×10^4 CFU/ml		Counts of $< 1 \times 10^4$ CFU/ml	
	Correct identifications n/N (%)	Mean scores	Correct identifications n/N (%)	Mean scores	Correct identifications n/N (%)	Mean scores	Correct identifications n/N (%)	Mean scores
Gram-negative bacteria	77/80 (96.3)	2.063	3/10 (30)	1.650	3/11 (27.3)	1.456	0/6 (0)	-
Enterobacteriaceae	74/76 (97.4)	2.070	3/8 (37.5)	1.650	3/8 (37.5)	1.456	-	-
NFGNR ^a	3/4 (75)	1.809	0/2 (0)	-	0/3 (0)	-	-	-
Gram-positive bacteria	13/20 (65)	1.885	1/4 (25)	1.608	0/6 (0)	-	-	-
<i>Staphylococcus</i> spp.	1/4 (25)	1.528	-	-	0/1 (0)	-	-	-
<i>S. agalactiae</i>	2/5 (40)	1.536	0/1 (0)	-	0/4 (0)	-	-	-
<i>Enterococcus</i> spp.	10/11 (90.9)	1.985	1/3 (33.3)	1.608	0/1 (0)	-	-	-
Total	90/100 (90)	2.037	4/14 (28.6)	1.640	3/17 (17.6%)	1.456	0/6 (0)	-

^a NFGNR: non-fermenting Gram-negative rods.

samples with counts between 5×10^4 and 1×10^5 CFU/ml there were ten with Gram-negative bacterial isolates, and from these three correct identifications were obtained, which were two isolates of *E. coli* and one of *K. pneumoniae*. Three isolates of *E. coli*, one of *P. mirabilis* and one of *Morganella morganii* were not identified from the sample directly. On the other hand, of the four samples with Gram-positive bacterial isolates (two urines with an isolate of *E. faecalis*, one with *Enterococcus faecium* and one with *S. agalactiae*) only one identification of *E. faecalis* was obtained.

Of the 17 urine samples with counts between 1×10^4 and 5×10^4 CFU/ml there were 11 with Gram-negative bacterial isolates which provided three acceptable identifications of *E. coli* from a direct sample; three isolates of *E. coli*, two of *P. mirabilis* and three of *P. aeruginosa* were not identified. In the six samples with Gram-positive bacterial isolates no correct identification was obtained. In this case, the strains identified from culture were one of *S. aureus*, four of *E. faecalis* and one of *S. agalactiae*.

Of the six urine samples processed with counts of $< 1 \times 10^4$ CFU/ml, no valid identification was obtained. Five strains of *E. coli* and one of *P. mirabilis* were identified from culture.

As can be seen in Table 3, as the bacterial concentration was reduced in the samples, the percentages of identification and average scores obtained were also reduced. For each urinary bacterial concentration, the bacteria belonging to the family Enterobacteriaceae showed the greater percentage of correct identifications and higher average score, and in the same way, the percentage of correct identifications and the average score in Gram-negative bacteria were greater than that of Gram-positive bacteria.

In the identification of yeasts by MALDI-TOF from four urine samples, the species identified from culture was *Candida albicans*. In the two urine samples with counts of $\geq 1 \times 10^5$ CFU/ml identification was obtained with an average score of 1.989, and in the two with counts between 1×10^4 and 5×10^4 CFU/ml no valid identification was obtained.

Discussion

This paper was focused on the direct microbial identification in urine samples regardless of their concentration because, apart from the classic criterion described by Kass¹³, it had demonstrated that counts of $< 1 \times 10^5$ CFU/ml of bacteria and yeasts might be indicative of UTI in samples obtained through midstream clean catch¹⁴⁻¹⁸.

The criteria for validation of results obtained using MALDI-TOF can be classified into two groups: one takes into account the score and consistency index obtained in each reading and the other is based only on the score of the first microorganism in the list. Belonging to the first group two proposals have been reported. So, Moussaoui et al.⁶ established that an identification is valid if a score of ≥ 1.400 is obtained for the first microorganism in the list and the species in the first four identification proposals coincides; similarly, Schubert et al.⁷ advocated that an identification is valid if a score of ≥ 1.500 is obtained for the first microorganism and the species is the same in the first three identification proposals in the list. Based on the score obtained for the first microorganism in the list given by the software, two criteria can be found in the literature, i.e., the one proposed by Stevenson et al.⁸, and subsequently by Prod'hom et al.¹⁹, Juiz et al.²⁰ and Ferreira et al.²¹, establishing that a score of ≥ 2.000 in an identification indicates a species level identification, a score between 1.700 and 1.900 indicates a genus level identification, and a score of < 1.700 indicates non-identification. Finally, the standard proposed by La Scola and Raoult⁹ established that a microorganism is identified correctly using MALDI-TOF when, after having performed four identifications of a single sample, the bacterial species with the highest score (the first on the list) coincides in all of them and a score of ≥ 1.900 is obtained in at least two identifications, or when a score of ≥ 1.200 is obtained in the four identifications.

Urine samples with counts of $\geq 1 \times 10^5$ CFU/ml of Gram-negative bacteria and *Enterococcus* spp. provided high identification scores (close to 2.000) and therefore high correct identification percentages were obtained, regardless of the validation criteria used. It is worth mentioning that the proposed criterion produced more direct identification percentages in the study group (Table 2). However, for the urine samples with counts of $\geq 1 \times 10^5$ CFU/ml of *Staphylococcus* spp. or *Streptococcus* spp. and urine with counts of $< 1 \times 10^5$ CFU/ml, low identification scores (close to 1.400) were obtained, and as a consequence, low identification percentages were obtained. For these urine samples with low scores, the identification percentage obtained depended on the criterion used in validating results and our criterion also produced higher percentages of correct direct identification (Table 2). The criteria of Moussaoui et al.⁶ and Schubert et al.⁷, which take into account the score and the consistency index, were not suitable for the validation of these urine samples that provided low identification scores. It was due to the lack of concordance at species level on the list of

the ten microorganisms proposed by the software, despite the fact that the first option in the list could coincide with the identification obtained from culture. La Scola and Raoult⁹, who used lower scores than all those published to date, proposed substituting the consistency index obtained in a reading with the concordance at species level obtained in the first identification of the four readings carried out from the same sample; which is to say, this criterion is based on the score and the reproducibility of the equipment. A limitation of this criterion consists in that proposing valid identification from scores of ≥ 1.200 is not useful for validating of the results obtained from direct urine samples with low bacterial counts, since we have observed that scores of < 1.400 suggested microorganisms which are rarely etiological agents in UTI. Using the criterion proposed in this study, the higher identification score obtained in one of the four readings carried out from one sample was not a determining factor, given that if an identification with a higher score than any other of those repeated was obtained, this should be discarded. So, with the proposed criterion, the weighting of the score was reduced in the validation of results.

When 5 ml of urine with counts of $\geq 1 \times 10^5$ CFU/ml of *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. or with counts of $< 1 \times 10^5$ CFU/ml was processed, the bacterial concentration was insufficient for carrying out direct identification by MALDI-TOF from urine. This suggested that in order to achieve the direct identification successfully it would be better to process greater sample volumes in order to process a greater amount of bacteria.

No previous studies on direct identifications of yeasts from urine samples have been found in the literature. Although the number of samples studied in which a yeast was isolated is very low, the results obtained coincided with those from bacteria positive urine with regard to the microbial concentration in the sample; which is to say, the two strains of *C. albicans* present in two urine samples with counts of $\geq 1 \times 10^5$ CFU/ml were correctly identified by applying our criterion and the two strains isolated in two samples with counts of $< 1 \times 10^5$ CFU/ml were not.

Results obtained in this study concur with those of Ferreira et al.²¹ and with those of Kohling et al.²², which also observed that counts of $\geq 1 \times 10^5$ CFU/ml produced higher percentage of direct identification in urine samples, and that concentrations $< 1 \times 10^5$ CFU/ml produced low percentages of direct identification. Our results also matched with those published by Christner et al.²³, who pointed out that with greater bacterial concentration in the sample, greater is the quantity of microorganisms deposited on the metal sample plate and consequently a higher score was obtained. In this way, when the bacterial concentration in the urine sample is high ($\geq 1 \times 10^5$ CFU/ml) satisfactory identification percentages are obtained, above all in Gram-negative bacteria. In urine with counts between 5×10^4 and 1×10^5 CFU/ml identification percentages were considerably reduced; in urine with counts between 1×10^4 and 5×10^4 CFU/ml the percentages were reduced even further; and in urine with counts of $< 1 \times 10^4$ CFU/ml, no direct identification was achieved. Moreover, for each urine bacterial concentration the average score for Gram-negative bacteria obtained is superior to that of Gram-positive bacteria (Table 3); these data coincides with that published by Schubert et al.⁷ who asserted that the MALDI-TOF system offers greater identification capacity for Gram-negative than Gram-positive bacteria.

For performing bacterial identification directly from urine samples, the clinician must request it in patients with suspected severe UTI. Direct bacterial identification cannot be applied in all urine samples because they are those most commonly processed in clinical microbiology laboratories²⁴.

Direct identification is reported in less than one hour from the arrival of the urine to the laboratory and only includes the bacterial species present in urine. For confirmation of direct identification and clinical significance, it is necessary to perform bacterial

identification and calculate bacterial counts from colonies obtained on isolation plates. Therefore, the clinician must assess clinical significance of direct bacterial identification and adopt appropriate measures regarding antimicrobial therapy.

A problem of direct identification by MALDI-TOF is that polymicrobial samples could provide wrong identifications since the spectra obtained include peaks of two or more microorganisms. This problem has been partially solved with the use of software (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) which, in some cases, is able to report two bacterial identifications if both microorganisms are in correct proportions.

To sum up, applying the differential centrifugation protocol together with the validation criterion proposed in this study, it was possible to achieve identification by MALDI-TOF of the microorganisms that most frequently cause UTI from direct monomicrobial urine samples with bacterial counts of $\geq 1 \times 10^5$ CFU/ml; and, it was also possible to improve correct identifications in urine samples with bacterial counts of $< 1 \times 10^5$ CFU/ml.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Wagenlehner FM, Pilatz A, Naber KG, Weidner W. Therapeutic challenges of urosepsis. *Eur J Clin Invest.* 2008;38 Suppl. 2:45-9.
2. Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med.* 2000;26 Suppl. 1:S64-74.
3. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med.* 2008;34:17-60.
4. Elhanan G, Sarhat M, Raz R. Empiric antibiotic treatment and the misuse of culture results and antibiotic sensitivities in patients with community-acquired bacteraemia due to urinary tract infection. *J Infect.* 1997;35:283-8.
5. Sauer S, Freiwald A, Maier T, Kube M, Reinhardt R, Kostrzewa M, et al. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS ONE.* 2008;3:e2843.
6. Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, Ludes B, Kostrzewa M, Riegel P, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:1631-8.
7. Schubert S, Weinert K, Wagner C, Gunzl B, Wieser A, Maier T, et al. 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. *J Mol Diagn.* 2011;13:701-6.
8. Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010;48:444-7.
9. La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE.* 2009;4:e8041.
10. Sobel JD, Kaye D. Urinary tract infections. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious disease.* 6th ed. New York: Elsevier; 2005. p. 881-9.
11. Demirev PA, Ho YP, Ryzhov V, Fenselau C. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. *Anal Chem.* 1999;71:2732-8.
12. Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, Wells G, Lunt M, McKenna T, et al. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect Genet Evol.* 2004;4:221-42.
13. Kass EH. Asymptomatic infections of the urinary tract. *Trans Assoc Am Physicians.* 1956;69:56-64.
14. Colodner R, Eliasberg T, Chazan B, Raz R. Clinical significance of bacteriuria with low colony counts of *Enterococcus* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006;25:238-41.
15. Behzadi P, Behzadi E, Yazdanbod H, Aghapour R, Akbari Cheshmeh M, Salehian Omran D. Urinary tract infections associated with *Candida albicans*. *Maedica (Buchur).* 2010;5:277-9.
16. Hummers-Pradier E, Ohse AM, Koch M, Heizmann WR, Kochen MM. Urinary tract infection in men. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2004;42:360-6.
17. Arav-Boger R, Leibovici L, Danon YL. Urinary tract infections with low and high colony counts in young women. Spontaneous remission and single-dose vs multiple-day treatment. *Arch Intern Med.* 1994;154:300-4.
18. Kim J, Kim DS, Lee YS, Choi NG. Fungal urinary tract infection in burn patients with long-term Foley catheterization. *Korean J Urol.* 2011;52:626-31.

- 454 19. Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. Matrix-assisted laser
455 desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial iden-
456 tification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1481-3.
- 457 20. Juiz PM, Almela M, Melcion C, Campo I, Esteban C, Pitart C, et al. A comparative
458 study of two different methods of sample preparation for positive blood cultures
459 for the rapid identification of bacteria using MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol*
460 *Infect Dis.* 2012;31:1353-8.
- 461 21. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-Avila M, Cembrero-Fucinos D, Herrero-
462 Hernandez A, Gonzalez-Buitrago JM, et al. Direct identification of urinary tract
463 pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-
time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2110-5.
- 464 22. Kohling HL, Bittner A, Muller KD, Buer J, Becker M, Rubben H, et al. Direct
465 identification of bacteria in urine samples by matrix-assisted laser desorp-
466 tion/ionization time-of-flight mass spectrometry and relevance of defensins as
467 interfering factors. *J Med Microbiol.* 2012;61:339-44.
- 468 23. Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K, Aepfelbacher M.
469 Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of
470 matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry
471 fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1584-91.
- 472 24. Brilha S, Proenca H, Cristino JM, Hanscheid T. Use of flow cytometry (Sysmex®
473 UF-100 to screen for positive urine cultures: in search for the ideal cut-off. *Clin*
474 *Chem Lab Med.* 2010;48:289-92.

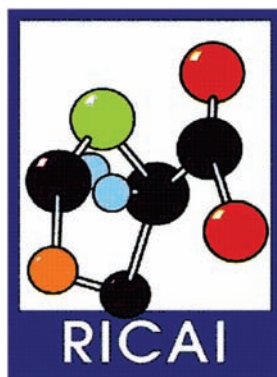
UNCORRECTED PROOF

Sessions d'affiches

Poster sessions

**Jeudi 21 novembre à 8h30 jusqu'au
vendredi 22 novembre à 16h00**
*Thursday, November 21 at 8:30 am until
Friday, November 22 at 4:00 pm*

Hall Pierre Curie



- 368 A rapid method for the detection of staphylococci methicillin-resistant from positive blood cultures.**
G.A. March³, M.C. Garcia Loygorri¹, M.P. Gutiérrez³, M. Simarro³, A. Orduña³⁻², M.A. Bratos³⁻²
¹Microbiología y Parasitología, Hospital de Medina del Campo, Medina Del Campo ²Microbiología y parasitología, Hospital clínico universitario de Valladolid ³Department of microbiology. faculty of medicine, University of Valladolid, Valladolid, Espagne
- 369 Evaluation of Clearview Exact PBP2a, an immunochromatographic assay, for the detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci.**
L. Mekkaoui, O. Denis, C. Nonhoff
 Service de microbiologie, Erasme, ULB, Bruxelles, Belgique
- 370 Intérêt du kit Xpert® MRSA/SA BC pour la détection de la méticillinorésistance des variants à petites colonies de *Staphylococcus aureus* (SCV-SA).**
 C. Beauvue², C. Lasserre²⁻³, N. Rouzic¹⁻³, B. Guisnel¹, M.F. Exbourse², M.F. Guèdes², D. Tande², G. Héry-Arnaud⁴
¹ARLIN Bretagne ²Unité de bactériologie, Pôle de biologie-pathologie, CHRU de Brest ³EA3882-LUBEM (Laboratoire universitaire de biodiversité et écologie microbienne)-SFR148, Université de Brest, Brest, France
- 371 Le *Staphylococcus lugdunensis* à l'ère de la spectrométrie de masse MALDI-TOF : un pathogène émergent ?**
A. Noël, A. Verroken, H. Rodriguez-Villalobos
 Biologie clinique - microbiologie, Cliniques universitaires Saint-Luc, Bruxelles, Belgique
- 372 Apport de l'identification des staphylocoques à coagulase négative (CoNS) par la méthode MALDI-TOF dans le diagnostic des bactériémies.**
A. Denoel¹, P.H. Jarreau⁴, D. Salmon³, D. Bouscary², C. Poyart¹, J. Raymond¹
¹Bactériologie ²Hématologie ³Médecine Interne ⁴Réanimation néonatale, Hôpital Cochin, Paris, France
- 373 Sensibilité à la ceftaroline des bactéries responsables d'infections compliquées de la peau et des tissus mous en France : étude nationale multicentrique PREMIUM.**
 A. Emirian, C. Leprince, V. Fihman, C. Coutureau, C.J. Soussy, J.W. Decousser
 Département de virologie, bactériologie-hygiène, parasitologie-mycologie, CHU Henri Mondor, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Creteil, France
- 374 Capacité d'adaptation rapide à la pression de sélection par la vancomycine : un possible avantage sélectif pour l'implantation en néonatalogie du clone *Staphylococcus capitis*NRCS-A.**
M. Butin¹⁻², J.P. Rasigade¹⁻²⁻³, P. Martins Simões¹⁻², S. Tigaud¹, F. Vandenesch¹⁻²⁻³, O. Claris¹⁻³, J.C. Picaud¹⁻³, F. Laurent¹⁻²⁻³
¹Hospices Civils de Lyon ²CIRI (Centre international de recherche en infectiologie), Inserm U1111, Lyon ³Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France
- 375 Caractérisation phénotypique et génotypique des *Staphylococcus aureus* impliqués dans mammites bovines en Algérie**
N. Benhamed
 Laboratoire de microbiologie, Université d'Oran, Oran, Algérie
- 376 Détermination de la sensibilité à l'oxacilline des *Staphylococcus non aureus* (Sna) par la méthode de diffusion : plaidoyer pour conserver l'utilisation du disque de Moxalactam (MOX).**
N. Brieu, J. Gallou, C. Pachetti, L. Maulin, E. Lagier, C. Ferrali, H. Chardon
 Service de diagnostic biologique des maladies infectieuses, CH du Pays d'Aix, Aix En Provence, France
- 377 Détection phénotypique des SARM porteurs du gène *mecC* : quelles conditions ? Quels milieux ? Quels disques ?**
J. Tasse, O. Dumitrescu, A. Sapin, A. Tristan, F. Vandenesch, F. Laurent
 Centre national de référence des staphylocoques, Centre international de recherche en infectiologie - Inserm U1111, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

A RAPID METHOD FOR THE DETECTION OF STAPHYLOCOCCI METHICILLIN-RESISTANT FROM POSITIVE BLOOD CULTURES

G.A. March¹, M.C. García Loygorri², M.P. Gutiérrez³, M. Simarro³, A. Orduña^{1,3}, M.A. Bratos^{1,3}

Universidad de Valladolid

¹Department of Microbiology, Faculty of medicine, University of Valladolid, Espagne. ²Microbiología y Parasitología, Hospital de Medina del Campo, Espagne. ³Microbiología y Parasitología, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Espagne.

Introduction

- Staphylococci are the microorganisms most frequently isolated from blood cultures, which are characterized by its high rate of resistance to Methicillin, resulting in a increased consumption of glycopeptides (1).
- MALDI-TOF system allows obtain a direct identification from positive blood cultures in one hour. However, there is a need for obtaining a faster and accurate antimicrobial susceptibility since, in septic patients, the correct and early administration of antibiotics is key to ensuring a favourable outcome (2).

Objective

- To determine the antimicrobial susceptibility to Methicillin in staphylococci from positive blood cultures.

Methods

- Direct identification from 20 blood cultures (Becton Dickinson) with grape-like clusters cocci was performed with MALDI-TOF (Bruker Daltonik) applying a protocol of differential centrifugation (3).
- For each strain, three tubes were prepared with 30 ml of Mueller-Hinton broth cation adjusted, one without antibiotic (control) and two containing Oxacillin at concentrations CLSI breakpoints. Each tube was inoculated with an aliquot of positive blood culture to obtain a concentration between 500 and 900 bacteria/μl. The tubes were incubated in a water bath at 37°C and the bacterial concentration was determined after 60, 120 and 180 minutes of incubation by the flow cytometer Sysmex UF-1000i (Sysmex Corporation).
- With the colonies obtained from the subculture of blood cultures, identification was carried out using MALDI-TOF and antimicrobial susceptibility testing was performed using E-test (BioMérieux), VITEK2 (BioMérieux) and MicroScan (Siemens). These results were considered the gold standard.

Results

Table 1. Bacterial counts obtained by Sysmex UF-1000i

Strain tested	Susceptibility to oxacillin	Bacterial counts								
		T ₆₀			T ₁₂₀			T ₁₈₀		
		Control	[S]	[R]	Control	[S]	[R]	Control	[S]	[R]
S. aureus	S	643	622	671	1261	931	938	6106	1221	1045
S. aureus	S	784	648	698	2375	1316	1285	9845	1524	990
S. aureus	R	985	994	977	2746	2732	2844	8576	9865	8000
S. aureus	R	1021	988	1005	3643	3065	3021	7346	7200	7398
S. epidermidis	S	654	621	712	1867	775	713	6004	654	784
S. epidermidis	S	1063	998	980	4753	1055	1001	10901	1984	1768
S. epidermidis	R	854	903	879	2536	2587	2594	8564	8666	8451
S. epidermidis	R	933	984	954	1854	1665	1670	6559	5990	6208
S. epidermidis	R	1035	1002	985	7486	6610	6542	10022	9877	9981
S. epidermidis	R	760	679	704	4576	4457	4443	9870	9983	988
S. epidermidis	R	766	838	747	2551	2655	2671	7654	7680	7301
S. epidermidis	R	954	1056	1547	7658	7620	7589	10304	9983	9921
S. hominis	S	851	852	847	3045	643	603	8898	760	786
S. hominis	S	865	833	860	3468	1516	1387	9006	1897	1790
S. hominis	S	956	974	941	2445	1745	1731	7895	1890	1701
S. hominis	R	784	750	764	2339	2208	2182	8790	8899	8812
S. hominis	R	852	952	874	3381	3469	3445	9760	4090	3780
S. hominis	R	964	945	1072	2565	2495	2835	7753	7734	7839
S. haemolyticus	R	925	1057	963	2981	3217	3190	8679	8732	8940
S. haemolyticus	R	733	864	798	7657	7956	7751	12202	10021	10743

- All identifications performed directly from blood culture coincided with those obtained from the colony grown on plates
- There was 100% agreement among the susceptibility obtained with the different commercial methods.

- As shown in Table 1, after one hour of incubation, the microbial count obtained from drug-free culture and the strains incubated with antibiotic increased slightly.
- However, after two and three hours of incubation:
 - ✓ the sensitive strains incubated with antibiotic provided a microbial count significantly lower than the drug-free control at the same times.
 - ✓ the resistant strains incubated with antibiotic provided, after two and three hours of incubation, similar counts with those obtained from the drug-free control at the same times.

Conclusion

- In two hours it is possible to determine the susceptibility of staphylococci to Methicillin from positive blood culture by flow cytometry

References

1. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th Edition 2007. Chapter 193. Staphylococcus epidermidis and Other Coagulase-Negative Staphylococci. Elsevier Churchill Livingstone
2. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Sappes R, Feinstein D, Zanotti S, Talberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M (2009) Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. Crit Care Med 34(6):1589-1596.
3. March Rosselló GA, Muñoz Moreno MF, García-Loygorri Jordán de Urríes MC, Bratos Pérez MA (2013). A differential centrifugation protocol and validation criterion for enhancing mass spectrometry (MALDI-TOF) results in microbial identification using blood culture growth bottles. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 32(5):699-704.

From: eccmid.abstracts@kenes.com
To: gmr810@hotmail.com
Subject: ECCMID 2014 - Your submitted abstract
Date: Thu, 6 Feb 2014 19:52:23 +0000

Abstract Reference No: ECCMI-3897

Dear Mr March Rosselló

On behalf of the Programme Committee of the 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, we are pleased to inform you that your abstract entitled **BACTERIAL COUNTS BY FLOW CYTOMETRY PREDICT THE SUSCEPTIBILITY OF BACTERIA TO ANTIBIOTICS DIRECTLY FROM POSITIVE BLOOD CULTURE BOTTLES**

has been accepted for **poster presentation** at the ECCMID to be held in Barcelona from 10 – 13 May 2014.

Your presentation is scheduled for the session **Rapid antimicrobial susceptibility testing** to be held on **10 May 2014** from **3:30 PM to 4:30 PM**.

During this time you will be required to stand by your poster. For further information regarding poster preparation and presentation please download the [Poster Instructions](#).

In case that you are not the presenting author, please forward this notification to the presenting author

and advise the Congress Secretariat accordingly.

If you have not yet registered for the meeting, please do so now online at the ECCMID website: www.eccmid.org. Please note that for the presenting author of the abstract, the early registration fee applies until **24 February 2014**.

The presenting author **must register before this date** to ensure publication of the abstract in the online lecture library of ESCMID and on the congress website.

If you are unable to attend please advise us of your withdrawal before 24 February 2014.

In order to register with the early registration fee please follow the steps below when completing your registration:

1. Via the [congress website](#) you need to log in with your ESCMID user name and password. (The same login as used for the abstract submission)
2. Begin completing the registration form.
3. At the page entitled "Select Main Fee", insert your code (**LEE95**) in the "Special Registration Code" field and press enter.
This will now change the registration fee to the early registration fee for you.
4. Proceed to the next step to complete your registration.

Similar to last year all abstracts and posters will be published in the online lecture library of ESCMID allowing the electronic viewing of all scientific posters presented during the ECCMID. All abstracts will be available as of 30 April 2014. For this reason, you will receive further information by ESCMID in March.

OFFICIAL AIRLINE

The Star Alliance™ Members Airlines have been appointed as the Official Airline Network for the ECCMID 2014 Congress and as such are offering discounts to participants using their member airlines.

For detailed information relating to the official airline and discounts please [click here](#)
The Convention Code for ECCMID 2014 Congress is: **LX05S14**

We look forward to seeing you in Barcelona.

Yours sincerely,

ECCMID 2014 Administrative Secretariat

On behalf of the ECCMID 2014 Scientific Committee



Introduction and Objective

- Sepsis and septic shock are common syndromes among patients admitted to intensive care units, and are frequently associated with blood stream infections [1]. Several authors have concluded that early administration of appropriate antibiotics in patients with sepsis results in an increase of survival [2]. For this reason, rapid antibiotic susceptibility test of bacteria causing bloodstream infections are given a very high priority by the Clinical Laboratories.

- The objective of this work was to develop a fast procedure to determine the bacterial susceptibility to antibiotics from positive blood cultures bottles.

Materials and Methods

- Monobacterial positive blood cultures with the strains *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 33853, *Escherichia coli* ATCC 35218 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were prepared artificially.

- The antibiotic tested at CLSI breakpoints were: Ampicillin and Vancomycin against *E. faecalis* ATCC 29212; Amikacin, Cefotaxime, Vancomycin and Oxacillin against *S. aureus* ATCC 29213; Ceftazidime, Amikacin and Colistin against *P. aeruginosa* ATCC 33853; Ampicillin against *E. coli* ATCC 35218; and Amikacin, Cefotaxime and Ciprofloxacin against *E. coli* 25922.

- The culture medium used was cation-adjusted Mueller-Hinton. Moreover, to each strain tested against one antibiotic, a control without antibiotic was added.

- Each culture was inoculated with an aliquot of positive blood culture and the bacterial concentration was determined. Then, the cultures were incubated in a water bath at 35°C and the bacterial concentration was determined after 60 (T₆₀), 120 (T₁₂₀) and 180 (T₁₈₀) minutes of incubation by the Sysmex UF-1000i flow cytometer (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

Results

- Table 1 shows the mean values of the bacterial counts obtained from the strains incubated with and without antibiotics after different times.

- The bacterial counts from the cultures of *E. faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 33853 and *E. coli* ATCC 25922, which were sensitive to the antibiotics tested, after 60, 120 and 180 minutes of incubation with antibiotics, were substantially lower than those from the controls, at the same times of incubation.

- The bacterial counts from the cultures of *S. aureus* ATCC 29213, which was sensitive to the antibiotics tested, after 60 minutes of incubation with antibiotics, were very similar than those from the controls. However, after 120 and 180 minutes of incubation with antibiotics, the counts were substantially lower than those from the controls, at the same times of incubation.

- The bacterial counts from the culture of *E. coli* ATCC 35218, which was resistant to the antibiotic tested, after 60, 120 and 180 minutes of incubation with antibiotics, the bacterial counts were very similar to those from the control.

Table 1. Bacterial counts obtained from the strains incubated with and without antibiotics after different times

Strain tested	Antibiotic tested	Bacterial counts (bacteria/μl)											
		T ₆₀				T ₁₂₀				T ₁₈₀			
		Control	(S)	(I)	(R)	Control	(S)	(I)	(R)	Control	(S)	(I)	(R)
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Ampicillin	97	64	-	56	567	58	-	54	8794	422	-	492
	Vancomycin	752	535	545/530**	496	3853	2103	1965/1834	1672	12675	1458	1229/1090	913
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 33853	Ceftazidime	837	635	638	615	2642	890	845	837	9543	1298	1269	973
	Amikacin	804	583	551	559	2331	589	564	501	9743	701	516	468
	Colistin	764	568	575	564	2659	1180	1167	1146	10584	2053	1990	1852
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Amikacin	934	674	687	690	6783	1051	1010	949	11765	2	12	247
	Cefotaxime	941	478	489	464	6592	369	283	250	10472	10	10	10
	Ciprofloxacin	959	723	718	712	6130	1691	1563	1526	10573	1026	1110	835
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Amikacin	643	589	592	597	2653	1178	1106	1287	39541	4231	3408	3954
	Cefotaxime	856	808	827/823	821	3649	2113	2197/2306	2171	39238	9849	9535/9378	11771
	Vancomycin	899	856	864/880	871	2854	2183	2072/2029	2014	41432	7541	8286/8734	8245
<i>E. coli</i> ATCC 35218	Oxacillin	925	893	-	896	2679	1993	-	1963	45434	12448	-	12767
	Ampicillin	77	77	75	74	423	392	398	394	7758	6974	6858	6792

*S, I and R: breakpoints concentrations of sensitivity, intermediate and resistance

**Results with the lowest /highest breakpoint concentration of intermediate

Conclusions

- In two hours it is possible to predict the susceptibility to antibiotics directly from positive blood culture by flow cytometry.

References

1. Balk RA (2000). Severe sepsis and septic shock. Definitions, epidemiology, and clinical manifestations. Crit Care Clin 16: 179-192.
2. Gaieski DF, Mikkelsen ME, Band RA, Pines JM, Massone R, et al. (2010). Impact of time to antibiotics on survival in patients with severe sepsis or septic shock in whom early goal-directed therapy was initiated in the emergency department. Crit Care Med 38: 1045-1053.



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Abstracts

XVI Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología
Clínica (SEIMC)

Bilbao, 9-11 de mayo de 2012

levaduras, sin embargo el procedimiento estándar, que requiere una extracción previa, es laborioso para la rutina normal del laboratorio. Van Herendael et al (Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011) describen una modificación de este procedimiento, con el cual realizan una extracción rápida consiguiendo acortar el tiempo y la laboriosidad, obteniendo buenos resultados en la identificación.

Objetivos: Determinar la utilidad de esta técnica comparándolo con el sistema de identificación habitual Vitek 2 ID YST (bioMérieux®).

Material y métodos: Se analizaron un total de 122 aislados de levaduras (procedente de cultivo de 18-24 horas en medio Sabouraud). La técnica consiste en poner la colonia en el pocillo de la tarjeta, añadir 1 µL de ácido fórmico (70%) y dejar secar 1 minuto, posteriormente añadir 1 µL matriz y dejar secar. Estos autores consideran como válido para identificación a nivel de especie un score mínimo de 1,7. La identificación por Vitek 2 ID YST (bioMérieux®) se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

Resultados: Ver tabla.

Conclusiones: La identificación de levaduras por esta técnica muestra una excelente correlación respecto a la identificación realizada a través de la metodología convencional, ofreciéndonos una opción rápida y sencilla de identificar levaduras en la rutina del laboratorio de microbiología. Incluso con scores < 1,7 la identificación a nivel de especie coincide con el sistema habitual, lo cual podría ayudar a la hora de dar una identificación presuntiva y a considerar el protocolo a seguir, sobre todo para aquellas especies con mayores resistencias a antifúngicos.

619. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA MALDI-TOF EN LA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA A PARTIR DE MUESTRA DIRECTA DE ORINA

G.A. March Rosselló, L. Gonçalves da Freitas, M. Justel Álvarez, I.C. López Mestanza, A. Rodríguez Fernández, M.D.C. Gobernado Serrano, E. Álvarez Alonso, M.A. Bratos Pérez y R. Ortiz de Lejarazu

Hospital Clínico de Valladolid.

Introducción: Una de las posibles aplicaciones de la espectrometría de masas (MALDI-TOF) en la rutina de trabajo de un laboratorio de microbiología clínica consiste en realizar las identificaciones microbianas a partir de muestra directa sin previo cultivo de la misma.

Objetivos: Desarrollar un protocolo de centrifugación diferencial que permita la identificación de microorganismos mediante MALDI-TOF a partir de muestra directa de orinas positivas monobacterianas con un recuento > 10⁵ UFC/ml.

Material y métodos: Tamaño muestral. Se estimó una muestra aleatoria de 100 orinas positivas monobacterianas con un recuento > 10⁵ UFC/ml proporcionalmente representativa de las especies microbianas de los urocultivos positivos del HCUV en 2010 (3.272 urocultivos positivos). Procedimiento de trabajo; se comparó el resultado de identificación mediante MALDI-TOF obtenido a partir del cultivo de la muestra con la identificación MALDI-TOF obtenida a partir de muestra

directa de cada orina. Para ello se sembraron las orinas y se guardaron en nevera 24 horas a 4 °C hasta su procesamiento. Protocolo de centrifugación diferencial realizado: se centrifugaron 5 ml de cada orina durante 5 minutos a 700 rpm para retirar las células del sedimento. El sobrenadante obtenido se centrifugó durante 15 minutos a 6.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y del sedimento se realizó un "lavado" resuspendiéndolo en 1 ml de agua de calidad HPLC y centrifugando durante 15 minutos a 6.000 rpm. Con el sedimento obtenido se realiza una extracción etanol/ácido fórmico, realizándose 4 determinaciones por cada muestra. Criterios de validación MALDI-TOF: la espectrometría MALDI-TOF asigna en cada identificación un número del 3 a 0 en relación con la calidad de la identificación. Para cada muestra analiza el software del espectrómetro da un listado de diez microorganismos ordenados de mayor a menor puntuación. Se aplicó el criterio de considerar un resultado como válido si de las 4 determinaciones de cada muestra, la especie bacteriana con mayor puntuación coincidió como mínimo en dos de ellas con una puntuación ≥ 1,4.

Resultados: El porcentaje de identificación a partir de muestra directa mediante MALDI-TOF de orinas positivas monobacterianas se muestra en la tabla. Se obtuvo una concordancia del 100% entre los resultados obtenidos a partir de muestra directa y los obtenidos a partir del cultivo previo de la muestra. La sensibilidad encontrada fue del 90% con un IC del 95% (81,96; 94,84).

Grupo bacteriano	Identificación directa 100 orinas > 10 ⁵ UFC/ml
Enterobacteriaceae	74/76 (97,4%)
BGNF	3/4 (75%)
Micrococcaceae	1/4 (25%)
Streptococcaceae	12/16 (75%)
Gram -	77/80 (96,3%)
Gram +	13/20 (65%)
Total	90/100 (90%)

Conclusiones: La aplicación del protocolo de centrifugación diferencial descrito permite la identificación directa mediante MALDI-TOF de orinas positivas monobacterianas con recuentos > 10⁵ UFC/ml sin cultivo previo.

620. RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN BACTERIANA EN MUESTRAS DE ORINA Y LA IDENTIFICACIÓN DIRECTA MEDIANTE MALDI-TOF

G.A. March Rosselló, L. Gonçalves da Freitas, M. Justel Álvarez, I.C. López Mestanza, A. Rodríguez Fernández, L. Barrio Revenga, S. Rojo Rello, J.M. Eiros Bouza, M.A. Bratos Pérez y R. Ortiz de Lejarazu

Hospital Clínico de Valladolid.

Introducción: El método MALDI-TOF usado para la rápida identificación (10 minutos) de microorganismos a partir de colonias crecidas

Tabla comunicación 618. Comparación de la identificación de 122 levaduras mediante MALDI-TOF y mediante sistema Vitek 2 ID YST bioMérieux®

Identificación VITEK (nº cepas)	Identificación MALDI-TOF		Correlación en la especie %
	Nº cepas con score ≥ 1,7	Nº cepas con score < 1,7	
<i>Candida glabrata</i> (52)	<i>Candida glabrata</i> (45) No picos (2)	<i>Candida glabrata</i> (5)	96,15%
<i>Candida albicans</i> (19)	<i>Candida albicans</i> (14)	<i>Candida albicans</i> (5)	100%
<i>Candida parapsilosis</i> (18)	<i>Candida parapsilosis</i> (14) <i>Candida orthopsilosis</i> (1)	<i>Candida parapsilosis</i> (2) (0)	88,8% No picos (1)
<i>Candida krusei</i> (10)	<i>Candida krusei</i> (7)	<i>Candida krusei</i> (3)	100%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (8)	<i>Candida robusta</i> (6) No picos (1)	<i>Candida robusta</i> (1)	88,8%
<i>Candida tropicalis</i> (8)	<i>Candida tropicalis</i> (6) No picos (1)	<i>Candida tropicalis</i> (1)	87,5%
<i>Candida lusitanae</i> (3)	<i>Candida lusitanae</i> (3)	(0)	100%
<i>C. dubliniensis</i> (1)	<i>C. dubliniensis</i> (1)	(0)	100%
<i>Candida guilliermondii</i> (1)	<i>Candida guilliermondii</i> (1)	(0)	100%
<i>Trichosporon asahii</i> (1)	No picos (1)	0%	

en medios ordinarios puede permitir en determinadas circunstancias la identificación a partir de muestra directa. Uno de esos supuestos son las orinas monobacterianas. Un punto clave para lograr la identificación directa de orinas mediante MALDI-TOF consiste en obtener un extracto suficientemente enriquecido del microorganismo que se pretende identificar ya que la capacidad de identificación del MALDI-TOF depende de la cantidad de microorganismo depositada sobre la superficie de identificación que a su vez depende de la concentración microbiana de la muestra (UFC/ml).

Objetivos: Estudiar la influencia de la carga bacteriana de la orina en la calidad de la identificación mediante MALDI-TOF a partir de muestra directa.

Material y métodos: Procedimiento de trabajo: se comparó el resultado de identificación mediante MALDI-TOF obtenido a partir del cultivo de la muestra con la identificación MALDI-TOF obtenida a partir de muestra directa de cada orina. Para ello se sembraron 137 orinas y se guardaron en nevera 24 horas a 4 °C hasta su procesamiento. Protocolo de centrifugación diferencial: se centrifugaron 5 ml de cada orina durante 5 minutos a 700 rpm para retirar las células del sedimento. El sobrenadante obtenido se centrifugó durante 15 minutos a 6.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y del sedimento se realizó un "lavado" resuspendiéndolo en 1 ml de agua de calidad HPLC y centrifugando durante 15 minutos a 6.000 rpm. Con el sedimento obtenido se realiza una extracción etanol/ácido fórmico, realizándose 4 determinaciones por cada muestra. Criterios de validación MALDI-TOF: la espectrometría MALDI-TOF asigna en cada identificación un número del 3 a 0 en relación con la calidad de la identificación. Para cada muestra analizada el software del espectrómetro da un listado de diez microorganismos ordenados de mayor a menor puntuación. Se aplicó el criterio de considerar un resultado válido si de las 4 determinaciones de cada muestra, la especie bacteriana con mayor puntuación coincidió como mínimo en dos de ellas con una puntuación ≥ 1.4 .

Resultados: Los resultados obtenidos se muestran en la tabla.

Conclusiones: Orinas monomicrobianas con concentraciones $< 10^5$ UFC/ml proporcionan porcentajes de identificación directa mediante MALDI-TOF inaceptablemente bajos. El mayor grado de fiabilidad se obtiene con bacterias gram negativas y recuentos $\geq 10^5$ UFC/ml.

621. EVALUACIÓN DE UN ENZIMOINMUNOENSAYO EN LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS DE FASE II FRENTE A COXIELLA BURNETTI

L.A. Arroyo¹, Z. Díaz¹, M. Lara², B. Gómez-Alonso¹, I. Jado³, P. Anda³ y M. Lecuona¹

¹Hospital Universitario de Canarias. La Laguna. Tenerife. ²Complejo Hospitalario Nuestra Señora de Candelaria (CHNSC). La Laguna. Tenerife. ³Centro Nacional de Microbiología. Majadahonda. Madrid.

Introducción y objetivos: La técnica de referencia para el diagnóstico de infección por *Coxiella burnetti* es la inmunofluorescencia indirecta (IFI), aunque resulta laboriosa y puede estar sujeta a interpretación subjetiva. Para hospitales con alta carga asistencial, un enzimoinmunoensayo (EIA) supondría una alternativa al estar automatizado, aunque no existen muchos estudios comparativos. El objetivo fue evaluar la detección de anticuerpos IgM e IgG de fase II frente a *C. burnetti* en un estudio prospectivo y en un brote epidémico, utilizando un EIA de Vircell® en comparación con la IFI como técnica de referencia.

Material y métodos: De modo prospectivo, se incluyeron en el estudio todos los sueros recibidos en el CHNSC para determinación de anticuerpos de fase II (n = 128) durante noviembre y diciembre de 2011. Como técnica de referencia se realizó la IFI de Vircell® (Granada) con un título $\geq 1/50$ y $\geq 1/128$ como puntos de corte para la detección de IgM e IgG, respectivamente. De modo retrospectivo, se ensayaron los 41 sueros (incluyendo 27 sueros de individuos expuestos, 9 de no expuestos y 5 de enfermos) disponibles de un

Tabla comuicación 620.

Grupo bacteriano	100 orinas > 105 UFC/ml		14 orinas 50.000 a 100.000 UFC/ml		17 orinas 10.000 a 50.000 UFC/ml		6 orinas < 10.000 UFC/ml	
	Porcentaje identificación	Punt media	Porcentaje identificación	Punt Media	Porcentaje identificación	Punt media	Porcentaje identificación	
Enterobacteriaceae	74/76 (94,7%)	2,07	3/8 (37,5%)	1,65	3/8 (37,5%)	1,456	0/6 (0%)	
BGNNF	3/4 (75%)	1,809	0/2	-	0/3	-	-	
Micrococcaceae	1/4 (25%)	1,528	-	-	0/1	-	-	
Streptococcaceae	12/16 (75%)	1,914	1/4 (25%)	1,608	0/5	-	-	
Gram -	77/80 (96,3%)	2,063	3/10 (30%)	1,65	3/11 (27,3%)	1,456	-	
Gram +	13/20 (65%)	1,885	1/4 (25%)	1,608	0/6	-	-	
Total	90/100 (90%)	2,037	4/14 (28,6%)	1,64	3/17 (17,6%)	1,456	0/6 (0%)	

Tabla comuicación 621.

	IgM		IgG	
	Estudio prospectivo n = 128	Brote epidémico n = 41	Estudio prospectivo n = 128	Brote epidémico n = 41
Prevalencia (%)	3 (2,3)	6 (14,6)	9 (7,0)	14 (34,1)
Concordancia (%)	119/128 (92,9)	35/41 (85,3)	99/128 (77,3)	31/41 (75,6)
Discrepancias (%)	9 (7,1)	6 (14,6)	29 (22,7)	14 (24,4)
Límite detección EIA	$\approx 1/50$	$\approx 1/50$	$\approx 1/64$	$\approx 1/100$
Sensibilidad	66,6*	83,3*	100	71,4*
(IC95%)	(12,5-98,2)	(36,4-99,1)	(62,8-98,9)	(42,0-90,4)
Especificidad	93,6	85,7	75,6	77,7
(IC95%)	(87,3-96,9)	(68,9-94,6)	(66,7-82,8)	(57,2-90,6)
Valor predictivo positivo	20*	50,0*	23,6*	62,5*
(IC95%)	(3,5-55,7)	(20,1-79,8)	(12,0-40,6)	(35,8-83,7)
Valor predictivo negativo	99,1	96,7	100	84
(IC95%)	(94,7-99,9)	(81,4-99,8)	(94,9-99,9)	(63,0-94,7)
Spearman (p < 0,01)	0,34	0,73	0,47	0,47
Falsos positivos: n [intervalo de índice]	8 [1,2-2,2] 2,00	5 [1,29-2,75] 2,03	29 [1,1-4,7] 1,56	6 [1,26-3,13] 1,43
índice mediana				

*Valores cuyo intervalo de confianza incluye el 50%.

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Volumen 31, Especial Congreso 1, Mayo 2013

Publicación mensual



PUBLICACIÓN OFICIAL
DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA
DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS
Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

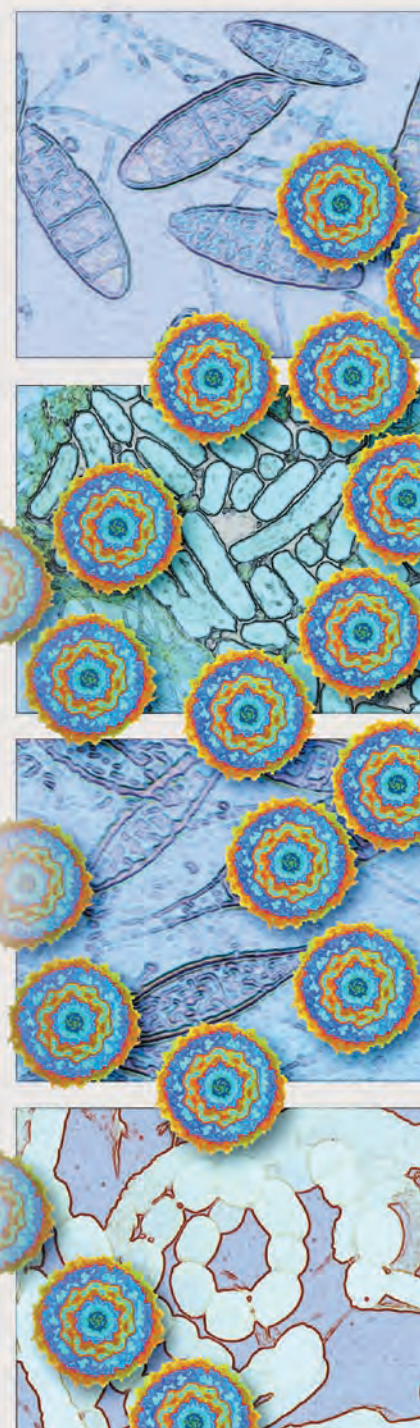
XVII Congreso de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología
Clínica (SEIMC)

Zaragoza, 29-31 de mayo de 2013



www.elsevier.es/eimc

Incluida en: Index Medicus/MEDLINE
Excerpta Medica/EMBASE
Current Contents/Clinical Medicine
ISI Alerting Services
Science Citation Index-Expanded
Journal Citation Reports
SCOPUS



da sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de VIH así como en la diferenciación del VIH-1, destacando los buenos resultados obtenidos con el subtipo no B y el grupo O. Por todo ello, consideramos que este sistema es una buena alternativa como prueba de confirmación en el diagnóstico de VIH.

656. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS CORINEFORMES DE INTERÉS CLÍNICO CON EL SISTEMA VITEK-MS BASADO EN MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION-TIME OF FLIGHT (MALDI-TOF)

C. Salas¹, C. Ruiz de Alegría¹, J. Agüero¹, F. Marco², J. Navas³, C. García de la Fuente¹, J. Vila² y L. Martínez-Martínez²

¹Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander. ²Hospital Clínic i Provincial. Barcelona. ³Universidad de Cantabria. Santander.

Objetivos: En los últimos años la tecnología "Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF)" ha supuesto un avance en la identificación de microorganismos de interés clínico por su eficacia y rapidez. El objetivo de este estudio es evaluar los resultados obtenidos con el sistema MALDI-TOF VITEK MS™ (V-MS, bioMérieux) en la identificación de cepas clínicas de *Corynebacterium* spp., *Arcanobacterium haemolyticum* y *Rhodococcus equi*.

Material y métodos: Se han estudiado 102 cepas aisladas de muestras clínicas en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, incluyendo 12 *Corynebacterium amycolatum* (CAMY), 6 *C. aurimucosum* (CAUR), 3 *C. glucuronolyticum* (CGLU), 17 *C. jeikeium* (CJEI), 1 *C. minutissimum* (CMIN), 10 *C. pseudodiphtheriticum* (CPSE), 7 *C. propinquum* (CPRO), 11 *C. striatum* (CSTR), 7 *C. urealitycum* (CURE), 4 *C. xerosis* (CXER), 1 *Dietzia maris* (DMAR), 10 *R. equi* (REQU) y 13 *A. haemolyticum* (AHAE). La identificación de referencia se realizó mediante métodos fenotípicos convencionales y API Coryne, complementados con la secuenciación del gen *16S rRNA* y [para discriminar entre CMIN y CAUR, y entre CPSE y CPRO] del gen *rpoB*. Las cepas se analizaron mediante V-MS con la base de datos SARAMIS MS-ID v2 (Anagnos Tee GMBH, bioMérieux), siguiendo las instrucciones del fabricante. Como cepas de referencia se incluyeron las cepas CURE ATCC 43042 y CSTR ATCC 6940.

Resultados: VITEK MS identificó correctamente todas las cepas de CAUR, CGLU, CJEI, CPSE, CSTR, CURE y AHAE. Una de las cepas de CAUR no se pudo discriminar de *C. tuberculostearicum*. VITEK MS identificó la cepa de CMIN como CAUR. Las 12 cepas de CAMY y las 3 de CXER se identificaron por V-MS como CAMY/CXER, pero sin llegar a diferenciarse a nivel de especie. Otro tanto ocurrió con las 7 cepas de CPRO que fueron identificadas por V-MS como CPRO/CPSE, sin diferenciación a nivel de especie. Las 10 cepas de REQU fueron identificadas correctamente a nivel de especie, en seis (60%) de ellas con un nivel de confianza de 99,9% y en las otras 4 no se pudo discriminar entre REQU y otro microorganismo. La cepa de DMAR se identificó correctamente.

Conclusiones: El sistema VITEK MS identifica de forma fiable a nivel de especie la gran mayoría de las bacterias corineformes de más relevancia clínica, aunque debe mejorarse su capacidad para discriminar

entre *C. amycolatum* y *C. xerosis* y entre *C. propinquum* y *C. pseudodiphtheriticum*.

657. PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN MICROBIANA MEDIANTE LA TÉCNICA MALDI-TOF A PARTIR DE MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO

G.A. March Rosselló, L. Gonçalves de Freitas, I.C. López Mestanza, M. Justel Álvarez, A. Rodríguez Fernández, E. Coletta Griborio, E. Álvarez Alonso, L. Barrio Revenga, R. Ortiz de Lejarazu Leonardo y M.A. Bratos Pérez

Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

Introducción y objetivos: Los laboratorios de Microbiología Clínica disponen de medios de enriquecimiento *brain heart infusion* (B.H.I.) y tioglicolato en los que se incuban muestras de exudados, líquidos biológicos, drenajes, etc. A partir de éstos, en caso de ser positivos y no haberse observado crecimiento en las placas de aislamiento, se podría realizar la identificación directa mediante MALDI-TOF sin la necesidad de realizar el subcultivo de los mismos, con lo que se podría lograr un acortamiento del tiempo necesario para llevar a cabo la identificación del microorganismo presente. El objetivo de este trabajo es establecer un protocolo que permita la identificación microbiana mediante MALDI-TOF a partir de los medios de enriquecimiento en los que se incuban diferentes muestras.

Material y métodos: Se procesaron 82 caldos B.H.I. y 18 caldos tioglicolato en los que se sembraron 76 exudados de herida, 15 drenajes, cinco líquidos biológicos y cuatro muestras de biopsias. Para llevar a cabo la identificación directa (MALDI-TOF) se centrifugaron 4 ml de medio durante 5 minutos a 6.000 rpm. Con el sedimento obtenido se realizó la extracción de proteínas mediante la técnica etanol/ácido fórmico. Con el sobrenadante obtenido de cada muestra a analizar se realizaron cuatro *spots* de 1 µl cada uno, se añadió 1 µl de matriz sobre cada depósito y se procedió a su lectura. Para la interpretación de los resultados se consideró que un microorganismo era correctamente identificado mediante MALDI-TOF cuando realizadas cuatro lecturas de una misma muestra se obtuvieron como mínimo dos lecturas con la misma propuesta de identificación a nivel de especie en el primer microorganismo del listado y ambas con un score ≥ 1.400 , comparando cada identificación directa con la obtenida a partir de las colonias presentes en el cultivo de la muestra (*gold standard*).

Resultados: De los 82 caldos B.H.I. siete proporcionaron crecimiento de dos microorganismos. En cinco de ellos se identificaron correctamente uno de los dos microorganismos presentes (dos cepas de *Enterococcus faecalis*, una de *Staphylococcus epidermidis*, una de *Acinetobacter baumannii* y una de *Streptococcus anginosus*). Los otros dos caldos no proporcionaron picos de identificación. Los resultados de los 75 caldos B.H.I. monomicrobianos se muestran en la tabla. Los 18 tioglicolatos fueron todos ellos monomicrobianos y solo se logró una identificación directa correcta de una cepa de *E. cloacae*.

Conclusiones: El sistema MALDI-TOF permite la identificación microbiana a partir de B.H.I. sin subcultivo, pero no a partir del tioglicolato. Esto redundará en una anticipación diagnóstica de 24 horas.

Tabla. (Comunicación 657) Identificaciones realizadas mediante MALDI-TOF a partir de 75 caldos B.H.I monobacterianos

Grupo bacteriano	Identificación en el cultivo N	Identificaciones directas válidas n (%)	Score medio
Bacilos gramnegativos	14	14 (100)	2.298
<i>Enterobacteriaceae</i>	10	10 (100)	2.321
NFGNR	4	4 (100)	2.239
Gram positivos	58	53 (91,4)	2.045
<i>Staphylococcus</i>	31	30 (96,8)	2.026
<i>Streptococcus</i>	6	2 (33,3)	1.701
<i>Enterococcus</i>	20	20 (100)	2.121
Bacilos grampositivos	1	1 (100)	1.853
Levaduras	3	3 (100)	2.112
Total	75	70 (93,3)	2.098

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Volumen 32, Especial Congreso 1, Abril 2014

Publicación mensual



PUBLICACIÓN OFICIAL
DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA
DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS
Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

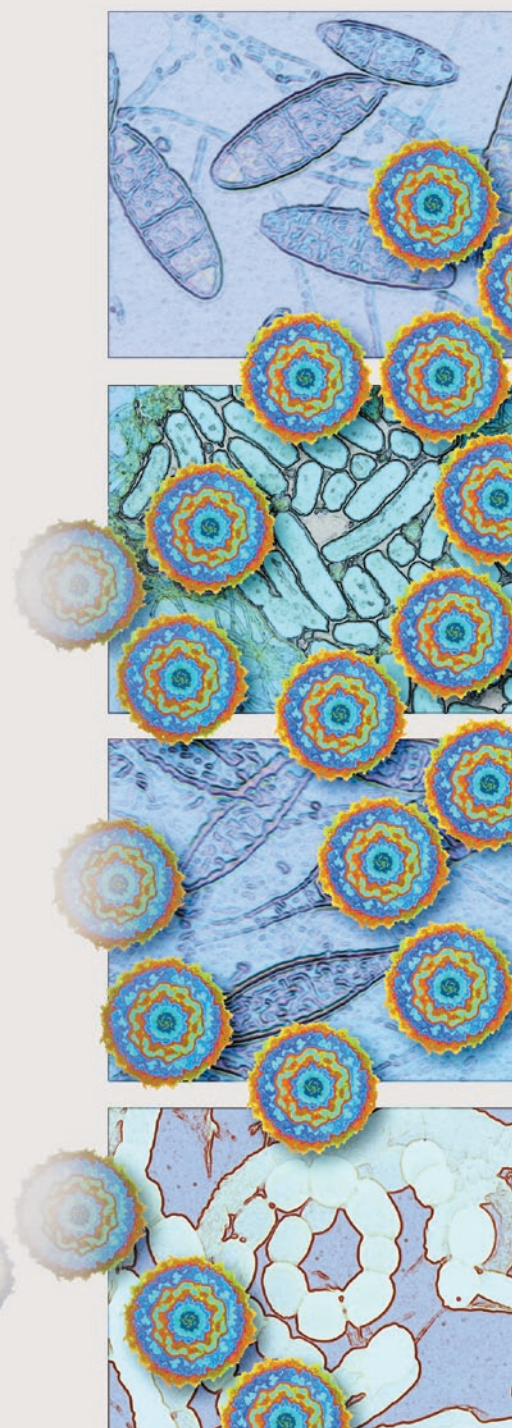
XVIII Congreso de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología
Clínica (SEIMC)

Valencia, 9-11 de abril de 2014



www.elsevier.es/eimc

Incluida en: Index Medicus/MEDLINE
Excerpta Medica/EMBASE
Current Contents/Clinical Medicine
ISI Alerting Services
Science Citation Index-Expanded
Journal Citation Reports
SCOPUS



bacteriaceae productoras BLEE a partir de hemocultivos positivos en 60 min (máximo 180 min), proporcionando al clínico un informe previo de sensibilidad que permite orientar la terapia antibiótica. El método desarrollado presenta una sensibilidad del 99% y una especificidad del 100% en la detección de BLEE.

556. DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE ENTEROCOCOS A AMPICILINA A PARTIR DE FRASCOS DE HEMOCULTIVO CRECIDOS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

G.A. March Rosselló¹, M.C. García Loygorri², M. Simarro Grande¹, M.P. Gutiérrez Rodríguez¹, A. Orduña Domingo³ y M.A. Bratos Pérez³

¹Universidad de Valladolid. ²Hospital Comarcal. Medina del Campo.

³Hospital Clínico Universitario. Valladolid.

Introducción y objetivos: Las infecciones bacterianas graves requieren la administración del antibiótico adecuado con la mayor prontitud posible. El objetivo es determinar la susceptibilidad de enterococos a ampicilina a partir del frasco de hemocultivo crecido.

Material y métodos: La identificación directa de la bacteria presente en diez frascos de hemocultivo (Becton Dickinson) fue realizada mediante el sistema MALDI-TOF (Bruker Daltonik) aplicando un protocolo de centrifugación diferencial. Para realizar el antibiograma directo se prepararon tres tubos con 30 ml de Müeller-hinton, uno sin antibiótico (control) y dos con ampicilina a las concentraciones de punto de corte del CLSI. Cada uno de los tubos se inoculó con una alícuota del frasco de hemocultivo crecido para alcanzar una concentración inicial de 40 a 90 bacterias/µl. Los tubos se incubaron al baño maría a 37 °C y se determinó la concentración bacteriana a los 60, 120 y 180 minutos de incubación mediante el citómetro de flujo Sysmex UF-1000i (Sysmex Corporation). Los hemocultivos se sembraron en las placas de aislamiento y las placas se incubaron a 37 °C con 5% CO₂ durante 24 horas. Con las colonias obtenidas se realizó la identificación mediante MALDI-TOF y se determinó la susceptibilidad mediante E-test (BioMérieux), VITEK 2 (BioMérieux) y MicroScan (Siemens). Estos resultados fueron considerados como *gold standard*.

Resultados: Los recuentos obtenidos se muestran en la tabla. A los 60 minutos de incubación se observa que las cepas sensibles a ampicilina proporcionan un recuento menor que las cepas del cultivo control; a los 120 y minutos esta diferencia se acusó más. En cambio, las cepas resistentes proporcionan recuentos muy similares a los del grupo control a los diferentes tiempos de incubación.

Conclusiones: El recuento microbiano obtenido mediante citometría de flujo permite predecir la susceptibilidad de los enterococos a ampicilina en un tiempo de una hora desde que el frasco de hemocultivo es marcado como positivo por el sistema de incubación.

557. EVALUACIÓN DE LAS PLACAS CROMOGENICAS CHROMID CARBA Y CHROMID OXA-48 PARA LA DETECCIÓN DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASA OXA-48 SENSIBLES A CEFALOSPORINAS

F. Lázaro Perona¹, C. Casares Peinado², C. Colliga Jiménez¹, R. Gómez-Gil Mira¹, J. García Rodríguez¹ y G. Ruiz Carrascoso¹

¹Hospital Universitario La Paz. Madrid. ²Hospital Puerta de Hierro. Majadahonda.

Introducción: Tradicionalmente para la detección de pacientes colonizados por bacterias multirresistentes se han utilizado medios selectivos que contienen cefalosporinas de 3ª generación (C3G) en su composición. Las enterobacterias productoras de carbapenemasa OXA-48 (EPOXA-48) portan en la mayoría de los casos una BLEE que permitiría su detección con placas selectivas que contienen C3G. El objetivo de este estudio es evaluar 2 placas cromogénicas comerciales para la detección de EPOXA-48 sensibles a las cefalosporinas que no serían detectadas con los medios fabricados con C3G.

Material y métodos: En el contexto de un brote por *Klebsiella pneumoniae* productora de OXA-48 y BLEE, se recogieron de forma retrospectiva aquellas cepas de EPOXA-48 sensibles a cefalosporinas de amplio espectro aisladas en muestras clínicas en el Hospital Universitario La Paz desde diciembre de 2010 hasta agosto de 2013. La sensibilidad antibiótica se realizó mediante los sistemas WIDER (Soria Melguizo), VITEK (BioMérieux) y/o E-test, estableciéndose los puntos de corte en función del CLSI. Todas las enterobacterias sospechosas de ser EPOXA-48 por los métodos fenotípicos habituales (antibiograma y test de Hodge Modificado) fueron confirmadas mediante técnicas de PCR específica. A partir de un cultivo en agar sangre (AS), se inoculó una colonia de los aislados estudiados en placas que contienen C3G: agar McConkey con 4 mg/L de cefotaxima utilizada en la rutina habitual (MCF) y chromID ESBL (BioMérieux); en las placas evaluadas: chromID CARBA y chromID OXA-48 (BioMérieux); y en placas de AS como control de crecimiento. La lectura de las placas se realizó a las 18-24 horas según las indicaciones del fabricante.

Resultados: Se procesaron con las placas utilizadas para los estudios de colonización 20 aislados de EPOXA-48 sensibles a cefalosporinas y obtenidos de muestras clínicas de 19 pacientes: *Escherichia coli* (n = 10), *Klebsiella pneumoniae* (8), *Klebsiella oxytoca* (1) y *Serratia marcescens* (1). Todos los aislados crecieron en la placa chromID OXA-48 (100%), 14 (70%) en la placa chromID CARBA y 1 (5%) en la placa MCF. Ningún aislado creció en la placa chromID ESBL.

Conclusiones: El medio chromID OXA-48 fue el que presentó una mayor sensibilidad para la detección de EPOXA-48 sensibles a cefalosporinas de amplio espectro.

Tabla. (Comunicación 556) Recuentos bacterianos (bacterias/µl) obtenidos mediante el Sysmex UF-1000i en 10 cepas de enterococos analizadas

Bacteria estudiada	Susceptibilidad a ampicilina	Tiempos de incubación								
		60 minutos			120 minutos			180 minutos		
		Control	[S]	[R]	Control	[S]	[R]	Control	[S]	[R]
<i>E. faecalis</i>	Sensible	308	180	176	1.257	104	100	8.760	349	312
<i>E. faecalis</i>	Sensible	544	205	218	1.543	191	166	10.921	322	243
<i>E. faecalis</i>	Sensible	730	374	346	3.454	566	434	20.332	763	860
<i>E. faecalis</i>	Sensible	686	399	394	5.430	432	389	43.671	1.532	1.031
<i>E. faecalis</i>	Sensible	872	478	463	7.552	1.093	903	85.430	12.329	11.753
<i>E. faecalis</i>	Sensible	423	241	234	6.437	588	436	7.356	240	175
<i>E. faecalis</i>	Sensible	1.063	647	625	8.751	780	569	98.650	1.064	983
<i>E. faecalis</i>	Sensible	373	144	140	1.774	32	20	28.055	134	67
<i>E. faecium</i>	Resistente	431	422	442	2.649	2.612	2.600	35.630	34.632	35.348
<i>E. faecium</i>	Resistente	876	807	772	1.542	1.404	1.581	7.923	8.002	8.121

ción clínica y microbiológica de este tipo de infecciones es complicada, ya que los microorganismos implicados forman parte de la microbiota de la piel.

562. INFLUENCIA DE LA CONSERVACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE A TEMPERATURA AMBIENTE EN LOS ENSAYOS SEROLÓGICOS

Y. Hoyos Mallecot, A. Sampedro, J. Rodríguez Granger y J.M. Navarro Marí

Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada.

Introducción: Como norma general, se recomienda que las muestras de sangre para estudios serológicos han de transportarse refrigeradas (2-8 °C) si el tiempo desde su obtención hasta su procesamiento es mayor a 2 horas. En muestras de procedencia extrahospitalaria, el cumplimiento de esta recomendación plantea problemas técnicos, pues hace necesario el empleo de neveras portátiles. El objetivo de este estudio ha sido ver la influencia de la conservación de muestras de sangre a temperatura ambiente en los ensayos serológicos.

Material y métodos: Muestras: hemos analizado 140 muestras de sangre anticoagulada (tubos: 8,5 mL BD Vacutainer® Plastic PPT tube with Pearl White BD Hemogard™ closure, Mylar, CE Mark label. Additive: Polyester based (SST) polymer gel and spray dried K2EDTA), recibidas en nuestro laboratorio, con estatus serológico frente a VIH, VHB y VHC previo conocido, y cuyo tiempo de transporte no excedió de 2 h. De cada muestra se separó una alícuota (2 ml) que se dejó a temperatura ambiente (22-25 grados) durante 24 h., mientras que el resto de sangre en el tubo original se centrifugó y proceso esa misma mañana. Ensayos serológicos: los ensayos realizados y número de muestras en cada ensayo fueron: anti-VIH (n = 54; 34 positivos y 20 negativos), anti-VHC (n = 54; 36 positivos y 18 negativos), Ags VHB, (n = 32; 24 positivos y 8 negativos), anti-core VHB (n = 32; 26 positivos y 6 negativos), antígeno e VHB (n = 32; 0 positivos y 32 negativos) y anti antígeno e VHB (n = 32; 22 positivos y 10 negativos). Todos los ensayos serológicos se realizaron por quimioluminiscencia en una plataforma Advia Centaur (Siemens). La comparación de los resultados de cada muestra conservada a temperatura ambiente y analizada la misma mañana se realizó cualitativa y cuantitativamente (Unidades Relativas de Luz, RLU).

Resultados: La comparación cualitativa de los resultados en las 236 determinaciones estudiadas no ofreció ninguna discrepancia en ninguno de los ensayos realizados, tanto en muestras negativas como positivas. En la comparación cuantitativa, tan solo se observó un cambio significativo ($p = 0,003$) en los valores de RLU en los ensayos de CLIA para la determinación de anti-VHC de muestras positivas.

Conclusiones: Según estos resultados parece que no es necesaria una refrigeración por debajo de 22 grados si las muestras se procesan en menos de 24 horas desde la extracción. Serían necesarios más estudios para comprobar si esto también es válido con otros formatos de ensayo y para otras determinaciones.

563. EVALUACIÓN DE LOS ENSAYOS ARCHTECT® EBV VCA IGG, VCA IGM Y EBNA-1 IGG (ABBOTT DIAGNOSTICS) PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE AL VIRUS DE EPSTEIN-BARR

I. Corrales, E. Giménez, S. Poujois, X. Marcano y D. Navarro

Hospital Clínico Universitario. Valencia.

Introducción: La detección de anticuerpos específicos frente a distintas proteínas antigénicas del virus de Epstein-Barr constituye la base diagnóstica de la infección primaria sintomática (mononucleosis infecciosa) por este virus y de la constatación de la exposición previa a este virus, información crítica en el marco del trasplante de órgano sólido. En este estudio, evaluamos las prestaciones analíticas

de tres inmunoensayos quimioluminiscentes comercializados por Abbott Diagnostics para su ejecución en la plataforma ARCHTECT® en relación con técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) de referencia.

Material y métodos: Se ha analizado mediante los ensayos ARCHTECT aludidos un panel de 365 sueros previamente caracterizado mediante IFI con los siguientes perfiles serológicos: (1) VCA IgG -/VCA IgM-/EBNA IgG- (n = 51); (2) VCA IgG-/VCA IgM+/EBNA IgG- (n = 76); (3) VCA IgG+/VCA IgM+/EBNA IgG- (n = 77); (4) VCA IgG+/VCA IgM+/EBNA IgG+ (n = 40); (5) VCA IgG+/VCA IgM-/EBNA IgG+ (n = 61); (6) VCA IgG+/VCA IgM-/EBNA IgG- (n = 38); (7) VCA IgG-/VCA IgM-/EBNA IgG+ (n = 22). En el primer análisis, se consideró que los perfiles 2,3,6 se correspondían con una infección primaria, el perfil 5 con una infección pasada y el perfil 1 con la ausencia de infección previa. En el segundo análisis consideró que solo los perfiles 2,3 se correspondían con una infección primaria.

Resultados: La concordancia (índice Kappa) de los resultados obtenidos mediante los inmunoensayos y las IFIs fue la siguiente: 0,825 ($p \leq 0,001$) para VCA IgM, 0,869 ($p \leq 0,0001$) para VCA IgG y 0,940 ($p \leq 0,0001$) para EBNA- IgG. La sensibilidad fue de un 99,23% para la prueba VCA IgG, 91,08% para VCA IgM y 96,77% para EBNA-1 IgG, y las especificidades fueron 86,27%, 99,48% y 99,16%, respectivamente. El primer análisis por perfiles mostró que los inmunoensayos de ARCHTECT filieron la seronegatividad, la infección primaria y la infección pasada con una sensibilidad de 94,12%, 87,01% y 96,72%, respectivamente y una especificidad de 93,68%, 97,30% y 96,49%, respectivamente. En el segundo, la sensibilidad fue de 94,12%, 89,36% y 96,72%, respectivamente y la especificidad de 94,55%, 100% y 100%, respectivamente.

Conclusiones: El rendimiento de los inmunoensayos quimioluminiscentes ARCHTECT es adecuado para el diagnóstico de la infección primaria y la caracterización del estatus serológico frente al VEB.

564. NUEVO ALGORITMO PARA LA IDENTIFICACIÓN MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MALDI-TOF) A PARTIR DE MUESTRA DIRECTA DE ORINA

G.A. March Rosselló¹, M.F. Muñoz Moreno², E. Álvarez Alonso², L. Barrio Revenga², R. Ortiz de Lejarazu Leonardo² y M.A. Bratos Pérez²

¹Universidad de Valladolid. Valladolid. ²Hospital Clínico Universitario. Valladolid.

Introducción y objetivos: El sistema MALDI-TOF permite realizar una identificación bacteriana rápida a partir de muestra directa. Para la validación de las identificaciones obtenidas directamente de la muestra se han publicado varios criterios en los que se ha rebajado el nivel de exigencia con respecto a los criterios de los fabricantes. El objetivo de este trabajo es proponer un nuevo criterio de validación de los resultados obtenidos a partir de muestra directa de orina.

Material y métodos: Se procesaron 137 muestras de orina monomicrobianas. Las muestras se sembraron en placas de aislamiento y, una vez crecidas las colonias, se realizó recuento de las mismas y la identificación mediante MALDI-TOF aplicando los criterios del fabricante. Esta identificación fue considerada como *gold standard*. Para la identificación directa se centrifugaron 5 ml de orina durante 5 minutos a 700 rpm. El sobrenadante se centrifugó 15 minutos a 6.000 rpm. El sedimento se resuspendió en 1 ml de agua y se centrifugó 15 minutos a 6.000 rpm. El sedimento se mezcló con 300 µl de agua y 900 µl de etanol absoluto y se centrifugó 2 minutos a 13.000 rpm. Se añadieron 25 µl de ácido fórmico al 70% y 25 µl de acetonitrilo al sedimento y se centrifugó 1 minuto a 13.000 rpm. Con el sobrenadante obtenido se realizaron cuatro *spots* de 1 µl cada uno en cuatro lugares de la tarjeta portamuestras. Se dejaron secar y se añadió 1 µl de matriz sobre cada *spot* a analizar. Se dejó secar y se procedió a la lectura. Equipo utiliza-

do: Microflex® Bruker Daltonics. El software proporcionado del fabricante proporciona, para cada lectura realizada, un listado de diez microorganismos como identificaciones más probables ordenados de mayor a menor puntuación. Según el fabricante se aceptan como identificaciones válidas aquellas que proporcionan una puntuación ≥ 2.000 en el primer microorganismo del listado.

Resultados: 100 orinas presentaron un recuento $\geq 1 \cdot 10^5$ CFU/ml, 14 entre $5 \cdot 10^4$ y $1 \cdot 10^5$ UFC/ml, 17 entre $1 \cdot 10^4$ y $5 \cdot 10^4$ CFU/ml, y 6 $< 1 \cdot 10^4$ UFC/ml. De todas las combinaciones posibles de las puntuaciones obtenidas de forma directa, la que proporcionó un mayor número de identificaciones directas correctas fue la que consideró que un microorganismo es identificado correctamente mediante MALDI-TOF cuando realizadas cuatro lecturas de una misma muestra se obtienen como mínimo dos lecturas con la misma propuesta de identificación a nivel de especie en el primer microorganismo del listado, y ambas con una puntuación ≥ 1.400 .

Conclusiones: Es posible aumentar la utilidad clínica del MALDI-TOF utilizando un criterio de validación que proporcione un mayor número de identificaciones que el criterio del fabricante.

565. INFLUENCIA DEL CRITERIO DE VALIDACIÓN EN EL PORCENTAJE DE IDENTIFICACIÓN DIRECTA OBTENIDA MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MALDI-TOF) A PARTIR DE MUESTRAS DE ORINA

G.A. March Rosselló¹, I.C. López Mestanza², E. Álvarez Alonso², L. Barrio Revenga², R. Ortiz de Lejarazu Leonardo² y M.A. Bratos Pérez²

¹Universidad de Valladolid. Valladolid. ²Hospital Clínico Universitario. Valladolid.

Introducción y objetivos: El sistema MALDI-TOF es una herramienta utilizada en Microbiología Clínica que permite realizar una identificación microbiana rápida, tanto a partir de colonia como a partir de muestra directa. En la identificación directa, el porcentaje de identificación aceptable depende del criterio de validación utilizado. El objetivo es comparar el rendimiento de nuestro criterio frente al de los otros publicados.

Material y métodos: Se procesaron 137 muestras de orina monomicrobianas: 100 con recuentos $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml y 37 con recuentos $< 1 \cdot 10^5$ UFC/ml. Se realizó un cultivo cuantitativo de las muestras en agar sangre y medio de MacConkey. Una vez crecidas las colonias se

Tabla 1. Comunicación 565

Puntuación	Nivel de identificación MALDI-TOF
De 2.300 y 3.000	Identificación segura de género y alta probabilidad de identificación de especie
De 2.000 y 2.299	Identificación segura de género e identificación probable de especie
De 1.700 a 1.999	Identificación probable de género
De 0.000 a 1.699	Identificación poco fiable

Tabla 2. (Comunicación 565) Resultados de las identificaciones obtenidas mediante MALDI-TOF a partir de 100 orinas monobacterianas en función del criterio de validación adoptado

Criterio utilizado	Identificaciones correctas en 100 orinas con recuentos $\geq 1 \cdot 10^5$ UFC/ml	Significación estadística
Moussaoui et al	84%	(p > 0,05)
Schubert et al	84%	(p > 0,05)
Stevenson et al	84%	(p > 0,05)
La Scola y Raoult	86%	(p > 0,05)
Criterio propuesto	90%	

Tabla 3. (Comunicación 565) Resultados de las identificaciones obtenidas mediante MALDI-TOF a partir de 37 orinas monobacterianas en función del criterio de validación adoptado

Criterio utilizado	Identificaciones correctas en 37 orinas con recuentos $< 1 \cdot 10^5$ UFC/ml, n (%)	Significación estadística
Moussaoui et al	1 (2,7)	(p < 0,05)
Schubert et al	1 (2,7)	(p < 0,05)
Stevenson et al	1 (2,7)	(p < 0,05)
La Scola y Raoult	2 (5,4)	(p > 0,05)
Criterio propuesto	7 (18,9)	

realizó la identificación mediante MALDI-TOF aplicando los criterios del fabricante. Esta identificación fue considerada como *gold standard*. Para lograr la identificación directa, a partir de una alícuota de 5 ml de muestra se realizó una centrifugación a 700 rpm durante 5 minutos; el sobrenadante obtenido se centrifugó a 6.000 rpm durante 15 minutos. Con el sedimento obtenido se realizó la extracción de proteínas etanol/ácido fórmico y se efectuaron cuatro determinaciones por muestra analizada. Equipo utilizado: Microflex® Bruker Daltonics. El software proporciona, para cada lectura realizada, un listado de diez microorganismos como identificaciones más probables ordenados de mayor a menor puntuación. Esta puntuación corresponde a un nivel de identificación (tabla 1). Según Bruker, se aceptan como identificaciones válidas aquellas que proporcionan una puntuación ≥ 2.000 en el primer microorganismo del listado. Los resultados de las puntuaciones de las identificaciones directas obtenidas mediante MALDI-TOF se validan con nuestro criterio y con los publicados. Los porcentajes de identificación obtenidos con los diferentes criterios fueron comparados mediante el test de McNemar.

Resultados: Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 2 y 3. **Conclusiones:** Nuestro criterio ha sido el que ha proporcionado un mayor número de identificaciones aceptables, con independencia de la concentración microbiana.

566. IDENTIFICACIÓN DE ACTINOMYCES DE ORIGEN URINARIO: DESCRIPCIÓN DE 6 CASOS

M. Fernández Vázquez¹, M. Siller Ruiz², J.L. Muñoz Bellido² y M.I. Fernández Natal¹

¹Complejo Asistencial de León. León. ²Hospital Universitario de Salamanca. Salamanca.

Introducción y objetivos: El género *Actinomyces* engloba especies anaerobias y aerotolerantes no formadoras de esporas, gram positivas y con formas que van desde los bacilos ramificados a simples cocobacilos. Típicamente se encuentra asociado a infecciones poli-microbianas en superficies mucosas. La actinomicosis es la presentación clínica más característica y está causada principalmente por *A. israelii*. Las especies más aisladas en clínica son *A. neuii*, mayoritariamente en abscesos, y *A. turicensis*. Los casos de infección urinaria (ITU) descritos son fundamentalmente por *A. turicensis*, mientras otras especies como *A. urogenitalis* se han relacionado con infecciones asociadas a DIUs. El objeto de este estudio ha sido describir bre-