



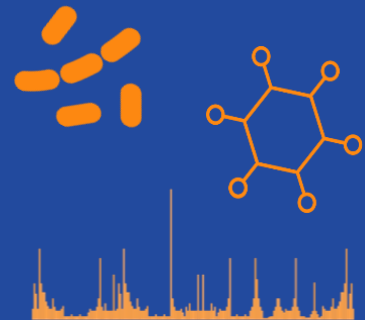
VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**Nuevas aplicaciones del sistema MALDI-
TOF MS en la Microbiología Clínica**

TESIS DOCTORAL

Doctorando:
Ignacio Torres Fink

Director de la tesis:
David Navarro Ortega



VNIVERSITAT (U·V)
DE VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Doctorado en Medicina

Mayo 2022



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA (Q 人)
Facultat de **M**edicina i **O**dontologia

Departamento de Microbiología y Ecología

Doctorado en Medicina

Tesis Doctoral

**NUEVAS APLICACIONES DEL SISTEMA MALDI-TOF
MS EN LA MICROBIOLOGÍA CLÍNICA**

David Navarro Ortega, jefe del Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Clínico Universitario de Valencia y Catedrático de Microbiología de la Universidad de Valencia,

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por el Licenciado Ignacio Torres Fink, titulado “*Nuevas aplicaciones del sistema MALDI-TOF MS en la Microbiología Clínica*” ha sido realizado bajo mi dirección, habiendo sido revisada y estando conforme con su presentación para obtener el grado de Doctor, siempre que así lo considere el tribunal designado por la Universidad de Valencia.

Y para que conste firma el presente certificado en Valencia, a mayo de 2022,



David Navarro Ortega

Agradecimientos

Quién me iba a decir a mí aquel 10 de abril de 2015 que realizar mi formación en Microbiología en el Hospital Clínico de Valencia me iba a dar todo lo bueno que me ha pasado. Siete años más tarde estoy aquí, presentando mi Tesis Doctoral. No voy a dejarlo todo al destino, la consecución de esta Tesis Doctoral supone un gran éxito personal que lleva detrás trabajo, perseverancia y humildad. No hay que verlo como el fin de una etapa sino el inicio de una nueva mejor, si cabe. Como persona de pocas palabras que me caracteriza, no me voy a extender en mis agradecimientos.

Quiero dar las gracias a mis padres y a mi hermano por quererme y apoyarme incondicionalmente, esta tesis también es suya.

Dixie. Doy gracias porque la vida haya cruzado nuestros caminos. Eres la persona más maravillosa que conozco. Nos quedan muchísimas experiencias por vivir y no puedo sentirme más afortunado por ello.

Dar las gracias a toda la gente con la que he tenido la suerte de trabajar durante estos años. Todas ellas han aportado en mi desarrollo personal y profesional. En especial a mis compañeros y amigos Bea, Felipe, Estela, Eliseo, Rocío, Víctor, Alberto y Javier, gracias por dejarme aprender de vosotros y apoyarme. Ni que decir tiene que las tesis no son solo cosa de uno, las tesis son cosa de equipo.

No puedo olvidarme de mis amigos Sevi, Edu y Manu, si soy como soy, también es gracias a ellos.

Por último, mención especial a mi director, David. Darte las gracias por transmitirme tu mentalidad y ambición. Gracias por intentar sacar lo mejor de nosotros. Gracias por cuidarnos y defendernos. Gracias por buscar siempre lo mejor para nosotros. En definitiva, gracias por ser como un padre para nosotros.

A mis padres y a mi hermano

A Dixie

Presentación

Esta tesis doctoral se presenta como compendio de publicaciones en virtud del nuevo Reglamento sobre depósito, evaluación y defensa de la tesis doctoral, aprobado en cumplimiento de lo que disponen el Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado.

Los resultados de esta tesis doctoral se encuentran resumidos en los siguientes artículos científicos:

- I. Torres I, Gimenez E, Pascual T, Bueno F, Huntley D, Martínez M, Navarro D. Short-term incubation of positive blood cultures in brain-heart infusion broth accelerates identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry. *J Med Microbiol*. 2017 Dec;66(12):1752-1758.
- II. Torres I, Pinto C, Oltra R, Pascual T, Carbonell N, Colomina J, Tormo M, Albert E, Aguilar G, Solano C, Navarro D. Early adjustment of empirical antibiotic therapy of bloodstream infections on the basis of direct identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and Gram staining results. *J Infect Chemother*. 2020 Sep;26(9):963-969.
- III. Torres I, Albert E, Giménez E, Olea B, Valdivia A, Pascual T, Huntley D, Sánchez D, Costa RM, Pinto C, Oltra R, Colomina J, Navarro D. Performance of a MALDI-TOF mass spectrometry-based method for rapid detection of third-generation oxymino-cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. from blood cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021 Sep;40(9):1925-1932.
- IV. Torres I, Giménez E, Vinuesa V, Pascual T, Moya JM, Alberola J, Martínez-Sapiña A, Navarro D. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) proteomic profiling of cerebrospinal fluid in the diagnosis of enteroviral meningitis: a proof-of-principle study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018 Dec;37(12):2331-2339.

Abreviaturas y Acrónimos

- °C: Grados centígrados
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ARN: Ácido ribonucleico
- AUC: Área bajo la curva
- BGN: Bacilos Gram-negativos
- BHI: Caldo de infusión Cerebro-Corazón
- BLEE: β -lactamasas de espectro extendido
- Ceph3: oximinocefalosporinas de tercera generación
- CGP: Cocos Gram-positivos
- CMI: Concentración mínima inhibitoria
- CO₂: Dióxido de carbono
- CRO: ceftriaxona
- EV: Enterovirus
- g: fuerza centrífuga relativa
- gr: gramo
- h: hora
- HCCA: ácido α -ciano-3,4-hidroxicinámico
- HCUV: Hospital Clínico Universitario de Valencia
- HMSZ: Hospital Miguel Servet de Zaragoza
- Hz: Hercio
- IC: Inmunocromatográfico
- IC 95%: Intervalo de confianza del 95%
- kDa: kilodalton
- LCR: Líquido cefalorraquídeo
- LFIA: Inmunoensayo de flujo lateral
- MALDI-TOF MS: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight; ionización-desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo
- MDR: multidrug-resistant
- mg: miligramo
- min: minuto
- ml: mililitro
- m/z: masa/carga
- nm: nanometros
- PCR: Polymerase Chain Reaction; Reacción en cadena de la polimerasa
- rpm: revoluciones por minuto
- RT-PCR: Real-Time Polymerase Chain Reaction; Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

- s: segundo
- SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
- SCN: *Staphylococcus* coagulase-negativo
- TCID₅₀: Tissue Culture Infectious Dose 50%
- UFC: Unidades formadoras de colonia
- µl: microlitro
- VHS-1: Virus herpes simplex Tipo 1
- VHS-6: Virus herpes simplex Tipo 6
- VVZ: Virus varicela-zóster
- XDR: extensively drug-resistant

Índice

Agradecimientos	VII
Presentación	XI
Abreviaturas y acrónimos	XIII
Índice	XVII
I. Introducción	1
I.1 La espectrometría de masas MALDI-TOF MS	3
I.1.1 Componentes y funcionamiento de la espectrometría de masas MALDI-TOF MS	4
I.2 Integración de la tecnología MALDI-TOF MS en el laboratorio de Microbiología Clínica	5
I.3 Aplicaciones de la tecnología MALDI-TOF MS en la identificación de microorganismos a partir de colonias aisladas	5
I.3.1 Identificación bacterias y levaduras mediante MALDI-TOF MS a partir de colonias aisladas	6
I.3.2 Identificación micobacterias y hongos filamentosos mediante MALDI-TOF MS a partir de colonias aisladas.....	7
I.4 Aplicaciones de la tecnología MALDI-TOF MS en la identificación de parásitos	9
I.5 Aplicaciones de la tecnología MALDI-TOF MS en la identificación de microorganismos a partir de muestras clínicas	10
I.5.1 Diagnóstico de las infecciones del tracto urinario	10
I.5.2 Diagnóstico de las infecciones del torrente sanguíneo	11
I.5.3 Diagnóstico de meningitis/encefalitis	12
I.6 Impacto clínico y económico de MALDI-TOF MS en el diagnóstico rápido y la integración en los programas de administración de antimicrobianos	13
I.7 Aplicación e impacto de la tecnología MALDI-TOF MS en la detección de resistencias bacterianas	15
II. Hipótesis	19
III. Objetivos	23
III.1 Desarrollo de un nuevo método para la identificación rápida de bacterias directamente de hemocultivos positivos	25

III.2 Realizar un estudio cuasiexperimental pre-post destinado a evaluar el valor potencial de agregar una identificación bacteriana rápida por MALDI-TOF MS a la información proporcionada por la tinción de Gram para adaptar regímenes antibióticos empíricos sin guía de administración antimicrobiana en pacientes con bacteriemia ingresados en salas oncohematológicas y de cuidados intensivos	26
III. 3 Desarrollo de un nuevo método fenotípico de cribado rápido de resistencias antibióticas a partir de hemocultivos positivos mediante la tecnología MALDI-TOF MS	27
III. 4 Evaluación de un método MALDI-TOF MS con líquido cefalorraquídeo para el diagnóstico de meningitis/encefalitis víricas	27
IV. Metodología	29
IV.1 Pacientes	31
IV.2 Aislados bacterianos y muestras de sangre y LCR	31
IV.2.1 Aislados bacterianos	31
IV.2.2 Muestras de sangre	32
IV.2.3 Muestras de LCR	33
IV.3 Protocolo de diagnóstico de rutina de bacteriemias	33
IV.4 Identificación bacteriana rápida de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF MS	34
IV.4.1 Procesamiento de hemocultivos positivos	34
IV.4.2 Análisis MALDI-TOF MS	35
IV.5 Evaluación del ajuste de la terapia antibiótica empírica de las infecciones del torrente sanguíneo en base a los resultados de la tinción de Gram y la identificación directa de bacterias mediante MALDI-TOF-MS	35
IV.5.1 Procesamiento de hemocultivos positivos	35
IV.5.2 Análisis de la idoneidad de los ajustes empíricos de la terapia antibiótica	36
IV.6 Detección fenotípica rápida de resistencia a cefalosporinas de 3 ^a generación en <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella spp.</i> de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF MS	38
IV.6.1 Procesamiento de hemocultivos positivos	38
IV.6.2 Análisis MALDI-TOF MS	39
IV.6.3 Detección de BLEE mediante técnica inmunocromatográfica	39
IV.6.4 Estudios de sensibilidad antibiótica y análisis genotípico	39
IV.7 Análisis MALDI-TOF MS de perfiles proteómicos de muestras de LCR	40
IV.8 Definiciones	41

IV.9 Análisis estadístico	41
V. Resultados y Discusión	43
VI. Conclusiones	87
VII. Bibliografía	91
VIII. Anexos	101
VIII.1 Escrito del director de la Tesis Doctoral sobre el factor de impacto de las publicaciones que se recogen en la Tesis Doctoral	103
VIII.2 Informe del director de la Tesis Doctoral sobre la coautoría de las publicaciones compendiadas en la Tesis Doctoral	107
IX. Artículos	109

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

I.1 La espectrometría de masas MALDI-TOF MS

La espectrometría de masas es una técnica de determinación estructural que permite estudiar la distribución de moléculas de una sustancia en función de su masa. Esta tecnología se introdujo en el ámbito del análisis de las biomoléculas al final de la década de los años 70 del siglo pasado con la aparición de diversas técnicas de ionización suave, como la desorción de campo eléctrico, la desorción por plasma y la ionización con átomos rápidos. Estas técnicas permitían la ionización de moléculas termolábiles de gran tamaño, como los péptidos y las proteínas, sin producir la extensiva degradación característica de las denominadas técnicas de ionización dura. Posteriormente, a finales de los años 80, los grupos de Karas y Hillenkamp y Koichi Tanaka desarrollaron, entre otros métodos de ionización suave, la desorción por láser asistida por matriz (MALDI) que presenta como principal diferencia frente al resto de técnicas que utiliza una matriz química para la deposición de la muestra. Este método se constituyó como uno de los pilares básicos de la espectrometría de masas en la proteómica contemporánea (1).

El desarrollo de analizadores de masa de elevada resolución y velocidad de análisis ha ido marcando y ampliando los límites con los que se ha podido abordar el estudio del proteoma por espectrometría de masas en los últimos años. En este contexto, el analizar de tiempo de vuelo (TOF) se basa en el hecho de que los iones acelerados por un campo eléctrico adquieren distintas velocidades según su relación masa/carga (m/z) y por tanto tardan distinto tiempo en recorrer una determinada distancia. La medición del tiempo de vuelo permite determinar de forma precisa la masa de cada uno de estos iones, generando así un espectro de masas de las especies iónicas presentes en la muestra, expresadas en función de su m/z y la abundancia relativa (intensidad) de cada una en la muestra.

De ahí surgió el nombre de MALDI-TOF, que obedece a las siglas *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight* o ionización-desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo. Una de las principales ventajas con respecto a otro tipo de espectrómetros es que éste va a permitir que se produzcan muchas menos fragmentaciones en la muestra y que la interpretación del espectro generado sea más sencilla. Cuánto más grande es la molécula que se quiere analizar, más complejo es el proceso de análisis cuando ésta se fragmenta en múltiples iones. Sin embargo, si la molécula permanece prácticamente intacta, se generará un espectro con un número mínimo de especies iónicas, que será mucho más sencillo de analizar (2).

I.1.1 Componentes y funcionamiento de la espectrometría de masas MALDI-TOF MS

El espectrómetro de masas MALDI-TOF MS está compuesto por: una fuente de ionización, un analizador y un detector. El primer paso del proceso consiste en la co-cristalización de la muestra con la matriz orgánica que permite la producción de iones intactos en fase gaseosa de biomoléculas de gran tamaño, no volátiles y termolábiles, como las proteínas. Para ello, se deposita la muestra en uno de los pocillos de la tarjeta de acero MALDI-TOF MS y, sin necesidad de esperar a que se seque, adicionar un pequeño volumen de matriz, generalmente de ácido α -ciano-3,4-hidroxicinámico (HCCA).

Una vez cristalizado se introduce en una cámara de alto vacío donde es irradiado por un láser de nitrógeno con una longitud de onda de 337 nm. La interacción entre los fotones del láser y la muestra provoca que la matriz sublime a estado gaseoso, arrastrando consigo a la muestra y produciéndose inmediatamente la ionización.

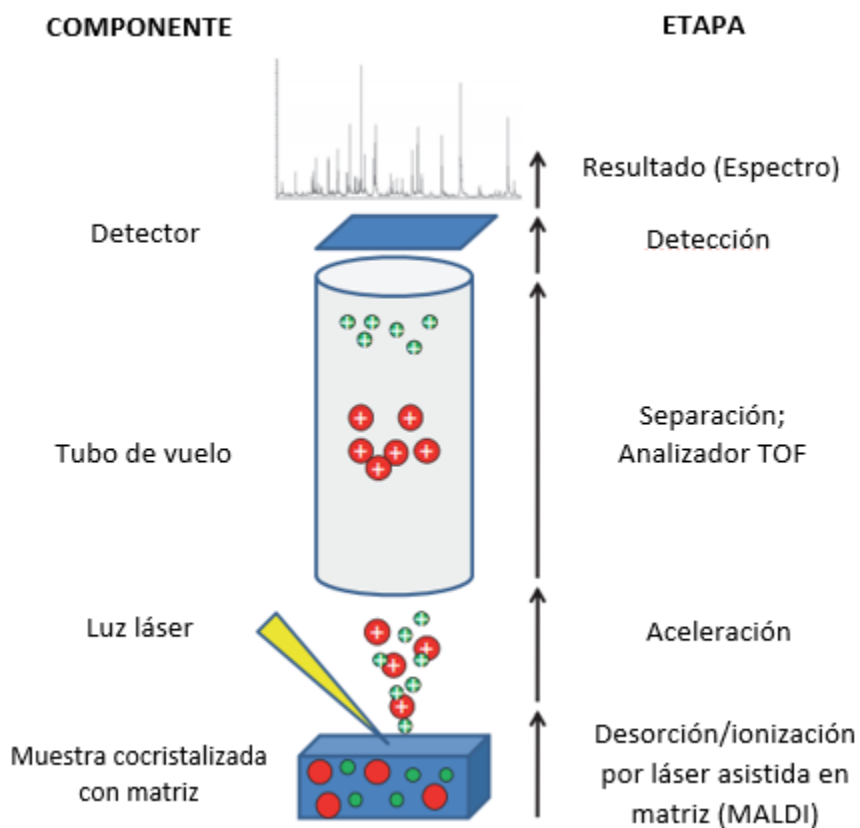


Figura I-1. Esquema de funcionamiento de un equipo de espectrometría de masas MALDI-TOF.

La siguiente fase tras el proceso de ionización es el paso de la muestra por el analizador, el cual genera un potente campo magnético que atrae las partículas cargadas hacia el detector donde se registra el tiempo que tarda un grupo de iones en atravesar este campo, de forma que va a transformar la señal de la corriente de iones en una relación de masas cuya intensidad será la abundancia relativa (2).

Como se ha comentado previamente, una de las principales ventajas de esta tecnología es el análisis de macromoléculas con una fragmentación mínima. Esta característica la convierte en una técnica muy versátil para los laboratorios de Microbiología Clínica.

I.2 Integración de la tecnología MALDI-TOF MS en el laboratorio de Microbiología Clínica

La tecnología MALDI-TOF MS surgió hace casi dos décadas como una técnica para la identificación rápida y se ha consolidado como un instrumento fundamental para los laboratorios de Microbiología Clínica. Con el uso de esta tecnología se pueden detectar proteínas que van de 2 a 20 kDa, o incluso mayores cuando se aplican matrices específicas. Las proteínas ribosómicas se pueden encontrar dentro de este rango y es sobre ellas en las que se basa la identificación por MALDI-TOF MS (3).

Los perfiles de estas proteínas ribosómicas generados se comparan con los perfiles proteicos almacenados para cada microorganismo en las bases de datos del equipo que contienen la gran mayoría de las especies con importancia clínica en los procesos infecciosos.

Las principales ventajas que han permitido la integración de esta tecnología en los laboratorios de Microbiología Clínica son su alto rendimiento, el bajo coste de reactivos y su facilidad de uso. La relevancia de la identificación por MALDI-TOF MS reside en su rapidez para la emisión de resultados, la posibilidad de partir de una pequeña cantidad de muestra y su precisión para identificar microorganismos, incluso aquellos que resulta difícil realizarlo por métodos convencionales (2).

I.3 Aplicaciones de la tecnología MALDI-TOF MS en la identificación de microorganismos a partir de colonias aisladas

En Microbiología Clínica, la identificación de microorganismos en muestras de pacientes de una manera rápida, fiable y rentable puede ser crucial para iniciar el tratamiento adecuado, así como para definir los riesgos asociados que impactan en el

paciente y, potencialmente, a otros pacientes y personal sanitario que está en contacto con la fuente (4).

La espectrometría de masas MALDI-TOF MS ofrece la posibilidad de obtener la identificación microbiana en cuestión de minutos a partir de los aislamientos cultivados, en lugar de retrasarse horas o días que habitualmente se requieren para las caracterizaciones fenotípicas y genotípicas tradicionales.

I.3.1 Identificación bacterias y levaduras mediante MALDI-TOF MS a partir de colonias aisladas

Las Enterobacterias son uno de los grupos de microorganismos que más frecuentemente se aíslan en los laboratorios de Microbiología Clínica, pudiendo causar una gran variedad de infecciones tanto a nivel comunitario como a nivel nosocomial. Su identificación mediante métodos fenotípicos supone una importante carga de trabajo para los laboratorios, por lo que la identificación rápida, fiable y coste-eficaz que proporciona la tecnología MALDI-TOF MS ha permitido su sencilla integración en las rutinas de trabajo.

Se ha demostrado ampliamente que prácticamente todas las especies con importancia clínica de este grupo se identifican con una alta precisión mediante esta técnica (5). Solo presenta algunas limitaciones, como la identificación errónea de *Shigella* spp. como *Escherichia coli* y la discriminación limitada para las especies de *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y *Salmonella entérica*.

Algo similar ocurre con los bacilos Gram-negativos no fermentadores que son causantes de infecciones graves en el contexto nosocomial y en pacientes inmunodeprimidos, siendo además frecuentes colonizadores del tracto respiratorio en pacientes con fibrosis quística. Estas bacterias se identifican con una elevada precisión en torno al 95% de los casos (6). Sin embargo, otros géneros bacterianos pertenecientes a este grupo presentan mayor dificultad para obtener la identificación a nivel complejo (complejo de *Burkholderia cepacia* y complejo de *Acinetobacter baumannii*) o a nivel especie (*Achromobacter* spp., *Chryseobacterium* spp. o *Ralstonia* spp.) debido a la alta homología que presentan las especies.

Otras bacterias Gram-negativas como las pertenecientes al grupo HACEK o similares, que se asocian a procesos infecciosos graves y que suelen presentar dificultades a la hora de la identificación por los enfoques tradicionales debido a su crecimiento

fastidioso, también es posible identificarlas con gran éxito utilizando la tecnología MALDI-TOF MS (7).

En cuanto a las bacterias anaerobias, MALDI-TOF MS ha demostrado una precisión en la identificación a nivel especie similar a las técnicas moleculares, pero de una manera más rápida y rentable (8).

Las bacterias Gram-positivas siempre han representado un gran desafío para MALDI-TOF MS debido a la compleja composición de su pared celular y a la estrecha relación de las especies dentro de los principales géneros. De ahí que la aplicación de esta tecnología haya proporcionado menores tasas de identificación en este grupo de microorganismos que en las bacterias Gram-negativas. El uso de ácido fórmico para la extracción de proteínas directamente en la tarjeta MALDI-TOF MS ha mejorado considerablemente estas tasas de identificación, aunque todavía hay algunas especies que solo pueden obtenerse a nivel de complejo como es el caso de *Streptococcus pneumoniae* y las especies pertenecientes al complejo *Streptococcus mitis* donde hacen falta otro tipo de pruebas fenotípicas para confirmar la identificación (9).

En el caso de las levaduras, la identificación a partir de colonia aislada mediante la tecnología MALDI-TOF MS también se ha convertido en la técnica de referencia debido, como ya hemos comentado anteriormente, a su sencillez de realización y a su elevada sensibilidad y especificidad. Si bien es cierto, que esta identificación para los géneros comúnmente encontrados como *Candida* y *Cryptococcus* se ve muy favorecida cuando se realiza una extracción in-target con ácido fórmico (3).

Es posible que todas las limitaciones puedan superarse en el futuro mediante el enriquecimiento de las bases de datos o la existencia de algoritmos de identificación más refinados.

I.3.2 Identificación micobacterias y hongos filamentosos mediante MALDI-TOF MS a partir de colonias aisladas

Aunque la discriminación de las especies pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* sigue siendo uno de los principales retos que MALDI-TOF MS debería superar en un futuro próximo, sí que se ha logrado con bastante éxito en los últimos años la identificación de las especies no tuberculosas gracias al desarrollo de bases de datos completas y actualizadas y al desarrollo de métodos estandarizados de procesamiento de las muestras (10). Este procedimiento consiste en la aplicación de un paso de sonicación o método mecánico con perlas de cristal para la ruptura de la pared

celular de las micobacterias inactivadas previamente con calor, seguido de un proceso de extracción de proteínas con ácido fórmico y acetonitrilo. Este proceso permite la identificación de las especies no tuberculosas de forma fiable y con una precisión comparable a la obtenida mediante métodos moleculares, teniendo un tiempo de respuesta de alrededor de 1 hora. Una de las ventajas de este método es que se puede realizar tanto de medio líquido como de medio sólido.

Ya hay alguno estudio (11) que ha conseguido con éxito la diferenciación de las especies pertenecientes al complejo *Mycobacterium avium* complex gracias a la presencia/ausencia de picos específicos de especie.

De la misma manera que en las micobacterias, los Actinomycetales de interés clínico como los géneros *Nocardia* y *Streptomyces* también requieren la ruptura de la pared celular para ser identificados con precisión por MALDI-TOF MS.

La adaptación del proceso de preparación de los aislados de hongos filamentosos para su identificación por MALDI-TOF MS ha sido mucho más lenta que para las levaduras. Más bien, ha seguido unos pasos similares a los explicados anteriormente para las micobacterias. La dificultad de la identificación por MALDI-TOF MS es debida a tres factores que son la necesidad de aplicar métodos mecánicos para romper la pared celular, la mayor complejidad de estas especies eucariotas con respecto a las bacterias y que el patrón de proteínas cambia con el tiempo. Además, la falta de bases de datos exhaustivas ha provocado que diferentes autores construyeran bibliotecas internas propias. Aunque todavía no se dispone de ningún método estandarizado, algunos autores han aplicado la combinación de métodos mecánicos y métodos químicos seguidos de un proceso de extracción de proteínas con resultados exitosos (12).

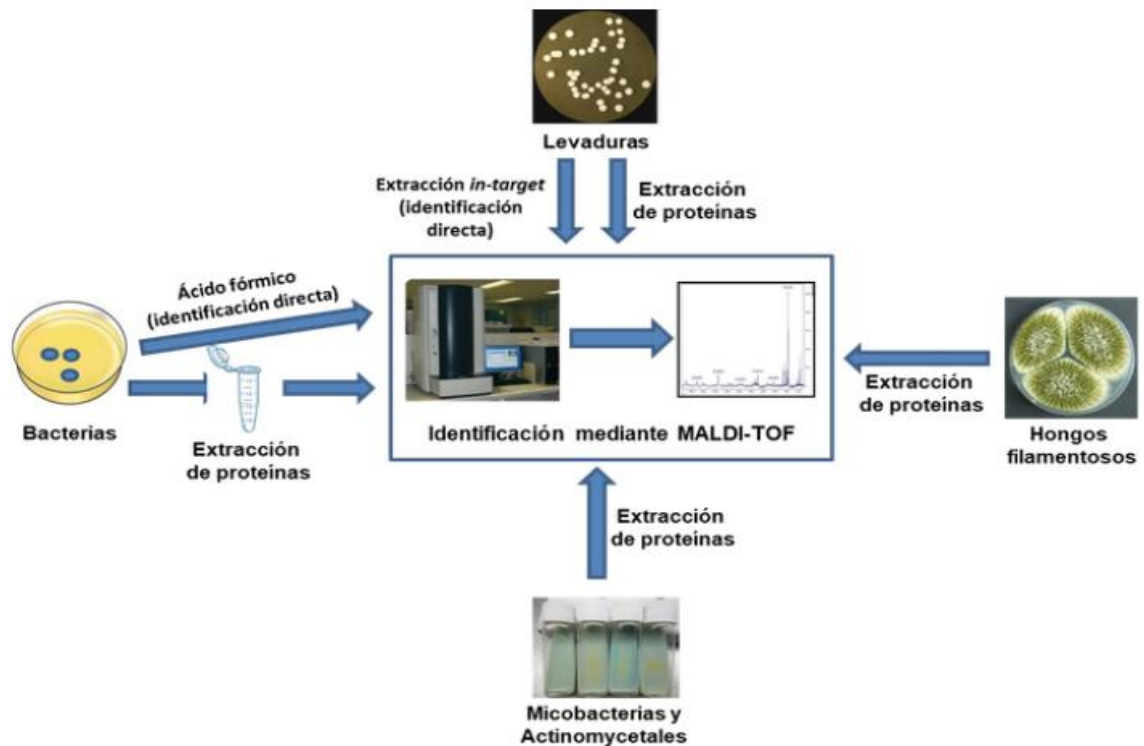


Figura I-2. Diagrama de trabajo de un equipo de espectrometría de masas MALDI-TOF para la identificación de diferentes microorganismos.

I.4 Aplicaciones de la tecnología MALDI-TOF MS en la identificación de parásitos

Existen varias razones por las que la tecnología MALDI-TOF MS no se ha implementado en los laboratorios de Microbiología Clínica para el diagnóstico de las parasitosis. Además de presentar ciclos biológicos complejos que a menudo hacen imposible la obtención de los especímenes, los parásitos suelen presentar diferentes estadios evolutivos (huevos, larvas, quistes, adultos, etc.) que pueden dar lugar a diferentes espectros de masas. En segundo lugar, para muchos grupos de parásitos es necesario la generación de bases de datos de referencia que no está al alcance de muchos laboratorios clínicos. Por último, para obtener espectros de buena calidad se requiere el cultivo in vitro de los parásitos, con la complejidad y lentitud (de días a semanas) que conlleva, o incluso la necesidad de otros microorganismos para crecer (2).

Pese a que se han logrado con resultados exitosos la identificación mediante MALDI-TOF MS a partir de muestras clínicas de diferentes parásitos como *Giardia*, *Cryptosporidium* o *Leishmania* (13), su uso se encuentra relegado a los laboratorios de referencia, siendo necesario resolver algunos inconvenientes para su aplicación en los laboratorios de Microbiología Clínica.

I.5 Aplicaciones de la tecnología MALDI-TOF MS en la identificación de microorganismos a partir de muestras clínicas

Una de las aplicaciones de mayor impacto clínico de MALDI-TOF MS es la identificación directa de microorganismos a partir de muestras clínicas ya que permite adelantar el diagnóstico de las enfermedades infecciosas con respecto a los métodos convencionales y, por consiguiente, la instauración de un tratamiento antimicrobiano adecuando de manera precoz. Sin embargo, este proceso tiene una serie de limitaciones. En primer lugar, esta tecnología requiere una concentración mínima ($1,5 \times 10^5$ - 10^6 bacterias/ml) de microorganismos para obtener espectro de calidad, siendo esta densidad infrecuente en la mayoría de las muestras clínicas. Por otro lado, la presencia de proteínas humanas puede interferir durante el proceso de identificación. Por último, esta técnica es incapaz de discriminar microorganismos que participan en infecciones polimicrobianas.

Actualmente, los tres tipos de muestras a partir de los cuales se han obtenido resultados exitosos de identificación han sido: orina, hemocultivos y líquido cefalorraquídeo (LCR).

I.5.1 Diagnóstico de las infecciones del tracto urinario

Las infecciones del tracto urinario son una de las infecciones bacterianas más comunes y el diagnóstico rápido es esencial para evitar un tratamiento antibiótico empírico inadecuado o innecesario. A menudo, las muestras de orina de pacientes que cursan este proceso infeccioso presentan una concentración bacteriana alta y son monomicrobianas, por lo que son buenas candidatas para el diagnóstico directo por MALDI-TOF MS.

Se han llevado a cabo numerosos estudios destinados a evaluar el rendimiento de esta tecnología para el diagnóstico rápido de las infecciones del tracto urinario. Generalmente, en estos trabajos, se realizaba un cribado previo mediante citometría de flujo seguido de una tinción de Gram con el objetivo de conocer la cantidad de leucocitos y bacterias presentes en la muestra y, de este modo, poder seleccionar aquellas susceptibles de ser analizadas por MALDI-TOF MS. El análisis MALDI-TOF MS posterior al procesamiento de las orinas positivas centrifugación diferencial dio como resultado una concordancia muy buena (85-95%) especialmente para bacterias Gram-negativas (14,15).

Debido al gran número de muestras orinas procesadas por los laboratorios de Microbiología Clínica, es necesario realizar un cribado previo de las mismas pudiendo

utilizar diferentes estrategias. Por ello, al ser una técnica laboriosa, podría reservarse para el diagnóstico de las infecciones del tracto urinario hospitalarias en pacientes graves.

I.5.2 Diagnóstico de las infecciones del torrente sanguíneo

La bacteriemia se define como la presencia de bacterias en el torrente sanguíneo puesta de manifiesto por el aislamiento de éstas en hemocultivos. Cuando, por una respuesta inadecuada del organismo, un retraso en el diagnóstico, o un manejo terapéutico inadecuado, este cuadro evoluciona desfavorablemente, se produce una disfunción orgánica; es decir, una sepsis. Estos procesos se asocian a una mortalidad elevada, que puede oscilar entre el 10% y el 30%, según el tipo de paciente, el origen y el manejo inicial (2). La gravedad de esta entidad clínica requiere la administración temprana de un tratamiento antibiótico apropiado, algo que está bien demostrado que mejora la supervivencia entre los pacientes con infecciones del torrente sanguíneo (16).

En la actualidad, prácticamente todos los laboratorios de Microbiología Clínica disponen de sistemas automatizados de incubación de hemocultivos que alertan de la positividad y, por tanto, aceleran su procesamiento. La realización de una tinción de Gram proporciona cierta información acerca del agente causal de la bacteriemia y permite orientar el tratamiento antimicrobiano. Sin embargo, la identificación y determinación de la susceptibilidad definitivas mediante técnicas tradicionales se retrasa de 24 a 72 horas. Este retraso influye probablemente en la administración de tratamientos empíricos inadecuados, cuya tasa puede alcanzar el 25-30% con el subsiguiente impacto negativo sobre las probabilidades de supervivencia del paciente (2).

La tecnología MALDI-TOF MS se utiliza cada vez más para el diagnóstico etiológico de rutina de infecciones del torrente sanguíneo. La correcta identificación de los microorganismos presentes en los hemocultivos ha sido ampliamente evaluada. Esta identificación requiere un preprocesamiento de la muestra de sangre cultivada con el objetivo de concentrar los patógenos y eliminar las células sanguíneas y las resinas presentes en los frascos de hemocultivo.

Con el fin de mejorar el rendimiento, se han implementado diferentes métodos de preparación de muestras, entre los que destaca el método de extracción de proteínas bacterianas/fúngicas con etanol/ácido fórmico (17). Sin embargo, el uso de estos métodos da como resultado un tiempo de procesamiento práctico adicional y mayores costos. Por ello, se ha desarrollado un enfoque práctico y simple para eludir el paso de extracción de proteínas requerido en la preparación para el análisis MALDI-TOF MS que requiere una incubación corta del hemocultivo positivo en medio sólido para, posteriormente, utilizar

la biomasa bacteriana en crecimiento para identificación microbiana (18). Se ha demostrado que este método facilita la identificación bacteriana muy temprana y fiable a partir de hemocultivos positivos, además de asociarse con una reducción en la duración de la hospitalización y el riesgo de mortalidad en pacientes adultos y pediátricos (19,20).

Independientemente del método utilizado, la tasa de éxito en la identificación utilizando los métodos basados en MALDI-TOF MS está por encima del 80%, siendo superior para las bacterias Gram-negativas (3). Esta tecnología cumple con los requisitos para la implementación como método en la rutina de los laboratorios de Microbiología Clínica, aunque la presencia de infecciones polimicrobianas resulta una limitación por la que la tinción de Gram sigue siendo de obligada realización.

I.5.3 Diagnóstico de meningitis/encefalitis

Las meningitis/encefalitis son una de las manifestaciones más graves y potencialmente mortales dentro de los procesos infecciosos. El diagnóstico precoz y el inicio rápido de la terapia antimicrobiana son vitales (21). Convencionalmente, los patógenos causantes de estos procesos infecciosos han sido detectados mediante tinción de Gram, métodos inmunológicos o métodos moleculares, siendo estos últimos más rápidos, pero más costosos económicamente.

Son varios los trabajos donde se describe la identificación directa de microorganismos en LCR. Se ha identificado *Streptococcus pneumoniae* (22) o *Klebsiella pneumoniae* (21) en pacientes con meningitis bacteriana. Sin embargo, todavía no se ha consolidado como una técnica de rutina para el diagnóstico de estas infecciones. La principal limitación, además del escaso volumen de muestra que recibe el laboratorio, es la baja concentración bacteriana, generalmente inferior a 10^5 bacterias/ml. No obstante, las muestras obtenidas a través de drenajes ventriculares externos podrían presentar una mayor probabilidad de éxito en la identificación MALDI-TOF MS, debido a su mayor volumen y densidad bacteriana.

Desafortunadamente, el uso de MALDI-TOF-MS en virología diagnóstica no ha evolucionado al mismo ritmo, aunque sí que se ha logrado la identificación y/o tipificación molecular de una amplia gama de virus, incluidos virus respiratorios, enterovirus, virus del herpes simple, citomegalovirus, virus de la hepatitis B y virus de la hepatitis C mediante espectrometría de masas, pero solo después de un paso de cultivo celular o acoplando esta técnica con procedimientos moleculares (23–25).

Actualmente, los ensayos de RT-PCR en el LCR son los métodos de referencia para el diagnóstico de enfermedades neurológicas y el uso de la tecnología MALDI-TOF-MS para la identificación de virus directamente de muestras clínicas está muy limitado por su baja sensibilidad (26).

I.6 Impacto clínico y económico de MALDI-TOF MS en el diagnóstico rápido y la integración en los programas de administración de antimicrobianos

Más allá de la contribución del MALDI-TOF MS a la fiabilidad y precisión de la identificación microbiológica, que está fuera de toda duda, aún quedan campos por explorar. En la actualidad, el equilibrio entre costes y ahorro es la piedra angular para la introducción de nuevas tecnologías en la práctica clínica. La mayoría de los estudios se centran en medir los beneficios clínicos de la identificación microbiana en casos de bacteriemia.

En este contexto, la detección de la bacteriemia constituye una de las prioridades de los laboratorios de Microbiología Clínica, dada su importancia diagnóstica y pronóstica. Según la Organización Mundial de la Salud, se estimaron cerca de 49 millones de casos de sepsis en el mundo en 2017, de los cuales 11 millones fallecieron por causas relacionadas con esta complicación. En otras palabras, las infecciones del torrente sanguíneo son responsables de aproximadamente el 20% de muertes de cualquier causa a nivel mundial, una gran parte de ellas evitables.

En el informe más recientemente publicado por esta organización sobre estos procesos infecciosos, se incide sobre la importancia de concienciar a las autoridades sanitarias sobre la necesidad de un abordaje multidisciplinar para afrontar la carga económica y de salud que suponen estas infecciones a nivel mundial. Entre los objetivos, se hace hincapié en el hecho de que un diagnóstico rápido de infecciones que pueden evolucionar a una sepsis aumenta notablemente la supervivencia (16). Según este informe, la prueba diagnóstica ideal para estas infecciones debería de, entre otras cosas, ser rápida, sensible y específica para guiar la terapia antibiótica, limitar el sobreuso de esta y reducir el desarrollo de resistencias.

En ese aspecto, la implementación de la tecnología MALDI-TOF MS para la identificación directa y rápida de microorganismos a partir de hemocultivos conduce a una reducción en el tiempo requerido para la optimización del régimen antimicrobiano, reduce la duración de la estancia hospitalaria, mejora los resultados del paciente y reduce los costos hospitalarios generales (27). Se ha demostrado que su integración en los laboratorios ha permitido el cambio de la terapia empírica por un tratamiento optimizado

en un 35% de los casos (28). Cabe destacar que, en casos de bacteriemia el riesgo de mortalidad se duplica con un retraso de 24 horas en la administración de los antibióticos adecuados (29).

En el trabajo realizado por Verroken, et al. (30) se evaluó el impacto en la terapia antimicrobiana de un flujo de trabajo en el que la identificación fue proporcionada por MALDI-TOF MS. Concluyeron que el tiempo medio para la identificación se redujo en alrededor del 65%, el tiempo medio para completar los resultados de susceptibilidad se redujo en un 27% y el tiempo medio para el tratamiento antimicrobiano óptimo se redujo a 16 horas.

Sin embargo, no hay que olvidar que, como se ha demostrado, realizar la tinción de Gram inmediatamente después de que los hemocultivos sean marcados como positivos y comunicar los resultados rápidamente al médico prescriptor también tienen un impacto positivo en la selección adecuada de antibióticos, conduciendo así a una disminución de la mortalidad (31,32).

En comparación con los avances realizados en el diagnóstico de bacteriemias, como se ha comentado anteriormente, las aplicaciones de MALDI-TOF MS en virología no han dado el salto desde los laboratorios de investigación a los de diagnóstico clínico, y en la mayoría de los casos están acopladas a otras técnicas diagnósticas. El bajo contenido de proteínas en los virus, el peso molecular más alto de las proteínas víricas o la presencia de restos celulares son las razones a las que se debe este retraso. Pese a ello, sorprende que su uso experimental sea muy prometedor tanto en algunas muestras clínicas directas como para identificar virus cultivados en líneas celulares.

Uno de los campos de la virología en los que se podría expandir esta tecnología es la epidemiología, donde ya se ha utilizado para tipificar y detectar polimorfismos y mutaciones, como en el caso del virus de la influenza y de los virus de la hepatitis B (33,34) o en el estudio de la resistencia a antivirales (35).

Las principales ventajas y el impacto del uso de MALDI-TOF para el diagnóstico de las infecciones víricas son que permite la caracterización de una variedad amplia de virus, el diagnóstico de coinfecciones, y la identificación es fiable y rápida. Además, su uso mejora el manejo clínico de los pacientes al ofrecer un diagnóstico etiológico rápido. Pero todavía se deben mejorar tanto la sensibilidad de la técnica como las bases de datos disponibles (26).

I.7 Aplicación e impacto de la tecnología MALDI-TOF MS en la detección de resistencias bacterianas

La versatilidad de la tecnología MALDI-TOF MS favorece cada vez más la aparición de nuevas aplicaciones. En especial, destaca la utilización de esta tecnología para la detección de resistencias a antimicrobianos en la práctica clínica.

En 2019, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) publicaron un informe que incluye las últimas estimaciones nacionales de muerte e infección para 18 bacterias y hongos resistentes a los antibióticos. Los nuevos datos de los CDC muestran que, si bien la carga de las amenazas de resistencia a los antibióticos en los Estados Unidos era mayor de lo que se pensaba inicialmente, las muertes están disminuyendo desde el informe de 2013. Esto sugiere que los esfuerzos de EE. UU. para prevenir infecciones, detener la propagación de bacterias y hongos y mejorar el uso de antibióticos están funcionando, especialmente en los hospitales <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>. Sin embargo, la cantidad de personas que se enfrentan a infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos en los Estados Unidos sigue siendo demasiado alta. Cada año se producen más de 2,8 millones de infecciones resistentes a los antibióticos en los Estados Unidos y, como resultado, mueren más de 35 000 personas.

Por ello, se hace necesaria la incorporación de técnicas de diagnóstico rápido de infecciones producidas por estos microorganismos. El tiempo que se tarda en proporcionar los resultados microbiológicos es inversamente proporcional al valor médico (36), por lo que cuanto antes se obtenga información sobre la resistencia a los antimicrobianos, mejor será la terapia antimicrobiana que se prescribirá. El tiempo hasta el resultado es especialmente importante para prevenir tratamientos innecesarios y evitar la transmisión de estas bacterias de especial preocupación en entornos hospitalarios (37,38).

En la actualidad, los principales enfoques para la detección rápida de resistencias a antimicrobianos se basan en: métodos moleculares, métodos bioquímicos, inmunoensayos basados en anticuerpos monoclonales, ensayos electroquímicos y la espectrometría de masas.

El método MALDI-TOF MS es un procedimiento rápido y sencillo que combina las ventajas universales de los ensayos fenotípicos con la rapidez y precisión de los ensayos moleculares. Esto, junto a los avances en el equipo y el software, ha hecho que poco a poco se haya ido implementando como una de las tecnologías de referencia para

la detección de resistencias antibióticas. Se utilizan tres enfoques principales: la detección de resistencia a los antimicrobianos midiendo las modificaciones de los antibióticos debidas a la actividad enzimática de las bacterias, el análisis de los patrones máximos de las bacterias y la semicuantificación del crecimiento bacteriano en presencia de un dado antibiótico (39).

La modificación de la estructura del antibiótico por la acción de las enzimas bacterianas implica un cambio en la masa molecular de la molécula nativa, algo que se puede controlar mediante espectrometría de masas. Para ello, es necesario conocer de manera precisa la estructura del antibiótico y los metabolitos resultantes de su degradación. Estos, generalmente, se analizan en el rango de masas entre 100 y 1000 kDa (40). Este enfoque ha sido uno de los que más ha evolucionado en los últimos años (41) incluso a partir de muestras clínicas (42), principalmente para la detección de β -lactamasas utilizando una gran variedad de antibióticos (ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima, cefepime). Aunque también se ha demostrado sus buenos resultados para la detección de carbapenemasas (43) y la resistencia a fluoroquinolonas mediada por la enzima AAC(6=)-Ib-cr (44).

Algunos picos de masa están asociados con un patrón de resistencia de un aislado debido a la expresión de una proteína específica involucrada en el fenotipo de resistencia. Se han encontrado, por ejemplo, biomarcadores específicos para la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus* (45), la carbapenemasa tipo KPC en *Klebsiella pneumoniae* (46) o la resistencia de las Enterobacterias a polimixina (47). La principal ventaja de este enfoque que los picos específicos identificados se pueden analizar en el flujo de trabajo a tiempo real sin necesidad de costes adicionales, aunque todavía debe validarse en el entorno clínico para garantizar su reproducibilidad.

Finalmente, se ha desarrollado un nuevo enfoque basado en la medida del crecimiento bacteriano relativo en presencia de un fármaco antimicrobiano. Los aislados susceptibles no podrán crecer, por lo que no se observará un espectro reconocible, mientras que los microorganismos resistentes mostrarán cierto crecimiento demostrado por el espectro típico obtenido por MALDI-TOF MS. Esta prueba se ha realizado tanto en bacterias de cultivos en placa como directamente de hemocultivos positivos. Ya se han probado diferentes antibióticos como piperacilina, oxacilina, cefotaxima, meropenem, gentamicina, ciprofloxacina y vancomicina con buenos resultados (48,49).

La resistencia antimicrobiana es un proceso complejo, que es resultado de un conjunto de variables como las mutaciones cromosómicas, adquisición de determinantes de resistencia, diferentes niveles de expresión, bombas de expulsión, porinas, etc. El

MALDI-TOF MS no va a reemplazar a ninguna de las técnicas ya existentes para la detección de la resistencia antimicrobiana, pero su uso se puede convertir en un valor añadido, ya que permite adelantar una información muy valiosa con respecto al tratamiento antimicrobiano a un bajo coste.

Hipótesis

II. HIPÓTESIS

II.1 Nuevos desarrollos en los métodos basados en la tecnología MALDI-TOF MS podrían incrementar el rendimiento y reducir los costes de procedimientos en uso para la identificación de bacterias y hongos causantes de bacteriemia/fungemia a partir de hemocultivos positivos y la detección rápida de resistencia bacteriana a los antibióticos.

II.2 La tecnología MALDI-TOF MS puede ser utilizada para el diagnóstico etiológico de meningitis/encefalitis víricas utilizando el líquido cefalorraquídeo como matriz de análisis.

Objetivos

III. OBJETIVOS

La implementación de la espectrometría de masas MALDI-TOF MS en los laboratorios de Microbiología Clínica ha supuesto una revolución en el diagnóstico microbiológico. En el momento actual, la espectrometría de masas MALDI-TOF MS es una de las técnicas más utilizadas en la rutina de los laboratorios para la identificación de microorganismos, tanto de bacterias, como micobacterias, levaduras y hongos filamentosos a partir de colonias aisladas. El uso de MALDI-TOF MS se ha venido extendiendo al campo del diagnóstico directo y de la detección de resistencia antimicrobiana a partir de muestras clínicas; sin embargo, nuevos desarrollos son necesarios para que alcancen un rendimiento óptimo.

Esta tesis doctoral incluye cuatro objetivos específicos principales:

I. Desarrollo de un nuevo método para la identificación rápida de bacterias directamente de hemocultivos positivos

Para conseguir la identificación bacteriana con MALDI-TOF MS a partir de un frasco de hemocultivo positivo, los procesos consisten básicamente en concentrar las bacterias presentes en la muestra y retirar los componentes que puedan interferir en el proceso de identificación, tales como células humanas u otras sustancias del medio de cultivo. Existen diferentes protocolos que han conseguido acelerar la identificación de bacterias a partir de hemocultivos, entre los que destacan el método comercial MALDI Sepsityper kit (Bruker Daltonics, MA, USA) y la incubación corta en medio sólido. El primer caso se basa en un protocolo de extracción de proteínas con etanol y ácido fórmico, incluyendo durante el proceso una serie de pasos de centrifugación diferencial y lavado para aislar las bacterias en el sobrenadante y eliminar sustancias que puedan interferir en el análisis por MALDI-TOF MS. El segundo caso está basado en una incubación corta de un pequeño volumen de sangre en agar sangre Columbia. La biomasa obtenida se somete al análisis por MALDI-TOF MS. No obstante, ambas estrategias presentan ciertos inconvenientes. El primer enfoque se asoció con un procesamiento de muestra más complejo y con peores resultados en la identificación exitosa de cocos Gram-positivos. Por el contrario, la identificación a partir de incubación en medio sólido resultó ser un proceso más sencillo e integrable en la rutina del laboratorio, además de obtenerse mejores resultados para bacterias Gram-positivas, aunque el tiempo necesario para alcanzar la identificación exitosa se demora por encima de las 4 horas (18).

El rápido aumento de la biomasa bacteriana producida al incubar los hemocultivos en un medio líquido altamente nutritivo podría permitir una identificación de especies

bacterianas más rápida y precisa. En este contexto, desarrollamos un nuevo método de identificación basado en el enriquecimiento a corto plazo en medio líquido que fue comparado con otros ya existentes, incluyendo al MALDI Sepsityper kit y la generación de biomasa en medio sólido tras una incubación corta.

II. Realizar un estudio cuasiexperimental pre-post destinado a evaluar el valor potencial de agregar una identificación bacteriana rápida por MALDI-TOF MS a la información proporcionada por la tinción de Gram para adaptar regímenes antibióticos empíricos sin guía de administración antimicrobiana en pacientes con bacteriemia ingresados en salas oncohematológicas y de cuidados intensivos

Los laboratorios de microbiología clínica tienen un papel clave en el manejo de la bacteriemia porque son los primeros en estar en condiciones de registrar la infección a partir de los hemocultivos positivos. Estudios previos han demostrado que la realización de la tinción de Gram inmediatamente después de que los hemocultivos sean marcados como positivos y la comunicación rápida de los resultados al médico tienen un impacto positivo en la selección adecuada de antibióticos, lo que conduce a una disminución de la mortalidad. Este impacto es incluso mayor en el uso de antimicrobianos que los resultados proporcionados por los estudios de sensibilidad antibiótica (31,32). Sin embargo, la evaluación de los resultados de la tinción de Gram y el examen microscópico es bastante subjetiva y está influenciada por la habilidad y la experiencia del microbiólogo. Por lo tanto, los resultados de la tinción de Gram en ocasiones son inconsistentes con la identificación final de los microorganismos, lo que representa un riesgo que puede conducir a una terapia antimicrobiana inadecuada y por ello, afectar de forma negativa en el curso clínico.

Está claro que la práctica antimicrobiana actual tiende hacia el uso de agentes de amplio espectro para la cobertura empírica de infecciones graves. En parte, esto se debe al aumento de las tasas de resistencia a los antimicrobianos, combinado con la reticencia de los médicos a reducir la cobertura antibiótica en el contexto de una mejoría clínica.

La identificación microbiana rápida directamente de hemocultivos mediante MALDI-TOF MS proporciona más información acerca del agente causal de la bacteriemia y, por tanto, permite potencialmente a los médicos adaptar la terapia antibiótica antes de que los resultados de las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos estén disponibles. En este marco, evaluamos el potencial añadido de utilizar el nuevo método de identificación bacteriana rápida por MALDI-TOF MS desarrollado por el grupo a la información proporcionada por la tinción de Gram para adaptar la terapia antibiótica en pacientes de alto riesgo con bacteriemia.

III. Desarrollo de un nuevo método fenotípico de cribado rápido de resistencias antibióticas a partir de hemocultivos positivos mediante la tecnología MALDI-TOF MS

La expansión de patógenos bacterianos resistentes a los antibióticos es una amenaza seria y global. En la actualidad, la terapia empírica con antibióticos de amplio espectro es a menudo inadecuada debido a la frecuente implicación de bacterias multirresistentes, entre las cuales, las Enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación (Ceph3) son de especial preocupación por el aumento de prevalencia y su asociación con una mayor mortalidad (50).

La tecnología MALDI-TOF MS destaca por ser un procedimiento rápido y sencillo que combina las ventajas de los ensayos fenotípicos con la rapidez y precisión de los ensayos moleculares. Se han desarrollado varios enfoques para la detección de la resistencia a los antimicrobianos mediante esta tecnología, basados en las modificaciones de los antibióticos debidas a la actividad enzimática de las bacterias, el análisis de los patrones máximos de las bacterias y la semicuantificación del crecimiento bacteriano en presencia de un dado antibiótico (39).

En este contexto, otras técnicas como los inmunoensayos de flujo lateral (LFIA) también se han utilizado cada vez más para detectar β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en Gram-negativos de colonias aisladas o directamente de hemocultivos, ya que son fáciles de usar y arrojan resultados rápidos y confiables (51).

La detección de la resistencia de Enterobacterias a las Ceph3 mediante MALDI-TOF MS se puede lograr comparando el crecimiento bacteriano en presencia o ausencia de un antibiótico dado, seguido de una medición semicuantitativa de las proteínas bacterianas. En este sentido, pretendimos optimar el nuevo método de identificación bacteriana rápida de hemocultivos positivos desarrollado para la detección rápida de resistencia a Ceph3 en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.*

IV. Evaluación de un método MALDI-TOF MS con líquido cefalorraquídeo para el diagnóstico de meningitis/encefalitis víricas

El uso de MALDI-TOF MS en el diagnóstico de infecciones víricas a partir de muestras clínicas no ha evolucionado al mismo ritmo que la identificación bacteriana y fúngica, debido principalmente a su relativa baja sensibilidad. Hasta la fecha, la identificación del virus en muestras clínicas utilizando este enfoque metodológico se ha

logrado solo después del cultivo celular o en combinación con técnicas de PCR. Por otra parte, la búsqueda de perfiles proteómicos específicos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) puede proporcionar información importante sobre diferentes procesos patogénicos. Estudios previos han utilizado con éxito el perfil proteómico del LCR obtenido mediante espectrometría para diagnosticar y clasificar otras enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis lateral amiotrófica y la esclerosis múltiple (52,53).

En este estudio de prueba de concepto pretendimos determinar si existe un perfil proteómico del LCR que esté específicamente asociado con la meningitis/encefalitis por Enterovirus, de modo que permita el diagnóstico rápido y a muy bajo coste de dichas infecciones.

Metodología

IV. METODOLOGÍA

IV.1 Pacientes

Los diferentes estudios llevados a cabo incluyeron cohortes de pacientes con episodios significativos de bacteriemia atendidos en el Hospital Clínico Universitario de Valencia para los Artículos I, II y III entre los años 2014 y 2020, y de pacientes con signos o síntomas de enfermedad neurológica atendidos en el Hospital Clínico Universitario de Valencia y el Hospital Miguel Servet de Zaragoza para el Artículo IV entre los años 2012 y 2017.

El número concreto, las fechas en las que los pacientes sufrieron el episodio y el tipo de estudio se resumen en la tabla IV.1.

Tabla IV.1. Características metodológicas: tipo de estudio, localización, pacientes y fecha del episodio.

Estudio	Tipo	Localización	Nº pacientes	Fecha del episodio
Torres I. J Med Microbiol 2017	Prospectivo	HCUV	84	Diciembre 2016 y abril 2017
Torres I. J Infect Chemother 2020	Pre-post cuasi-experimental retrospectivo	HCUV	70 / 70	Junio 2014 y abril 2017 / junio 2017 y octubre 2018
Torres I. Eur J Clin Microbiol 2021	Prospectivo	HCUV	168	Noviembre 2019 y septiembre 2020
Torres I. Eur J Clin Microbiol 2018	Observacional retrospectivo	HCUV y HMSZ	114	Octubre 2012 y febrero 2017

HCUV: Hospital Clínico Universitario de Valencia; HMSZ: Hospital Miguel Servet de Zaragoza

El conjunto de los datos clínico-demográficos de los pacientes incluidos en cada estudio viene detallado en cada una de las publicaciones correspondientes.

IV.2 Aislados bacterianos y muestras de sangre y LCR

IV.2.1 Aislados bacterianos

Los aislamientos bacterianos recuperados para los estudios preliminares destinados a evaluar el rendimiento de los enfoques metodológicos propuestos, detallados más adelante, fueron aislados clínicos que estaban criopreservados a -20°C. Estos no se habían descongelado previamente.

Para el primer trabajo (Torres I. J Med Microbiol 2017), que investigó si el cultivo previo de hemocultivos positivos en un medio líquido altamente nutritivo acortaría aún más el tiempo para lograr la identificación exitosa de bacterias mediante MALDI-TOF MS, se utilizaron aislados de Enterobacterias y *Staphylococcus aureus* obtenidos de pacientes que habían cursado con bacteriemia, cuyas muestras habían sido recepcionadas y procesadas por el Servicio de Microbiología Clínica del HCUV.

En el tercer artículo (Torres I. Eur J Clin Microbiol 2021), que optimizó, en base al estudio previo, el método simple de identificación rápida basado en MALDI-TOF MS para la detección de susceptibilidad a Ceph3 en *E. coli* y *Klebsiella* spp. directamente de hemocultivos, se utilizaron aislados de estas especies bacterianas no necesariamente obtenidos de pacientes que habían cursado con bacteriemia y cuyas muestras habían sido recepcionadas y procesadas por el Servicio de Microbiología Clínica del HCUV. Además, se utilizaron como controles de estos estudios preliminares las cepas de referencia *E. coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 25955 (no productoras de β -lactamasa) y *E. coli* ATCC 35218 y *K. pneumoniae* ATCC 700603 (productoras de β -lactamasa) proporcionadas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

IV.2.2 Muestras de sangre

Las muestras de sangre obtenidas de pacientes atendidos en el HCUV con sospecha de bacteriemia se recibieron introducidas en frascos de hemocultivo BACTEC Plus Aerobic/F y BACTEC Plus Anaerobic/F (Becton Dickinson-BD- and Company, NJ, EE. UU) y fueron incubadas en un instrumento de cultivo de sangre de monitoreo continuo automatizado (BACTEC FX; BD). Esta tecnología se basa, de manera resumida, en la detección de fluorescencia producida cuando el dióxido de carbono liberado por las bacterias al medio al metabolizar los nutrientes de este reacciona con un colorante fluorescente.

De cada paciente se recibieron dos parejas de frascos de hemocultivos extraídas con un intervalo de tiempo de una hora. Solo se incluyeron en el estudio los hemocultivos positivos para bacterias (revelados por tinción de Gram) correspondientes a episodios significativos de bacteriemia. No se tuvieron en cuenta otros criterios específicos (aparte de las condiciones logísticas, es decir, la capacidad de realizar los experimentos inmediatamente después de la positividad del hemocultivo) para la selección de muestras.

IV.2.3 Muestras de LCR

Las muestras de LCR recuperadas para el cuarto trabajo (Torres I. Eur J Clin Microbiol 2018) estaban criopreservadas a -20°C durante una mediana de 365 días (80-1825) y nunca fueron descongeladas previamente. Este estudio consistió en analizar la utilidad de la tecnología MALDI-TOF MS para buscar una firma proteómica del LCR que estuviera específicamente asociada con la meningitis causada por EV. Fue requisito indispensable un volumen mínimo de las muestras de 100 µl.

Las muestras se obtuvieron de pacientes atendidos por sospecha de enfermedad neurológica en el HCUV o el HMSZ. Todas fueron centrifugadas a su llegada al laboratorio para eliminar los restos celulares y posteriormente se almacenaron a -20°C, dentro de las primeras 48h desde su recepción. Específicamente, se utilizaron muestras positivas y negativas para EV por técnicas de PCR o RT-PCR (SmartCycler Enterovirus y real Xpert® EV, Cepheid, CA, EE. UU.). Dentro de las muestras negativas se incluyeron algunas que fueron positivas para *Streptococcus pneumoniae* por cultivo bacteriológico y positivas para VHS-1, VVZ y VHS-6 por ensayos PCR realizados en la plataforma Abi Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) utilizando los kits RealQuality RQ-HHV-1/2, RealQuality RQ-VZV y RS-HHV 6 (AB Analitica, Padova, Italia).

Se utilizó como control positivo una alícuota (1 ml) de coxsackievirus B3 purificado a partir de sobrenadantes de células infectadas con HeLa ($5,6 \times 10^8$ TCID₅₀/ml) que agregamos en concentraciones de 10^4 , 10^5 y 10^6 TCID₅₀/ml a una muestra de LCR extraída de un paciente sin sospecha de meningoencefalitis infecciosa y que dio negativo para bacterias en un cultivo de rutina, y para EV, HSV-1, VVZ y HHV6 mediante PCR en tiempo real.

IV.3 Protocolo de diagnóstico de rutina de bacteriemias

Todos los hemocultivos incluidos en los diferentes estudios se procesaron mediante el protocolo de diagnóstico de rutina según recomienda la guía “Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares” de Procedimientos en Microbiología Clínica de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (54).

Cuando se detectó un hemocultivo como positivo se realizó una tinción de Gram y un subcultivo en agar chocolate (BD) que se incubó a 36°C en aire con 5% de CO₂

(incubadora de CO₂ Heracell 240i, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Alemania) durante 24-48 horas.

Las colonias bacterianas aisladas obtenidas tras la incubación se identificaron mediante la tecnología MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) según las instrucciones del fabricante (55).

Las pruebas de susceptibilidad antibiótica se realizaron mediante difusión en disco (Oxoid Limited, Hampshire, Reino Unido) o microdilución en caldo utilizando los paneles MicroScan NM44 y PM33 (Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.) y se interpretaron de acuerdo con las pautas de EUCAST (https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf).

IV.4 Identificación bacteriana rápida de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF MS

En el primer trabajo (Torres I. J Med Microbiol 2017), con objeto de evaluar el diseño del nuevo método de identificación rápida que se describe a continuación, se simularon bacteriemias a partir de aislamientos bacterianos clínicos cultivados durante la noche en agar chocolate a 36°C en aire con 5% de CO₂ en una incubadora Heracell 240i. Una vez obtenidas las colonias aisladas, se resuspendieron en solución salina estéril cinco Enterobacterias y cinco *Staphylococcus aureus* y se inocularon en frascos de hemocultivos aerobios y anaerobios a 10³ UFC/ml. Estos se incubaron en el sistema automatizado BACTEC FX. La concentración de bacterias se determinó mediante el método de cultivo cuantitativo antes de la inoculación en los frascos de hemocultivo.

IV.4.1 Procesamiento de hemocultivos positivos

Para la evaluación in vivo del nuevo método de identificación rápida se procesaron los hemocultivos marcados como positivos por el instrumento mediante tres protocolos diferentes, realizados en paralelo. El primero fue el método comercial MALDI Sepsityper kit basado en la extracción de proteínas con etanol y ácido fórmico, según lo recomendado del fabricante (56). En segundo lugar, se inocularon dos gotas de sangre del hemocultivo positivo en una placa de agar sangre (BD Columbia III Agar with 5% Sheep Blood, BD) y se extendieron con un asa de siembra, como se describió anteriormente (18). Por último, se inocularon 50 µl de sangre del hemocultivo positivo en un Eppendorf estéril que contenía 500 µl de caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) (Oxoid Limited, Hampshire, Reino Unido). Las placas de agar sangre y los viales se incubaron a 36°C en aire con 5% de CO₂ durante períodos tiempos preestablecidos (30, 90, 180 y 240 min). Siguiendo estos

tiempos de incubación, los viales se centrifugaron a 13.000 rpm durante 2 min, se descartaron los sobrenadantes y los sedimentos se usaron para el análisis MALDI-TOF MS. Los hemocultivos positivos se subcultivaron siguiendo el protocolo de diagnóstico de rutina previamente detallado.

IV.4.2 Análisis MALDI-TOF MS

Los análisis MALDI-TOF MS para la identificación de los tres métodos se realizaron por triplicado utilizando una placa de 96 pocillos, según indica el fabricante (55). En los protocolos de incubación corta en agar sangre y BHI se intentó la identificación bacteriana hasta el éxito en los diferentes puntos de tiempo. Los espectros se adquirieron utilizando el sistema Microflex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) y se analizaron en el software MALDI BIOTYPER 3.3 (Bruker Daltonics). Se consideró exitosa la identificación cuando al menos uno de los 3 replicados alcanzó una puntuación ≥ 2.0 (a nivel de especie) y ≥ 1.7 (a nivel de género), según las recomendaciones del fabricante.

IV.5 Evaluación del ajuste de la terapia antibiótica empírica de las infecciones del torrente sanguíneo en base a los resultados de la tinción de Gram y la identificación directa de bacterias mediante MALDI-TOF-MS

En el segundo trabajo (Torres I. J Infect Chemother 2020), evaluamos mediante un estudio retrospectivo cuasi-experimental pre-post el valor añadido de la información suministrada por la identificación a la proporcionada por la tinción de Gram en la adaptación de los regímenes de antibioterapia empírica en pacientes con bacteriemia pertenecientes a grupos de riesgo.

IV.5.1 Procesamiento de hemocultivos positivos

Los hemocultivos positivos incluidos en la fase pre-MALDI-TOF MS se procesaron según el protocolo de rutina de diagnóstico de bacteriemias, detallado previamente. Cabe destacar que durante este período la identificación bacteriana se realizaba mediante los métodos fenotípicos Vitek2 o tiras reactivas API de Biomerieux, L'Etoile, Francia o BD Phoenix BD system de BD.

Los hemocultivos positivos incluidos durante el período post-MALDI-TOF MS se procesaron del mismo modo que en la fase pre- a diferencia de la identificación bacteriana que se realizó mediante nuestro nuevo método rápido de precultivo en medio líquido que estaba completamente integrado en la rutina de trabajo del laboratorio.

IV.5.2 Análisis de la idoneidad de los ajustes empíricos de la terapia antibiótica

Dos médicos especialistas en enfermedades infecciosas revisaron las historias clínicas y extrajeron los datos demográficos, clínicos y el patrón de prescripción de antibióticos de cada paciente.

Los tratamientos con antibióticos se consideraron correctos cuando se adaptaron al sitio de adquisición (comunitario o nosocomial) (57), gravedad de la infección (58), foco de la bacteriemia, perfiles locales de resistencia a los antimicrobianos, factores de riesgo del paciente para albergar una cepa resistente a los antibióticos (BLEE, SARM, *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos) (59) y registros microbiológicos individuales, de acuerdo con una guía española (60) y se esperaba que fuera eficaz contra las bacterias aisladas en base de los resultados de susceptibilidad antibiótica (tabla IV.2), y mejorable cuando la cobertura era adecuada pero pudo ser y no fue refinada (mejor ajustada) de acuerdo con los parámetros anteriores. Los tratamientos incorrectos fueron aquellos que no cubrieron las bacterias aisladas según los estudios de sensibilidad antibiótica.

Tabla IV.2. Terapia antibiótica empírica para infecciones del torrente sanguíneo considerada como correcta según foco de infección, lugar de adquisición y gravedad clínica.

Foco de infección	Lugar de adquisición	Gravedad clínica		
		Bacteriemia	Sepsis	Shock Séptico
Respiratorio	Comunidad	CRO + AZT AMC LVX	CRO + AZT LVX	CRO or CFT + AZT LVX
	Nosocomial	CAZ o FEP	MEM/TZP/CAZ/ FEP + VAN/LZ o +/-AMK/CIP/CST	MEM/TZP/CAZ/FEP/ CZA/C-T + AMK/ CIP/CST + LZ/VAN
Intestinal (peritonitis)	Comunidad	AMC CTZ + MTZ	TZP ETP TGC	MEM/TZP + LZ/DAP /VAN +/- AMK
	Nosocomial	ETP + VAN o LZ TGC	TZP o MEM +/- AMK	MEM/TZP + LZ/DAP /VAN + AMK * ATM + TGC
Hepatobiliar	Comunidad	CTX o CRO	TZP	MEM/TZP + LZ/DAP /VAN +/- AMK
	Nosocomial	TZP	TZP or ETP or TGC +/- AMK	MEM /TZP + LZ/DAP/VAN + AMK * ATM + TGC
Urinario	Comunidad	CRO	CRO + AMK TZP	MEM/TZP + AMK
	Nosocomial	ETP	TZP/ETP/MEM +/- AMK	MEM + AMK +/- VAN * ATM + AMK
Catéter	Nosocomial	CAZ + DAP/ VAN /LZ	TZP/MEM/CAZ + DAP/VAN/LZ +/- AMK o CST	MEM/TZP/CZA/C/T + LZ/DAP/VAN + AMK/CST
Desconocido	Comunidad	AMC	CRO ETP	MEM o TZP +/-AMK +/-LZ/DAP/VAN
	Nosocomial	CAZ FEP	MEM or TZP +/- LZ/DAP/VAN +/- AMK	MEM o TZP o C/T o CZA + AMK + LZ/DAP/VAN

AMC, Amoxicilina-ácido clavulánico; AMK, Amikacina; AZT, Azitromicina; ATM, Aztreonam; FEP, Cefepime; CAZ, Ceftazidima; CZA, Ceftazidima/avibactam; CFT, Ceftriaxona; CTX, Cefotaxima; CIP, Ciprofloxacino; C-T, Ceftolozano-tazobactam; CRO, Ceftriaxona; CST, Colistina; DAP, Daptomicina; ETP, Ertapenem; LVX, Levofloxacino; LZ, Linezolid; MEM, Meropenem; MTZ, Metronidazol; TGC, Tigeciclina; TZP, Piperacilina/tazobactam; VAN, Vancomicina; * Si alergia a betalactámicos.

IV.6 Detección fenotípica rápida de resistencia a cefalosporinas de 3ª generación en *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF MS

Para la evaluación del método de detección fenotípica rápida de resistencia propuesto en el tercer trabajo (Torres I. Eur J Clin Microbiol 2021) se seleccionó la Ceftriaxona Fresenius Kabi 1 gr. (CRO) en formato polvo para solución inyectable (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Alemania) como antibiótico. Con objeto de establecer la concentración óptima de CRO que permitiera la detección de resistencia a Ceph3 por MALDI-TOF MS se seleccionaron diez aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp., algunos de ellos productores de β -lactamasa. Las bacterias se cultivaron durante la noche en agar chocolate (BD) y se inocularon por triplicado, a una concentración de 10^8 UFC/ml, en Eppendorf que contenían BHI con una alta concentración de CRO (1, 2, 4 y 8 mg/ml). Los viales se incubaron durante 2 h a 36°C en aire con 5% de CO₂ en una incubadora Heracell 240i para su posterior análisis por MALDI-TOF MS.

Del mismo modo que en el primer trabajo (Torres I. J Med Microbiol 2017), en este, se simularon bacteriemias para evaluar los enfoques metodológicos a partir de aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. cuya sensibilidad o resistencia a Ceph3 se había determinado previamente mediante microdilución en caldo y análisis genotípico. Las cepas de referencia *E. coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 25955 (no productoras de β -lactamasa) y *E. coli* ATCC 35218 y *K. pneumoniae* ATCC 700603 (productoras de β -lactamasa) se utilizaron como controles.

IV.6.1 Procesamiento de hemocultivos positivos

Siguiendo el protocolo previamente descrito en el primer artículo (Torres I. J Med Microbiol 2017) se procedió a la validación in vivo del método. Para ello, se transfirió un volumen total de 50 μ l de sangre del hemocultivo positivo en 450 μ l de BHI precalentado que contenían (prueba) o no (control) CRO. Las suspensiones bacterianas se incubaron a 36°C en aire con 5% de CO₂ en una incubadora Heracell 240i 2 h y se obtuvieron sedimentos bacterianos, previo paso por una centrifugación a 13.000 rpm durante 2 min, que se usaron para el análisis por MALDI-TOF MS.

Los viales Eppendorf de prueba que contenían CRO se prepararon previamente y criopreservaron a -20°C hasta un máximo de un mes. Confirmamos que el almacenamiento durante este período no afectó a la estabilidad del antibiótico.

IV.6.2 Análisis MALDI-TOF MS

El análisis MALDI-TOF MS para la identificación y la obtención de los espectros se llevó a cabo del mismo modo que en el primer trabajo, previamente detallado.

Los criterios para la caracterización de una especie bacteriana resistente o sensible a Ceph3 fueron la identificación exitosa en al menos dos de las tres réplicas para las especies resistentes y la no identificación para las especies susceptibles.

IV.6.3 Detección de BLEE mediante técnica inmunocromatográfica

El NG-Test CTX-M MULTI es un inmunoensayo de flujo lateral que permite la detección de BLEE tipo CTX-M pertenecientes a los grupos 1, 2, 8, 9 y 25, que incluyen los más comunes β -lactamasas para Enterobacterias en nuestro medio CTX-M 14 y 15. Para su realización se utilizó el sedimento bacteriano restante de los viales control, siguiendo las instrucciones del fabricante (51).

IV.6.4 Estudios de sensibilidad antibiótica y análisis genotípico

Los estudios de sensibilidad antibiótica de los aislados utilizados en los experimentos preliminares y en la validación se realizaron mediante microdilución en caldo utilizando el panel MicroScan NM44 (Beckman Coulter) y se interpretó de acuerdo con las guías EUCAST.

El análisis genotípico para la caracterización del gen de resistencia antimicrobiana de los aislados bacterianos resistentes a Ceph3 utilizados para la validación del método se realizó mediante el kit Antimicrobial Resistance (AMR) Direct Flow Chip (Máster Diagnóstica, Granada, Spain). Esta tecnología se basa, de manera resumida, en la amplificación de dianas de ADN, mediante una reacción de PCR multiplex, y la posterior hibridación reversa sobre una membrana que contiene sondas específicas.

Específicamente, el ensayo AMR puede detectar carbapenemasas de clase A, incluidas GES (variantes alélicas 1 a 26), SME (1 a 5), KPC (1 a 23), NMC/IMI (1 a 9), clase B carbapenemasas que incluyen SIM, GIM (variantes alélicas 1 y 2), SPM, NDM (variantes alélicas 1 a 16), VIM (1–46), IMP (22 variantes alélicas), carbapenemasas de clase D, incluidas las similares a OXA23 (14 variantes alélicas), similar a OXA 24 (7 variantes alélicas), similar a OXA48 (4 variantes alélicas), similar a OXA51 (67 variantes alélicas), similar a OXA58 (4 variantes alélicas), ESBL blaSHV (las variantes alélicas

detectadas incluían el mutante G238S de SHV y E240K genes SHV-5-), ESBL blaCTX-M (las variantes alélicas detectadas no son reveladas por el fabricante).

El análisis se realizó a partir de colonias bacterianas aisladas recuperadas de los hemocultivos positivos durante la fase de evaluación prospectiva del estudio, según lo descrito previamente (61).

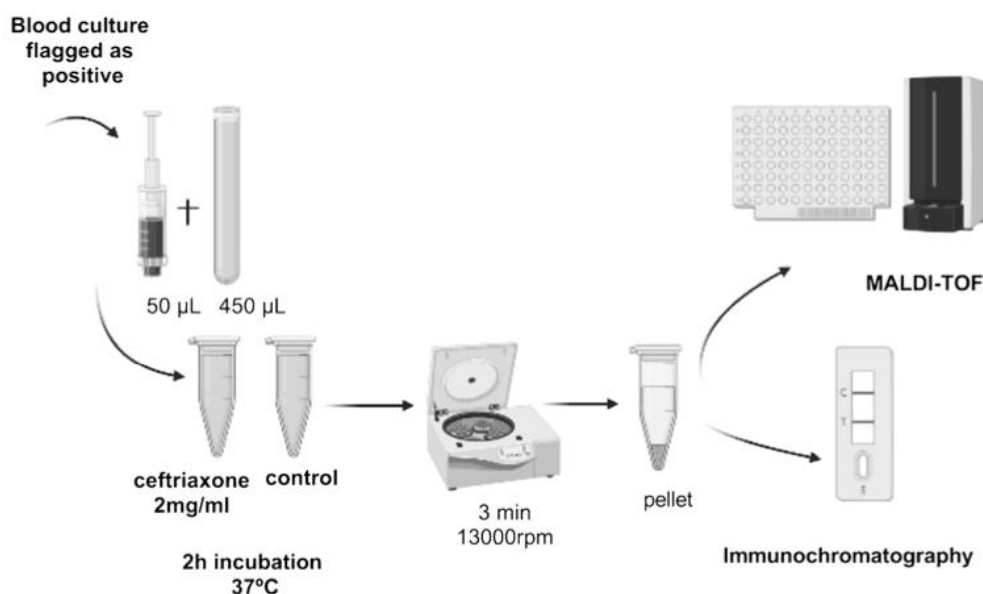


Figura IV-1. Diagrama de flujo que representa el proceso operativo para evaluar el rendimiento del método basado en MALDI-TOF MS y el ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral (NG-Test CTX-M MULTI) para la detección de resistencia a cefalosporinas de 3ª generación en *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. de hemocultivos positivos.

IV.7 Análisis MALDI-TOF MS de perfiles proteómicos de muestras de LCR

La precipitación de las proteínas totales de las muestras de LCR procesadas en el Artículo VI (Torres I. Eur J Clin Microbiol 2018) se llevó a cabo siguiendo un protocolo descrito en otro trabajo (62). El proceso consistió en transferir 100 µl de LCR a 400 µl de metanol y centrifugar la mezcla durante 10 segundos. Seguidamente, se añadieron 100 µl de cloroformo y tras una nueva centrifugación de 10 s, se agregaron 300 µl de agua destilada. Después de un vorteo intenso, se centrifugó la mezcla a 9000 x g durante 1 min obteniendo así tres fases. La fase acuosa superior fue retirada con cuidado y a la solución resultante se le añadieron 300 µl de metanol para ser posteriormente centrifugada durante 2 min. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento de proteínas se resuspendió con 10 µl de ácido fórmico 70% y 10 µl de acetonitrilo al 99,9% (ambos de Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

Para el análisis MALDI-TOF MS de los precipitados de proteínas se colocó 1 µl en la placa de 96 pocillos, realizando siete replicados por cada muestra. Una vez seco, se

recubrió con 1 μ L de solución de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (5 mg/ml en acetonitrilo al 50% y ácido trifluoroacético al 0,1%).

Los espectros se obtuvieron en un rango de bajo peso molecular (2-20 kDa) utilizando el software FlexControl (v.3.4.135.0) tras el modo automático de iones positivos lineales con una frecuencia de láser de 60 Hz y 240 disparos de láser en pasos de 40 disparos. Cada replica se adquirió por triplicado obteniendo un total de 21 espectros por muestra. El software FlexAnalysis (v.3.4.76.0) se utilizó para la visualización de los espectros y la eliminación de la interferencia de alta y baja frecuencia realizando un pre-procesamiento mediante el filtro de suavizado de Savitzky-Golay y la corrección de línea de base. Con objeto de asegurar la reproducibilidad de los resultados, solo se incluyeron en el estudio las muestras con al menos 15 espectro, como se recomienda en un trabajo anterior (63).

Las listas de picos se procesaron utilizando el software Mass-Up (64) obteniendo espectros de consenso que contenían solo los picos presentes en el 75% de las réplicas y siguiendo los criterios MALDIquant (valor de tolerancia para considerar dos picos iguales establecidos en 0,002 ppm).

IV.8 Definiciones

Se definió episodio significativo de bacteriemia aquel que evidenciaba la presencia de una determinada especie bacteriana creciendo en dos frascos de hemocultivo extraídos en un máximo de 1 hora.

Se consideró pacientes con sospecha de enfermedad neurológica aquellos que presentaban síntomas o signos tales como, meningitis aséptica, síndrome convulsivo, fiebre, dolor de cabeza o encefalitis.

IV.9 Análisis estadístico

Las diferencias entre medias y medianas se compararon mediante el uso de la prueba de T- Student o U-Mann-Whitney. Las variables categóricas se analizaron mediante la estadística Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher cuando correspondía. Los análisis de concordancia entre variables cualitativas se efectuaron mediante el estadístico Kappa. La selección de picos diferenciales de MALDI-TOF MS se realizó mediante regresión logística por pasos hacia atrás siguiendo el criterio de información de Akaike. La probabilidad estimada se calculó utilizando la ecuación $P=1/(1+e^{-(\alpha+\beta x)})$ a partir de los coeficientes de regresión del modelo de regresión logística. Se informaron

valores de P bivariados; se consideró que un valor de P era estadísticamente significativo cuando era igual o inferior a 0,05. Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS versión 20.0 (SPSS, Chicago, IL, EE. UU.).

Resultados y discusión

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis se encuentran estructurados en cuatro partes, correspondientes a los cuatro objetivos presentados anteriormente. En primer lugar, se presentan los resultados relacionados con el desarrollo de un nuevo método de identificación bacteriana rápida de hemocultivos positivos por MALDI-TOF MS. En segundo lugar, se presentan los resultados relacionados con la evaluación del valor potencial añadido de utilizar el nuevo método de identificación bacteriana rápida por MALDI-TOF MS a la información proporcionada por la tinción de Gram para adaptar la terapia antibiótica en pacientes de riesgo con cuadros de bacteriemia. En tercer lugar, se presentan los resultados obtenidos tras la optimización del método de identificación bacteriana rápida de hemocultivos positivos como método fenotípico para predecir la susceptibilidad antibiótica a Ceph3 para *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.*, así como la evaluación comparativa en paralelo del funcionamiento de la técnica inmunocromatográfica NG-Test CTX-M MULTI. En cuarto y último lugar, se presentan los resultados obtenidos de la investigación de un perfil proteómico del LCR por MALDI-TOF MS que esté específicamente asociado con la meningitis/encefalitis por Enterovirus.

V.1 Desarrollo de un nuevo método para la identificación rápida de bacterias directamente de hemocultivos positivos (Artículo I)

V.1.1 Simulación de bacteriemias

Razonamos que el enriquecimiento de un pequeño volumen de sangre de hemocultivos positivos en un medio líquido altamente nutritivo (BHI) podría acortar el tiempo para obtener una identificación exitosa por MALDI-TOF MS con respecto a la incubación corta en medio sólido agar sangre. Con objeto de probar este enfoque metodológico, llevamos a cabo estudios preliminares realizando la simulación de bacteriemias inoculando en frascos de hemocultivos aerobios y anaerobios 5 bacilos Gram-negativos (*Escherichia coli*, n=3, *Klebsiella pneumoniae*, n=1, *Enterobacter aerogenes*, n=1) y 5 *Staphylococcus aureus*. Evaluamos ambos procedimientos tras el precultivo a diferentes tiempos (30, 90, 180 y 240 min). Como se observa en la tabla V.1, los aislados de Enterobacterias y *Staphylococcus aureus* se identificaron antes mediante el método de enriquecimiento en BHI. Concretamente, se identificaron 4 Enterobacterias tras 30 min de incubación con BHI y 3 mediante la incubación en agar sangre, mientras que para los *Staphylococcus aureus* fue de 5 y 2 a los 90 min de incubación en BHI y agar sangre, respectivamente. Independientemente del método utilizado, se necesitaron 90 minutos de incubación para conseguir la identificación de Enterobacterias y 180 minutos para los aislamientos de *Staphylococcus aureus*.

Tabla V.1. Número de aislados correctamente identificados mediante MALDI-TOF MS (%)

Especie bacteriana (número de aislados)	Precultivo en medio líquido (tiempo)				Precultivo en medio sólido (tiempo)			
	30 min	90 min	180 min	240 min	30 min	90 min	180 min	240 min
Total (n=10)	4 (40)	10 (100)	-	-	4 (40)	7 (70)	10 (100)	-
BGN (n=5)	4 (80)	5 (100)	-	-	3 (60)	5 (100)	-	-
<i>Escherichia coli</i> (n=3)	2 (66,7)	3 (100)	-	-	2 (66,7)	3 (100)	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=1)	1 (100)	-	-	-	1 (100)	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=1)	1 (100)	-	-	-	0 (0)	1 (100)	-	-
CGP (n=5)	0 (0)	5 (100)	-	-	1 (20)	2 (40)	5 (100)	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=5)	0 (0)	5 (100)	-	-	1 (20)	2 (40)	5 (100)	-

BGN, bacilos Gram-negativos; CGP, cocos Gram-positivos

V.1.2 Identificación de especies bacterianas aisladas en hemocultivos positivos de rutina siguiendo diferentes protocolos

Para el análisis prospectivo de los experimentos que se describen a continuación se utilizaron un total de 84 hemocultivos positivos monomicrobianos. De estos, 40 fueron frascos aerobios, 38 anaerobios y 6 pediátricos. La distribución de grupos bacterianos se representa en la figura V.1:

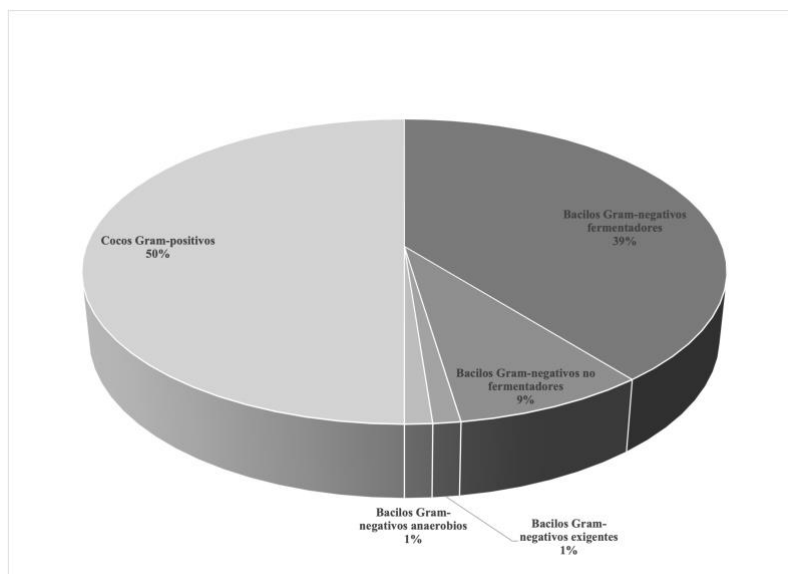


Figura V-1. Distribución por grupos bacterianos de los aislamientos cultivados en hemocultivos positivos incluidos en el estudio.

Como se muestra en la tabla V.2, todas las bacterias se identificaron correctamente a nivel de especie mediante MALDI-TOF MS mediante el protocolo de rutina de diagnóstico de bacteriemias. El método comercial MALDI Sepsityper kit no logró identificar 29 (34,6%) a nivel de especie destacando los *Staphylococcus* spp. coagulasa negativo (SCN), *Streptococcus pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii*. Solo en 5 de estos 29 se obtuvo una identificación a nivel de género (*Streptococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. y *Listeria* spp.).

El precultivo en BHI obtuvo resultados ligeramente superiores que el precultivo en agar sangre durante una incubación de hasta 4 horas. De hecho, el método BHI pudo identificar todas las especies bacterianas excepto 7 (8,4%) (*Acinetobacter baumannii*, n=1, SNC, n=2, *Staphylococcus aureus*, n=1, *Streptococcus pneumoniae*, n=2 y *Abiotrophia defectiva*, n=1), mientras que el método de agar sangre no consiguió identificar 9 (10,8%) especies bacterianas que en 8 casos se trató de cocos Gram-positivos y, como era de esperar, *Bacteroides vulgatus*.

Tabla V.2. Identificación correcta de bacterias cultivadas en frascos de hemocultivos mediante MALDI-TOF MS utilizando diferentes protocolos

Especie bacteriana (número de aislados)	Número de aislados correctamente identificados (%)			
	Precultivo en medio líquido	Precultivo en medio sólido	Sepsityper MALDI kit	Subcultivo de rutina en agar chocolate
Total (n=84)	77 (91,6)	75 (89,2)	55 (65,4)	84 (100)
Enterobacterias (n=33)	33 (100)	33 (100)	28 (84,8)	33 (100)
<i>Escherichia coli</i> (19)	19 (100)	19 (100)	17 (89,5)	19 (100)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (4)	4 (100)	4 (100)	3 (75)	4 (100)

<i>Enterobacter cloacae</i> (2)	2 (100)	2 (100)	1 (50)	2 (100)
<i>Proteus mirabilis</i> (2)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)
<i>Klebsiella oxytoca</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>Klebsiella variicola</i> (1)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	1 (100)
<i>Enterobacter aerogenes</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>Citrobacter freundii</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>Serratia liquefaciens</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>Serratia marcescens</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
BGNMF (7)	6 (85,7)	7 (100)	3 (42,8)	7 (100)
<i>Acinetobacter baumannii</i> (4)	3 (75)	4 (100)	1 (25)	4 (100)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)
<i>Pseudomonas putida</i> (1)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	1 (100)
Otros BGN (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>Campylobacter coli</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
Anaerobios (1)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	1 (100)
<i>Bacteroides vulgatus</i> (1)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	1 (100)
Staphylococcus spp. (26)	23 (88,5)	21 (80,8)	13 (15,5)	26 (100)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (11)	10 (90,9)	7 (63,6)	3 (27,3)	11 (100)
<i>Staphylococcus aureus</i> (7)	6 (85,7)	7 (100)	6 (85,7)	7 (100)
<i>Staphylococcus hominis</i> (7)	6 (85,7)	6 (85,7)	3 (42,8)	7 (100)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
Streptococcus/Enterococcus spp. (15)	12 (80)	12 (80)	9 (60)	15 (100)
<i>Enterococcus faecalis</i> (6)	6 (100)	6 (100)	5 (83,3)	6 (100)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (4)	2 (50)	3 (75)	1 (25)	4 (100)
<i>Streptococcus agalactiae</i> (2)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)
<i>Streptococcus oralis</i> (1) *	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
<i>Enterococcus faecium</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>Abiotrophia defectiva</i> (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
BGP (1)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	1 (100)
<i>Listeria monocytogenes</i> (1)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	1 (100)

BGNMF, bacilos Gram-negativos no fermentadores; BGN, bacilos Gram-negativos; BGP, bacilos Gram-positivos;
 *Identificado como *Streptococcus mitis/oralis* por MALDI-TOF MS

Todos los aislamientos bacterianos a excepción de un *Streptococcus oralis* fueron identificados a nivel de especie mediante los métodos de precultivo a corto plazo. La identificación para este caso dio como resultado *Streptococcus mitis/oralis* con un score de 1,83 que, por fines analíticos, se consideró correcta a nivel de especie.

V.1.3 Efecto del precultivo en medio líquido BHI en la reducción del tiempo para una identificación exitosa mediante MALDI-TOF MS

A continuación, evaluamos el tiempo requerido para una identificación exitosa a nivel de especie mediante MALDI-TOF MS después de un precultivo en BHI o en agar sangre. Como se observa en la figura V.2, el tiempo medio de incubación para la identificación exitosa fue más corto cuando se realizaron precultivos en BHI (el tiempo medio para los bacilos Gram-negativos fue de 78,2 min en BHI y de 108,2 min en agar sangre, $P=0,045$); el tiempo medio para cocos Gram-positivos fue de 128,5 min en BHI y de 169,6 min en agar sangre, $P=0,013$).

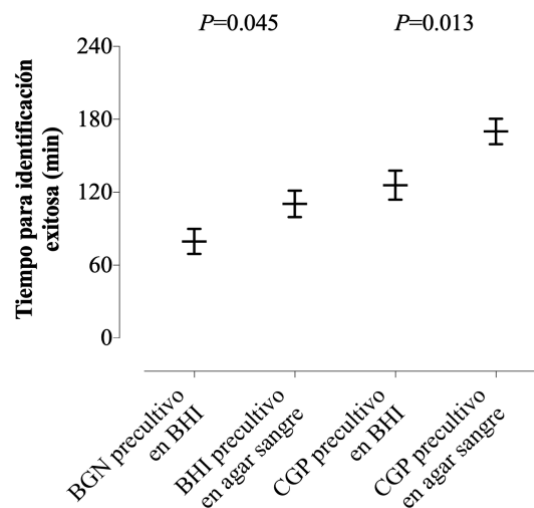


Figura V-2. Tiempo medio de incubación en caldo cerebro-corazón (BHI) y agar sangre para identificación exitosa de bacilos Gram-negativos (BGN) y cocos Gram-positivos (CGP).

Este hallazgo se extendió a la mayoría de aislados bacterianos incluidos en el estudio, como muestra la tabla V.3. De hecho, el precultivo en agar sangre solo superó al de BHI para *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter baumannii* y *Staphylococcus haemolyticus*.

Tabla V.3. Identificación correcta de bacterias cultivadas en frascos de hemocultivos mediante MALDI-TOF MS después del precultivo en caldo cerebro-corazón o agar sangre

Especie bacteriana (número de aislados)	Número de aislados correctamente identificados (%)							
	Precultivo en medio líquido (tiempo)				Precultivo en medio sólido (tiempo)			
	30 min	90 min	180 min	240 min	30 min	90 min	180 min	240 min
Total (n=84)	29 (34,5)	52 (61,9)	71 (84,5)	77 (91,6)	12 (14,3)	37 (44)	60 (71,4)	74 (88,1)
Enterobacterias (n=33)	21 (63,6)	31 (93,9)	33 (100)	-	11 (33,3)	26 (78,8)	32 (96,9)	33 (100)
<i>Escherichia coli</i> (19)	15 (78,9)	18 (94,7)	19 (100)	-	7 (36,8)	15 (78,9)	19 (100)	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (4)	2 (50)	4 (100)	-	-	2 (50)	4 (100)	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (2)	1 (50)	2 (100)	-	-	1 (50)	2 (100)	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> (2)	2 (100)	-	-	-	0 (0)	1 (50)	2 (100)	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> (1)	0 (0)	1 (100)	-	-	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
<i>Klebsiella variicola</i> (1)	0 (0)	1 (100)	-	-	0 (0)	1 (100)	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (1)	1 (100)	-	-	-	1 (100)	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i> (1)	0 (0)	1 (100)	-	-	0 (0)	1 (100)	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i> (1)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	-	0 (0)	0 (0)	1 (100)	-
<i>Serratia marcescens</i> (1)	0 (0)	1 (100)	-	-	0 (0)	1 (100)	-	-
BGNF (7)	1 (14,3)	1 (14,3)	4 (57,1)	6 (85,7)	0 (0)	1 (14,3)	4 (57,1)	7 (100)
<i>Acinetobacter baumannii</i> (4)	0 (0)	0 (0)	2 (50)	1 (75)	0 (0)	0 (0)	3 (75)	4 (100)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	1 (50)	1 (50)	1 (50)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	2 (100)
<i>Pseudomonas putida</i> (1)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	-	0 (0)	1 (100)	-	-
Otros BGN (1)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	-	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
<i>Campylobacter coli</i> (1)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	-	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
Anaerobios (1)	0 (0)	1 (100)	-	-	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Bacteroides vulgatus</i> (1)	0 (0)	1 (100)	-	-	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Staphylococcus spp. (26)	3 (11,1)	7 (25,9)	19 (70,4)	23 (88,5)	0 (0)	3 (11,1)	12 (44,5)	20 (76,9)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (11)	0 (0)	3 (27,3)	7 (63,7)	10 (90,9)	0 (0)	0 (0)	4 (36,4)	7 (63,7)

<i>Staphylococcus aureus</i> (7)	3 (42,8)	4 (57,1)	6 (85,7)	6 (85,7)	0 (0)	2 (28,5)	4 (57,1)	7 (100)
<i>Staphylococcus hominis</i> (7)	0 (0)	0 (0)	6 (85,7)	6 (85,7)	0 (0)	0 (0)	4 (66,6)	6 (85,7)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	-	-
Streptococcus/Enterococcus spp. (15)	4 (28,5)	11 (73,3)	12 (80)	12 (80)	1 (7,1)	6 (40,8)	11 (73,3)	12 (80)
<i>Enterococcus faecalis</i> (6)	1 (66,6)	5 (83,3)	6 (100)	-	0 (0)	2 (33,3)	5 (83,3)	6 (100)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (4)	1 (25)	2 (50)	2 (50)	2 (50)	0 (0)	1 (25)	3 (75)	3 (75)
<i>Streptococcus agalactiae</i> (2)	1 (50)	2 (100)	-	-	1 (50)	2 (100)	-	-
<i>Streptococcus oralis</i> (1) *	0 (0)	1 (100)	-	-	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Enterococcus faecium</i> (1)	1 (100)	-	-	-	0 (0)	0 (0)	1 (100)	-
<i>Abiotrophia defectiva</i> (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
BGP (1)	0 (0)	1 (100)	-	-	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
<i>Listeria monocytogenes</i> (1)	0 (0)	1 (100)	-	-	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)

BGNMF, bacilos Gram-negativos no fermentadores; BGN, bacilos Gram-negativos; BGP, bacilos Gram-positivos; *Identificado como *Streptococcus mitis/oralis* por MALDI-TOF MS

Sorprendentemente, el precultivo durante 30 min en BHI permitió identificar con éxito el 63,3% de las Enterobacterias frente al 33,3% cuando se realizó el precultivo en agar sangre, y en especial, *Escherichia coli* (78,9 vs. 36,8%). Después de 90 min, el 93,9% de las Enterobacterias se identificaron correctamente frente al 78,8% después del precultivo en agar sangre. Además, en general, el precultivo en BHI aceleró la identificación de la mayoría de los aislamientos de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp, así como de *Listeria monocytogenes* que se identificó correctamente después de un precultivo de 90 min en BHI, mientras que requirió 240 min cuando se realizó un precultivo en agar sangre.

Independientemente de si el precultivo se realizó en BHI o en agar sangre, el tiempo para la identificación exitosa de las especies de bacterias Gram-positivas fue más largo que el de los bacilos Gram-negativos, y entre estos últimos, los bacilos Gram-negativos no fermentadores y los bacilos exigentes *Campylobacter coli* requirieron tiempos de precultivo más prolongados que las Enterobacterias. Cabe destacar que todos los métodos comparados no lograron identificar correctamente uno o más de los

aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, SNC y *Abiotrophia defectiva* incluidos en el estudio. Como se muestra en la tabla V.4, el tiempo hasta la identificación exitosa de especies bacterianas (tanto Gram-negativas como positivas) por MALDI-TOF MS después de un precultivo a corto plazo en BHI estuvo directamente relacionado con el tiempo hasta la positividad del hemocultivo.

Tabla V.4. Identificación correcta de bacterias mediante MALDI-TOF MS después del precultivo en caldo cerebro-corazón y tiempo de positividad del hemocultivo

Especies bacterianas identificadas con éxito después del precultivo en caldo cerebro-corazón en diferentes tiempos (número de aislados)	Tiempo hasta la positividad del hemocultivo de BGN/CGP: media de horas (rango)
30 min (29)	11,6 (5,1-14,3)/13,3 (9,6-16,6)
90 min (52)	14,3 (8,5-33,5)/13,2 (6,7-23,9)
180 min (71)	17,8 (8,41-27,8)/20,2 (8,0-29,3)
240 min (77)	16,5 (11,7-21,3)/28,8 (20,0-41,1)

BGN, bacilos Gram-negativos; CGP, cocos Gram-positivos

El objetivo del artículo I (Torres I. J Med Microbiol 2017) consistió en investigar si el precultivo de hemocultivos positivos en un medio líquido altamente nutritivo (BHI) acortaría aún más el tiempo para la identificación exitosa de bacterias por MALDI-TOF MS. El uso de esta tecnología para la identificación rápida y directa del agente causal de la bacteriemia conduce a una reducción en el tiempo requerido para la optimización de la terapia antimicrobiana y el uso excesivo de antibióticos, así como la duración de la estancia hospitalaria y sus costes asociados y, por supuesto, impacta en la morbi-mortalidad del paciente (27).

Tras el desarrollo de un método basado en la incubación corta de hemocultivos positivos en medio líquido, observamos que, en general, este precultivo en BHI previo al procesamiento por MALDI-TOF MS supera en términos de identificación exitosa y rapidez tanto al MALDI Sepsityper kit como al precultivo en medio sólido, métodos actualmente disponibles.

Son varios los trabajos en los que, como nosotros, se observa un menor rendimiento del MALDI Sepsityper kit (18,65), especialmente para cocos Gram-positivos, con respecto a otros métodos de identificación rápida. El enriquecimiento con BHI logró la identificación correcta a nivel especie del 91,6% de los hemocultivos positivos frente al 65,4% para el método basado en la extracción de proteínas. Nuestro método obtuvo mejor rendimiento que este tanto para bacilos Gram-negativos como para cocos Gram-positivos.

Mediante el método de precultivo en medio sólido se logró identificar correctamente el 89,2% de los aislamientos, un resultado ligeramente menor al obtenido tras la incubación en medio líquido. Este rendimiento es superior al informado por otros estudios (19,66), en los que no se superaba el 85%. Sin embargo, el uso de diferentes instrumentos, procesamientos de muestra, análisis MALDI-TOF MS y reglas de interpretación hace difícil la comparación entre todos estos trabajos. Al igual que en nuestro estudio, como era esperable, los resultados de identificación fueron mejores para las bacterias Gram-negativas que para las Gram-positivas.

Se cree que el rápido aumento de la biomasa bacteriana producida por la incubación en un medio líquido altamente nutritivo está relacionado con una reducción en el tiempo requerido para alcanzar una identificación exitosa a nivel de especie. Esto ya fue postulado por primera vez por Kroumova, et al. (67), quienes combinaron el precultivo en medio líquido como paso previo a un protocolo de extracción de proteínas con etanol y ácido fórmico identificando correctamente la mayoría de los aislamientos con un tiempo promedio de 3 horas. Nosotros observamos que el precultivo en BHI redujo

notablemente el tiempo para lograr una identificación exitosa a nivel de especie tanto para bacilos Gram-negativos, especialmente en Enterobacterias, como para cocos Gram-positivos con respecto al precultivo en agar sangre. La combinación con un método de extracción de proteínas podría aumentar aún más el rendimiento de nuestro método, como ya mostraron en algún trabajo (18), donde utilizaron como paso previo el cultivo en medio sólido. Sin embargo, esto aumentaría la complejidad del método y su tiempo de manipulación.

La principal ventaja de nuestro nuevo enfoque metodológico, además de su simplicidad, es su velocidad para identificar correctamente las especies bacterianas de hemocultivos positivos. Esto significa un impacto clínico potencial que se pueden ver maximizado en aquellos centros que tengan una atención 24/7 y que realicen la prueba nada más se marque como positivos el hemocultivo.

La selección de los hemocultivos positivos que potencialmente se pueden beneficiar de este enfoque sería una estrategia adecuada para incorporarlo a la rutina de los laboratorios. En este aspecto, nosotros observamos que la identificación correcta a nivel de especie después del precultivo en BHI durante 30 minutos se logró en aquellos hemocultivos que tuvieron un tiempo de positividad inferior a 16,6 horas, por lo que proponemos utilizar este parámetro como estrategia de identificación bacteriana de rutina en los laboratorios. Aquellos hemocultivos positivos que superaban las 16,6 horas prolongaban hasta 4 horas la incubación en BHI para lograr la identificación exitosa.

Indudablemente el tamaño muestral de los hemocultivos positivos es relativamente pequeño, pese a que la mayoría de las especies comúnmente involucradas en las infecciones del torrente sanguíneo estuvieron representadas en nuestra serie. Además, otra limitación de nuestro enfoque metodológico es su menor rendimiento para la identificación de varias especies bacterianas (*Acinetobacter baumannii*, ciertos SNC, *Abiotrophia defectiva* y *Streptococcus pneumoniae*) que probablemente requerirían mayores tiempos de incubación. Por último, nuestro método solo se ha probado para hemocultivos con una única especie bacteriana, por lo que desconocemos su funcionamiento en el contexto de infecciones polimicrobianas.

En conclusión, nuestro método de precultivo en BHI de hemocultivos positivos supera en rapidez y éxito en la identificación directa por MALDI-TOF MS al kit MALDI Sepsityper y al precultivo en medio sólido. En este sentido, nuestro método necesita más estudios prospectivos para validarlo y medir su impacto clínico potencial en el manejo de las infecciones bacterianas del torrente sanguíneo.

V.2 Evaluación del valor potencial de agregar una identificación bacteriana rápida por MALDI-TOF MS a la información proporcionada por la tinción de Gram en la adaptación de la terapia antibiótica empírica en pacientes con bacteriemia ingresados en salas oncohematológicas y de cuidados intensivos (Artículo II)

Una vez integrado en la rutina de trabajo del laboratorio nuestro método de precultivo en medio líquido para la identificación rápida de hemocultivos positivos por MALDI-TOF MS, evaluamos mediante un estudio cuasi-experimental pre-post el valor añadido de la información suministrada por la identificación a la proporcionada por la tinción de Gram en la adaptación de los regímenes de antibioterapia empírica en pacientes con bacteriemia pertenecientes a grupos de riesgo.

Se incluyeron un total 70 episodios de bacteriemia monomicrobiana de pacientes únicos tanto para el grupo pre- como para el grupo post-MALDI-TOF MS. Como se observa en la tabla V.5, los pacientes incluidos fueron seleccionados en base a características clínico-demográficas, ingreso, fuente y foco probable de la bacteriemia.

Parámetro	Fase pre-MALDI-TOF MS n° (%)	Fase post-MALDI-TOF MS n° (%)	P
Edad Mediana (Rango)	65 (67)	64 (67)	0,52
Sexo			
Hombre	46 (56,1)	36 (41,4)	0,09
Mujer	24 (43,9)	34 (58,6)	
Índice Charlson (≥ 3)	56 (80,0)	59 (84,3)	0,50
Servicio			
Onco-hematología	39 (55,7)	43 (61,4)	0,56
Unidad cuidados intensivo	31 (54,3)	27 (39,6)	
Adquisición			
Nosocomial	55 (78,6)	63 (90,0)	0,07
Comunitaria	15 (21,4)	7 (10,0)	
Gravedad			
Bacteremia	40 (57,1)	52 (74,2)	0,1
Sepsis	5 (7,1)	4 (5,7)	
Shock séptico	25 (35,7)	14 (20,0)	
Foco de la bacteriemia			
Desconocido	27 (38,6)	34 (58,6)	0,183
Abdominal	6 (8,6)	9 (12,9)	
Respiratorio	12 (17,1)	5 (7,1)	
Hepato-biliar	9 (12,9)	12 (17,1)	
Asociado a catéter	7 (10,0)	2 (2,9)	
Urinario	9 (12,9)	8 (11,4)	
Factores de riesgo para SARM	37 (52,9)	35 (50,0)	0,73
Factores de riesgo para Enterobacterias productoras de BLEE/<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR	56 (80,0)	56 (80,0)	1,00

BLEE, β -lactamasa de espectro extendido; SARM, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; MR, Multirresistente

En busca de que los dos grupos fueran lo más homogéneos posible también se tuvo en cuenta la bacteria involucrada en el proceso infeccioso ($P=0,97$). Como se muestra en la tabla V.6, las Enterobacterias fueron las bacterias más representadas en ambos períodos (68,8% y 67,1%), seguidas por los bacilos Gram-negativos no fermentadores, en especial representados por *Pseudomonas aeruginosa* y, por último, los cocos Gram-positivos, principalmente *Enterococcus* spp. En ambos períodos del estudio, el 35% de las Enterobacterias eran productoras de BLEE y el 4% hiperproductores de β -lactamasa de tipo ampC. Hubo cuatro y tres *Pseudomonas aeruginosa* MDR y XDR en los períodos pre- y post-MALDI-TOF MS, respectivamente. Solo se incluyó un *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y no hubo ningún *Enterococcus* spp. resistente a glucopéptidos.

Tabla V.6. Bacterias causantes de la bacteriemia en los períodos pre- y post-MALDI-TOF MS

Especies bacterianas	Fase pre-MALDI-TOF MS n°	Fase post-MALDI-TOF MS n°
Enterobacterias	48	47
<i>Escherichia coli</i>	27	31
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	10
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	1
<i>Serratia marcescens</i>	3	2
<i>Morganella morganii</i>	1	0
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	0
<i>Citrobacter koseri</i>	0	1
Bacilos Gram-negativos no fermentadores	11	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	10
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	1
Cocos Gram-positivos	11	12
<i>Enterococcus faecium</i>	6	7
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	3

V.2.1 Impacto de la tinción de Gram frente a los resultados MALDI-TOF MS en el ajuste de la terapia antibiótica empírica

Como se ha detallado previamente, dos especialistas en enfermedades infecciosas categorizaron los tratamientos antibióticos empíricos recibidos por los pacientes como correctos, mejorables o incorrectos, siendo comparables para los dos períodos de estudio ($P=0,45$, $P=0,57$, $P=0,87$, respectivamente), como se muestra en la tabla V.7.

Table V.7. Idoneidad del tratamiento antibiótico para las infecciones del torrente sanguíneo antes (empíricamente) y después de proporcionar los resultados de la tinción de Gram o MALDI-TOF MS al médico prescriptor

Fase de estudio	Categorización del tratamiento antibiótico		
	Correcto, n° (%)	Mejorable, n° (%)	Incorrecto, n° (%)
Pre-MALDI-TOF MS			
Tratamiento antibiótico empírico	12 (17,1)	41 (58,6)	17 (24,3)
Tratamiento antibiótico tras los resultados de la tinción de Gram	11 (15,7)	52 (74,3)	7 (10,0)
Post-MALDI-TOF MS			
Tratamiento antibiótico empírico	16 (22,9)	36 (51,4)	18 (25,7)
Tratamiento antibiótico tras los resultados de la tinción de Gram	19 (27,1)	41 (58,6)	10 (14,3)
Tratamiento antibiótico tras los resultados de la tinción de Gram y el informe MALDI-TOF MS	27 (38,6)	36 (51,4)	7 (10,0)

Durante la fase pre-MALDI-TOF MS, los resultados de la tinción de Gram llevaron a la modificación de la terapia antibiótica en 19 (27,1%) pacientes. Como se observa en la figura V.3, en 13 casos la infección estuvo causada por Enterobacterias, en 3 por bacilos Gram-negativos no fermentadores y en el resto por cocos Gram-positivos. El ajuste terapéutico fue la ampliación del espectro antibiótico en 15 casos y la racionalización en los cuatro restantes (tabla V.8). Esto supuso un aumento de 41 a 52 pacientes que recibieron tratamientos antibióticos mejorables, mientras que los tratamientos correctos se mantuvieron relativamente intactos (disminuyó de 12 a 11 pacientes). Curiosamente, se redujo de 17 a 7 el número de pacientes que seguían recibiendo un tratamiento antibiótico incorrecto.

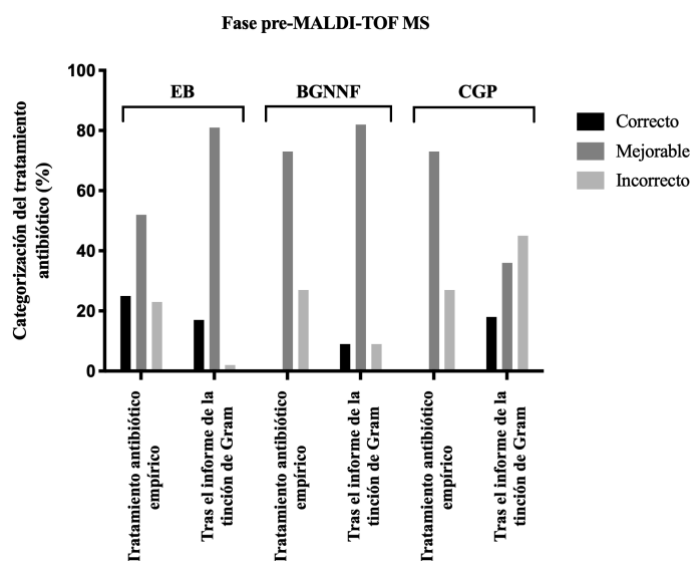


Figura V-3. Idoneidad de la terapia antibiótica para la bacteriemia antes o después de los ajustes realizados en base a los resultados de la tinción de Gram en la fase pre-MALDI-TOF MS según el microorganismo causante. EB, Enterobacterias; BGNNF, bacilos Gram-negativos no fermentadores; CGP, cocos Gram-positivos.

Tabla V.8. Ajustes de la terapia antibiótica empírica realizados en base a la información proporcionada por la tinción de Gram en la fase pre-MALDI TOF MS del estudio.

Paciente	Gravedad	Foco de bacteriemia	Factores de riesgo para SARM/EB productoras de ESBL/MDR-XDR <i>P. aeruginosa</i>	Microorganismo (perfil de resistencia)	Antibioterapia posterior a la tinción de Gram (C/IN/M)/Razón	Antibioterapia posterior a la identificación por MALDI TOF-MS (C/IN/M)/Razón	Ajuste antibiótico
52	Shock séptico	Desconocido	No/Si	<i>Enterobacter cloacae</i> (ampC)	MEM + AMK + DAP (C)	MEM + AMK (C)	1
53	Bacteremia	Desconocido	Si/Si	<i>Enterococcus faecium</i> (WT)	MEM (M)/ EAR	MEM + TEC (M)/ EAR	2
54	Sepsis	Abdominal	Si/Si	<i>Enterococcus faecium</i> (WT)	MEM + AMK (M)/EER. Cobertura inadecuada de CGP	MEM + AMK + TEC (M)/No se desescala.	2
55	Bacteremia	Respiratorio	No/Si	<i>Enterococcus faecium</i> (WT)	MEM (M)/ EAR	MEM + TEC (M)/ EAR	2
56	Bacteremia	Desconocido	No/Si	<i>Escherichia coli</i> (WT)	TZP (M)/EAR	TZP + AMK (M)/ EAR	2
57	Shock séptico	Hepato-biliar	No/Si	<i>Escherichia coli</i> (WT)	CRO (IN)/EESS	TZP (M)/EESS	2
58	Shock séptico	Urinario	Si/No	<i>Escherichia coli</i> (WT)	TZP (M)/EESS	ETP (M)/EESS	2
59	Shock séptico	Desconocido	Si/Si	<i>Escherichia coli</i> (WT)	MEM + AMK (IN)/ EER. Cobertura inadecuada de CGP	MEM + AMK + CST (M)/Nefrotóxico. CST innecesario.	2
60	Shock séptico	Hepato-biliar	No/Si	<i>Escherichia coli</i> (WT)	CIP (IN)/ EESS	TZP + AMK (C)	2
61	Shock séptico	Urinario	No/No	<i>Escherichia coli</i> (BLEE)	ETP + AMK (C)	ETP (M)/EESS. Debió mantenerse AMK.	1

62	Sepsis	Abdominal	No/Si	<i>Escherichia coli</i> (BLEE)	MEM + TEC + MTZ (M)/EAR. MTZ innecesario	MEM + TEC + MTZ + AMK (M)/No se desescala.	2
63	Bacteriemia	Desconocido	No/Si	<i>Klebsiella oxytoca</i> (WT)	TZP + AMK)/EAR	TZP + AMK + TEC (M)/No se desescala.	2
64	Bacteriemia	Respiratorio	No/Si	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (WT)	AMC + VAN (IN)/EER	CAZ + VAN (M)/EER. No se desescala.	2
65	Shock séptico	Abdominal	No/Si	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (WT)	TZP + AMK + TEC (C)	TZP + AMK (C)	1
66	Shock séptico	Desconocido	No/Si	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (BLEE)	TZP + TEC (IN)/EER. Debió asociarse AMK	ETP + AMK + CST + TEC (M)/No se desescala. Potencial nefrotoxicidad	2
67	Bacteriemia	Asociado a catéter	Si/Si	<i>Morganella morganii</i> (WT)	AMC + LVX (IN)/EER	TZP (M)/EAR	1
68	Bacteriemia	Respiratorio	No/Si	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (WT)	TZP (M)/EAR	CAZ + CIP (M)/CIP innecesario.	2
69	Bacteriemia	Desconocido	Si/Si	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (WT)	MEM (M)/EAR	MEM + AMK (M)/EAR	2
70	Shock séptico	Respiratorio	No/Si	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MDR)	MEM (IN)/EESS	ATM + CST (C)	2

1, Ajuste; 2, Ampliación de espectro; AMK, Amikacina; AZM, Azitromicina; BLEE, β-lactamasa de espectro extendido; C, Correcto; CGP, Cocos Gram-positivos; CIP, Ciprofloxacino; CRO, Ceftriaxona; CST, Colistina; C/T, Ceftolozano/tazobactam; DAP, Daptomicina; EAR, espectro más amplio de lo requerido; EB, Enterobacterias; EER, espectro más estrecho de lo requerido; EESS, espectro estrecho en shock séptico; ETP, Ertapenem; FOF, Fosfomicina; IN, incorrecto; IPM, Imipenem; LZD, Linezolid; M, mejorable; MEM, Meropenem; SARM, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; SXT, Cotrimoxazol; TZP, Piperacilina/tazobactam; TGC, Tigeciclina; TEC, Teicoplanina; WT, wild-type; XDR, extremadamente resistente.

En la fase post-MALDI-TOF MS las intervenciones en base a los resultados de la tinción de Gram se redujeron a 9 (12,8%) con respecto a la fase pre-MALDI-TOF MS ($P=0,06$), ampliando el espectro antibiótico en todos los casos (tabla V.9). Estas modificaciones supusieron un aumento en el número de pacientes que recibieron un tratamiento correcto y redujeron el de los pacientes con un tratamiento incorrecto con respecto a la etapa previa a MALDI-TOF MS. Como se observa en la tabla V.10, la identificación bacteriana rápida por MALDI-TOF MS condujo a ajustes adicionales en 18 pacientes de los cuales 11 tenían una bacteriemia causada por Enterobacterias, 4 por bacilos Gram-negativos no fermentadores y 3 por cocos Gram-positivos (figura V.4), realizando una ampliación del espectro antibiótico en todos los casos. Solo uno de estos 18 casos ya había sufrido una modificación previa con la información de la tinción de Gram.

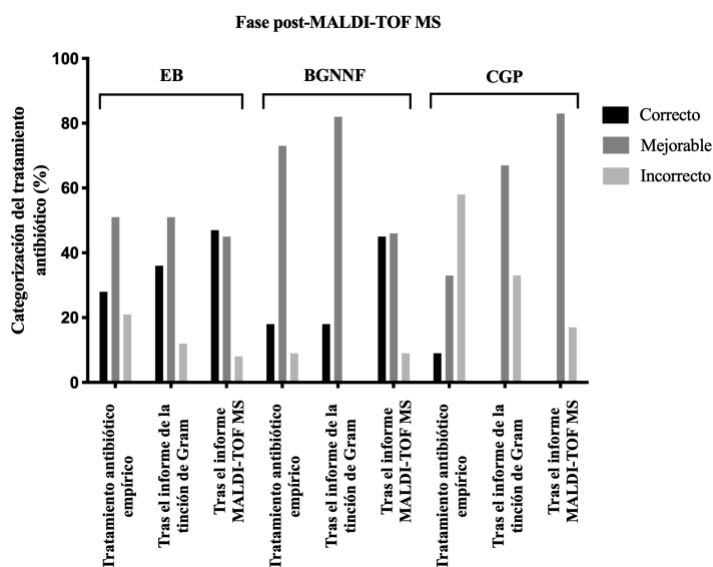


Figura V-4. Idoneidad de la terapia antibiótica para la bacteriemia antes o después de los ajustes realizados en base a los resultados de la tinción de Gram y el informe MALDI-TOF MS en la fase post-MALDI-TOF MS según el microorganismo causante. EB, Enterobacterias; BGNNF, bacilos Gram-negativos no fermentadores; CGP, cocos Gram-positivos.

Tabla V.9. Ajustes en la antibioterapia empírica realizados en base a la información proporcionada por la tinción de Gram en la fase post-MALDI-TOF MS del estudio.

Paciente	Gravedad	Foco de bacteriemia	Factores de riesgo para SARM/EB productoras de BLEE /MDR-XDR <i>P. aeruginosa</i>	Microorganismo (perfil de Resistencia)	Antibioterapia empírica (C/IN/M)/Razón	Tratamiento antibiótico empírico post-tinción de Gram (C/IN/M)/Razón
62	Bacteriemia	Respiratorio	No/ Si	<i>Acinetobacter baumannii</i> (XDR)	TZP + LZD + LVX (M)/EAR	MEM + TGC (C)
63	Bacteriemia	Hepato-biliar	No/ Si	<i>Enterococcus faecium</i> (WT)	ETP (C)	ETP + LZD (M)/No se desescala
64	Bacteriemia	Desconocido	No/No	<i>Enterococcus faecium</i> (WT)	- (IN)/No tratamiento	TZP + TEC (M)/No se desescala
65	Bacteriemia	Desconocido	No / Si	<i>Enterococcus faecium</i> (WT)	MEM (M)/EAR	MEM + TEC (M)/EAR
66	Bacteriemia	Hepato-biliar	No / Si	<i>Escherichia coli</i> (WT)	CIP (IN)/EER	ETP (C)
67	Bacteriemia	Desconocido	No / Si	<i>Escherichia coli</i> (WT)	MEM (M)/EAR	MEM + AMK (C)
68	Bacteriemia	Hepato-biliar	No / Si	<i>Escherichia coli</i> (WT)	TZP (C)	ETP + AMK (C)
69	Bacteriemia	Desconocido	No /Si	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (WT)	CIP (IN)/ EER	CIP + AMK (M) ^a
70	Bacteriemia	Desconocido	Si/Si	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (VIM)	IPM + AMK (M)/EAR	IPM + AMK + DAP (M)/EAR. No se desescala.

^aCefalosporinas de 3^a o 4^a generación se consideraron adecuadas.

AMK, Amikacina; AZM, Azitromicina; C, Correcto; CGP, Cocos Gram-positivos; CIP, Ciprofloxacino; CRO, Ceftriaxona; CST, Colistina; C/T, Ceftolozano/tazobactam; DAP, Daptomicina; EAR, espectro más amplio de lo requerido; EB, Enterobacterias; EER, espectro más estrecho de lo requerido; BLEE, β-lactamasa de espectro extendido; ETP, Ertapenem; FOF, Fosfomicina; IN, incorrecto; IPM, Imipenem; LZD, Linezolid; M, mejorable; MDR, multirresistente; MEM, Meropenem; SARM, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; SXT, Cotrimoxazol; TZP, Piperacilina/tazobactam; TGC, Tigeciclina; TEC, Teicoplanina; WT, wild-type; XDR, extremadamente resistente.

Tabla V.10. Ajustes antibióticos realizados en base a la identificación bacteriana directa de hemocultivos mediante espectrometría de masas después de la información proporcionada por la tinción de Gram en la fase post-MALDI-TOF MS.

Paciente	Gravedad	Foco de bacteriemia	Factores de riesgo para SARM/EB productoras de ESBL/MDR-XDR <i>P. aeruginosa</i>	Microorganismo (perfil de resistencia)	Antibioterapia posterior a la tinción de Gram (C/IN/M) ^a /Razón	Antibioterapia posterior a la identificación por MALDI TOF-MS (C/IN/M)/Razón
7	Bacteriemia	Desconocido	No/Si	<i>Enterococcus faecium</i> (WT)	CRO (IN)/EER	CRO + TEC (M)/EAR
8	Bacteriemia	Abdominal	No/ Si	<i>Enterococcus faecium</i> (WT)	MEM (IN)/EER. Cobertura inadecuada de CGP	MEM + LZD (M)/EAR
15	Bacteriemia	Desconocido	Si /No	<i>Escherichia coli</i> (WT)	(IN)/No tratamiento.	CIP + AZM (IN)/EER
17	Bacteriemia	Desconocido	No/ Si	<i>Escherichia coli</i> (WT)	TZP (C)	TZP + AMK (C)
18	Shock séptico	Abdominal	Si / Si	<i>Escherichia coli</i> (WT)	TZP (M)/EER. Debió asociarse AMK.	TZP + AMK (C)
19	Bacteriemia	Desconocido	No/ Si	<i>Escherichia coli</i> (WT)	TZP (C)	TZP + AMK (C)
21	Bacteriemia	Desconocido	Si / Si	<i>Escherichia coli</i> (WT)	TZP (C)	MEM (C)
22	Bacteriemia	Desconocido	Si / Si	<i>Escherichia coli</i> (ampC)	TZP + SXT (IP)/EAR	TZP + SXT + FOF (M)/FOF considerada innecesaria.
27	Shock séptico	Hepato-biliar	No/ Si	<i>Escherichia coli</i> (BLEE)	TZP (IN)/EER. Debió asociarse AMK.	MEM + AMK (C)
29	Bacteriemia	Hepato-biliar	No/ Si	<i>Escherichia coli</i> (BLEE)	TZP (C)	ETP (C)
31	Bacteriemia	Desconocido	Si / Si	<i>Escherichia coli</i> (BLEE)	TZP (M)/EAR	TZP + AMK (C)

34	Bacteriemia	Hepato-biliar	No/ Si	<i>Escherichia coli</i> (BLEE)	TZP (C)	MEM + AMK (C)
39	Bacteriemia	Asociada a catéter	Si / Si	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (WT)	TZP + LZD (M)/EAR	TZP + TGC (M)/ EAR
49	Bacteriemia	Desconocido	Si / Si	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (XDR)	MEM + AMK + TEC (M)/EAR	ETP + CST + LZD (M)/ EAR. No se desescala
52	Shock séptico	Desconocido	No/ Si	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (WT)	C/T + DAP (M)/EAR	C/T + CIP (C)
53	Bacteriemia	Desconocido	Si / Si	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (WT)	TZP + TEC + SXT (M)/EAR	TZP + AMK + SXT (C)
59	Shock séptico	Desconocido	Si /No	<i>Staphylococcus aureus</i> (WT)	CRO (IN)/EER	TZP + LZD (M)/No se desescala.
70	Bacteriemia	Desconocido	Si / Si	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (VIM)	IPM + AMK + DAP (M)/EAR	C/T + AZM + FOF (C)

^aEn todos menos en un caso, el mismo que tratamiento empírico.

AMK, Amikacina; AZM, Azitromicina; C, Correcto; CGP, Cocos Gram-positivos; CIP, Ciprofloxacino; CRO, Ceftriaxona; CST, Colistina; C/T, Ceftolozano/tazobactam; DAP, Daptomicina; EAR, espectro más amplio de lo requerido; EB, Enterobacterias; EER, espectro más estrecho de lo requerido; BLEE, β -lactamasa de espectro extendido; ETP, Ertapenem; FOF, Fosfomicina; IN, incorrecto; IPM, Imipenem; LZD, Linezolid; M, mejorable; MEM, Meropenem; SARM, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; SXT, Cotrimoxazol; TZP, Piperacilina/tazobactam; TGC, Tigeciclina; TEC, Teicoplanina; WT, wild-type; XDR, extremadamente resistente.

Si bien estos ajustes supusieron una ligera reducción en los tratamientos incorrectos (de 10 a 7), el número de pacientes que recibieron tratamientos correctos aumentó sustancialmente (de 19 a 27 pacientes). Por lo tanto, los pacientes que terminaron recibiendo el tratamiento correcto tras los ajustes de la terapia antibiótica empírica fue muy significativamente ($P=0,008$) superior en la fase post-MALDI-TOF MS que en el período previo al uso de esta tecnología.

Como se muestra en la tabla V.11, el impacto de la información proporcionada por MALDI-TOF MS en la modificación a los tratamientos antibióticos correctos fue más pronunciado en pacientes oncohematológicos (14%) que en pacientes de la unidad de cuidados intensivos (7%); sin embargo, las acciones tomadas en base a estos resultados llevaron a una disminución en el número de pacientes que recibieron tratamientos incorrectos entre los atendidos en la unidad de cuidados intensivos (5 vs 2) pero no en los pacientes de la sala de oncohematología (5 y 5, respectivamente).

Tabla V.11. Idoneidad del tratamiento antibiótico para bacteriemias antes (empíricamente) o después de proporcionar los resultados de la tinción de Gram o MALDI-TOF MS al médico prescriptor en pacientes oncohematológico y de unidades de cuidados intensivos (UCI)

Fase de estudio/Servicio	Categorización del tratamiento antibiótico		
	Correcto, no. (%)	Mejorable, no. (%)	Incorrecto, no. (%)
Pre-MALDI-TOF MS/oncohematología			
Tratamiento antibiótico empírico	6 (15,4)	23 (59,0)	10 (25,6)
Tratamiento antibiótico tras los resultados de la tinción de Gram	7 (18,0)	28 (71,8)	4 (10,2)
Pre-MALDI-TOF MS/UCI			
Tratamiento antibiótico empírico	6 (19,4)	18 (58,0)	7 (22,6)
Tratamiento antibiótico tras los resultados de la tinción de Gram	4 (12,9)	24 (77,4)	3 (9,7)
Post-MALDI-TOF MS/oncohematología			
Tratamiento antibiótico empírico	10 (23,3)	24 (55,8)	9 (20,9)
Tratamiento antibiótico tras los resultados de la tinción de Gram	17 (39,6)	21 (48,8)	5 (11,6)
Tratamiento antibiótico tras los resultados de la tinción de Gram y el informe MALDI-TOF MS	23 (53,5)	15 (34,9)	5 (11,6)
Post-MALDI-TOF MS/UCI			
Tratamiento antibiótico empírico	6 (22,2)	12 (44,5)	9 (33,3)
Tratamiento antibiótico tras los resultados de la tinción de Gram	2 (7,4)	20 (74,1)	5 (18,5)
Tratamiento antibiótico tras los resultados de la tinción de Gram y el informe MALDI-TOF MS	4 (14,8)	21 (77,8)	2 (7,4)

Está bien demostrado que el uso de la tecnología MALDI-TOF MS para la identificación directa de hemocultivos positivos reduce sustancialmente el tiempo en comparación con los métodos convencionales en los que el resultado puede llegar a retrasarse entre 24 y 48 horas. Esto permite un ajuste temprano de la terapia antimicrobiana empírica, lo que puede impactar positivamente en un beneficio clínico para el paciente (68).

Las limitaciones económicas y logísticas inherentes al uso de esta tecnología hacen complicada su integración en el diagnóstico de rutina de bacteriemias. Algo que es particularmente cierto teniendo en cuenta que la información proporcionada por la tinción de Gram poco después de que el hemocultivo sea detectado como positivo tiene un impacto significativo en la adecuación temprana del tratamiento antibiótico empírico (31).

No se ha investigado en profundidad el impacto de agregar al resultado de la tinción de Gram la identificación bacteriana rápida por MALDI-TOF MS en la adaptación de regímenes antibióticos empíricos. El objetivo en este segundo trabajo (Torres I. *J Infect Chemother* 2020) consistió en evaluar el valor potencial de la identificación bacteriana rápida por MALDI-TOF MS sumado a la información proporcionada por la tinción de Gram en pacientes con bacteriemia ingresados en salas de oncohematología y cuidados intensivos, donde la elección adecuada de los regímenes antibióticos empíricos prescritos y la pronta adaptación de la terapia en caso de una selección errónea de antimicrobianos tiene un gran impacto en la supervivencia del paciente. Cabe destacar que para la identificación rápida de hemocultivos positivos se utilizó nuestro método de enriquecimiento en medio líquido desarrollado en el primer trabajo (Torres I. *J Med Microbiol* 2017).

Nosotros observamos que, en ambas fases del estudio, la información proporcionada por la tinción de Gram resultó ser valiosa a la hora de adaptar terapias antibióticas empíricas, lo que condujo a una reducción sustancial de los pacientes regímenes terapéuticos empíricos incorrectos, en línea con los informes anteriores (31,32). Esto también indujo un aumento del número de pacientes que recibieron esquemas mejorables durante la fase pre- y post-MALDI-TOF MS y tratamientos correctos durante la fase posterior al uso de esta tecnología. Cabe destacar que el número de intervenciones en base a los resultados de la tinción de Gram se redujo a la mitad durante la fase con identificación bacteriana rápida, probablemente debido a que el médico prescriptor era conocedor de que esta información estaría disponible poco después de recibir los resultados de la tinción de Gram.

La introducción de la tecnología MALDI-TOF MS en el diagnóstico de rutina de bacteriemias llevó a un aumento sustancial (15,7%) del número de pacientes que cambiaron a esquemas de tratamiento correcto. Este dato es similar a otros estudios (69), donde encontraron que el uso de MALDI-TOF MS aumentó la proporción de terapia antimicrobiana apropiada en un 11,3% (64% versus 75,3%; $P < 0,001$). Cabe destacar que, pese a tener similitudes en el diseño del estudio, estos evaluaron la terapia antimicrobiana adecuada dentro de las 24 horas posteriores a la positividad del hemocultivo, no se realizó la identificación bacteriana rápida 24/7, los pacientes reclutados no solo fueron de las salas de oncohematología y cuidados intensivos, los criterios para la idoneidad de los tratamientos antibióticos empíricos fueron diferentes y la prevalencia de multirresistencia fue muy baja.

No obstante, en nuestro trabajo, el porcentaje de pacientes que permanecieron bajo regímenes de antibióticos incorrectos después de los ajustes no fue significativamente diferente al de la fase de estudio previa a MALDI-TOF MS. Es de interés subrayar que se observaron diferencias en cuanto al impacto de los resultados de la MALDI-TOF MS según la sala de hospitalización (oncohematología vs. unidad de cuidados intensivos), quizás debido a la ausencia de criterios homogéneos para los ajustes tempranos de antibióticos en todos los pacientes en estas unidades. En este sentido, aunque especulativo, planteamos la hipótesis de que la intervención de un equipo de administración antimicrobiana en el manejo terapéutico de nuestros pacientes habría resultado en una selección más adecuada de los regímenes antibióticos empíricos en base a la información proporcionada no solo por la tecnología MALDI-TOF MS, sino también los resultados de la tinción de Gram, como se demostró anteriormente (70,71) e independientemente de la sala de hospitalización.

Nuestro estudio tiene diversas limitaciones. En primer lugar, aunque se tuvo cuidado a la hora de mantener homogéneos los dos grupos de comparación se podría haber introducido un sesgo por la falta de aleatorización. Sin embargo, consideramos que esta posibilidad es poco probable ya que se incluyeron la mayoría (aunque no todos) los episodios de bacteriemia primaria que ocurrieron en las salas de oncohematología y de las unidades de cuidados intensivos. En segundo lugar, informamos sobre una experiencia de un solo centro, por lo que no hay certeza de que nuestras conclusiones puedan extrapolarse a otros entornos hospitalarios. En este sentido, la prevalencia de cepas resistentes en la comunidad y en las salas hospitalarias puede ser un factor determinante en la modulación del impacto clínico de la identificación bacteriana rápida mediante la tecnología MALDI-TOF MS. Por último, el verdadero impacto de MALDI-TOF MS en la práctica clínica de la vida real podría haberse sobreestimado; ciertamente, la exclusión de episodios de bacteriemia polimicrobiana en los que estuvieron involucrados

contaminantes potenciales (es decir, SCN) o aquellos en los que MALDI-TOF MS no pudo proporcionar una identificación precisa puede haber introducido un sesgo a favor de esta tecnología.

En conclusión, los datos presentados aquí refuerzan la idea de que los resultados de la tinción de Gram ofrecen información valiosa para el ajuste temprano de las terapias antibióticas empíricas para infecciones del torrente sanguíneo y respaldan la suposición de que la identificación rápida de bacterias involucradas en estos procesos infecciosos por MALDI-TOF MS proporciona un valor agregado para lograr este objetivo.

V.3 Rendimiento de un método basado en espectrometría de masas MALDI-TOF MS para la detección rápida de *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.* resistentes a cefalosporinas de tercera generación a partir de hemocultivos (Artículo III)

V.3.1 Optimización de la concentración de ceftriaxona

En base al método de identificación bacteriana rápida de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF MS desarrollado en el primer trabajo (Torres I. J Med Microbiol 2017) razonamos que este método podría optimizarse para lograr la detección rápida de resistencias a cefalosporinas de tercera generación (Ceph3) mediante MALDI-TOF MS comparando el crecimiento bacteriano en presencia o ausencia de un antibiótico dado. Para ello, establecimos la concentración óptima de ceftriaxona (CRO) que permitiera la detección de esta resistencia 10 aislamientos clínicos de *E. coli* (n=5) y de *K. pneumoniae* (n=5). De estos, dos *E. coli* eran productores de BLEE tipo CTX-M y tres *K. pneumoniae* eran productores de BLEE por la combinación de los tipos SHV y CTX-M.

Como se muestra en la tabla V.12, de las diferentes concentraciones de CRO que se utilizaron, la de 2 mg/ml fue la que obtuvo los mejores y más reproducibles resultados.

Table V.12. Categorización de aislados clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* como productores de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) o no productores de BLEE mediante MALDI-TOF MS a diferentes concentraciones de ceftriaxona

Especies bacterianas	Perfil de Resistencia genotípica (n° aislados)	Categorización correcta a una determinada concentración de ceftriaxona (%)			
		1 mg/ml	2 mg/ml	4 mg/ml	8 mg/ml
Todos	Todos (10)	7 (70)	9 (90)	7 (70)	6 (60)
	No BLEE (5)	2 (40)	4 (80)	4 (80)	5 (100)
	BLEE (5)	5 (100)	5 (100)	3 (60)	1 (20)
<i>E. coli</i>	Todos (5)	3 (60)	4 (80)	4 (80)	4 (80)
	No BLEE (3)	1 (33,3)	2 (66,7)	2 (66,7)	3 (100)
	BLEE (2)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	1 (50)
<i>K. pneumoniae</i>	Todos (5)	4 (80)	5 (100)	3 (60)	2 (40)
	No BLEE (2)	1 (50)	2 (100)	2 (100)	2 (100)
	BLEE (3)	3 (100)	3 (100)	1 (33,3)	0 (0)

V.3.2 Simulación de bacteriemias

Al igual que en el primer trabajo (Torres I. J Med Microbiol 2017), previo a la evaluación prospectiva, llevamos a cabo estudios experimentales destinados a evaluar el enfoque metodológico propuesto. Se utilizaron 44 aislamientos clínicos de *E. coli* (n=21) y *K. pneumoniae* (n=23) para simular bacteriemias inoculándolos en frascos de

hemocultivos aerobios a una concentración de 10^3 UFC/ml. De estos, 32 (72,7%) era resistentes a Ceph3, todos ellos productores de BLEE tipo CTX-M para *E. coli* (n=21) y tipo SHV + CTX-M para *K. pneumoniae* (n=23). Los 12 (27,3%) eran sensibles a Ceph3.

Los frascos de hemocultivos fueron detectados como positivos en una median de 11,5 horas (7,3-14,5 h) Los datos de la caracterización correcta de resistencia o sensibilidad a Ceph3 tras incubación de 2 h en BHI con o sin antibiótico se muestran en la tabla V.13. Los datos muestran que se logró la caracterización correcta en >90% de los casos. El método funcionó ligeramente mejor para los aislados de *E. coli* (95,2%) que para los de *K. pneumoniae* (91,3%).

Tabla V.13. Categorización de aislados clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* a partir de hemocultivos positivos como resistentes o sensibles a cefalosporinas de 3ª generación mediante MALDI-TOF MS

Especies bacterianas	Perfil de susceptibilidad a cefalosporinas de 3ª generación por microdilución en caldo (nº aislados)	Categorización correcta de las cepas como resistentes o sensibles a cefalosporinas de 3ª generación por MALDI-TOF MS (%)
Todos	S+R (44)	41 (93,2)
	S (12)	11 (91,6)
	R (32)	30 (93,7)
<i>E. coli</i>	S+R (21)	20 (95,2)
	S (6)	6 (100)
	R (15)	14 (93,3)
<i>K. pneumoniae</i>	S+R (23)	21 (91,3)
	S (6)	5 (83,3)
	R (17)	16 (94,1)

R, resistente; S, sensible.

V.3.3 Evaluación del rendimiento del método MALDI-TOF MS para la detección de Enterobacterias resistentes a cefalosporinas de 3ª generación

Para el análisis prospectivo se incluyeron un todas de 168 hemocultivos positivos consecutivos de pacientes únicos (mediana de edad 74 años; rango 36-99) con bacteriemia causada por *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. Los datos clínico-demográficos de los pacientes incluidos en el estudio se muestran en la tabla V.14.

Cuarenta y nueve (29,2%) de los aislamientos fueron resistentes a Ceph3 (*E. coli*, n=31 y *Klebsiella* spp., n=18) según lo determinado por microdilución en caldo con una CMI media a CRO de 16 mg/l ($8 \geq 32$ mg/l). De estos, 41 (83,7%) eran productores de BLEE, 7 (14,3%) expresaban BLEE y carbapenemasa clase D tipo OXA-48 según lo determinado por el ensayo Antimicrobial Resistance (AMR) Direct Flow Chip, y 1 (2%)

presumiblemente expresaba un ampC según el perfil de susceptibilidad antibiótica (piperacilina-tazobactam, CMI \leq 8 mg/l; Cefepime, CMI \leq 1 mg/l; ceftriaxona, CMI $>$ 32 mg/l; Ertapenem, CMI \leq 0.5 mg/l) y la ausencia de detección de BLEE mediante el kit genotípico AMR chip (tabla V.15).

Tabla V.14. Datos clínico-demográficos de los pacientes incluidos en el estudio

Parametro	Número (%)
Sexo	
Hombre	105 (62,5)
Mujer	63 (37,5)
Hospitalización	
Medicina interna	49 (29,2)
Unidad de cuidados intensivos	30 (17,8)
Oncohematología	23 (13,7)
Medicina digestiva	11 (6,5)
Urología	11 (6,5)
Otros servicios	29 (17,4)
No hospitalizados	15 (8,9)
Adquisición	
Nosocomial	56 (33,3)
Comunitaria	112 (66,7)
Gravedad	
Bacteremia	107 (63,7)
Sepsis	45 (26,8)
Shock séptico	16 (9,5)
Foco	
Desconocido	39 (22,6)
Abdominal	22 (13,1)
Respiratorio	3 (3,6)
Hepato-biliar	23 (13,7)
Urinario	74 (44)
Otros	5 (3)

Tabla V.15. Susceptibilidad a cefalosporinas de 3ª generación y perfil genotípico de las especies bacterianas cultivadas en hemocultivos

Especies bacterinas (nº aislados)	Sensible a cefalosporinas de 3ª generación, nº (%)	Resistentes a cefalosporinas de 3ª generación, nº (%)		
		BLEE	BLEE + carbapenemasa	ampC plasmídico
Total (168)	119 (70,8)	41 (24,4)	7 (4,2)	1 (0,6)
<i>E. coli</i> (115)	84 (73,0)	31 (26,9)	0	0
<i>K. pneumoniae</i> (50)	32 (64)	10 (20)	7 (14)	1 (2)
<i>K. oxytoca</i> (2)	2 (100)	0	0	0
<i>K. variicola</i> (1)	1 (100)	0	0	0

BLEE, β -lactamasa de espectro extendido.

La categorización correcta se logró de 45 (91,8%) de los 49 aislamientos resistentes a Ceph3, de los cuáles 38 eran productores de BLEE tipo CTX-M y 7 productores de CTX-M + OXA-48. En los cuatro aislamientos restantes que se clasificaron erróneamente como sensibles (*E. coli*, n=3 y *Klebsiella* spp., n=1), considerados errores muy importantes, se detectó mediante el ensayo AMR chip el alelo CTX-M 15 (n=2) o SHV-5 (n=1) para *E. coli*, mientras que no se detectó nada para la *K. pneumoniae* que albergaba presumiblemente un ampC plasmídico. La CMI a CRO fue ≥ 32 mg/l para las 3 cepas de *E. coli* y de 2 mg/l para la de *K. pneumoniae*.

Con respecto a las 119 (70,8%) cepas sensibles a Ceph3, 117 (98,3%) fueron correctamente clasificadas por el método basado en MALDI-TOF MS y dos fueron erróneamente categorizadas como resistentes, consideradas como errores mayores. A través del análisis genotípico, se encontró que uno de los dos aislamientos correspondía a una cepa de *K. pneumoniae* que expresaba el alelo SHV-5 presentando una CMI a CRO ≤ 1 mg/l. En la cepa restante (*E. coli*) no se identificó ningún marcador genotípico de resistencia a los antibióticos β -lactámicos.

En consecuencia, la concordancia en el “mundo real” entre los resultados proporcionados por el método MALDI-TOF MS y el ensayo de microdilución en caldo de referencia fue muy alta (índice Kappa, 0,91; IC 95%, 0,84-0,98). La sensibilidad del método MALDI-TOF MS fue del 91,8% (IC 95%, 80,8-96,8) y su especificidad del 98,3% (IC 95%, 94,1-99,5%).

Finalmente, las cepas discordantes (n=6) fueron recuperadas, se inocularon en frascos de hemocultivos aerobios y se analizaron de nuevo mediante el método MALDI-TOF MS como se describe anteriormente. Todas menos una cepa, presumiblemente una *K. pneumoniae* productora de ampC plásmido (error importante), se clasificaron correctamente como resistentes (n=4) o sensibles (n=1).

V.3.4 Comparación entre la inmunocromatografía de flujo lateral y el método basado en MS MALDI-TOF para la detección de resistencia a cefalosporinas de 3ª generación mediada por BLEE

Como parte del protocolo del estudio, evaluamos prospectivamente el rendimiento del inmunoensayo NG-Test CTX-M MULTI que permite la detección de las, ampliamente extendidas en nuestro medio, BLEE CTX-M en comparación con el método MALDI-TOF MS y finalmente con la microdilución en caldo convencional. La técnica inmunocromatográfica (IC) se realizó en un total 141 hemocultivos positivos (*E. coli*, n=97 y *Klebsiella* spp., n=44) incluidos en el estudio. El método MALDI-TOF MS

identificó 47 (33,3%) cepas bacterianas (*E. coli*, n=29 y *Klebsiella* spp., n=18) como resistentes a Ceph3, que fueron confirmadas por microdilución en caldo. De estas, 44 cepas eran productores de BLEE según lo determinado por el ensayo AMR chip.

El inmunoensayo de flujo lateral (LFIC) obtuvo resultados positivos para los 44 aislamientos productoras de BLEE (*E. coli*, n=28; *Klebsiella* spp., n=16). Las 3 cepas restantes que arrojaron un resultado negativo fueron un *E. coli* y una *K. pneumoniae* que expresaban un SHV-5, y la *K. pneumoniae* que presumiblemente albergando un ampC plasmídico. Todos estos posiblemente no detectados por la técnica IC.

Todas las cepas (*E. coli*, n=68; *Klebsiella* spp., n=26) categorizadas como sensibles a Ceph3 por el método MALDI-TOF MS (y por microdilución en caldo convencional) dieron negativo por el ensayo IC. Por lo tanto, la concordancia entre este ensayo IC y el método MALDI-TOF MS para detectar la resistencia a Ceph3 mediada por BLEE fue del 100%.

Los métodos basados en MALDI-TOF MS para la detección fenotípica de las resistencias bacterianas a los antimicrobianos que comparan el crecimiento bacteriano en presencia o ausencia de un antibiótico determinado a una concentración preestablecida están ganando popularidad debido a su simplicidad y bajo coste (39,72).

Algunos de los otros métodos aprovechan los programas de software comercialmente disponibles (MB-ASTRA) (73) o desarrollados internamente (74) para calcular y comparar el área bajo una curva de los espectros de bacterias expuestas o no a un determinado antibiótico. Se ha demostrado que un enfoque más simple, que consiste en categorizar como sensibles las cepas no identificadas correctamente a nivel de especie o género en presencia del antibiótico, y las identificadas correctamente como resistentes, tiene un rendimiento comparable (75,76).

En este tercer trabajo (Torres I. Eur J Clin Microbiol 2021) optimizamos y evaluamos prospectivamente nuestro método de identificación bacteriana rápida de hemocultivos positivos basado en MALDI-TOF MS para detectar resistencia a Ceph3 en Enterobacterias, omitiendo la evaluación semicuantitativa de proteínas bacterianas. En este contexto, también los comparamos con el inmunoensayo NG-Test CTX-M MULTI que permite la detección de los productores de BLEE tipo CTX-M. Nos enfocamos en pacientes que desarrollaron infecciones del torrente sanguíneo causadas por *E. coli* y *Klebsiella* spp. por su afectación especialmente frecuente en nuestro medio (>90%).

Nuestro método, que utilizó una concentración de CRO muy por encima del punto de corte de susceptibilidad para Enterobacterias, clasificó correctamente el 91,8% de las cepas resistentes con cuatro errores muy importantes (falsa sensibilidad) y el 98,3% de las cepas sensibles con dos errores importantes (falsa resistencia). La sensibilidad general del "mundo real" del método MALDI-TOF MS fue del 91,8% (IC 95%, 80,8-96,8%) y su especificidad fue del 98,3% (IC 95%, 94,1-99,5%). Las cepas discordantes se volvieron a analizar mediante la inoculación en frascos de hemocultivos, obteniendo categorización correcta en todas menos una. Esto sugiere que puede haber ocurrido un error operativo durante el procedimiento como el uso de inóculos demasiado bajos o altos. Quizá la estandarización de la preparación del inóculo podría evitar estos errores, pero a costa de aumentar el tiempo de manipulación y, por lo tanto, minimizar la simplicidad del protocolo. No obstante, según nuestra experiencia, basta con una formación adecuada del personal para conseguir una precisión adecuada.

Estudios previos (73,74,77,78) han evaluado métodos basados en MALDI-TOF MS con el mismo propósito que el nuestro, pero en estos casos utilizando programas de software asistente como MB-ASTRA o incluso desarrollados localmente. En estos

métodos, además de incluir un paso de extracción de proteína bacteriana, la exposición a la concentración de Ceph3 (generalmente cefotaxima) y la duración de la incubación oscilaron entre 2 y 20 mg/L y 2 y 4 h, respectivamente. En estos trabajos, la concordancia categórica entre el MBT-ASTRA y el método de referencia varió entre 83 y 100%. En particular, (78) informaron una alta tasa de errores importantes (16%) y muy importantes (29%). El método MALDI-TOF MS que evaluamos aquí, como se indicó, no implica el uso de programas de software auxiliares y omite la extracción de proteínas, lo que hace que el proceso operativo sea más simple y rápido.

El ensayo NG-Test CTX-M MULTI es una técnica inmunocromatográfica que permite la detección de BLEE tipo CTX-M, mecanismo principal de resistencia a Ceph3 en *E. coli* y *Klebsiella* spp. en nuestro medio. Nuestro trabajo obtuvo una concordancia del 100% entre el LFIC y el método basado en MALDI-TOF MS. Las tres cepas resistentes que mostraban otros marcadores genotípicos que mediaban la resistencia a las Ceph3 dieron negativo en el ensayo IC, al igual que todas las cepas susceptibles.

Hasta donde sabemos, son pocos los estudios que han evaluado el rendimiento del ensayo NG-Test CTX-M MULTI en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* a partir de hemocultivos positivos. En el trabajo realizado por Bianco, et al. (79) analizaron un total de 166 aislados de Enterobacterias a partir de hemocultivos positivos, que incluían 34 cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE, mientras que en el trabajo de Bernabeu, et al. (80) evaluaron 100 hemocultivos positivos donde identificaron correctamente las 5 cepas *E. coli* productoras de BLEE que se incluyeron. En ambos estudios se obtuvo una concordancia excelente (100%) entre el LFIC y el análisis genotípico.

Indudablemente, una de las principales limitaciones de nuestro estudio es el número relativamente limitado de episodios de infección del torrente sanguíneo causados por cepas resistentes a Ceph3, así como la falta de estudios de clonalidad bacteriana. Otra limitación importante compartida por el método MALDI-TOF-MS evaluado aquí y otros de alguna manera análogos a él es que el procedimiento no informa sobre la susceptibilidad de los aislados a los antibióticos carbapenémicos, que son ampliamente utilizados como opción terapéutica cuando las Ceph3 son resistentes; sin embargo, la prevalencia de la resistencia a los carbapenémicos en *E. coli* y *Klebsiella* spp. en nuestro medio es despreciable (0% para *E. coli* y 0,8% para *Klebsiella*. spp.).

En conclusión, demostramos que nuestro método basado en MALDI-TOF MS presenta una alta precisión para la categorización de sensibilidad o resistencia a cefalosporinas de 3ª generación mediada por una variedad de genes de β -lactamasas en

Escherichia coli y *Klebsiella* spp. causantes de infecciones del torrente sanguíneo. De manera similar, el ensayo NG-Test CTX-M MULTI funcionó excelentemente para la detección de *E. coli* y *Klebsiella* spp. para cepas productoras de BLEE directamente de hemocultivos positivos.

V.4 Perfil proteómico del líquido cefalorraquídeo para el diagnóstico de la meningitis por Enterovirus mediante MALDI-TOF MS (Artículo IV)

Para la obtención de un perfil proteómico del LCR, mediante la tecnología MALDI-TOF MS, que estuviera específicamente asociado con la meningitis/encefalitis por Enterovirus (EV) y que permitiera el diagnóstico rápido de dichas infecciones sin necesidad de recurrir a la detección de ARN del virus mediante RT-PCR, utilizamos un total de 114 LCR no consecutivos que se dividieron aleatoriamente en un grupo de entrenamiento (n=76) y un grupo de validación (n=38). El número de muestras de LCR positivas y negativas para EV se distribuyó equitativamente entre ambos conjuntos, siendo de 41% las muestras positivas para EV en el grupo de entrenamiento y de 42% en el grupo de validación. Los datos clínico-demográficos de los pacientes y las características biológicas de las muestras de LCR se muestran en la tabla V.16.

Tabla V.16. Características clínico-demográficas y biológicas de los pacientes y muestras de LCR incluidas en el estudio

Factor	Grupo de entrenamiento (n=76)		Grupo de validación (n=38)	
	EV negativo (n=45, 59%)	EV positivo (n=31, 41%)	EV negativo (n=22, 58%)	EV positivo (n=16, 42%)
Edad				
<18 años	20 (44,4)	30 (96,8) *	6 (27,3)	13 (81,3) *
>18 años	25 (55,6)	1 (3,2)	16 (72,7)	3 (18,8)
Sexo^a				
Hombre	29 (65,9)	22 (78,6)	12 (54,5)	13 (86,7) *
Mujer	15 (34,1)	6 (21,4)	10 (45,5)	2 (13,3)
Diagnóstico				
Meningitis aséptica	4 (8,9)	17 (54,8)	7 (31,8)	10 (62,5)
Bacteriemia/sepsis	3 (6,6)	-	1 (4,5)	-
Síndrome confusional	4 (8,9)	-	2 (9,1)	1 (6,3)
Convulsiones	3 (6,7)	-	-	-
Encefalitis	11 (24,4)	-	3 (13,6)	-
Fiebre y cefalea	11 (24,4)	14 (45,2)	2 (9,1)	5 (31,3)
Otros	9 (20)	-	7 (31,8)	-
Características bioquímicas del LCR. Mediana (rango)				
Glucosa (mg/dl)	65 (40-147)	59 (35-81) *	72 (28-166)	64 (36-78)
Proteínas (mg/dl)	52 (12-721)	28 (14-147) *	62 (17-539)	36 (17-680) *
Celularidad (células/ μ l)	14 (0-593)	39 (1-1617) *	11 (0-3570)	161 (4-472)
% mononucleares	87 (4-100)	55 (10-80) *	90 (1-100)	68 (32-100)
% polimorfonucleares	14 (0-94) *	45 (20-90) *	10 (0-99)	32 (0-68)
Hematíes (células/ μ l)	23 (0-40200)	5 (0-16000)	5 (0-12107)	6 (0-2000)

EV, Enterovirus; LCR, líquido cefalorraquídeo

^a Datos disponibles para 72 y 37 de los pacientes de entrenamiento y validación, respectivamente.

* Valor de $p < 0,05$ mediante la prueba chi-cuadrado y la prueba U de Mann-Whitney para variables categóricas y continuas, respectivamente

En general, los pacientes con meningitis por EV eran más jóvenes y tenían una mayor celularidad del LCR. En el grupo de entrenamiento, los pacientes con meningitis por EV incluidos también mostraron niveles bajos de glucosa y proteínas en la muestra de LCR. Cabe destacar que no existieron diferencias significativas ($P=0,86$) entre los pacientes que fueron positivos para EV y los que lo hicieron para otros agentes infecciosos.

V.4.1 Análisis de los espectros de MALDI-TOF MS de las muestras de LCR de los grupos de entrenamiento y validación

Este análisis reveló la presencia de 403 picos con una intensidad relativa $\geq 10\%$. Como se observa en la tabla V.17, el estudio mediante regresión logística por pasos (backward/forward stepwise) identificó 30 picos que estaban presentes de manera diferencial en las muestras positivas y negativas para EV, y fueron los que usamos para construir el modelo.

Tabla V.17. Parámetros del modelo y presencia de picos discriminantes en muestras de LCR positivo y negativo para Enterovirus en los grupos de entrenamiento y validación

Pico (m/z)	Coefficiente beta ^a	% en EV positivo (entrenamiento)	% en EV negativo (entrenamiento)	% en EV positivo (validación)	% en EV negativo (validación)
1990	-72	25,8	2,2	12,5	0
2413	24	16	0	18,8	9,1
2425	-48	3,2	22,2	18,8	22,7
2435	10	9,7	0	0	0
2601	40	9,7	0	6,3	4,5
2761	-86	22,6	4,4	12,5	9,1
2837	105	22,6	2,2	6,3	4,5
3038	12	9,7	0	6,3	0
3232	19	32,3	44,4	37,5	68,2
3272	4	0	8,9	6,3	18,2
3283	-36	19,4	37,8	31,3	59,1
3441	34	41,9	26,7	68,8	22,7
3868	19	9,7	37,8	25	50
3948	36	9,7	40	37,5	45,5
3989	18	38,7	17,8	43,8	27,3
4151	42	9,7	0	31,3	4,5
4301	-23	6,5	44,4	18,8	54,5
4455	-107	0	13,3	6,3	9,1
4587	2	83,9	66,7	81,3	72,7
5751	-6	0	8,9	0	18,2
5829	-19	0	20	0	13,6
5865	33	64,5	75,6	37,5	81,8
5873	72	25,8	0	0	4,5
6277	33	41,9	4,4	6,3	4,5
6622	-2	74,2	55,6	62,5	54,5
6631	-1	3,2	22,2	12,5	18,2
7817	-37	6,5	35,6	25	50
7892	-2	6,5	33,3	31,3	31,8
7975	0,12	45,2	15,6	43,8	18,2
8930	-30	0	11,1	6,3	40,9
Constante	-34				

^a Coeficientes de regresión logística. Estos coeficientes proporcionan la magnitud (valor y signo) de la contribución de cada variable al modelo. El coeficiente beta informa sobre la contribución (“peso”) de un determinado pico incluido en el modelo para clasificar una muestra como EV positiva (signo positivo) o EV negativa (signo negativo). La ausencia total de picos categoriza una muestra como EV negativa, ya que la constante en el modelo es -34.

El modelo obtuvo un Cox-Snell R^2 de 0,68 y un Nagelkerke's R^2 de 0,92. En la figura V.5 se observa la capacidad discriminatoria del modelo mediante un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales supervisados PLS-DA.

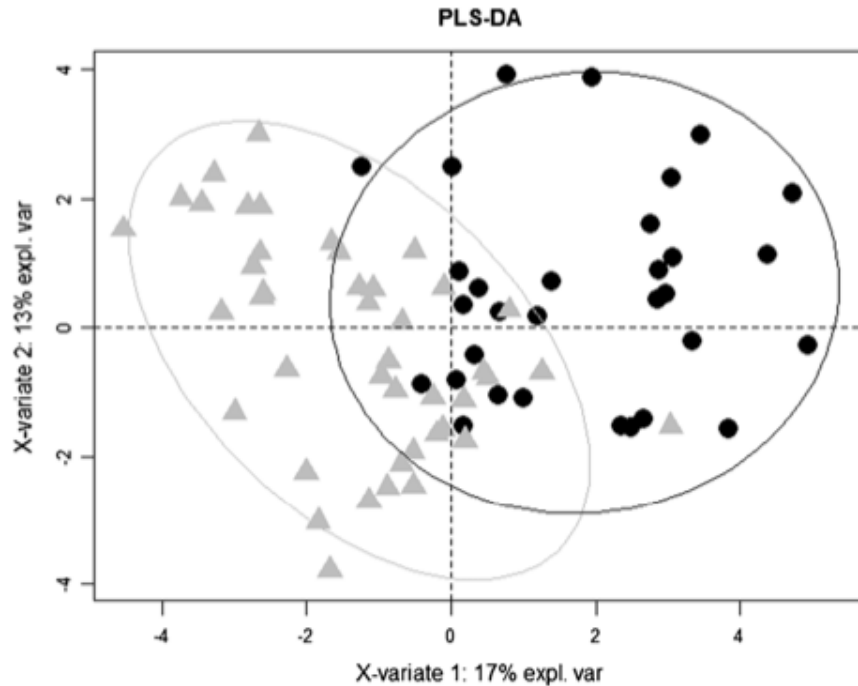


Figura V-5. Diferenciación de muestras de líquido cefalorraquídeo positivas y negativas para Enterovirus en el grupo de entrenamiento mediante análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales supervisados (PLS-DA). Círculos negros, muestras positivas para Enterovirus; Triángulos grises, muestras negativas para enterovirus.

La combinación de picos expresadas diferencialmente permitió clasificar correctamente las muestras de LCR, ya que no hubo ningún pico que, individualmente, pudiera distinguir por completo las muestras positivas. En la figura V.6 se observan 3 espectros representativos de las LCR positivos para Enterovirus.

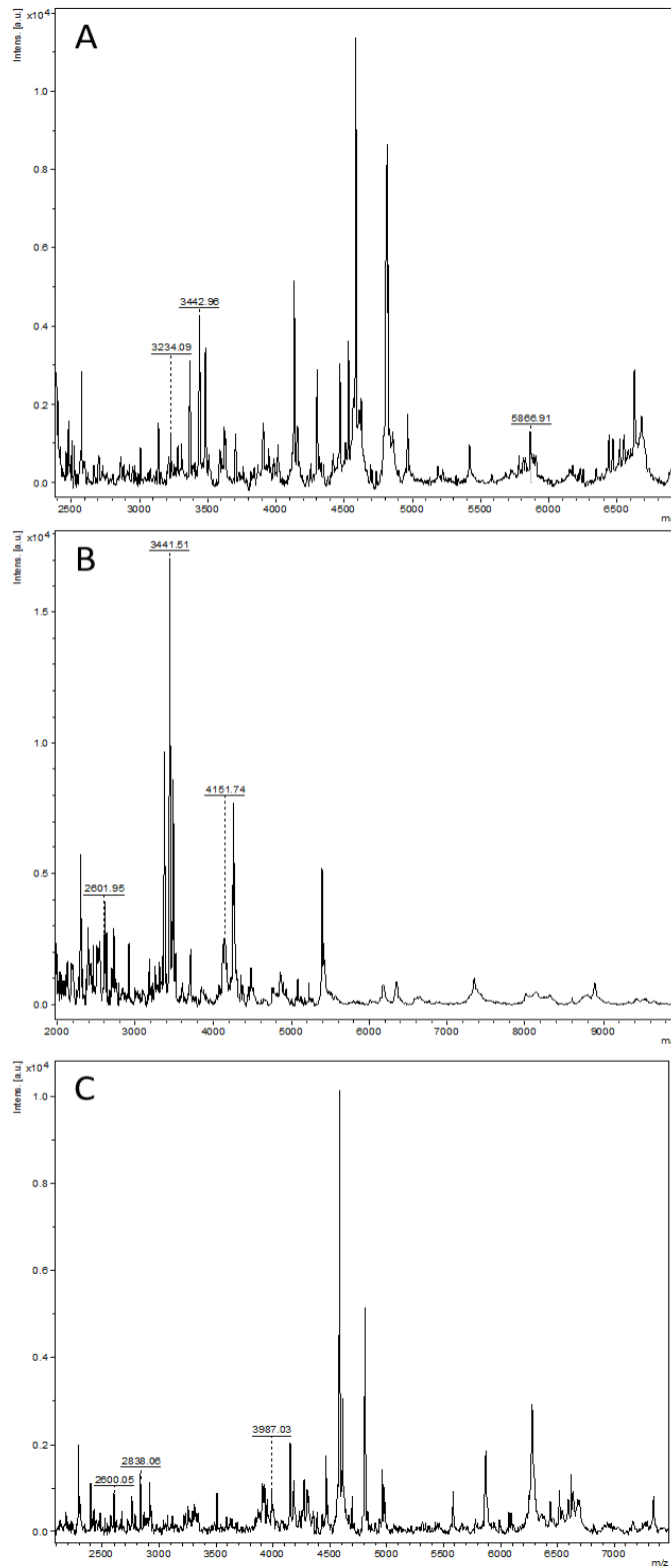


Figura V-6. A-C. Espectros MALDI-TOF MS representativos de tres muestras de LCR positivas para Enterovirus por RT-PCR. Se detecta los picos (2601, 2838, 3234, 3442, 3987, 4151, 5866 m/z).

Nuestro modelo mostró una alta capacidad predictiva y una alta precisión para la clasificación general. El modelo pudo clasificar correctamente 42 (93,3%) de las 45

negativas para EV y 29 (93,5%) de las muestras EV positivas, obteniendo así tres resultados falsos positivos y dos falsos negativos.

Seguidamente se probó la capacidad discriminadora del modelo para las 38 muestras de LCR del grupo de validación. El modelo clasificó correctamente 19 (86,4%) de las 22 muestras negativas incluidas en este grupo y 13 (81,3%) de las muestras positivas, obteniéndose así tanto tres resultados falsos positivos como falsos negativos. Los resultados de la categorización de las muestras de LCR incluidas en los grupos de entrenamiento y validación se muestran en la tabla V.18. La sensibilidad y la especificidad del modelo fueron de 93,5% y 93,3% para las muestras del grupo de entrenamiento y de 81,3% y 86,4% para las del grupo de validación.

Tabla V.18. Evaluación del rendimiento del modelo para la discriminación entre las muestras de LCR positivas y negativas para Enterovirus entre los grupos de entrenamiento y validación

Variable	Grupo de entrenamiento (n=76)		Grupo de validación (n=38)	
	EV negativo	EV positivo	EV negativo	EV positivo
Resultado previsto				
Positivo	3	29	3	13
Negativo	42	2	19	3
Clasificación correcta (%)	93,3%	93,5%	86,4%	81,3%
Exactitud	93,4%		84,2%	
AUC (IC 95%)	0,99 (0,98-1,00)		0,81 (0,66-0,97)	
Sensibilidad, % (IC 95%)	93,5% (79-98)		81,3% (57-93)	
Especificidad, % (IC 95%)	93,3% (82-98)		86,4% (67-95)	
AUC, área bajo la curva; IC, intervalo de confianza; EV, enterovirus				

Cabe destacar que el modelo clasificó correctamente 18 (94,7%) de las 19 muestras de LCR positivo para ADN de VHS-1, VVZ o VHS-6 y que eran negativas para ARN de EV. Es de interés resaltar que los espectros obtenidos de muestras de LCR que dieron positivo para virus distintos al EV fueron bastante heterogéneos, y no se pudo reconocer un perfil proteómico típico para un virus determinado.

En general, un total de seis muestras se clasificaron como resultados falsos positivos, uno de ellos siendo positivo para VHS-1, y cinco muestras se clasificaron como falsos negativos.

Como de muestras en la figura V.7 A-C, el perfil proteómico de MALDI-TOF-MS obtenido de las muestras de LCR enriquecidas con coxsackievirus B3 no contenía ninguno de los picos incluidos en el modelo y era comparable al de la muestra de LCR no enriquecida (figura V.7 D). Cabe destacar que los espectros obtenidos directamente de la preparación de coxsackievirus B3 incluyeron un total de 27 picos que no estaban presentes en el modelo descrito en este documento (figura V.7 E).

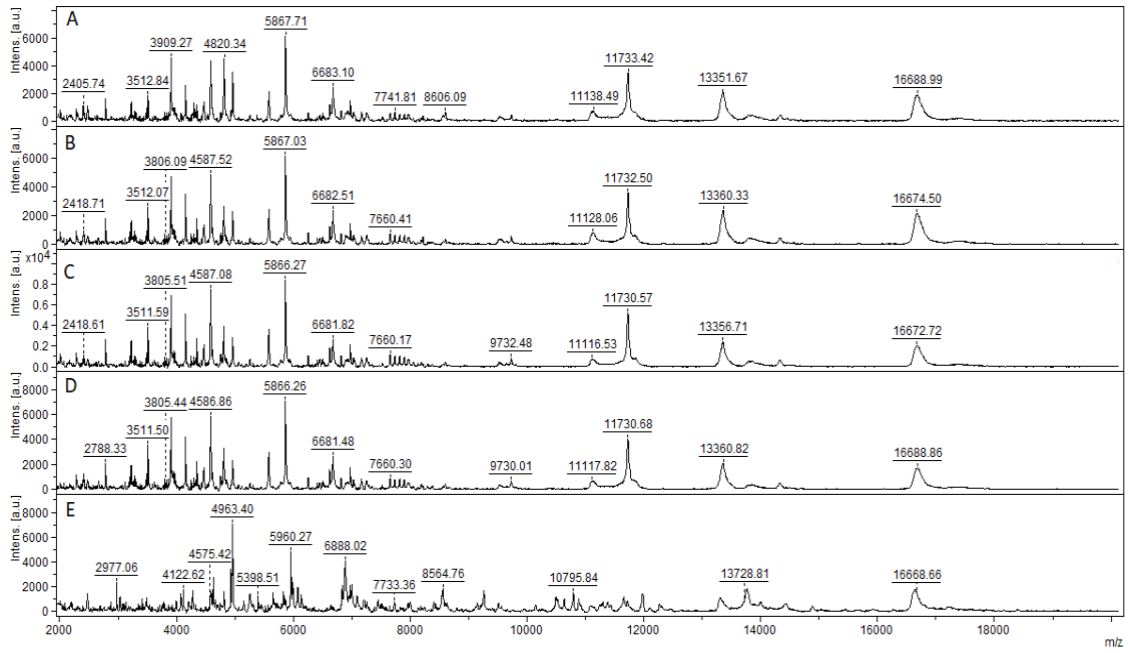


Figura V-7. A-E. Espectros MALDI-TOF MS representativos obtenidos de muestras de LCR enriquecidas con coxsackievirus B3 en 10^6 (A), 10^5 (B) y 10^4 (C) TCID₅₀/ml; LCR no enriquecido (D) y preparación de coxsackievirus B3 que contiene 10^8 TCID₅₀/ml.

Hasta la fecha, el uso de la tecnología MALDI-TOF-MS para la identificación de virus directamente de muestras clínicas está muy limitado por su baja sensibilidad (26), lográndose solo después del cultivo celular o mediante la combinación con técnicas de PCR (23–25,81). En particular, se ha utilizado PCR multiplex con tecnología MALDI-TOF-MS para detectar coxsackievirus, poliovirus y echovirus en muestras de heces (82,83). Sin embargo, hasta donde sabemos, este cuarto trabajo (Torres I. Eur J Clin Microbiol 2018) es el único que buscó identificar pequeñas proteínas presentes en muestras de LCR que se expresan diferencialmente entre pacientes con o sin meningitis por Enterovirus mediante el uso de perfiles proteómicos obtenidos por MALDI-TOF MS.

Inicialmente realizamos un análisis experimental que nos permitió construir un modelo que incorpora 30 picos que pueden permitir la discriminación entre muestras de LCR con resultados positivos o negativos para ARN de EV mediante RT-PCR. La presencia o ausencia en la muestra de los diferentes picos del modelo proporciona información relevante pero no definitiva en cuanto a su categorización final como EV positivo o EV negativo; de hecho, la contribución relativa de cada pico al modelo se pondera teniendo en cuenta el resto de los picos sobre los que se construye el modelo. La precisión general del modelo fue de alrededor del 93% y, en particular, clasificó correctamente el 93% tanto de muestras EV positivas como negativas.

Adicionalmente, para confirmar la capacidad de discriminación del modelo se utilizó un grupo de muestras de validación para las cuales la precisión fue ligeramente inferior (84%), probablemente debido al menor tamaño muestral. Este método pudo categorizar correctamente todas las muestras negativas para EV excepto una que resultó positiva para el VHS-1.

Una de las principales ventajas de este método es que se puede completar en menos de 40 minutos a un coste muy bajo (aproximadamente 3€ por muestra), que es sustancialmente menor que el de las técnicas de RT-PCR disponibles comercialmente. El protocolo de precipitación de proteínas se lleva a cabo en menos de 10 minutos y emplea productos disponibles en todos los laboratorios, y el análisis MALDI-TOF-MS se realiza bajo las condiciones utilizadas para la identificación rutinaria de bacterias y levaduras.

Teóricamente, los picos que contribuyen a la elaboración de nuestro modelo pueden corresponder a componentes integrales de partículas virales, proteínas celulares o ambos. En un trabajo reciente (84) pudieron discriminar correctamente entre diferentes EV utilizando los perfiles proteómicos obtenidos por MALDI-TOF MS previo paso por cultivo celular. Todos los espectros que obtuvieron tenían dos comunes a aproximadamente 3700 y 7500 m/z correspondientes a las proteínas estructurales de EV más abundantes, VPg y VP4. En nuestro trabajo no encontramos ninguno de estos picos

en las muestras positivas para EV. Esto se podría atribuir a que las proteínas virales en otras matrices, como LCR, pueden haberse fragmentado debido a la actividad de las proteasas locales, en contraste con lo que cabría esperar de los ensayos que utilizan virus purificados.

El presunto bajo título de EV en las muestras de LCR es una de las principales causas que la posibilidad de que las proteínas virales contribuyan a este perfil del LCR, ya que, probablemente, este título cayó por debajo del límite de detección de la tecnología MALDI-TOF-MS (4). De acuerdo con esto, observamos que los espectros obtenidos de muestras de LCR enriquecidas a diferentes concentraciones de EV (que oscilan entre 10^4 y 10^6 TCID₅₀/ml) no recuperaron ninguno de los picos incluidos en el modelo, ni tampoco los presentes en el perfil de espectro de los virus purificados (84). Estos datos refuerzan la idea de que la sensibilidad de la técnica MALDI-TOF MS puede no ser suficiente para detectar EV en muestras de LCR, por lo que es probable que las proteínas que contribuyeron al modelo fueran de origen celular.

Las infecciones de líneas celulares neuronales SK-N-MC con la cepa neurovirulenta EV-A71 (EV-A71/UH1) dio como resultado una respuesta celular específica en la que se produjeron una serie de cambios en la apoptosis, el estrés, el citoesqueleto y la energía, donde las proteínas del metabolismo estaban reguladas al alza (85). Esto sugiere que la infección del sistema nervioso central por EV puede estar asociada con un perfil proteómico de LCR característico como el que puede estar representado en nuestro modelo. Desafortunadamente, la caracterización genotípica de las cepas de EV en esta cohorte no se llevó a cabo por razones logísticas (falta de disponibilidad de un volumen suficiente de muestra). Esto impide sacar cualquier conclusión sobre este asunto.

Naturalmente, el escaso número de muestras positivas para ADN de VHS o VVZ incluidas en el estudio impidió cualquier análisis que permitiera identificar un espectro representativo en muestras de LCR.

Indudablemente el estudio presenta diversos factores de confusión que incluyen; (i) las diferencias en la duración del tiempo de almacenamiento de la muestra que podría afectar la estabilidad de la proteína como ya se ha demostrado en algún trabajo (86); (ii) la concentración de proteínas totales y los recuentos de glóbulos blancos presentes en las muestras de LCR que difieren entre los grupos; (iii) la variabilidad en la carga EV en cada muestra de LCR; (iv) y, la heterogeneidad en el grupo de control en cuanto a la demografía de los pacientes y la enfermedad subyacente.

Además, el estudio tiene varias limitaciones que no pueden ser ignoradas. En primer lugar, hubo diferencias significativas entre las muestras EV positivas y EV negativas con respecto al número total de leucocitos, por lo que existe la posibilidad de que los picos de diferenciación puedan corresponder a proteínas de leucocitos, cuyas concentraciones escalan con la abundancia de leucocitos. Sin embargo, creemos que esto es poco probable ya que el modelo pudo identificar correctamente la mayoría de los LCR de pacientes con meningitis/encefalitis por herpesvirus con recuentos de células comparables (o incluso más altos) que los LCR de pacientes positivos para EV. En segundo lugar, debido a los pequeños volúmenes de LCR disponibles no se intentó investigar la naturaleza de las proteínas representadas por los 30 picos que contribuyen al modelo. En tercer lugar, se incluyó un número relativamente pequeño de muestras de pacientes con meningitis/encefalitis causadas por virus distintos de los EV. Por otro lado, no se incluyeron en los análisis muestras de LCR de pacientes con meningitis bacteriana decapitada (parcialmente tratada con agentes antibacterianos), que pueden producir perfiles bioquímicos y de celularidad similares a los de la meningitis por EV. Por último, nuevamente, no se realizó la caracterización genética de EV.

En conclusión, en este estudio demostramos que el perfil de pequeñas proteínas directamente de muestras de LCR mediante MALDI-TOF-MS puede permitir el diagnóstico de meningitis por EV. Nuestros hallazgos justifican estudios prospectivos adicionales que utilicen muestras de LCR no criopreservados que involucren cohortes de pacientes de prueba y de control homogéneos para validar este modelo. Además, si los picos en nuestro modelo predictivo se hubieran perfilado por completo, la identificación de las proteínas celulares (si las hubiera) que contribuyen a él probablemente nos habría ayudado a obtener una visión más profunda de la patogenia de las infecciones del sistema nervioso central por EV. A su vez, es muy posible que esto finalmente se traduzca en mejoras significativas en el manejo clínico de estas enfermedades.

Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

- I. El método desarrollado para la identificación directa de bacterias a partir de hemocultivos positivos, basado en la incubación corta de un pequeño volumen de estos en caldo de enriquecimiento BHI y posterior análisis mediante MALDI-TOF MS es preciso, reproducible y de bajo coste.
- II. La implementación del método desarrollado para la identificación directa de bacterias a partir de hemocultivos positivos ofrece una información valiosa añadida a la derivada del análisis microscópico tras la tinción de Gram para el ajuste de los tratamientos antimicrobianos empíricos en pacientes ingresados en la UCI o unidades de pacientes oncohematológicos.
- III. El método MALDI-TOF MS desarrollado permite la categorización de *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp. causantes de bacteriemia en sensibles o resistentes a cefalosporinas de 3ª generación mediada con rapidez y fiabilidad.
- IV. El perfil proteómico de muestras de líquido cefalorraquídeo obtenido mediante MALDI-TOF MS puede permitir el diagnóstico de las meningitis/encefalitis causadas por Enterovirus.

Bibliografía

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abián J, Carrascal M, Gay M. Introducción a la Espectrometría de Masas para la caracterización de péptidos y proteínas en Proteómica. 2008.
2. García MO, Oviaño M, Belén G, Sánchez R, de Dios J, Pérez C, et al. Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en Microbiología Clínica. 2019.
3. Oviaño M, Rodríguez-Sánchez B. MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. Vol. 39, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Elsevier Doyma; 2021. p. 192–200.
4. Angeletti S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. Vol. 138, *Journal of Microbiological Methods*. Elsevier B.V.; 2017. p. 20–9.
5. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, Scola B la, Fournier PE, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*. 2009 Aug 15;49(4):543–51.
6. Alby K, Gilligan PH, Miller MB. Comparison of matrix-Assisted laser Desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry platforms for the identification of gram-negative rods from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(11):3822–54.
7. Couturier MR, Mehinovic E, Croft AC, Fisher MA. Identification of HACEK clinical isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011 Mar;49(3):1104–6.
8. Rodríguez-Sánchez B, Alcalá L, Marín M, Ruiz A, Alonso E, Bouza E. Evaluation of MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) for routine identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe*. 2016 Dec 1;42:101–7.
9. Rodríguez-Sánchez B, Marín M, Sánchez-Carrillo C, Cercenado E, Ruiz A, Rodríguez-Créixems M, et al. Improvement of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of difficult-to-identify bacteria and its impact in the workflow of a clinical microbiology laboratory. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2014;79(1):1–6.
10. Alcaide F, Amlerová J, Bou G, Ceysens PJ, Coll P, Corcoran D, et al. How to: identify non-tuberculous Mycobacterium species using MALDI-TOF mass spectrometry. Vol. 24, *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V.; 2018. p. 599–603.
11. Pranada AB, Witt E, Bienia M, Kostrzewa M, Timke M. Accurate differentiation of mycobacterium chimaera from mycobacterium intracellulare by MALDI-TOF MS analysis. *Journal of Medical Microbiology*. 2017 May 1;66(5):670–7.
12. Zvezdanova ME, Escribano P, Ruiz A, Martínez-Jimenez MC, Pelaez T, Collazos A, et al. Increased species-assignment of filamentous fungi using MALDI-TOF MS coupled with a simplified sample processing and an in-house library. *Medical Mycology*. 2019 Jan 1;57(1):63–70.
13. Singhal N, Kumar M, Virdi JS. MALDI-TOF MS in clinical parasitology: Applications, constraints and prospects. Vol. 143, *Parasitology*. Cambridge University Press; 2016. p. 1491–500.
14. Íñigo M, Coello A, Fernández-Rivas G, Rivaya B, Hidalgo J, Quesada MD, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples, combining

- urine screening methods and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016 Apr 1;54(4):988–93.
15. İlki AA, Özsoy S, Gelmez G, Aksu B, Söyletir G. An alternative for urine cultures: Direct identification of uropathogens from urine by MALDI-TOF MS. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* [Internet]. 2020 Oct 21 [cited 2022 May 2];67(3):193–7. Available from: <https://akjournals.com/view/journals/030/67/3/article-p193.xml>
 16. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The Influence of Inadequate Antimicrobial Treatment of Bloodstream Infections on Patient Outcomes in the ICU Setting. *CHEST* [Internet]. 2000 Jul 1;118(1):146–55. Available from: <https://doi.org/10.1378/chest.118.1.146>
 17. 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 Nov 25;4(11).
 18. Idelevich EA, Schüle I, Grünastel B, Wüllenweber J, Peters G, Becker K. Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014 Oct 1;20(10):1001–6.
 19. Kohlmann R, Hoffmann A, Geis G, Gatermann S. MALDI-TOF mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid pathogen identification from positive blood cultures. *International Journal of Medical Microbiology*. 2015 Jun 1;305(4–5):469–79.
 20. Delport JA, Strikwerda A, Armstrong A, Schaus D, John M. MALDI-ToF short incubation identification from blood cultures is associated with reduced length of hospitalization and a decrease in bacteremia associated mortality. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2017 Jul 1;36(7):1181–6.
 21. Segawa S, Sawai S, Murata S, Nishimura M, Beppu M, Sogawa K, et al. Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. *Clinica Chimica Acta*. 2014 Aug 5;435:59–61.
 22. Nyvang Hartmeyer G, Kvistholm Jensen A, Böcher S, Damkjaer Bartels M, Pedersen M, Engell Clausen M, et al. Mass spectrometry: Pneumococcal meningitis verified and *Brucella* species identified in less than half an hour. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2010 Sep;42(9):716–8.
 23. Cobo F. Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net Application of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Virology: A Review. Vol. 7, *The Open Virology Journal*. 2013.
 24. Erukhimovitch V, Karpasasa M, Huleihel M. Spectroscopic detection and identification of infected cells with herpes viruses. *Biopolymers*. 2009;91(1):61–7.
 25. Zhang C, Xiao Y, Du J, Ren L, Wang J, Peng J, et al. Application of multiplex PCR coupled with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight analysis for simultaneous detection of 21 common respiratory viruses. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015 Aug 1;53(8):2549–54.
 26. Vila J, Zboromyrska Y, Burillo A, Bouza E. Future applications of mass spectrometry in microbiology. 2016.
 27. Buehler SS, Madison B, Snyder SR, Derzon JH, Cornish NE, Saubolle MA, et al. Effectiveness of practices to increase timeliness of providing targeted therapy for

- inpatients with bloodstream infections: A laboratory medicine best practices systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015 Nov 23;29(1):59–103.
28. Clerc O, Prod'Hom G, Vogne C, Bizzini A, Calandra T, Greub G. Impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with Gram-Negative Bacteremia: A prospective observational study. *Clinical Infectious Diseases*. 2013 Apr 15;56(8):1101–7.
 29. Fraser A, Paul M, Almanasreh N, Tacconelli E, Frank U, Cauda R, et al. Benefit of Appropriate Empirical Antibiotic Treatment: Thirty-day Mortality and Duration of Hospital Stay. *American Journal of Medicine*. 2006 Nov;119(11):970–6.
 30. Verroken A, Defourny L, le Polain De Waroux O, Belkhir L, Laterre PF, Delmée M, et al. Clinical impact of MALDI-TOF MS identification and rapid susceptibility testing on adequate antimicrobial treatment in sepsis with positive blood cultures. *PLoS ONE*. 2016 May 1;11(5).
 31. Munson EL, Diekema DJ, Beekmann SE, Chapin KC, Doern G v. Detection and treatment of bloodstream infection: Laboratory reporting and antimicrobial management. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003 Jan 1;41(1):495–7.
 32. Uehara Y, Yagoshi M, Tanimichi Y, Yamada H, Shimoguchi K, Yamamoto S, et al. Impact of reporting gram stain results from blood culture bottles on the selection of antimicrobial agents. *American Journal of Clinical Pathology*. 2009 Jul;132(1):18–25.
 33. Hong SP, Kim NK, Hwang SG, Chung HJ, Kim S, Han JH, et al. Detection of hepatitis B virus YMDD variants using mass spectrometric analysis of oligonucleotide fragments. *Journal of Hepatology*. 2004 May;40(5):837–44.
 34. Schwahn AB, Wong JWH, Downarda KM. Rapid typing and subtyping of vaccine strains of the influenza virus with high resolution mass spectrometry. In: *European Journal of Mass Spectrometry*. IM Publications LLP; 2010. p. 321–9.
 35. Lee JH, Hachiya A, Shin SK, Lee J, Gatanaga H, Oka S, et al. Restriction fragment mass polymorphism (RFMP) analysis based on MALDI-TOF mass spectrometry for detecting antiretroviral resistance in HIV-1 infected patients. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013;19(6).
 36. Seah VXF, Ong RYL, Lim ASY, Chong CY, Tan NWH, Thoon KC. Impact of a carbapenem antimicrobial stewardship program on patient outcomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017 Sep 1;61(9).
 37. Goff DA, Jankowski C, Tenover FC. Using Rapid Diagnostic Tests to Optimize Antimicrobial Selection in Antimicrobial Stewardship Programs [Internet]. Available from: <https://caesar.sheridan.com/reprints/>
 38. Maurer FP, Christner M, Hentschke M, Rohde H. Advances in rapid identification and susceptibility testing of bacteria in the clinical microbiology laboratory: Implications for patient care and antimicrobial stewardship programs. *Infectious Disease Reports*. 2017;9(1):18–27.
 39. Oviaño M, Bou G. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Rapid Detection of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Beyond. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2018 Nov 28;32(1):e00037-18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30487165>
 40. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012 Mar;50(3):927–37.

41. Hrabák J, Chudáčková E, Walková R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: From research to routine diagnosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013 Jan;26(1):103–14.
42. Oviaño M, Fernández B, Fernández A, Barba MJ, Mouriño C, Bou G. Rapid detection of enterobacteriaceae producing extended spectrum beta-lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014 Nov 1;20(11):1146–57.
43. Monteferrante CG, Sultan S, ten Kate MT, Dekker LJM, Sparbier K, Peer M, et al. Evaluation of different pretreatment protocols to detect accurately clinical carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by MALDI-TOF. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016 Oct 1;71(10):2856–67.
44. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Chi HP, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: A new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*. 2006 Jan;12(1):83–8.
45. Rhoads DD, Wang H, Karichu J, Richter SS. The presence of a single MALDI-TOF mass spectral peak predicts methicillin resistance in staphylococci. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2016 Nov 1;86(3):257–61.
46. Lau AF, Wang H, Weingarten RA, Drake SK, Suffredini AF, Garfield MK, et al. A rapid matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for single-plasmid tracking in an outbreak of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52(8):2804–12.
47. Dortet L, Bonnin RA, Pennisi I, Gauthier L, Jousset AB, Dabos L, et al. Rapid detection and discrimination of chromosome- and MCR-plasmid-mediated resistance to polymyxins by MALDI-TOF MS in *Escherichia coli*: The MALDIxin test. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018 Dec 1;73(12):3359–67.
48. Maxson T, Taylor-Howell CL, Minogue TD. Semi-quantitative MALDI-TOF for antimicrobial susceptibility testing in *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*. 2017 Aug 1;12(8).
49. Jung JS, Hamacher C, Gross B, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, et al. Evaluation of a semiquantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry method for rapid antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016 Nov 1;54(11):2820–4.
50. Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, van Duin D, Clancy CJ. Infectious Diseases Society of America Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β -lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-P. *aeruginosa*). *Clinical Infectious Diseases*. 2021 Apr 1;72(7):1109–16.
51. Takissian J, Bonnin RA, Naas T, Dortet L. NG-test carba 5 for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacterales from positive blood cultures. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2019 May 1;63(5).
52. Liguori M, Qualtieri A, Tortorella C, Drenzo V, Bagalà A, Mastrapasqua M, et al. Proteomic profiling in multiple sclerosis clinical courses reveals potential biomarkers of neurodegeneration. *PLoS ONE*. 2014 Aug 6;9(8).
53. von Neuhoff N, Oumeraci T, Wolf T, Kollewe K, Bewerunge P, Neumann B, et al. Monitoring CSF Proteome Alterations in Amyotrophic Lateral Sclerosis:

- Obstacles and Perspectives in Translating a Novel Marker Panel to the Clinic. *PLoS ONE*. 2012 Sep 6;7(9).
54. Cercenado E, Rafael M, Moreno C, Carlos J, Díaz R, Carlos Rodríguez J, et al. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares [Internet]. Available from: www.seimc.org
 55. Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). Vol. 93, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012. p. 965–74.
 56. Buchan BW, Riebe KM, Ledebor NA. Comparison of the MALDI biotyper system using sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012 Feb;50(2):346–52.
 57. Pujol M, Limón E. Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2013 Feb;31(2):108–13.
 58. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). Vol. 315, *JAMA - Journal of the American Medical Association*. American Medical Association; 2016. p. 801–10.
 59. Bar-Yoseph H, Hussein K, Braun E, Paul M. Natural history and decolonization strategies for ESBL/carbapenem-resistant Enterobacteriaceae carriage: Systematic review and meta-analysis. Vol. 71, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press; 2016. p. 2729–39.
 60. Cisneros-Herreros JM, Cobo-Reinoso J, Pujol-Rojo M, Rodríguez-Baño J, Salavert-Lletí M. Guidelines for the diagnosis and treatment of patients with bacteriemia. In: *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Elsevier Doyma; 2007. p. 111–30.
 61. Torres Fink I, Tormo Palop N, Borrás Salvador R, Buesa Gómez J, Gimeno Cardona C, Navarro Ortega D. Evaluation of the DNA microarray “AMR Direct Flow Chip Kit” for detection of antimicrobial resistance genes from Gram-positive and Gram-negative bacterial isolated colonies. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2019 Aug 1;37(7):454–7.
 62. Mather CA, Werth BJ, Sivagnanam S, SenGupta DJ, Butler-Wu SM. Rapid detection of vancomycin-intermediate staphylococcus aureus by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016 Apr 1;54(4):883–90.
 63. Wessel D, Flugge UI. A Method for the Quantitative Recovery of Protein in Dilute Solution in the Presence of Detergents and Lipids. Vol. 138, *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*. 1984.
 64. López-Fernández H, Santos HM, Capelo JL, Fdez-Riverola F, Glez-Peña D, Reboiro-Jato M. Mass-Up: An all-in-one open software application for MALDI-TOF mass spectrometry knowledge discovery. *BMC Bioinformatics*. 2015 Oct 5;16(1).
 65. Martiny D, Dediste A, Vandenberg O, Vandenberg O. Comparison of an in-house method and the commercial Sepsityper™ kit for bacterial identification directly from positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight mass spectrometry. Vol. 31, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012. p. 2269–81.
 66. Verroken A, Defourny L, Lechgar L, Magnette A, Delmée M, Glupczynski Y. Reducing time to identification of positive blood cultures with MALDI-TOF MS

- analysis after a 5-h subculture. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2015 Feb 1;34(2):405–13.
67. Kroumova V, Gobbato E, Basso E, Mucedola L, Giani T, Fortina G. Direct identification of bacteria in blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a new methodological approach. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2011 Aug 15;25(15):2247–9.
 68. Friedrich R, Rappold E, Bogdan C, Held J. Comparative analysis of the wako B-glucan test and the fungitell assay for diagnosis of candidemia and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*. 2018 Sep 1;56(9).
 69. Vlek ALM, Bonten MJM, Boel CHE. Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *PLoS ONE*. 2012 Mar 16;7(3).
 70. Osthoff M, Gürtler N, Bassetti S, Balestra G, Marsch S, Pargger H, et al. Impact of MALDI-TOF-MS-based identification directly from positive blood cultures on patient management: a controlled clinical trial. *Clinical Microbiology and Infection*. 2017 Feb 1;23(2):78–85.
 71. Beganovic M, Costello M, Wieczorkiewicz SM. Effect of matrix-assisted laser desorption ionization - Time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) alone versus MALDI-TOF MS combined with real-time antimicrobial stewardship interventions on time to optimal antimicrobial therapy in patients with positive blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017 May 1;55(5):1437–45.
 72. Faron ML, Buchan BW, Ledebor NA. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Use with Positive Blood Cultures: Methodology, Performance, and Optimization. *J Clin Microbiol*. 2017 Dec;55(12):3328-3338. doi: 10.1128/JCM.00868-17.
 73. Axelsson C, Rehnstam-Holm AS, Nilson B. Rapid detection of antibiotic resistance in positive blood cultures by MALDI-TOF MS and an automated and optimized MBT-ASTRA protocol for *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infectious Diseases*. 2020 Jan 2;52(1):45–53.
 74. Hernández Egado S, Luis Reborado A de, García Señán A, Gil González AB, Muñoz Bellido JL, González Buitrago JM, et al. Summation of peaks and L34 ribosomal protein in the presence and absence of antibiotics enables susceptibility testing using MALDI-TOF mass spectrometry in 2 h from *Escherichia coli*-positive blood cultures. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2019 Apr 1;37(4):244–50.
 75. Li M, Liu M, Song Q, Xiong L, Chen Z, Kang M, et al. Rapid antimicrobial susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry using a qualitative method in *Acinetobacter baumannii* complex. *Journal of Microbiological Methods*. 2018 Oct 1;153:60–5.
 76. Idelevich EA, Storck LM, Sparbier K, Drews O, Kostrzewa M, Becker K. Rapid direct susceptibility testing from positive blood cultures by the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based direct-on-target microdroplet growth assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2018 Oct 1;56(10).
 77. Jung JS, Hamacher C, Gross B, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, et al. Evaluation of a semiquantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry method for rapid antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016 Nov 1;54(11):2820–4.
 78. Sauget M, Bertrand X, Hocquet D. Rapid antibiotic susceptibility testing on blood cultures using MALDI-TOF MS. *PLoS ONE*. 2018 Oct 1;13(10).

79. Bianco G, Boattini M, Iannaccone M, Cavallo R, Costa C. Evaluation of the NG-Test CTX-M MULTI immunochromatographic assay for the rapid detection of CTX-M extended-spectrum- β -lactamase producers from positive blood cultures. Vol. 105, *Journal of Hospital Infection*. W.B. Saunders Ltd; 2020. p. 341–3.
80. Bernabeu S, Ratnam KC, Boutal H, Gonzalez C, Vogel A, Devilliers K, et al. A lateral flow immunoassay for the rapid identification of CTX-M-producing enterobacteriales from culture plates and positive blood cultures. *Diagnostics*. 2020 Oct 1;10(10).
81. Sjöholm MIL, Dillner J, Carlson J. Multiplex detection of human herpesviruses from archival specimens by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008 Feb;46(2):540–5.
82. Thao NTT, Ngoc NTK, Tú PV, Thúy TT, Cardoso MJ, McMinn PC, et al. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous identification of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16. *Journal of Virological Methods*. 2010 Dec;170(1–2):134–9.
83. Piao J, Jiang J, Xu B, Wang X, Guan Y, Wu W, et al. Simultaneous detection and identification of enteric viruses by PCR-Mass assay. *PLoS ONE*. 2012 Aug 1;7(8).
84. Calderaro A, Arcangeletti MC, Rodighiero I, Buttrini M, Gorrini C, Motta F, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. *Scientific Reports*. 2014;4.
85. Chan SY, Sam IC, Lai JKF, Chan YF. Cellular proteome alterations in response to enterovirus 71 and coxsackievirus A16 infections in neuronal and intestinal cell lines. *Journal of Proteomics*. 2015 Jul 1;125:121–30.
86. Simonsen AH, Bahl JMC, Danborg PB, Lindstrom V, Larsen SO, Grubb A, et al. Pre-analytical factors influencing the stability of cerebrospinal fluid proteins. *Journal of Neuroscience Methods*. 2013 May 5;215(2):234–40.

Anexos

VIII. ANEXOS

VIII.1 Escrito del director de la Tesis Doctoral sobre el Factor de Impacto de las publicaciones que se recogen en la Tesis Doctoral

Artículo I

Short-term incubation of positive blood cultures in brain-heart infusion broth accelerates identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry. *Journal of Medical Microbiology*. 2017: 66 (12);1752-1758
Ignacio Torres (1), Estela Giménez (1), Tania Pascual (1), Felipe Bueno (1), Dixie Huntley (1), Mireia Martínez (1) y David Navarro (1)

1.- Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, España.

Contribución del aspirante:

Ignacio Torres realizó la mayor parte de los aspectos analíticos, recopiló las muestras y asistió en el análisis de los datos, la interpretación de los resultados y revisó el texto definitivo.

Factor de impacto de la revista

2.11

Artículo II

Early adjustment of empirical antibiotic therapy of bloodstream infections on the basis of direct identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and Gram staining results. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2020; 26 (9); 963-969

Ignacio Torres (1), Carolina Pinto (2), Rosa Oltra (2), Tania Pascual (1), Nieves Carbonell (3), Javier Colomina (1), Mar Tormo (4), Eliseo Albert (1), Gerardo Aguilar (5), Carlos Solano (4) y David Navarro (1,6)

1.- Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, España.

2.- Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, España.

3.- Unidad de Cuidados Intensivos, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, España.

4.- Servicio de Hematología, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, España.

5.- Servicio de Anestesia y Reanimación, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, España.

6- Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España.

Contribución del aspirante:

Ignacio Torres realizó la mayor parte de los aspectos analíticos y asistió en el análisis de los datos, la interpretación de los resultados y revisó el texto definitivo.

Factor de impacto de la revista

2.21

Artículo III

Performance of a MALDI-TOF mass spectrometry-based method for rapid detection of third-generation oxymino-cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. from blood cultures. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease. 2021; 40 (9); 1925-1932

Ignacio Torres (1), Eliseo Albert (1), Estela Giménez (1), Beatriz Olea (1), Arantxa Valdivia (1), Tania Pascual (1), Dixie Huntley (1), David Sánchez (1), Rosa María Costa (1), Carolina Pinto (2), Rosa Oltra (2), Javier Colomina (1) y David Navarro (1,3)

1.- Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, España.

2.- Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, España.

3- Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España.

Contribución del aspirante:

Ignacio Torres realizó la mayor parte de los aspectos analíticos, recopiló las muestras y asistió en el análisis de los datos, la interpretación de los resultados y revisó el texto definitivo.

Factor de impacto de la revista

3.27

Artículo IV

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) proteomic profiling of cerebrospinal fluid in the diagnosis of enteroviral meningitis: a proof-of-principle study. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*. 2018; 37 (12); 2331-2339.

Ignacio Torres (1), Estela Giménez (1), Víctor Vinuesa (1), Tania Pascual (1), Juan Miguel Moya (1), Juan Alberola (2), Ana Martínez-Sapiña (3), y David Navarro (1,2)

1.- Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, España.

2.- Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, España.

3- Servicio de Microbiología, Hospital Miguel Servet, Zaragoza, España.

Contribución del aspirante:

Ignacio Torres realizó la mayor parte de los aspectos analíticos, recopiló las muestras y asistió en el análisis de los datos, la interpretación de los resultados y revisó el texto definitivo.

Factor de impacto de la revista

2.59

VIII.2 Informe del director de la Tesis Doctoral sobre la coautoría de las publicaciones compendiadas en la Tesis Doctoral

En cumplimiento del artículo 8.1.a del Reglamento sobre depósito, evaluación y defensa de la tesis doctoral de la Universidad de Valencia, vigente a partir del 11 de febrero de 2012, realizo el presente escrito con el objetivo de informar que el doctorando, Ignacio Torres, ha realizado la mayor parte de los aspectos analíticos contenidos en la tesis doctoral, participó en los análisis estadísticos y revisó los textos definitivos.

Ni el doctorando, Ignacio Torres, ni ninguno de los coautores han utilizado ninguno de los artículos compendiados en esta tesis ni implícita ni explícitamente para la realización de otras tesis doctorales.

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'D' followed by a horizontal line and a curved flourish.

David Navarro Ortega

Artículos

Short-term incubation of positive blood cultures in brain-heart infusion broth accelerates identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry

Ignacio Torres, Estela Gimenez, Tania Pascual, Felipe Bueno, Dixie Huntley, Mireia Martínez and David Navarro*

Abstract

Purpose. Fast identification of bacteria directly from positive blood cultures (BCs) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS) can be achieved either using the MALDI Sepsityper kit (protein extraction method) or after a short-term pre-cultivation step on solid medium. We developed a new method that involves short-term enrichment of positive BCs in brain–heart infusion broth (BHI) prior to MALDI-TOF MS analysis.

Methodology. Eighty-four BCs flagged as positive were included in this study; these were processed in parallel either directly using the MALDI Sepsityper kit or following a short-term culture either in BHI or on Columbia blood agar with 5 % sheep blood (CBA).

Results. Bacterial species were successfully identified in 91.6, 89.2 and 65.4 % of cases after pre-cultivation for 4 h in BHI, on CBA, or by using the MALDI Sepsityper kit, respectively. Overall, the mean incubation time to correct identification was shorter when pre-cultures were performed in BHI; the mean time for Gram-negative rods was 78.2 min in BHI and 108.2 min on CBA ($P=0.045$), and the mean time for Gram-positive cocci was 128.5 min in BHI and 169.6 min on CBA ($P=0.013$).

Conclusion. Short-term enrichment of BCs in BHI accelerates identification of a number of bacterial species by MALDI-TOF MS. Further prospective studies are needed to validate our method and gauge its potential clinical impact on the management of bloodstream bacterial infections.

INTRODUCTION

Rapid identification of bacteria from blood cultures (BCs) allows the timely initiation of optimal antibiotic therapy for bloodstream infections, and this dramatically impacts on patient survival [1, 2]. In fact, in cases of bacteraemia the mortality risk doubles with a 24 h delay in the provision of appropriate antibiotics [3]. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS) is increasingly being used for routine aetiological diagnosis of bloodstream infections. In order to improve its performance, different sample preparation methods, most notably the ethanol/formic acid bacterial/fungal protein extraction method, have been implemented [4, 5], and one of these methods is commercially available: the MALDI Sepsityper kit (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) [6, 7].

Nevertheless, the use of these methods results in additional hands-on processing time and increased costs. A practical and simple approach to circumventing the protein extraction step required in preparation for MALDI-TOF analysis has been developed: it requires short-term pre-cultivation of positive BCs on solid medium, and the growing biomass is then used for MALDI-TOF MS microbial identification [8–14]. This method has been shown to facilitate very early and reliable bacterial identification from positive blood cultures [8–14]. MALDI-TOF identification of bacterial pathogens grown in BCs following brief incubation on solid medium is associated with a reduction in the length of hospitalization and mortality risk in both adult and pediatric patients [15, 16]. Based on a previous study [17], here we investigated whether pre-cultivation of positive BCs in a highly nutritious liquid media (brain–heart infusion broth, BHI) would further shorten the time to successful

Received 21 August 2017; Accepted 6 November 2017

Author affiliation: Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Institute for Research INCLIVA, Valencia, Spain.

***Correspondence:** David Navarro, david.navarro@uv.es

Keywords: MALDI-TOF MS; short-term incubation; broth incubation; blood cultures; fast identification.

Abbreviations: BC, blood culture; BHI, brain-heart infusion; CBA, Columbia blood agar; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry.

identification of bacteria down to the species level by MALDI-TOF MS.

METHODS

Blood culture processing

Preliminary experiments aimed at evaluating the performance of the methodological approaches described below were carried out using a test set of 10 simulated bacteraemia samples. Five Gram-negative rods belonging to *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, $n=3$, *Klebsiella pneumoniae*, $n=1$, *Enterobacter aerogenes*, $n=1$) and 5 *Staphylococcus aureus* clinical isolates were spiked into blood culture bottles (BACTEC Plus Aerobic/F and Plus Anaerobic/F medium bottles, Becton Dickinson and Company, New Jersey, USA) at 10^3 c.f.u. ml⁻¹ and incubated in an automated continuous-monitoring blood culturing instrument (BACTEC FX; BD). The isolates had been grown overnight on chocolate agar medium (BD) at 36 °C in air with 5 % CO₂ using an incubator (Heracell 240i CO₂ incubator, Thermo Fisher Scientific, Langensfeld, Germany). The bacterial inocula were prepared in sterile saline. The concentration of bacteria was determined by the quantitative plating method prior to inoculation into the blood culture bottles.

Next, a total of 84 non-consecutive BCs flagged as positive and collected between December 2016 and April 2017 from unique adult or paediatric patients were prospectively analysed. Only BCs positive for bacteria (revealed by Gram staining) corresponding to significant bacteraemia episodes (the presence of given bacterial species growing in two blood culture bottles drawn within a maximum of 1 h.) were included in the study. No further specific criteria (other than logistical conditions, i.e. the ability to perform the experiments immediately after BC positivity) were taken into consideration for specimen selection. When the instrument flagged bottles as positive, these were immediately processed for MALDI-TOF identification following three different protocols, performed in parallel. (1) We used the MALDI Sepsityper kit (Bruker Daltonics, MA, USA) with ethanol/formic acid protein extraction, as recommended by the manufacturer [18]. (2) We also performed a short-term culture on Columbia blood agar with 5 % sheep blood (CBA) from BD, as previously described [8]. Briefly, two drops of positive blood cultures were plated on a CBA plate and spread over the plate surface with an inoculation loop. The plates were incubated at 36 °C in air with 5 % CO₂ in a Heracell 240i CO₂ incubator. (3) Finally, we carried out a short-term incubation at different time points in BHI (Oxoid Limited, Hampshire, UK) as follows: 50 µl of blood were inoculated into a volume of 500 µl of BHI in a sterile Eppendorf vial. The vials were incubated at 36 °C in air with 5 % CO₂ for different lengths of time, as detailed below. Following the pre-established incubation times the vials were centrifuged at 13,000 rpm for 2 min, the supernatants were discarded and the pellets were used for MALDI-TOF MS analyses. Positive BCs were then sub-cultured overnight on chocolate agar following our routine diagnostic protocol,

and the growing biomass was used for MALDI-TOF MS identification.

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry identification

MALDI-TOF MS identification from short-term and routine cultures was performed using the intact cell procedure, as previously described [19]. Bacterial identification from short-term cultures was attempted until successful at different time points: 30, 90, 180 and 240 min. The spectra were acquired using the Microflex LT system (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and analysed on MALDI BIOTYPER 3.3 (Bruker Daltonics) software. MALDI-TOF MS analyses were performed in triplicate on the same target slide. Criteria for successful identification were met when the spectral score of at least one out of the three spots was ≥ 2.0 (species level) and ≥ 1.7 (genus level), as recommended by the manufacturer.

Statistical analysis

Student's *t*-test was used for the comparison of two means. A *P* value ≤ 0.05 was deemed to be significant.

RESULTS

We reasoned that enrichment of BC bacterial mass in a highly nutritious liquid medium (BHI broth) could shorten the time to successful MALDI-TOF identification currently achieved by short-term incubation on a solid medium (CBA). To test this hypothesis, we conducted preliminary experiments using a set of 10 paired blood-culture bottles (aerobic and anaerobic) spiked with five fermentative Gram-negative rods (*Escherichia coli*, $n=3$, *Klebsiella pneumoniae*, $n=1$, *Enterobacter aerogenes*, $n=1$) and 5 *Staphylococcus aureus* clinical isolates. We evaluated the performance of both procedures after pre-cultivation for 30, 90, 180, and 240 min. Overall, both *Enterobacteriaceae* and *Staphylococcus aureus* isolates were identified earlier after enrichment in BHI. Specifically, 4 and 3 *Enterobacteriaceae* were identified following 30 min incubation in BHI and on CBA, respectively, and 5 and 2 *Staphylococcus aureus* were identified after 90 min of pre-culture in BHI and on CBA, respectively. All *Enterobacteriaceae* were identified after 90 min of pre-culture irrespective of the medium used, while it took 180 min to achieve correct identification of all *Staphylococcus aureus* isolates by either method.

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of bacterial species grown in routine blood cultures following different methods

A total of 84 positive BCs were used for the experiments described below. Of these, 40 were aerobic, 38 anaerobic and 6 were paediatric. A single bacterial species was isolated from all the BCs. These were fermentative Gram-negative rods ($n=33$), non-fermentative Gram-negative rods ($n=7$), fastidious Gram-negative rods (*Campylobacter coli*, $n=1$), anaerobic Gram-negative rods ($n=1$), Gram-positive cocci (*Staphylococcus* spp., $n=26$, *Streptococcus* spp., $n=7$,

Abiotrophia defectiva, $n=1$ and *Enterococcus* spp., $n=7$) or Gram-positive rods ($n=1$). As shown in Table 1, all bacteria were correctly identified at the species level by MALDI-TOF MS after overnight sub-culture on chocolate agar. The MALDI Sepsityper kit assay failed to identify 19 isolates (34.6%) at the species level, most notably coagulase-negative *Staphylococcus* spp. (CNS), *Streptococcus pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii*. Out of these 19 isolates, the MALDI Sepsityper kit allowed identification of 5 isolates at the genus level (*Streptococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. and *Listeria* spp.). However, these were misclassified at the species level.

Pre-cultivation in BHI for up to 4 h. produced slightly better results than pre-cultivation on CBA. In fact the BHI method was able to identify all but 7 bacterial species (*Acinetobacter baumannii*, $n=1$, CNS, $n=2$, *Staphylococcus aureus*, $n=1$, *Streptococcus pneumoniae*, $n=2$ and *Abiotrophia defectiva*, $n=1$). In turn, 9 bacterial species could not be identified following short-term pre-culture on CBA; in 8 cases these were Gram-positive cocci and, as expected, *Bacteroides vulgatus*. All but one of the bacterial isolates (*Streptococcus oralis*) were identified at the species level by either short-term culture method; *Streptococcus oralis* was denoted as *Streptococcus mitis/oralis*, with a spectral score of 1.83; for

Table 1. Successful identification of bacteria grown in blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight mass spectrometry using different protocols

Bacteria (number of isolates)	Number of bacterial isolates successfully identified (%)			
	Pre-culture on broth medium	Pre-culture on solid medium	Sepsityper (with protein extraction)	Overnight subculture on chocolate agar
All isolates ($n=84$)	77 (91.6)	75 (89.2)	55 (65.4)	84 (100)
<i>Enterobacteriaceae</i> ($n=33$)	33 (100)	33 (100)	28 (84.8)	33 (100)
<i>Escherichia coli</i> (19)	19 (100)	19 (100)	17 (89.5)	19 (100)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (4)	4 (100)	4 (100)	3 (75)	4 (100)
<i>Enterobacter cloacae</i> (2)	2 (100)	2 (100)	1 (50)	2 (100)
<i>Proteus mirabilis</i> (2)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)
<i>Klebsiella oxytoca</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>Klebsiella variicola</i> (1)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	1 (100)
<i>Enterobacter aerogenes</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>Citrobacter freundii</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>Serratia liquefaciens</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>Serratia marcescens</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
Non-fermentative Gram-negative bacilli (7)	6 (85.7)	7 (100)	3 (42.8)	7 (100)
<i>Acinetobacter baumannii</i> (4)	3 (75)	4 (100)	1 (25)	4 (100)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)
<i>Pseudomonas putida</i> (1)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	1 (100)
Other Gram-negative bacilli (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>Campylobacter coli</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
Anaerobes (1)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	1 (100)
<i>Bacteroides vulgatus</i> (1)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	1 (100)
<i>Staphylococcus</i> spp. (26)	23 (88.5)	21 (80.7)	13 (50.0)	26 (100)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (11)	10 (90.9)	7 (63.6)	3 (27.3)	11 (100)
<i>Staphylococcus aureus</i> (7)	6 (85.7)	7 (100)	6 (85.7)	7 (100)
<i>Staphylococcus hominis</i> (7)	6 (85.7)	6 (85.7)	3 (42.8)	7 (100)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>Streptococcus/Enterococcus</i> spp. (14)	12 (85.7)	12 (85.7)	9 (64.3)	14 (100)
<i>Enterococcus faecalis</i> (6)	6 (100)	6 (100)	5 (83.3)	6 (100)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (4)	2 (50)	3 (75)	1 (25)	4 (100)
<i>Streptococcus agalactiae</i> (2)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)
<i>Streptococcus oralis</i> (1)*	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
<i>Enterococcus faecium</i> (1)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>Abiotrophia defectiva</i> (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
Gram-positive bacilli (1)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	1 (100)
<i>Listeria monocytogenes</i> (1)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	1 (100)

*Identified as *Streptococcus oralis/mitis* by MALDI-TOF MS.

analytical purposes, this was deemed a correct identification at the species level.

Pre-cultivation of blood cultures in brain–heart infusion broth accelerates matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification

Next, we evaluated the time required for successful bacterial identification at the species level by performing MALDI-TOF MS on intact bacterial cells following short-term pre-cultivation either in BHI or on CBA. Overall, the mean incubation time to correct identification was shorter when pre-cultures were performed in BHI (the mean time for Gram-negative rods was 78.2 min in BHI and 108.2 min on CBA, $P=0.045$); the mean time for Gram-positive cocci was 128.5 min in BHI and 169.6 min on CBA, $P=0.013$). This finding also extended to most bacterial isolates included in our panel (Table 2). In fact, pre-cultivation on CBA only outperformed that in BHI in BCs positive for *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus haemolyticus*.

Strikingly, pre-cultivation for 30 min in BHI allowed successful identification of 63.3% of *Enterobacteriaceae* (vs. 33.3% when pre-cultivation was performed on CBA), and especially, *Escherichia coli* (78.9 vs 36.8%); after 90 min, 93.9% of *Enterobacteriaceae* were correctly identified (vs 78.8% following pre-cultivation on CBA). Furthermore, overall, pre-incubation in BHI accelerated identification of most isolates of *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. and *Enterococcus* spp. Of note, *Listeria monocytogenes* was correctly identified after pre-cultivation for 90 min in BHI, while it required 240 min when pre-cultivation was performed on CBA. Irrespective of whether pre-cultivation was performed in BHI or CBA, the time to correct identification of Gram-positive bacterial species was longer than that of Gram-negative rods, and among the latter, non-fermentative Gram-negative bacilli and fastidious organisms (*Campylobacter coli*) required longer pre-cultivation times than *Enterobacteriaceae*. Of note, all methods compared failed to correctly identify one or more of *Streptococcus pneumoniae*, CNS and *Abiotrophia defectiva* isolates included in the panel. As shown in Table 3, the time to successful bacterial species (both Gram-negative and -positive) identification by MALDI-TOF MS after short-term pre-cultivation in BHI was directly related to the time to BC positivity.

DISCUSSION

The use of MALDI-TOF MS for direct and rapid identification of microorganisms from positive BCs leads to reduction in the time required for antimicrobial regimen optimization, reduced hospital and ICU lengths of stay, improved patient outcomes and decreased overall hospital costs [20]. In this context, here we show that, overall, pre-cultivation of positive BCs in BHI up to 4 h prior to MALDI-TOF MS processing outperforms both the MALDI Sepsityper kit and pre-cultivation on solid medium (CBA)

in terms of successful and rapid bacterial species identification.

First, correct identification down to the species level was achieved in 91.6% of positive BCs after enrichment in BHI broth (in our experience, using a less stringent cut-off score of ≥ 1.7 for species identification did not result in an increased identification yield – not shown-) versus 65.4% with the MALDI Sepsityper kit; this latter figure is remarkably similar to that reported in other studies [4–8, 16, 18–23]. Of note, our method performed better than the MALDI Sepsityper kit for both Gram-negative rods and Gram-positive cocci.

Second, successful bacterial species identification following pre-incubation on CBA was achieved in a slightly lower number of isolates (89.2%) than after enrichment in BHI. This figure is higher than that reported in previous studies [8–14], where it was found not to exceed 85% of bacterial isolates; Nevertheless, direct comparison of these studies, including ours, is not straightforward owing to the use of different MALDI TOF MS instrumentation, sample processing protocols, assorted MALDI-TOF MS results analyses and interpretation rules. In all the above studies [8–14], as in ours, the rate of successful identification at the species level was higher for Gram-negative organisms than for Gram-positive bacteria, particularly for *Enterobacteriaceae*.

In a previous study [8], overall, the mean pre-cultivation time in solid medium to successful species-level identification was 4.6 h. Interestingly, the authors reported that their method performed better for Gram-negative rods than for Gram-positive cocci; in fact, 76.2 and 95.2% of the Gram-negative rod species included in the panel were correctly identified after ≤ 2 and ≤ 4 h of pre-cultivation. In turn, only 18.6% of Gram-positive aerobic cocci were successfully identified following ≤ 4 h incubation. Here, we show that pre-cultivation in BHI markedly reduced the time to correct identification to the species level, both for most Gram-negative rods, specially those belonging to *Enterobacteriaceae*, and Gram-positive cocci included in the panel, with respect to the time after pre-cultivation on CBA.

The impact of performing a rapid enrichment step on broth medium on producing faster and more accurate BC bacterial species identification was first noticed by Kroumova and colleagues [17], who used BHI, as we did in the current study; this is thought to be principally related to the rapid increase in bacterial biomass produced by growing them in a highly nutritious liquid medium; they correctly identified most Gram-negative and -positive bacteria to the genus level after protein extraction, with an average identification time of 3 h [17]. Thus, it may be possible to further increase the performance of our method (in particular for Gram-positive cocci) by coupling it to protein extraction after pre-cultivation, as shown by Idelevich *et al.* [8] when the pre-cultivation step was done on CBA. Nevertheless, this would increase the complexity of the method and especially its hands-on time.

Table 2. Time to successful identification of bacteria grown in blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight mass spectrometry after pre-culture in broth or on solid media

Bacteria (number of isolates)	Number of bacterial isolates successfully identified (%)							
	Pre-culture on broth media (time)				Pre-culture on solid media (time)			
	30 min	90 min	180 min	240 min	30 min	90 min	180 min	240 min
All isolates (n=84)	29 (34.5)	52 (61.9)	71 (84.5)	77 (91.6)	12 (14.3)	36 (42.8)	61 (72.6)	75 (89.2)
<i>Enterobacteriaceae</i> (n=33)	21 (63.6)	31 (93.9)	33 (100)	–	11 (33.3)	26 (78.8)	32 (96.9)	33 (100)
<i>Escherichia coli</i> (19)	15 (78.9)	18 (94.7)	19 (100)	–	7 (36.8)	15 (78.9)	19 (100)	–
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (4)	2 (50)	4 (100)	–	–	2 (50)	4 (100)	–	–
<i>Enterobacter cloacae</i> (2)	1 (50)	2 (100)	–	–	1 (50)	2 (100)	–	–
<i>Proteus mirabilis</i> (2)	2 (100)	–	–	–	0 (0)	1 (50)	2 (100)	–
<i>Klebsiella oxytoca</i> (1)	0 (0)	1 (100)	–	–	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
<i>Klebsiella variicola</i> (1)	0 (0)	1 (100)	–	–	0 (0)	1 (100)	–	–
<i>Enterobacter aerogenes</i> (1)	1 (100)	–	–	–	1 (100)	–	–	–
<i>Citrobacter freundii</i> (1)	0 (0)	1 (100)	–	–	0 (0)	1 (100)	–	–
<i>Serratia liquefaciens</i> (1)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	–	0 (0)	0 (0)	1 (100)	–
<i>Serratia marcescens</i> (1)	0 (0)	1 (100)	–	–	0 (0)	1 (100)	–	–
Non-fermentative Gram-negative bacilli (7)	1 (14.3)	1 (14.3)	4 (57.1)	6 (85.7)	0 (0)	1 (14.3)	5 (71.4)	7 (100)
<i>Acinetobacter baumannii</i> (4)	0 (0)	0 (0)	2 (50)	3 (75)	0 (0)	0 (0)	3 (75)	4 (100)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	1 (50)	1 (50)	1 (50)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	2 (100)
<i>Pseudomonas putida</i> (1)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	–	0 (0)	1 (100)	–	–
Other Gram-negative bacilli (1)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	–	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
<i>Campylobacter coli</i> (1)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	–	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
Anaerobes (1)	0 (0)	1 (100)	–	–	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Bacteroides vulgatus</i> (1)	0 (0)	1 (100)	–	–	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Staphylococcus</i> (26)	3 (11.5)	7 (26.9)	19 (73.1)	23 (88.5)	0 (0)	3 (11.5)	13 (50)	21 (80.7)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (11)	0 (0)	3 (27.3)	7 (63.7)	10 (90.9)	0 (0)	0 (0)	4 (36.4)	7 (63.7)
<i>Staphylococcus aureus</i> (7)	3 (42.8)	4 (57.1)	6 (85.7)	6 (85.7)	0 (0)	2 (28.5)	4 (57.1)	7 (100)
<i>Staphylococcus hominis</i> (7)	0 (0)	0 (0)	6 (85.7)	6 (85.7)	0 (0)	0 (0)	4 (57.1)	6 (85.7)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	–	–
<i>Streptococcus/Enterococcus</i> (14)	4 (28.5)	11 (78.5)	12 (85.7)	12 (85.7)	1 (7.1)	5 (35.7)	11 (78.5)	12 (85.7)
<i>Enterococcus faecalis</i> (6)	1 (16.6)	5 (83.3)	6 (100)	–	0 (0)	2 (33.3)	5 (83.3)	6 (100)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (4)	1 (25)	2 (50)	2 (50)	2 (50)	0 (0)	1 (25)	3 (75)	3 (75)
<i>Streptococcus agalactiae</i> (2)	1 (50)	2 (100)	–	–	1 (50)	2 (100)	–	–
<i>Streptococcus oralis</i> (1)*	0 (0)	1 (100)	–	–	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Enterococcus faecium</i> (1)	1 (100)	–	–	–	0 (0)	0 (0)	1 (100)	–
<i>Abiotrophia defectiva</i> (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Gram-positive bacilli (1)	0 (0)	1 (100)	–	–	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
<i>Listeria monocytogenes</i> (1)	0 (0)	1 (100)	–	–	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)

*Identified as *Streptococcus oralis/mitis* by MALDI-TOF MS.

Our methodological approach is simple and only requires one centrifugation step, thus taking less than 10 min to complete; this, however, reduces the effective gain in time to bacterial identification with respect to that following pre-incubation on solid medium, which does not require a centrifugation step. It remains to be demonstrated whether the net reduction in the time to bacterial identification afforded by our method proves to be clinically meaningful. In this context, an 87 % species-level success rate identification was recently reported using a modified protocol that omitted both a pre-incubation step and protein extraction [24];

however, that study also reduced the stringency required for accurate species-level identification with respect to that originally recommended by the manufacturer (spectral scores >2.0).

It is worth mentioning that no special practical skills or experience are needed to perform our method; in fact, in our hands, the results were reproducible across operators (data not shown).

The advantage of this new methodological approach over the other methods evaluated herein is undoubtedly its speed

Table 3. Time to successful bacterial species identification by matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight mass spectrometry after short-term pre-culture on brain–heart infusion broth and time to blood culture positivity

Bacterial species successfully identified after pre-culture in brain–heart infusion broth at different time points (no. of isolates)	Time to blood culture positivity of Gram-negative rods/Gram-positive cocci: mean hours (range)
30 min (29)	11.6 (5.1–14.3)/13.3 (9.6–16.6)
90 min (52)	14.3 (8.5–33.5)/13.2 (6.7–23.9)
180 min (71)	17.8 (8.41–27.8)/20.2 (8.0–29.3)
240 min (77)	16.5 (11.7–21.3)/28.8 (20.0–41.1)

in yielding correct bacterial species identification from BCs. This means that its potential clinical impact would be maximized when the test is performed immediately after BCs are flagged as positive and, in turn, would be weakened if positive BCs are batched for analysis [25]. We are aware that systematic integration of a short-term pre-cultivation step prior to MALDI-TOF MS analysis may require drastic (and perhaps unfeasible) reorganization of the laboratory workflow. Thus, selection of BCs which would potentially benefit from such an approach would likely be a suitable strategy for laboratories unable to cope with the extra work load. In this sense, the time to BC positivity may be taken as indicative of an eventual successful bacterial identification to the species level. For example, correct bacterial species identification (both Gram-positive and -negative) after a pre-cultivation step in BHI for 30 min was systematically achieved when BCs turned positive earlier than 16.6 h after BC incubation (see Table 3). Accordingly, we have implemented this bacterial identification strategy in our diagnostic laboratory routine. For those BCs flagged as positive later (>16.6 h), pre-incubation in BHI is prolonged to 4 h prior to MALDI TOF MS identification.

Our methodological approach, nevertheless, has one major limitation: it may not allow identification of several bacterial species (*Acinetobacter baumannii*, certain CNSs, *Abiotrophia defectiva* and *Streptococcus pneumoniae*), which would likely require longer pre-cultivation times. In addition, we do not know how the method performs in the setting of polymicrobial bloodstream infections.

The relatively small sample size of BCs used here may be viewed as another limitation of this study; nevertheless, most bacterial species commonly involved in bloodstream infections were represented in our panel, so that we believe the data presented are revealing and warrant further larger prospective validation studies.

In summary, we optimized a method for the rapid and reliable identification of common bacterial species involved in bloodstream infections based upon short-term pre-incubation of positive BCs in BHI and subsequent MALDI TOF MS analysis that outperforms direct identification by the MALDI Sepsityper kit and that following pre-cultivation on

solid medium. Further prospective studies are needed to validate our method and gauge its potential clinical impact on the management of bloodstream bacterial infections.

Funding information

The authors received no specific grant from any funding agency.

Acknowledgements

Estela Giménez holds a Río Hortega research contract from the Carlos III Health Institute (ISCIII) (Ref. CM16/00200).

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ethical statement

The Ethical Committee of Hospital Clínico Universitario Fundación INCLIVA deemed specific approval for this study unnecessary. Informed consent: not applicable (as discussed with the institutional medical Ethical Committee).

References

1. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* 2000;118:146–155.
2. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE *et al.* Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006;34:1589–1596.
3. Fraser A, Paul M, Almanasreh N, Tacconelli E, Frank U *et al.* Benefit of appropriate empirical antibiotic treatment: thirty-day mortality and duration of hospital stay. *Am J Med* 2006;119:970–976.
4. 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.
5. 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;48:444–447.
6. Klein S, Zimmermann S, Köhler C, Mischnik A, Alle W *et al.* Integration of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in blood culture diagnostics: a fast and effective approach. *J Med Microbiol* 2012;61:323–331.
7. Lagacé-Wiens PR, Adam HJ, Karlowsky JA, Nichol KA, Pang PF *et al.* Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: analysis of performance, cost, and turnaround time. *J Clin Microbiol* 2012;50:3324–3328.
8. Idelevich EA, Schüle I, Grünastel B, Wüllenweber J, Peters G *et al.* Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:1001–1006.
9. Kohlmann R, Hoffmann A, Geis G, Gatermann S. MALDI-TOF mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid pathogen identification from positive blood cultures. *Int J Med Microbiol* 2015;305:469–479.
10. Zabbe JB, Zanardo L, Mégraud F, Bessède E. MALDI-TOF mass spectrometry for early identification of bacteria grown in blood culture bottles. *J Microbiol Methods* 2015;115:45–46.
11. Verroken A, Defourny L, Lechgar L, Magnette A, Delmée M *et al.* Reducing time to identification of positive blood cultures with MALDI-TOF MS analysis after a 5-h subculture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015;34:405–413.
12. Chen Y, Porter V, Mubareka S, Kotowich L, Simor AE. Rapid identification of bacteria directly from positive blood cultures by use of a serum separator tube, smudge plate preparation, and matrix-

- assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2015;53:3349–3352.
13. Bhatti MM, Boonlayangoor S, Beavis KG, Tesic V. Rapid identification of positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry using prewarmed agar plates. *J Clin Microbiol* 2014;52:4334–4338.
 14. Curtoni A, Cipriani R, Marra ES, Barbui AM, Cavallo R et al. Rapid identification of microorganisms from positive blood culture by MALDI-TOF MS after short-term incubation on solid medium. *Curr Microbiol* 2017;74:97–102.
 15. Delpont JA, Strikwerda A, Armstrong A, Schaus D, John M. Quality of care is improved by rapid short incubation MALDI-ToF identification from blood cultures as measured by reduced length of stay and patient outcomes as part of a multi-disciplinary approach to bacteremia in pediatric patients. *PLoS One* 2016;11: e0160618.
 16. Delpont JA, Strikwerda A, Armstrong A, Schaus D, John M. MALDI-ToF short incubation identification from blood cultures is associated with reduced length of hospitalization and a decrease in bacteremia associated mortality. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017;36:1181–1186.
 17. Kroumova V, Gobbato E, Basso E, Mucedola L, Giani T et al. Direct identification of bacteria in blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a new methodological approach. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2011;25: 2247–2249.
 18. Buchan BW, Riebe KM, Ledebouer NA. Comparison of the MALDI Biotyper system using Sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2012;50:346–352.
 19. Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;93:965–974.
 20. Buehler SS, Madison B, Snyder SR, Derzon JH, Cornish NE et al. Effectiveness of practices to increase timeliness of providing targeted therapy for inpatients with bloodstream infections: a laboratory medicine best practices systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Rev* 2016;29:59–103.
 21. Kok J, Thomas LC, Olma T, Chen SC, Iredell JR. Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization Sepsityper™ and time of flight mass spectrometry. *PLoS One* 2011;6:e23285.
 22. Matsuda N, Matsuda M, Notake S, Yokokawa H, Kawamura Y et al. Evaluation of a simple protein extraction method for species identification of clinically relevant staphylococci by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012;50:3862–3866.
 23. Martiny D, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of an in-house method and the commercial Sepsityper™ kit for bacterial identification directly from positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:2269–2281.
 24. Maelegheer K, Nulens E. Same-day identification and antibiotic susceptibility testing on positive blood cultures: a simple and inexpensive procedure. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017;36:681–687.
 25. Clerc O, Prod'hom G, Vogne C, Bizzini A, Calandra T et al. Impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with Gram-negative bacteremia: a prospective observational study. *Clin Infect Dis* 2013;56:1101–1107.

Five reasons to publish your next article with a Microbiology Society journal

1. The Microbiology Society is a not-for-profit organization.
2. We offer fast and rigorous peer review – average time to first decision is 4–6 weeks.
3. Our journals have a global readership with subscriptions held in research institutions around the world.
4. 80% of our authors rate our submission process as 'excellent' or 'very good'.
5. Your article will be published on an interactive journal platform with advanced metrics.

Find out more and submit your article at microbiologyresearch.org.



Original Article

Early adjustment of empirical antibiotic therapy of bloodstream infections on the basis of direct identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and Gram staining results[☆]



Ignacio Torres^a, Carolina Pinto^b, Rosa Oltra^b, Tania Pascual^a, Nieves Carbonell^c, Javier Colomina^a, Mar Tormo^d, Eliseo Albert^a, Gerardo Aguilar^e, Carlos Solano^d, David Navarro^{a, f, *}

^a Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación INCLIVA, Valencia, Spain

^b Infectious Diseases Unit, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación INCLIVA, Valencia, Spain

^c Intensive Care Unit, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación INCLIVA, Valencia, Spain

^d Hematology Service, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación INCLIVA, Valencia, Spain

^e Critical Care Unit, Anesthesiology and Critical Care Department, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación INCLIVA, Valencia, Spain

^f Department of Microbiology, School of Medicine Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 January 2020

Received in revised form

3 April 2020

Accepted 20 April 2020

Available online 5 May 2020

Keywords:

Blood culture

Bacteremia

Matrix-assisted laser desorption/ionization

time-of-flight mass spectrometry

Gram staining

Antibiotic treatment

ABSTRACT

Introduction: To assess the potential added value of rapid MALDI-TOF MS-based identification of bacteria in positive blood cultures to the information provided by Gram staining for adequate empirical antibiotic treatment adjustments in patients with bloodstream infections (BSI).

Methods: We conducted a retrospective, single-center, pre-post quasi-experimental study. In the pre-MALDI-TOF MS phase of the study antibiotic adjustments were made on the basis of Gram stain results, whereas in the MALDI-TOF MS phase they were based on information provided by Gram staining and MALDI-TOF MS results. No antimicrobial stewardship program for BSI was in place within the study period. Antibiotic regimens were categorized as correct, improvable or incorrect.

Results: Cohorts were matched for demographics, clinical characteristics of patients and bacterial species involved. *Enterobacteriales* were the most represented in both study periods (67%), followed by Non-fermenting Gram-negative bacilli and Gram-positive cocci. The number of patients receiving correct, improvable and incorrect empirical antibiotic treatments was comparable for both study periods ($P = 0.45$, $P = 0.57$, $P = 0.87$, respectively). The percentage of patients who ended up receiving correct treatment following modified empirical antibiotic regimens was significantly higher ($P = 0.008$) in the MALDI-TOF MS phase (27 patients/38.6%) than in the pre-MALDI-TOF MS phase of the study (11 patients/15.7%), although overall adequate coverage of the bacteria causing the infection was comparable across the study periods (90%).

Conclusion: Gram stain results offer valuable information for early adjustment of empirical antibiotic therapies for BSI. Nevertheless, rapid identification of bacteria involved in BSI by MALDI-TOF MS provides added value to achieve this aim.

© 2020 Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Survival following severe bacterial bloodstream infections (BSI) is greatly dependent on starting effective antibiotic therapy promptly [1,2]. Unfortunately, nowadays, empiric therapy with broad-spectrum antibiotics is often inadequate due to the

[☆] All authors meet the ICMJE authorship criteria.

* Corresponding author. Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, and Department of Microbiology, School of Medicine, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010, Valencia, Spain.

E-mail address: david.navarro@uv.es (D. Navarro).

unpredictable involvement of multidrug-resistant bacteria [3]. Rapid microbial identification directly from blood cultures (BCs) flagged as positive by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) potentially allows physicians to adapt antibiotic therapy before antimicrobial susceptibility testing (AST) results are available [4–7]; in particular, when coupled with antimicrobial stewardship [8,9] this may result in decreased mortality [10,11]. Nevertheless, implementing MALDI-TOF MS systematically in the laboratory workflow to that end remains challenging in daily practice. In this setting, performing Gram stain immediately after BCs turn positive, and communicating the results rapidly to the attending physician was shown to impact positively on appropriate selection of antibiotics and lead to decreased mortality [12–14]. Here, we conducted a pre-post quasi-experimental study aimed at assessing the potential value of adding rapid bacterial identification by MALDI-TOF MS to the information provided by Gram staining for adapting empirical antibiotic regimens without antimicrobial stewardship guidance in BSI patients admitted to onco-hematological and intensive care wards.

2. Patients and methods

2.1. Patients, study design and hospital setting

This was a retrospective, single-center, pre-post quasi-experimental study conducted at Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV). The main objective of the study was to compare the impact of Gram stain combined with direct bacterial identification by MALDI-TOF MS versus Gram stain results only on adequate modification of empirical antibiotic treatment regimens in adult onco-hematological or intensive care unit patients with BSI. Mass spectrometry technology was implemented in BC workflow at our laboratory in May 2017. From June 2017 to October 2018 we documented a total of 70 consecutive BSI episodes occurring in unique patients fulfilling the study inclusion criterion: a first episode of monomicrobial bacteremia due either to Gram-positive or Gram-negative bacteria that could be identified to the species level by MALDI-TOF MS. We excluded polymicrobial bacteremia episodes, those caused by anaerobic bacteria and those in which coagulase-negative Staphylococci were isolated, irrespective of its clinical significance. A well-matched comparison-group study was built including non-consecutive patients ($n = 70$) who had developed primary monomicrobial BSI during the period June 2014 to April 2017, prior to implementation of MALDI-TOF MS. Prioritized parameters for matching were demographics, patients' clinical characteristics, including the site of bacteremia acquisition, source of bacteremia, clinical severity, co-morbidities (Charlson comorbidity index [15]) and bacterial species involved, as detailed below.

HCUV is a tertiary public teaching hospital with 582 beds that provides healthcare for 312,000 inhabitants (Clínico-Malvarrosa Health Department). Antibiotic resistance profiles of bacteria causing BSIs included in our series have not changed substantially over the last five years. Among isolates recovered from infection sites, the prevalence of extended spectrum β -lactamases (ESBL)-producing *Escherichia coli* was 15–20% overall, 25–35% for ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*, <0.5% for carbapenem-resistant *Enterobacteriales* (EB), 30–35% for carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, <0.1% for glycopeptides-resistant enterococci and 25–20% for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Here, multidrug-resistant (MDR) was defined as acquired non-susceptibility to at least one agent in three or more antimicrobial categories, and extensively drug-resistant (XDR) as non-susceptibility to at least one agent in all but two or fewer

antimicrobial categories (i.e. bacterial isolates remain susceptible to only one or two categories) [16].

2.2. Blood culture workflows

BCs (BACTEC™ Plus Aerobic/F and Plus Anaerobic/F medium bottles, -Becton Dickinson and Company, New Jersey, USA-incubated in BD BACTEC™ FX automated continuous-monitoring blood culturing instrument) were obtained and processed round the clock (24/hours/7 days a week). During the pre-MALDI-TOF-MS period, Gram staining (Gram-positive cocci resembling staphylococci or streptococci, Gram-negative rods for the purpose of the current study) was immediately performed (within 30 min) when BCs were flagged as positive and the results were reported by phone to the attending physician without delay. Overnight subculture of positive BCs in chocolate agar was performed and grown isolates were identified by commercially available phenotypic methods (Vitek2 or API test strips, both from Biomerieux, L'Etoile, France or BD Phoenix BD system, BD).

In the post-implementation phase of the study, in addition to reporting Gram stain results, positive blood cultures were processed for MALDI-TOF MS identification following a pre-enrichment step, as previously reported [17]. In brief, 50 μ l blood was inoculated into 500 μ l BHI (Oxoid Limited, Hampshire, United Kingdom) in sterile vials and incubated at 36 °C in air with 5% CO₂ for 2–3 h. Next, the vials were centrifuged at 13,000 rpm for 2 min, the supernatants discarded, and the pellets used for MALDI-TOF MS analyses. The spectra were acquired using the Microflex LT system (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and analyzed on MALDI BIOTYPER 3.3 (Bruker Daltonics) software. MALDI-TOF MS analyses were performed in triplicate on the same target slide. Criteria for successful identification were met when the spectral score of at least one of the three spots was ≥ 2.0 (species level) and ≥ 1.7 (genus level), as recommended by the manufacturer.

Positive BCs were subcultured overnight on chocolate agar and the growing biomass was used for MALDI-TOF MS identification.

At the time of Gram stain reporting the attending physicians were also informed that bacterial identification results would be available 3–4 h later in the laboratory information system to which they had direct access.

2.3. Data collection, clinical outcome and statistics

Two infectious diseases specialists (RO and CP) reviewed medical records and extracted demographic and clinical data and antibiotic prescribing pattern for each patient.

The primary clinical outcome of the study was the suitability of empirical antibiotic therapy adjustments (spectrum broadening or streamlining) driven by Gram stain or direct MALDI-TOF MS results. Antibiotic treatments were considered correct when adapted to site of acquisition (community-acquired vs. nosocomial) [18], severity of infection [19], source of bacteremia, local profiles of antimicrobial resistance, patient risk factors for harboring an antibiotic-resistant strain (ESBL, MRSA, Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*) [20–22] and individual microbiological records, according to Spanish guidelines [23,24] and it was expected to be effective against the isolated bacteria on the basis of AST results (Supplementary Table 1), and improvable when coverage was adequate but could have been and was not refined (better adjusted) according to the above parameters. Incorrect treatments were those that did not cover the isolated bacteria according to AST results.

A sample size of 54 patients per group was needed to achieve 80% power at a 5% significance level with a true difference of 25%

between appropriate empirical antibiotic regimen adjustments made in the pre and post-MALDI-TOF MS groups. Categorical variables were analyzed using Chi-square statistics or Fisher's exact test when appropriate. P values < 0.05 were considered statistically significant. The statistical software SPSS 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) was used to perform statistical calculations.

3. Results

A total of 70 episodes of monomicrobial bacteremia from unique patients were included in each study period. Patients in both periods were matched for demographics, ward admission, source and probable site of bacteremia acquisition, clinical characteristics and bacteria involved ($P = 0.97$), as shown in [Tables 1 and 2](#), respectively.

EB were the most represented bacteria in both study periods (68.8% and 67.1%), followed by Non-fermenting Gram-negative bacilli (NFGNB), in most cases *Pseudomonas aeruginosa*, and Gram-positive cocci (GPC), most of which were enterococci. In both study periods 35% of EB were ESBL producers and 4% were AmpC hyperproducers. There were four and three *Pseudomonas aeruginosa* MDR and XDR in the pre- and post-MALDI-TOF MS periods, respectively. Only one MRSA was identified in our series. No glycopeptide-resistant enterococci were present in either study period.

3.1. Impact of gram stain versus MALDI-TOF MS results on empiric antibiotic treatment adjustment

The number of patients receiving correct, improvable and incorrect empirical antibiotic treatments ([Table 3](#)) was comparable for the two study periods ($P = 0.45$, $P = 0.57$, $P = 0.87$, respectively). During the pre-MALDI-TOF MS period, Gram stain results led to antibiotic therapy modification in 19 patients (27.1%) with BSI caused by EB ($n = 13$), NFGNB ($n = 3$) or GPC ($n = 3$) ([Fig. 1](#)). As shown in [Supplementary Table 2](#), the therapeutic change was

antibiotic spectrum broadening in 15 cases and streamlining in the remaining four cases. Overall, the number of patients receiving improvable antibiotic treatments as a result of action taken increased from 41 to 52, whereas the percentage of patients undergoing correct treatment remained relatively conserved (decreased from 12 to 11 patients; [Table 3](#) and [Fig. 1](#)). Interestingly, the number of patients still receiving incorrect treatment was notably reduced, from 17 to 7.

In the post- MALDI-TOF MS study phase, fewer interventions were made on the basis of Gram stain results in comparison with the pre-MALDI-TOF MS phase ($n = 9$ –12.8%; $P = 0.06$), in all cases by broadening the spectrum of antibiotics ([Supplementary Table 3](#)). These interventions raised the number of patients receiving correct treatment and lowered the number of patients receiving incorrect treatment compared with adjustments made on the basis of Gram staining in the pre-MALDI-TOF MS phase. As shown in [Supplementary Table 4](#), rapid bacterial identification by MALDI-TOF MS led to further antibiotic adjustments in 18 patients (antibiotic treatment had been altered on the basis of Gram stain results in one of these patients), of whom 11 had a BSI caused by EB 4 by NFGNB and three by GPC (spectrum broadening in all cases) ([Fig. 2](#)). While only a modest reduction in incorrect treatments was registered (from 10 to 7), the number of patients receiving correct antibiotic treatments increased substantially (from 19 to 27 patients); the latter were patients in whom a BSI was caused by EB ($n = 5$) or NFBGB ($n = 3$). Thus, the percentage of patients who ended up receiving correct treatment following adjustments in empirical antibiotic regimen was significantly higher ($P = 0.008$) in the MALDI-TOF MS phase than in the pre-MALDI-TOF MS phase of the study.

As shown in [Supplementary Table 5](#), the impact of MALDI-TOF MS results on switching to correct antibiotic treatments was more pronounced in onco-hematological patients (14%) than in intensive care unit patients (7%); nevertheless, actions taken upon this information led to a decrease in the number of patients receiving incorrect treatments among those in the intensive care unit (5–2) but not in patients in the onco-hematology ward.

Table 1
Demographic and clinical data of patients enrolled in the study.

Parameter	Pre-MALDI-TOF MS phase no. (%)	Post-MALDI-TOF MS phase no. (%)	P value
Age Median (Range)	65 (67)	64 (67)	0.52
Sex			
Male	46 (56.1)	36 (41.4)	0.09
Female	24 (43.9)	34 (58.6)	
Charlson Index (≥ 3)	56 (80.0)	59 (84.3)	0.50
Ward			
Onco-hematology	39 (55.7)	43 (61.4)	0.56
Intensive care unit	31 (54.3)	27 (39.6)	
Acquisition			
Nosocomial	55 (78.6)	63 (90.0)	0.07
Community-acquired	15 (21.4)	7 (10.0)	
Severity			
Bacteremia	40 (57.1)	52 (74.2)	0.1
Sepsis	5 (7.1)	4 (5.7)	
Septic shock	25 (35.7)	14 (20.0)	
Source of bacteremia			
Unknown	27 (38.6)	34 (58.6)	0.183
Abdominal	6 (8.6)	9 (12.9)	
Respiratory	12 (17.1)	5 (7.1)	
Hepato-biliary	9 (12.9)	12 (17.1)	
Catheter related	7 (10.0)	2 (2.9)	
Urinary	9 (12.9)	8 (11.4)	
Risk factors for MRSA	37 (52.9)	35 (50.0)	
Risk factors for ESBL-producing <i>Enterobacteriaceae</i> /Multi-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	56 (80.0)	56 (80.0)	1.00

ESBL, extended spectrum β -lactamase; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Table 2
Bacteria causing bloodstream infections in the pre and post-MALDI-TOF MS study periods.

Bacterial species	Pre-MALDI-TOF MS phase no.	Post-MALDI-TOF MS phase no.
Enterobacteriaceae	48	47
<i>Escherichia coli</i>	27	31
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	10
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	1
<i>Serratia marcescens</i>	3	2
<i>Morganella morganii</i>	1	0
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	0
<i>Citrobacter koseri</i>	0	1
Non-fermenting Gram-negative bacilli	11	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	10
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	1
Gram-positive cocci	11	12
<i>Enterococcus faecium</i>	6	7
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	3

Table 3
Appropriateness of the antibiotic treatment for bloodstream infections prior to (empirical) and after providing Gram stain or MALDI-TOF MS results to the attending physician.

Study phase	Antibiotic treatment categorization		
	Correct, no. (%)	Improvable, no. (%)	Incorrect, no. (%)
Pre-MALDI-TOF MS			
Empirical antibiotic treatment	12 (17.1)	41 (58.6)	17 (24.3)
Antibiotic treatment following Gram stain results	11 (15.7)	52 (74.3)	7 (10.0)
Post-MALDI-TOF MS			
Empirical antibiotic treatment	16 (22.9)	36 (51.4)	18 (25.7)
Antibiotic treatment following Gram stain results	19 (27.1)	41 (58.6)	10 (14.3)
Antibiotic treatment following Gram stain and MALDI-TOF MS results reporting	27 (38.6)	36 (51.4)	7 (10.0)

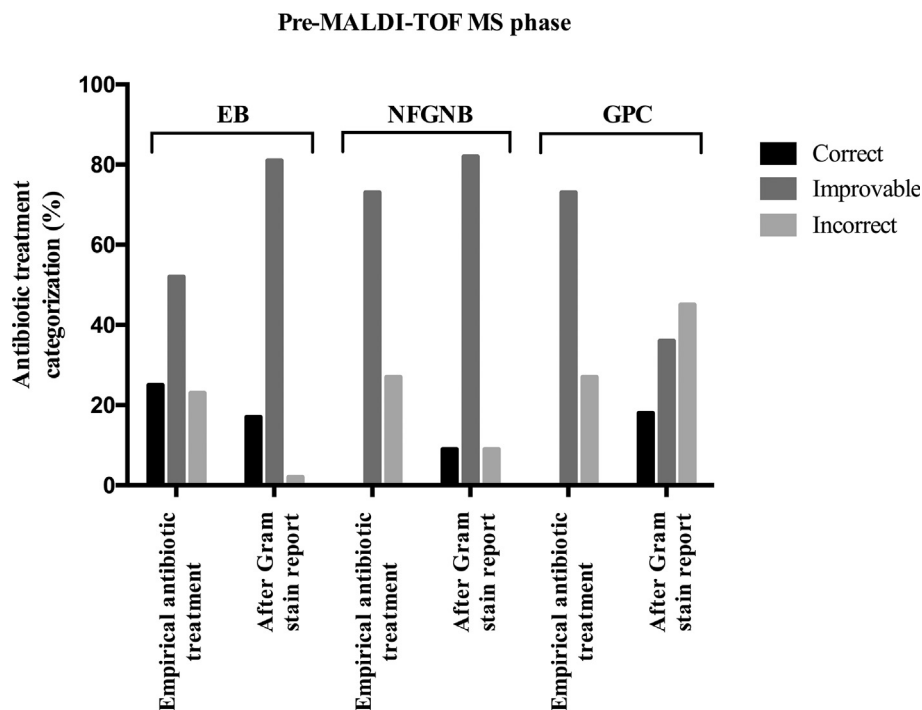


Fig. 1. Appropriateness of antimicrobial therapy for bacteremia either prior or after adjustments made on the basis of Gram staining results in the pre-MALDI-TOF MS phase of the study according to the causative microorganism. EB, Enterobacteriales; NFGNB, non-fermenting Gram negative bacilli; GPC, Gram positive cocci.

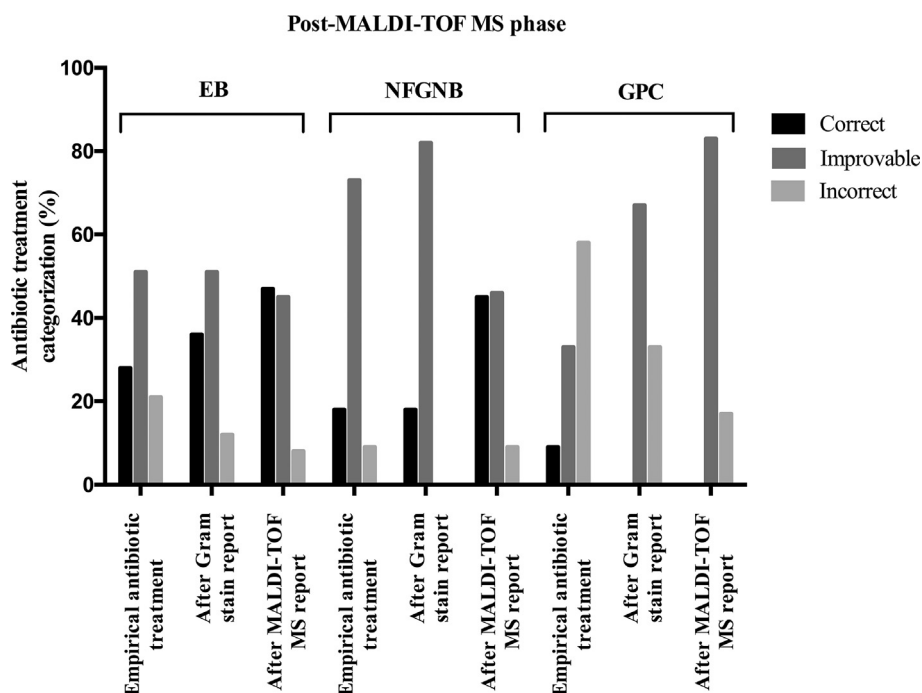


Fig. 2. Appropriateness of antimicrobial therapy for bacteremia either prior or after adjustments made on the basis of Gram staining results and MALDI-TOF MS results in the post-MALDI-TOF MS phase of the study according to the causative microorganism. EB, Enterobacteriales; NFGNB, non-fermenting Gram negative bacilli; GPC, Gram positive cocci.

4. Discussion

Undisputedly, use of MALDI-TO MS on positive BCs substantially reduces bacterial identification turnaround time compared to standard procedures, which may take 24–48 h [7]. This potentially allows for early adjustment of empirical antimicrobial therapies that may impact positively on patient's survival [7]. Nevertheless, adding MALDI-TOF MS into the routine BC workflow is not a straightforward task, mainly due to economic constraints and personnel logistics; the costs inherent to the use of this technology must therefore be balanced against the clinical benefit for the patient and the impact on antibiotic use and antimicrobial resistance. This is particularly true taking into account that reporting Gram stain results soon after BCs turn positive has been shown to impact significantly on early adequate adaptation of empirical antibiotic therapy and improve survival [12–14]. The potential value of rapid MALDI-TOF MS bacterial identification added to the information provided by Gram staining for adapting empirical antibiotic regimens in patients with BSI has not been investigated in depth. To this end, we designed a pre-post quasi-experimental study whose main objective was to compare the impact of Gram stain combined with direct bacterial identification by MALDI-TOF MS versus Gram stain results only on early adjustment of empirical antibiotic in patients admitted to onco-hematological and intensive care wards, where appropriate choice of empirical antibiotic regimens prescribed and prompt adaptation of therapy in case of an erroneous selection of antimicrobials has a major impact on patient survival. It must be highlighted that the MALDI-TOF MS procedure used in this study for direct bacterial identification from positive BCs included a short-term enrichment in BHI prior to MALDI-TOF MS analysis, which in our experience over performs protocols involving pre-incubation on solid media or skipping enrichment steps in terms of accuracy and fastness of identification of a number of bacterial species [17]. Thus, we cannot be certain that conclusions reached herein and discussed below can be extrapolated to centers using the latter two protocols. On the basis of the data presented herein

we came to the following conclusions: (i) in line with previous reports [12–14], reporting Gram stain results provided valuable information for prompt adjustment of empirical antibiotic regimens in a non-negligible number of patients. This was observed in both study phases and led to a substantial reduction in the percentage of patients on incorrect antibiotic empirical therapies, while increasing the number of patients receiving improvable and correct treatments in the post-MALDI-TOF MS phase of the study. The number of interventions made on the basis of Gram stain results was reduced by half in the post-MALDI-TOF MS phase, perhaps due to physicians in charge being notified that bacterial identification results would be available shortly after receiving the Gram results. (ii) Early MALDI-TOF MS identification of bacterial species involved had a notable impact on antibiotic adjustments, leading to a substantial increase in the number of patients who were switched to correct antibiotic regimens. Nonetheless, the percentage of patients who remained under incorrect antibiotic regimens following adjustments was not significantly different from in the pre-MALDI-TOF MS study phase. It is of interest to underline that differences were noted regarding the impact of MALDI-TOF MS results according to the hospitalization ward (onco-hematology vs. intensive care unit), perhaps due to the absence of homogeneous criteria for early antibiotic adjustments across these units. In this sense, although speculative, we hypothesize that the intervention of an antimicrobial stewardship team in the therapeutic management of our patients would have resulted in more adequate selection of empirical antibiotic regimens on the basis of the information provided not only by the MALDI-TOF MS technology but also by Gram stain results, as previously demonstrated [8,9] and irrespective of the hospitalization ward.

Very few studies have assessed the value of rapid identification of bacteria grown in BCs added to the information provided by Gram staining results in early adjustment of empirical antibiotic therapies. In a study relatively comparable to ours in terms of design, Vlek and colleagues [25] found that use of MALDI-TOF

increased the proportion of appropriate antimicrobial therapy by 11.3% (64% versus 75.3%; $P < 0.001$). This figure is similar to the one reported in the current study, despite the notable differences between the studies. In Vlek's study [25] (i) the primary outcome was the proportion of episodes receiving adequate antimicrobial therapy within 24 h of BC positivity. Thus, antimicrobial therapy could be adjusted on the basis of the information provided by Gram stain, culture results, MALDI-TOF MS (in the intervention phase) or even in some cases by AST. (ii) All consecutive positive BCs were included and MALDI-TOF MS was not performed 24/7. (iii) Both mono-microbial and polymicrobial episodes were included. (iv) GPC were overrepresented. (v) Patients were recruited from a wide variety of wards (not only ICU and onco-hematology). (vi) Criteria for empirical antibiotic suitability may have been rather different. (vii) The prevalence of MR bacteria was very low. Nevertheless, Vlek's study and ours share an important characteristic, the lack of antimicrobial stewardship.

Two other prospective observational (single arm) studies also underlined the clinical value of adding MALDI-TOF MS to Gram stain results, reporting appropriate adjustment of empirical antibiotic therapies, although importantly, antimicrobial stewardship was in place in the participating hospitals [4,5].

Several limitations should be acknowledged. First, this was a quasi-experimental study that lacked randomization; nevertheless, care was taken to thoroughly match patients in both comparison groups. In this respect, although matching could have introduced a bias, we find this possibility unlikely as most (yet not all) episodes of primary bacteraemia occurring at onco-hematological and intensive care unit wards were included. Second, we report on a single-center experience, so there is no certainty that our conclusions could be extrapolated to other hospital settings. In this regard, the prevalence of resistant strains in the community and hospital wards may be a determining factor modulating the clinical impact of rapid bacterial identification by MALDI-TOF MS technology. Third, the true impact of MALDI-TOF MS in clinical real-life practice could have been overestimated; certainly, exclusion of polymicrobial bacteremia episodes in which potentially contaminants were involved (i.e. coagulase negative staphylococci) or ones in which MALDI-TOF MS failed to provide accurate identification may have introduced bias in favor of this technology.

In summary, the data presented herein reinforce the idea that Gram stain results offer valuable information for early adjustment of empirical antibiotic therapies for BSI and support the assumption that rapid identification of bacteria involved in BSI by MALDI-TOF MS provides added value to achieve this aim.

Ethical statement

The ethics committee of the participating hospitals deemed specific approval for this study unnecessary.

Informed consent

Not applicable (as discussed with the institutional medical ethics committee).

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgements

We wish to thank all technicians and residents of the Microbiology Service at the Hospital Clínico Universitario of Valencia.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2020.04.019>.

References

- [1] Retamar P, Portillo MM, López-Prieto MD, Rodríguez-López F, de Cueto M, García MV, et al. Impact of inadequate empirical therapy on the mortality of patients with bloodstream infections: a propensity score-based analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:472–82.
- [2] Zubert S, Funk DJ, Kumar A. Antibiotics in sepsis and septic shock: like everything else in life, timing is everything. *Crit Care Med* 2010;38:1211–2.
- [3] Shorr AF, Micek ST, Welch EC, Doherty JA, Reichley RM, Kollef MH. Inappropriate antibiotic therapy in Gram-negative sepsis increases hospital length of stay. *Crit Care Med* 2011;39:46–51.
- [4] Clerc O, Prod'homme G, Vogne C, Bizzini A, Calandra T, Greub G. Impact of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with Gram-negative bacteremia: a prospective observational study. *Clin Infect Dis* 2013;56:1101–7.
- [5] Martiny D, Debaugnies F, Gateff D, Gérard M, Aoun M, Martin C, et al. Impact of rapid microbial identification directly from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry on patient management. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:E568–81.
- [6] French K, Evans J, Tanner H, Gossain S, Hussain A. The clinical impact of rapid, direct MALDI-ToF identification of bacteria from positive blood cultures. *PLoS One* 2016;11(12):e0169332.
- [7] Faron ML, Buchan BW, Ledebor NA. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for use with positive blood cultures: methodology, performance, and optimization. *J Clin Microbiol* 2017;55:3328–38.
- [8] Osthoff M, Gürtler N, Bassetti S, Balestra G, Marsch S, Pargger H, et al. Impact of MALDI-TOF-MS-based identification directly from positive blood cultures on patient management: a controlled clinical trial. *Clin Microbiol Infect* 2017;23:78–85.
- [9] Beganovic M, Costello M, Wiczorkiewicz SM. Effect of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) alone versus MALDI-TOF MS combined with real-time antimicrobial stewardship interventions on time to optimal antimicrobial therapy in patients with positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 2017;55:1437–45.
- [10] Huang AM, Newton D, Kunapuli A, Gandhi TN, Washer LL, Isip J, et al. Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. *Clin Infect Dis* 2013;57:1237–45.
- [11] Delport JA, Strikwerda A, Armstrong A, Schaus D, John M. MALDI-ToF short incubation identification from blood cultures is associated with reduced length of hospitalization and a decrease in bacteremia associated mortality. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017;36:1181–1186.12.
- [12] Munson EL, Diekema DJ, Beekmann SE, Chapin KC, Doern GV. Detection and treatment of bloodstream infection: laboratory reporting and antimicrobial management. *J Clin Microbiol* 2003;41:495–7.
- [13] Barenfanger J, Graham DR, Kolluri L, Sangwan G, Lawhorn J, Drake CA, et al. Decreased mortality associated with prompt Gram staining of blood cultures. *Am J Clin Pathol* 2008;130:870–6.
- [14] Uehara Y, Yagoshi M, Tanimichi Y, Yamada H, Shimoguchi K, Yamamoto S, et al. Impact of reporting gram stain results from blood culture bottles on the selection of antimicrobial agents. *Am J Clin Pathol* 2009;132:18–25.
- [15] Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chron Dis* 1987;40:373–83.
- [16] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268–81.
- [17] Torres I, Gimenez E, Pascual T, Bueno F, Huntley D, Martínez M, et al. Short-term incubation of positive blood cultures in brain-heart infusion broth accelerates identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry. *J Med Microbiol* 2017;66:1752–8.
- [18] Pujol M, Limón E. General epidemiology of nosocomial infections. Surveillance systems and programs. *Enferm Infecc Microbiol Clín* 2013;31:108–13.
- [19] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *J Am Med Assoc* 2016;315:801–10.

- [20] Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 2018;31. pii: e00020–18.
- [21] Bar-Yoseph H, Hussein K, Braun E, Paul M. Natural history and decolonization strategies for ESBL/carbapenem-resistant Enterobacteriaceae carriage: systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:2729–39.
- [22] Raman G, Avendano EE, Chan J, Merchant S, Puzniak L. Risk factors for hospitalized patients with resistant or multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrob Resist Infect Contr* 2018;7:79. eCollection 2018.
- [23] Cisneros-Herreros JM, Cobo-Reinoso J, Pujol-Rojo M, Rodríguez-Baño J, Salavert-Lletí M. Guidelines for the diagnosis and treatment of patients with bacteremia. *Enferm Infecc Microbiol Clín* 2007;25:111–30.
- [24] Mensa J, Soriano A, Garcia-Sanchez JE, Letang E, López-Suné E, Marco F, et al. *Antimicrobial therapeutic guide*. Barcelona, Spain: Antares Editorial; 2019.
- [25] Vlek AL, Bonten MJ, Boel CH. Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *PLoS One* 2012;7:e32589.



Performance of a MALDI-TOF mass spectrometry-based method for rapid detection of third-generation oxymino-cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. from blood cultures

Ignacio Torres¹ · Eliseo Albert¹ · Estela Giménez¹ · Beatriz Olea¹ · Arantxa Valdivia¹ · Tania Pascual¹ · Dixie Huntley¹ · David Sánchez¹ · Rosa María Costa¹ · Carolina Pinto² · Rosa Oltra² · Javier Colomina¹ · David Navarro^{1,3} 

Received: 12 February 2021 / Accepted: 11 April 2021 / Published online: 19 April 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

We optimized and prospectively evaluated a simple MALDI-TOF MS-based method for direct detection of third-generation oxymino-cephalosporin resistance (3rd CephR) in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. from blood cultures (BC). In addition, we assessed the performance of a lateral flow immunochromatographic assay (LFIC) for detecting extended-spectrum β -lactamases (ESBL) (NG-Test CTX-M MULTI assay) using bacterial pellets from BC. A total of 168 BCs from unique patients were included. A pre-established volume of BC flagged as positive was transferred in brain heart infusion with or without ceftriaxone (2 mg/ml). After 2-h incubation, intact bacterial pellets were used for MALDI-TOF MS testing. Identification of bacterial species (index score > 2) in the presence of CRO was considered marker of 3rd CephR. The LFIC assay was evaluated in 141 BC. Bacteremia episodes were caused by *E. coli* ($n = 115$) or *Klebsiella* spp. ($n = 53$). A total of 49 strains were 3rd CephR by broth microdilution, of which 41 were ESBL producers, seven expressed ESBL and OXA-48 type D carbapenemase, and one harbored a plasmid-mediated AmpC. The MALDI-TOF MS method yielded four very major errors (false susceptibility) and two major errors (false resistance). The overall sensitivity of the assay was 91.8% and the specificity 98.3%. Concordance between the LFIC assay and the MALDI-TOF MS method for detection of ESBL-mediated 3rd CephR was 100%. Both evaluated methods may prove useful for early adjustment of empirical therapy in patients with *E. coli* and *Klebsiella* spp. bloodstream infections. Whether their use has a beneficial impact on patient outcomes is currently under investigation.

Keywords MALDI-TOF MS · Antimicrobial susceptibility · Blood culture · Third-generation cephalosporins · Lateral flow immunochromatography · Extended-spectrum β -lactamases · *Escherichia coli* · *Klebsiella* spp

Introduction

It has been consistently shown that early administration of appropriate antibiotic treatment improves survival among patients with bloodstream Gram-negative bacterial infections

[1–3]. Nowadays, empiric therapy with broad-spectrum antibiotics is often inadequate in these patients due to the frequent involvement of resistant bacteria [4], among which extended-spectrum β -lactamase-producing (ESBL) *Enterobacterales* are of particular concern due to their prevalence and association with increased mortality [5]. Conventional microbiological methods require 12–48 h to identify the causal microorganism and provide its antimicrobial susceptibility profile. Over the last few years, a number of rapid genotypic or phenotypic assays yielding timely information on bacterial antimicrobial susceptibility/resistance, including molecular-based, biochemical, and electrochemical tests, immunoassays, and notably mass spectrometry (MALDI-TOF MS), have been developed and implemented in routine practice [6]. In particular, the MALDI-TOF MS technology offers accuracy,

✉ David Navarro
david.navarro@uv.es

¹ Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación INCLIVA, Valencia, Spain

² Infectious Diseases Unit, Hospital Clínico Universitario, Instituto de Investigación INCLIVA, Valencia, Spain

³ Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain

speed, and simplicity at a low cost [6, 7]. Detection of *Enterobacteriales* resistance to third-generation oxyminocephalosporins (3rd CephR) by MALDI-TOF MS can be achieved by comparing bacterial growth in the presence or absence of a given antibiotic followed by a semiquantitative measurement of bacterial proteins [8–13]. Here, based on a previous study by our group [14], we optimized and prospectively evaluated a simple MALDI-TOF MS-based method for detection of 3rd CephR in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. directly from blood cultures that skips semiquantitative assessment of bacterial proteins.

In our setting, 3rd CephR in *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* is mainly mediated by ESBL. Since the early 2000s, conjugative plasmids harboring CTX-M-type ESBL genes have been responsible for ESBL dissemination in *Enterobacteriales* worldwide [15]. Lateral flow immunoassays (LFIA) have been increasingly used to detect β -lactamases in Gram-negatives from either from isolated colonies or directly from blood cultures, as they are simple to use and return rapid and reliable results [16–20]. In this context, we also conducted a side-by-side comparative evaluation of the performance of one of these LFIA, the NG-Test CTX-M MULTI (NG-Biotech Laboratories, France), which allows detection of ESBL CTX-Ms, with the MALDI-TOF MS-based method using bacterial pellets from grown BC bottles.

Material and methods

Patients and bacterial isolates

A total of 44 *E. coli* and *Klebsiella* spp. cryopreserved clinical isolates, either susceptible or resistant to third-generation cephalosporins, as determined by broth microdilution (see below) were used to optimize the MALDI-TOF MS-based method, as later described. The reference strains *E. coli* ATCC 25922 and *K. pneumoniae* ATCC 25955 (β -lactamase non-producers) and *E. coli* ATCC 35218 and *K. pneumoniae* ATCC 700603 (β -lactamase producers) were used as controls.

Prospective evaluation of the MALDI-TOF MS method, using 168 consecutive BC from unique patients yielding *E. coli* or *Klebsiella* spp., was conducted from November 2019 to September 2020 at the Microbiology Service of the Hospital Clínico Universitario de Valencia. The study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital Clínico Universitario INCLIVA (September, 2019).

The Antimicrobial Resistance (AMR) Direct Flow Chip (Máster Diagnóstica, Granada, Spain), a DNA microarray-based assay, was used for antimicrobial resistance gene characterization (from isolated colonies) [21] of 3rd CephR strains used for validation of the MALDI-TOF MS-based method and recovered from BC during the prospective evaluation

phase of the study. Specifically, the AMR chip assay is able to detect class A carbapenemases including GES (allelic variants 1–26), SME (1–5), KPC (1–23), NMC/IMI (1–9), class B carbapenemases including SIM, GIM (allelic variants 1 and 2), SPM, NDM (allelic variants 1 to 16), VIM (1–46), IMP (22 allelic variants), class D carbapenemases including OXA23-like (14 allelic variants), OXA 24-like (7 allelic variants), OXA48-like (4 allelic variants), OXA51-like (67 allelic variants), OXA58-like (4 allelic variants), ESBLs blaSHV (allelic variants detected included SHV mutant G238S and E240K genes SHV-5-), ESBL blaCTX-M (allelic variants detected are not disclosed by the manufacturer),

Blood cultures and antimicrobial susceptibility testing

BC bottles (BACTEC Plus Aerobic/F and Plus Anaerobic/F medium bottles, Becton Dickinson-BD- and Company, New Jersey, USA) were incubated in an automated continuous monitoring blood culturing instrument (BACTEC FX; BD). Aliquots from each positive BC bottle were subjected to routine Gram stain microscopy, were subcultured on chocolate blood medium (BD), and were incubated for 24–48 h. Conventional antimicrobial susceptibility testing (AST) from subcultured isolated bacteria was performed by broth microdilution using the MicroScan NM44 panel from Beckman Coulter (Brea, CA, USA) and interpreted according to EUCAST guidelines (https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf).

MALDI-TOF mass spectrometry-based method for detection of third-generation cephalosporin resistance in *E. coli* and *Klebsiella* spp. from blood cultures

As shown in Fig. 1, following a previously published protocol for bacterial identification from BC [14], a total volume of 50 μ L of positive-flagged BC was transferred in a 450 μ L of pre-warmed brain heart infusion (BHI) broth in microtubes (to a final concentration of around 1×10^8 CFU/mL-0.5 MacFarland-) either containing (test) or not (control) ceftriaxone (CRO). Test and control bacterial suspensions were incubated at 37 °C in agitation in a 5% CO₂ (Heracell 240i CO₂ incubator, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Germany) atmosphere for 2 h. Bacterial pellets were then obtained following a centrifugation step (3 min at 13,000 rpm), and directly used for MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, MA, USA) testing using intact bacteria. The spectra were acquired using the Microflex LT system (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and analyzed on MALDI BIOTYPER3.3 (Bruker Daltonics) software. MALDI-TOF MS analyses were performed in triplicate on the same target slide. Criteria for successful species identification were met when the spectral score of at least two of the three spots was

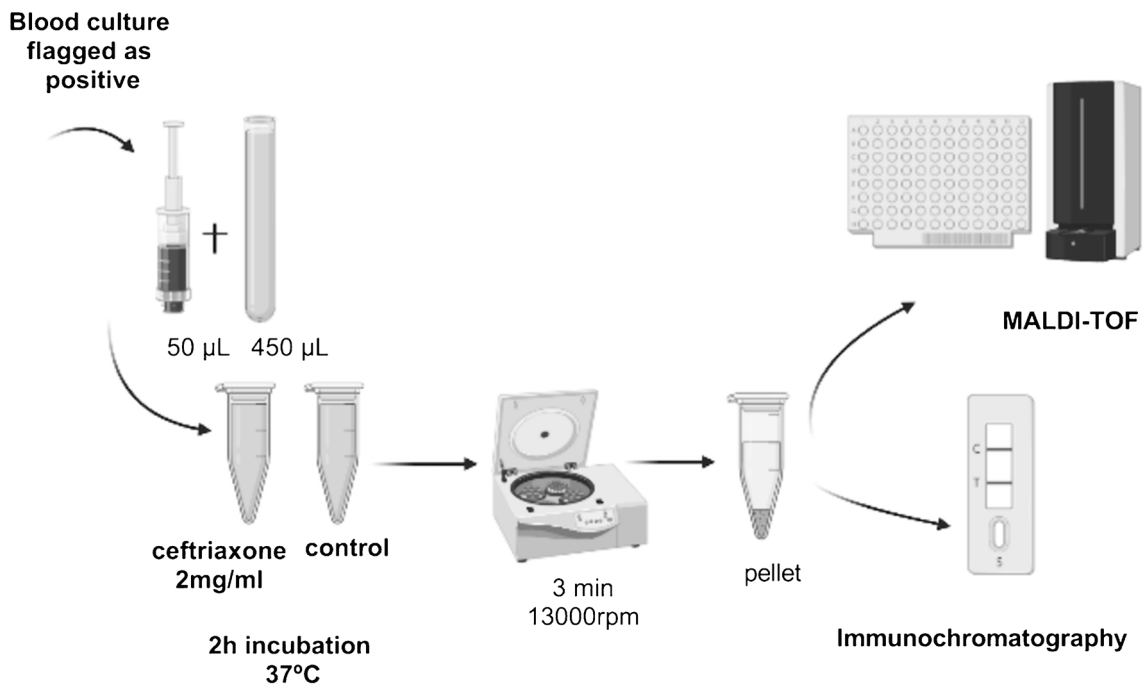


Fig. 1 Flow chart depicting the operational process for assessing the performance of a MALDI-TOF MS-based method and that of a lateral flow immunochromatography assay (NG-Test CTX-M MULTI) for

detection of extended-spectrum β-lactamase-mediated third-generation oxymino-cephalosporin resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. grown in blood cultures (BC)

2.0 (species level). Identification of the bacterial species by MALDI-TOF MS in the presence of CRO was considered a marker of 3rd CephR, whereas nonidentification was deemed to indicate susceptibility.

To establish the optimal CRO concentration allowing 3rd CephR detection by MALDI-TOF MS, a total of 10 clinical isolates of *E. coli* ($n = 5$) and *Klebsiella* spp. ($n = 5$) were used. Five were ESBL producers (CTX-M in *E. coli*, $n = 2$; SHV and CTX-M in *K. pneumoniae*, $n = 3$). Bacteria were grown overnight on chocolate blood agar, were inoculated in triplicate into BHI (10^8 CFU/mL) containing high CRO concentration (at either 1, 2, 4, or 8 mg/ml) and were incubated for 2 h, a

time span allowing accurate identification of *Enterobacterales* at the species level [14]. Results of these experiments (Table 1) indicated that CRO at 2 mg/ml yielded the best and most reproducible (identical profile in triplicates) results.

Next, we spiked aerobic BC bottles with 10^3 CFU/mL of test (3rd CephR; $n = 32$) and control (third-generation cephalosporin susceptible; $n = 12$) clinical isolates of *E. coli* ($n = 21$) and *K. pneumoniae* ($n = 23$). All 3rd CephR strains were ESBL-producing. Specifically, CTX-M ESBL were detected in all *E. coli* isolates and both SHV and CTX-M genes were detected in all *K. pneumoniae* isolates. BC bottles were flagged as positive at a median of 11.5 h (range, 7.3–15.4

Table 1 Categorization of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from pure cultures as extended-spectrum β-lactamase (ESBL) or non ESBL producers by MALDI-TOF MS at different ceftriaxone concentrations

Bacterial species	Genotypic resistance profile (no. of isolates)	Correct categorization at a given ceftriaxone concentration, no. (%)			
		1 mg/ml	2 mg/ml	4 mg/ml	8 mg/ml
All	ESBL+No ESBL (10)	7 (70)	9 (90)	7 (70)	6 (60)
	No ESBL (5)	2 (40)	4 (80)	4 (80)	5 (100)
	ESBL (5)	5 (100)	5 (100)	3 (60)	1 (20)
<i>E. coli</i>	ESBL+No ESBL (5)	3 (60)	4 (80)	4 (80)	4 (80)
	No ESBL (3)	1 (33.3)	2 (66.7)	2 (66.7)	3 (100)
	ESBL (2)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	1 (50)
<i>K. pneumoniae</i>	ESBL+No ESBL (5)	4 (80)	5 (100)	3 (60)	2 (40)
	No ESBL (2)	1 (50)	2 (100)	2 (100)	2 (100)
	ESBL (3)	3 (100)	3 (100)	1 (33.3)	0 (0)

Table 2 Categorization of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from spiked blood cultures as third-generation cephalosporin resistant or susceptible by MALDI-TOF MS

Bacterial species	Susceptibility profile to third-generation cephalosporins by broth microdilution (no. of isolates)	Correct categorization of strains as third-generation cephalosporins susceptible or resistant by MALDI-TOF MS. no. (%)
All	S+R (44)	41 (93.2)
	S (12)	11 (91.6)
	R (32)	30 (93.7)
<i>E. coli</i>	S+R (21)	20 (95.2)
	S (6)	6 (100)
	R (15)	14 (93.3)
<i>K. pneumoniae</i>	S+R (23)	21 (91.3)
	S (6)	5 (83.3)
	R (17)	16 (94.1)

R, resistant; all resistant strains were extended-spectrum β -lactamase producers. S, susceptible

h). MALDI-TOF MS of intact bacterial pellets on BHI with or without CRO at 2 mg/ml was performed after 2 h of incubation. The data indicated that correct categorization of either 3rd CephR or susceptible strains was achieved in >90% of cases (Table 2). The method performed slightly better with *E. coli* isolates (95.2%) than *K. pneumoniae* isolates (91.3%).

For prospective evaluation of the MALDI-TOF MS-based method, which was conducted around the clock (24/7), Eppendorf tubes containing 450 μ l of BHI with CRO at 2 mg/ml that were previously prepared and kept frozen at -20 until for a maximum of 1 month were used. We confirmed that storage for that period of time did not affect CRO stability (not shown). Tubes were pre-warmed before use.

Lateral flow immunochromatography assay for ESBL detection

The NG-Test CTX-M MULTI (NG-Biotech Laboratories, France; <http://www.ngbiotech.com>), a CE-marked in vitro LFIA which allows detection of ESBL CTX-M belonging to groups 1 (including CTX-M 15), 2, 8, 9 (including CTX-M 14), and 25 was performed as recommended by the manufacturer, using bacterial pellets grown in BHI in the absence of CRO (Fig. 1). The assay provides results in <15 min without discriminating across CTX-M variants.

Statistical analysis

Kappa statistics was used to assess the degree of concordance between qualitative results obtained by the MALDI-TOF MS-based method and the commercial broth microdilution method, and between the former and results provided by lateral flow immunochromatographic assay. Significance was set at P value <0.05.

Results

Prospective evaluation of the MALDI-TOF MS method for detection of *Enterobacterales* resistance to third-generation cephalosporins

A total of 168 consecutive BC from unique patients (median age, 74 years; range, 36–99 years) yielding *E. coli* or *Klebsiella* spp. were included for prospective validation of the MALDI-TOF MS-based method. Relevant patient data are shown in Table 3. Forty-nine isolates were 3rd CephR (*E. coli*, $n = 31$ and *K. pneumoniae*, $n = 18$), as determined by conventional broth microdilution (median MIC to cefotaxime, 16 mg/mL; range, 8– ≥ 32 mg/mL), of which 41 (83.6%) were ESBL producers, 7 (14.2%) expressed ESBL and OXA-48 type D carbapenemase, as characterized by the AMR chip assay, and one (2.0%) presumably harbored a plasmid-mediated AmpC according to the antimicrobial susceptibility profile (Piperacillin-Tazobactam, MIC ≤ 8 mg/L; Cefepime, MIC ≤ 1 mg/L; CRO, MIC > 32 mg/L; Ertapenem, MIC ≤ 0.5 mg/L) and the lack of detection of ESBL by the AMR chip assay (Table 4). Forty-five out of the 49 resistant isolates (91.8%) were correctly profiled (38 were CTX-M producers and 7 were CTX-M and OXA-48 producers whereas the remaining four were erroneously categorized as sensitive (very major error). These four isolates (*E. coli*, $n = 3$ and *K. pneumoniae*, $n = 1$) harbored either the CTX-M-15 allele ($n = 2$) or SHV-5 ($n = 1$; CRO MIC = > 32 mg/L), as confirmed by the AMR assay or presumed to carry a plasmid-mediated AmpC (*K. pneumoniae*, $n = 1$) as defined above. CRO MIC of the 3 *E. coli* strains was ≥ 32 mg/L and 2 mg/L in the *K. pneumoniae* strain.

Regarding the 119 third-generation cephalosporins susceptible strains, 117 (98.3%) were categorized as such by the MALDI-TOF MS-based method and two

Table 3 Demographic and clinical data of patients enrolled in the study

Parameter	Number (%)
Sex	
Male	105 (62.5)
Female	63 (37.5)
Hospitalization	
Internal medicine	49 (29.2)
Intensive care unit	30 (17.8)
Onco-hematology	23 (13.7)
Digestive medicine	11 (6.5)
Urology	11 (6.5)
Other services	29 (17.4)
No hospitalization	15 (8.9)
Acquisition	
Nosocomial	56 (33.3)
Community-acquired	112 (66.7)
Severity	
Bacteremia	107 (63.7)
Sepsis	45 (26.8)
Septic shock	16 (9.5)
Source	
Unknown	39 (22.6)
Abdominal	22 (13.1)
Respiratory	3 (3.6)
Hepato-biliary	23 (13.7)
Urinary	74 (44)
Others	5 (3)

were misclassified as resistant (major error). One of these two isolates (*K. pneumoniae*) was found to express the SHV-5 (CRO, MIC ≤ 1 mg/L). No genotypic marker of resistance to β-lactam antibiotics was identified in the remaining strain (*E. coli*).

Accordingly, the “real-world” concordance between the results provided by the MALDI-TOF MS method and the reference broth microdilution assay was very high (Kappa index, 0.91; 95% CI, 0.84–0.98). The sensitivity of the MALDI-TOF MS method was 91.8% (95% CI, 80.8–96.8%), and its specificity 98.3% (95% CI, 94.1–99.5%).

Discordant strains (n = 6) were retrieved, spiked into aerobic BC bottles, and tested by the MALDI-TOF MS method as described above. All but one strain, presumably a plasmidic-AMPc-producing *K. pneumoniae* (major error), were correctly categorized as resistant (n = 4) or susceptible (n = 1).

Table 4 Susceptibility to third-generation cephalosporins and genotypic profile of bacterial species grown in blood cultures

Bacterial species. no.	Third-generation cephalosporin susceptible. no. (%)	Third-generation cephalosporin resistant. no. (%)		
		ESBL-producer	ESBL plus Carbapenemase-producer	Plasmid-mediated AmpC producer ^a
Total (168)	119 (70.8)	41 (24.4)	7 (4.2)	1 (0.6)
<i>E. coli</i> (115)	84 (73.0)	31 (26.9)	0	0
<i>K. pneumoniae</i> (50)	32 (64)	10 (20)	7 (14)	1 (2)
<i>K. oxytoca</i> (2)	2 (100)	0	0	0
<i>K. variicola</i> (1)	1 (100)	0	0	0

ESBL, extended-spectrum β-lactamase

^a Presumably harboring a plasmid-mediated AmpC according to the antimicrobial susceptibility profile and the lack of detection of ESBL by the AMR chip assay

Comparison between lateral flow immunochromatography and MALDI-TOF MS-based method for detection of ESBL-mediated resistance to third-generation cephalosporins

As a part of the study protocol, we sought to prospectively evaluate the performance of LFIC assay allowing detection of widely spread CTX-M ESBLs in our setting (NG-Test CTX-M MULTI) in comparison with that of the MALDI-TOF MS method and ultimately with conventional broth microdilution. Bacterial pellets grown in BHI in the absence of CRO were used as the substrate for LFIC, which was carried out in parallel to the MALDI-TOF MS method. Data were available for a total of 141 BC flagged positive for *E. coli* (n = 97) or *Klebsiella* spp. (n = 44). The MALDI-TOF MS method identified 47 (33.3%) bacterial strains (*E. coli*, n = 29 and *Klebsiella* spp., n = 18) as being 3rd CephR, which were confirmed as such by conventional broth microdilution, of which 44 were ESBL producers as determined by the genotypic AMR assay. The LFIC assay returned positive results for the 44 ESBL-producing bacteria (*E. coli*, n = 28; *klebsiella* spp., n = 16) and negative results for the remaining three strains (*E. coli* SHV-5, *K. pneumoniae* SHV-5, and *K. pneumoniae* presumably harboring a plasmid-mediated ampC), all these possibly not detected by the LFIC. All the strains (*E. coli*, n = 68; *klebsiella* spp., n = 26) categorized as susceptible to 3rd Ceph by the MALDI-TOF MS method (and by conventional broth microdilution) tested negative by the LFIC assay. Thus, concordance between the LFIC assay and the MALDI-TOF MS method for detecting 3rd CephR mediated by ESBL was 100%.

Discussion

MALDI-TOF MS-based methods are being increasingly used for phenotypic detection of antimicrobial resistance in bacteria, among which those comparing bacterial growth in the presence or absence of a given antibiotic at a pre-established concentration are gaining popularity because of their simplicity and low cost [6,

7]. Commonly, these methods take advantage of either commercially available (MB-ASTRA) [8, 11] or in-house-developed [12] software programs for calculating and comparing the area under a curve of spectra of bacteria either exposed or not to an antibiotic. A simpler approach, consisting of categorizing strains not correctly identified at the species or genus level in the presence of the antibiotic as susceptible, and those correctly identified as resistant, has been shown to perform comparably [22] even when conducted on a MALDI-TOF MS target (direct-on-target microdroplet growth assay) [23].

Here, we adapted a MALDI-TOF MS-based method developed by our group for bacterial identification from BC to detect 3rd CephR among *E. coli* and *Klebsiella* spp. strains involved in bloodstream infections. This method used a high bacterial inoculum and a high CRO concentration (2 mg/ml), well above its susceptibility breaking point for *Enterobacteriales* (https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf), intact bacteria, thereby skipping protein extraction and leading to reduced hands-on time, and a high identification score (>2) for species identification. We focused on patients developing bloodstream infections caused by *E. coli* and *Klebsiella* spp. due to their particularly frequent involvement in our setting (>90%).

Our method correctly categorized 91.8% of resistant strains with four very major errors (false susceptibility) and 98.3% of susceptible strains with two major errors (false resistance). The overall “real-world” sensitivity of the MALDI-TOF MS method was 91.8% (95% CI, 80.8–96.8%), and its specificity was 98.3% (95% CI, 94.1–99.5%). Strains yielding discordant results were reanalyzed using spiked BC. We found that all but one were correctly re-classified as either resistant or susceptible, thus suggesting that an operational error may have occurred while performing the procedure (use of either too low or too high inocula for very major and major errors, respectively). Certainly, standardization of the inoculum preparation is a reasonable approach to avoid very major and major operational errors, but this would be at the cost of increasing the handling time and thus minimizing the simplicity of the protocol. Nevertheless, in our experience, adequate personnel training suffices to achieving adequate precision.

To our knowledge, previous studies evaluating the real-life performance of MALDI-TOF MS-based methods for the same purpose as ours (assessment of *Enterobacteriales* susceptibility to third-generation oxymino-cephalosporins directly from BC) used assistant software programs (MB-ASTRA or locally developed) and included a bacterial protein extraction step. In addition, third-generation cephalosporin (usually cefotaxime) concentration exposure and length of incubation ranged between 2 and 20 mg/L and 2 and 4 h, respectively [9–12]. Categorical agreement between the MBT-ASTRA and the reference method varied between 83 and 100% [9, 10, 12]. Notably, Saugeat and colleagues [10] reported a high rate of major (16%) and very major errors

(29%). The MALDI-TOF MS method evaluated herein, as stated, does not involve the use of assistant software programs and skips protein extraction thus making simpler and faster the operational process.

In our setting, resistance to third-generation oxymino-cephalosporins in *E. coli* and *Klebsiella* spp. is mainly mediated by ESBL. The NG-Test CTX-M MULTI assay is an LFIC device allowing detection of CTX-M ESBLs. We compared the performance of this LFIC method with the MALDI-TOF MS-based method using bacterial pellets from grown BC bottles (and ultimately with the reference broth microdilution assay). We observed 100% concordance between both methods. In fact, ESBL was detected by LFIC in all 3rd CephR ESBL-producing strains. Moreover, three resistant strains displaying other genotypic markers mediating resistance to oxymino-cephalosporins tested negative by the LFIC assay, as did all susceptible strains.

To our knowledge, only two studies have reported on the performance of NG-Test CTX-M MULTI assay on *E. coli* and *K. pneumoniae* strains grown in BC [19, 20]. Bernabeu et al. [20] were able to correctly identify by LFIC as ESBL producers 7 strains (*K. pneumoniae*, $n = 4$ and *E. coli*, $n = 3$) harboring CTX-M ESBLs (100% concordance between LFIC and genotypic analysis). In turn, Bianco et al. [19] also reported the NG-Test CTX-M MULTI assay performed on BC pellets to display an excellent (100%) concordance with genotypic analysis for 34 *E. coli* and *K. pneumoniae* strains.

Limitations of the current study are the relatively limited number of bloodstream infection episodes due to 3rd CephR strains in our series and the lack of bacterial clonality studies. In addition, a major limitation shared by the MALDI-TOF-MS method evaluated herein and others somehow analogous to it is that the procedure does not inform on the isolate susceptibility to carbapenem antibiotics, which are widely used as a therapeutic option when 3rd CephR is documented; yet, the prevalence of carbapenem resistance in *E. coli* and *Klebsiella* spp. in our setting is negligible (0% for *E. coli* and 0.8% for *Klebsiella* spp.).

In summary, we found our MALDI-TOF MS-based method to be highly accurate for correct categorization of *E. coli* and *Klebsiella* spp. grown in BC as either resistant or susceptible to third-generation oxymino-cephalosporins mediated by a variety of β -lactamase genes. Similarly, the NG-Test CTX-M MULTI LFIC assay performed excellently for detection of *E. coli* and *Klebsiella* spp. ESBL-producing strains directly from grown BC. Whether routine and timely use of either of these methods have a beneficial impact on patient outcomes is currently under investigation. In addition, studies comparing the MALDI-TOF MS-based method with molecular multiplexed assays allowing rapid bacterial identification and detection of resistance genes including not only ESBL but also those coding for carbapenemases in terms of cost-effectiveness are warranted.

Acknowledgements E.G holds a Juan Rodés research contract (JR18/00053) from the ISCIII (Carlos III Health Institute, *Instituto de Salud Carlos III* in the original Spanish). E.A. holds a Río Hortega research contract from the Carlos III Health Institute (Ref. CM18/00221).

Author contribution IT, EA, EG, JC: conceptualization, methodology, analysis of data, validation, review and editing; BG, AV, TP, DH, DS, RMC: methodology, review and editing; CP, RO: clinical management of patients; DN: conceptualization, supervision, writing the original draft.

Data availability The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Code availability Not applicable.

Declarations

Ethical statement The current study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital Clínico Universitario INCLIVA (September, 2019).

Consent for publication Not applicable.

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Informed consent Not applicable (as discussed with the institutional medical ethics committee).

References

- Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH (2000) The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* 118:146–155
- Ferrer R, Martin-Loeches I, Phillips G, Osborn TM, Townsend S, Dellinger RP, Artigas A, Schorr C, Levy MM (2014) Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program. *Crit Care Med* 42:1749–1755
- Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, Oh MD, Choe KW (2005) Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant Gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 49:760–766
- Shorr AF, Micek ST, Welch EC, Doherty JA, Reichley RM, Kollef MH (2011) Inappropriate antibiotic therapy in Gram-negative sepsis increases hospital length of stay. *Crit Care Med* 39:46–51
- Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, van Duin D, Clancy CJ (2020) Infectious Diseases Society of America Antimicrobial Resistant Treatment Guidance: Gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 27:ciaa1478
- Oviaño M, Bou G (2018) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the rapid detection of antimicrobial resistance mechanisms and beyond. *Clin Microbiol Rev* 32:e00037–e00018
- Faron ML, Buchan BW, Ledebner NA (2017) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for use with positive blood cultures: methodology, performance, and optimization. *J Clin Microbiol* 55:3328–3338
- Jung JS, Popp C, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, Schubert S (2014) Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of β -lactam resistance in Enterobacteriaceae derived from blood cultures. *J Clin Microbiol* 52:924–930
- Jung JS, Hamacher C, Gross B, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, Schubert S (2016) Evaluation of a semiquantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry method for rapid antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 54:2820–2824
- Sauget M, Bertrand X, Hocquet D (2018) Rapid antibiotic susceptibility testing on blood cultures using MALDI-TOF MS. *PLoS One* 13:e0205603
- Axelsson C, Rehnstam-Holm A-S, Nilso B (2020) Rapid detection of antibiotic resistance in positive blood cultures by MALDI-TOF MS and an automated and optimized MBT-ASTRA protocol for *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Dis (Lond)* 52:45–53
- Hernández Egado S, Luis Reboredo A, García Señán A, Gil González AB, Muñoz Bellido JL, González Buitrago JM, Sanchez-Juanes F (2019) Summation of peaks and L34 ribosomal protein in the presence and absence of antibiotics enables susceptibility testing using MALDI-TOF mass spectrometry in 2h from *Escherichia coli*-positive blood cultures. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 37:244–250
- Florio W, Baldeschi L, Rizzato C, Tavanti A, Ghelardi E, Lupetti A (2020) Detection of antibiotic-resistance by MALDI-TOF mass spectrometry: an expanding area. *Front Cell Infect Microbiol* 10:572909
- Torres I, Gimenez E, Pascual T, Bueno F, Huntley D, Martínez M, Navarro D (2017) Short-term incubation of positive blood cultures in brain-heart infusion broth accelerates identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Med Microbiol* 66:1752–1758
- Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM (2017) Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother* 72:2145e55
- Takissian J, Bonnin RA, Naas T, Dortet L (2019) NG-Test Carba 5 for rapid detection of carbapenemase-producing enterobacteriales from positive blood cultures. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e00011–e00019
- Boutal H, Naas T, Devilliers K, Oueslati S, Dortet L, Bernabeu S, Simon S, Volland H (2017) Development and validation of a lateral flow immunoassay for rapid detection of NDM-producing enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 55:2018–2029
- Boutal H, Vogel A, Bernabeu S, Devilliers K, Creton E, Cotellon G, Plaisance M, Oueslati S, Dortet L, Jousset A, Oueslati S, Dortet L, Jousset A, Simon S, Naas T, Volland H (2018) A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 73:909–915
- Bianco G, Boattini M, Iannaccone M, Cavallo R, Costa C (2020) Evaluation of the NG-Test CTX-M MULTI immunochromatographic assay for the rapid detection of CTX-M extended-spectrum- β -lactamase producers from positive blood cultures. *J Hosp Infect* 105:341–343
- Bernabeu S, Ratnam KC, Boutal H, Gonzalez C, Vogel A, Devilliers K, Plaisance M, Oueslati S, Malhotra-Kumar S, Dortet L, Fortineau N, Simon S, Volland H, Naas T (2020) A lateral flow immunoassay for the rapid identification of CTX-M-producing enterobacteriales from culture plates and positive blood cultures. *Diagnostics (Basel)* 10:764
- Torres Fink I, Tormo Palop N, Borrás Salvador R, Buesa Gómez J, Gimeno Cardona C, Navarro Ortega D (2019) Evaluation of the DNA microarray “AMR Direct Flow Chip Kit” for detection of antimicrobial resistance genes from Gram-positive and Gram-negative bacterial isolated colonies. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 37:454–457
- Li M, Liu M, Song Q, Xiong L, Chen Z, Kang M, Xie Y (2018) Rapid antimicrobial susceptibility testing by matrix-assisted laser

- desorption ionization-time of flight mass spectrometry using a qualitative method in *Acinetobacter baumannii* complex. *J Microbiol Methods* 153:60–65
23. Idelevich EA, Storck LM, Sparbier K, Drews O, Kostrzewa M, Becker K (2018) Rapid direct susceptibility testing from positive blood cultures by the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based direct-on-target microdroplet growth assay. *J Clin Microbiol* 56:e00913–e00918

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) proteomic profiling of cerebrospinal fluid in the diagnosis of enteroviral meningitis: a proof-of-principle study

Ignacio Torres¹ · Estela Giménez¹ · Víctor Vinuesa¹ · Tania Pascual¹ · Juan Miguel Moya¹ · Juan Alberola² · Ana Martínez-Sapiña³ · David Navarro^{1,2} 

Received: 31 May 2018 / Accepted: 11 September 2018 / Published online: 27 September 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

The use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) for diagnosing viral infections by directly testing clinical specimens has not previously been explored. In this proof-of-principle study, we tested the hypothesis that proteomic profiling of cerebrospinal fluid (CSF) by mass spectrometry may be useful in the diagnosis of enteroviral (EV) meningitis. A total of 114 cryopreserved CSF samples were analyzed, of which 47 were positive for EV and 67 were negative. Total CSF proteins were precipitated and subjected to MALDI-TOF-MS analysis in a low (2–20 kDa) molecular weight range using a MicroFlex LT mass spectrometer. The whole data set was randomly split into a training set ($n = 76$ specimens) and a validation set ($n = 38$ samples). Backward/forward stepwise logistic regression analyses identified 30 peaks that were differentially present in EV-positive and EV-negative specimens. These were used to build a model which displayed an overall classification accuracy of 93%. The discriminative ability of the model was confirmed by using a validation sample set (overall accuracy 83%). In fact, the model was able to correctly classify 61 out of 67 EV-negative samples and 42 out of 47 EV-positive specimens. EV meningitis is associated with a distinctive protein profile that may be directly detectable in CSF specimens by MALDI-TOF-MS.

Keywords MALDI-TOF-MS · Enteroviral meningitis · Cerebrospinal fluid · Proteomic profiling

Introduction

In recent years, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) has found many applications in routine clinical microbiology laboratories, most notably for the rapid and cost-effective identification of bacterial and fungal species, either directly from pure cultures or from clinical specimens (i.e., blood or urine), and for the detection of antibiotic resistance and bacterial typing (reviewed in [1, 2]). Unfortunately, the use of MALDI-

TOF-MS in diagnostic virology has not evolved at the same pace; identification and/or molecular typing of a wide range of viruses including respiratory viruses, enteroviruses, herpes simplex virus, cytomegalovirus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus by mass spectrometry has been achieved, but only after a cell culture step, by MALDI-TOF-MS or by coupling MALDI-TOF-MS with nucleic acid amplification procedures in which specific viral genome sequences are amplified by PCR, and then the amplicons are analyzed by mass spectrometry procedures [3–13]. Nevertheless, to our knowledge, there are no publications describing the performance of MALDI-TOF-MS for diagnosing viral infections by direct testing of clinical specimens.

Enteroviruses (EVs), which belong to the family *Picornaviridae* [14], cause neurological diseases, most frequently aseptic meningitis and encephalitis, especially at pediatric ages [15]. Rapid detection of EV meningitis is essential for making vital patient management and treatment decisions. Indeed, timely provision of EV test results has a major impact on health care and has been shown to be cost-effective [16].

✉ David Navarro
david.navarro@uv.es

¹ Microbiology Service, Institute for Research INCLIVA, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain

² Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Av. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain

³ Microbiology Service, Hospital Miguel Servet, Zaragoza, Spain

Currently, reverse transcription real-time PCR assays to detect EV RNA in cerebrospinal fluid (CSF) are the gold standard for the diagnosis of EV-related neurological diseases [15].

Proteomic profiling of CSF by mass spectrometry has been successfully used to diagnose and grade a number of other neurodegenerative diseases, including amyotrophic lateral sclerosis [17] and multiple sclerosis [18].

In this current study, we used MALDI-TOF-MS to search for a CSF proteomic signature which is specifically associated with EV meningitis.

Materials and methods

Patients and specimens

A total of 114 non-consecutive CSF specimens (minimum volume of 100 µl required) that had been cryopreserved at -20°C for a median of 365 days (range, 80–1825 days) and never previously thawed were selected for this study. The specimens were obtained from patients attended at the Hospital Clínico Universitario in Valencia ($n = 107$) or Hospital Miguel Servet in Zaragoza ($n = 7$). All CSF samples

were centrifuged upon arrival at the laboratory to remove cellular debris and were subsequently stored (within 24–48 h) at -20°C . Of these, 47 tested positive for EV RNA either by the FDA-approved real-time Xpert® EV PCR method or the SmartCycler Enterovirus PCR assay (both from Cepheid, CA, USA). The remaining 67 CSF samples belonged to patients with signs or symptoms of neurological disease, e.g., aseptic meningitis, convulsion syndrome, fever with a headache, or encephalitis. Regarding the 67 EV-negative samples, 3 were positive for *Streptococcus pneumoniae* by conventional culture, 11 tested positive for herpes simplex virus type 1 (HSV-1) DNA, 4 for varicella zoster virus (VZV) DNA, and 1 for human herpesvirus type 6 (HHV-6) DNA. All PCR assays were run in an Abi Prism 7500 platform (Applied Biosystems) following the respective manufacturer's recommendations, using the RealQuality RQ-HHV-1/2, the RealQuality RQ-VZV, and the RS-HHV 6 kits, (all from AB Analitica, Padua, Italy). The whole data set was randomly split into a training set ($n = 76$ specimens) and a validation set ($n = 38$ samples). The number of EV-positive and EV-negative CSF specimens was equally distributed between both sets (41% of EV-positive samples in the training set and 42% in the validation set) (Table 1). Given the retrospective and observational

Table 1 Characteristics of patients and biological features of cerebrospinal fluids included in the study

Factor	Training data set ($n = 76$)		Validation data set ($n = 38$)	
	EV-negative ($n = 45$, 59%)	EV-positive ($n = 31$, 41%)	EV-negative ($n = 22$, 58%)	EV-positive ($n = 16$, 42%)
Age				
< 18 years	20 (44.4)	30 (96.8)*	6 (27.3)	13 (81.3)*
> 18 years	25 (55.6)	1 (3.2)	16 (72.7)	3 (18.8)
Gender ^a				
Male	29 (65.9)	22 (78.6)	12 (54.5)	13 (86.7)*
Female	15 (34.1)	6 (21.4)	10 (45.5)	2 (13.3)
Diagnosis				
Aseptic meningitis	4 (8.9)	17 (54.8)	7 (31.8)	10 (62.5)
Bacteremia/sepsis	3 (6.6)	–	1 (4.5)	–
Confusion syndrome	4 (8.9)	–	2 (9.1)	1 (6.3)
Convulsions	3 (6.7)	–	–	–
Encephalitis	11 (24.4)	–	3 (13.6)	–
Fever and cephalaea	11 (24.4)	14 (45.2)	2 (9.1)	5 (31.3)
Others	9 (20)	–	7 (31.8)	–
Biochemical characteristics of CSF. Median (range)				
Glucose (mg/dL)	65 (40–147)	59 (35–81)*	72 (28–166)	64 (36–78)
Proteins (mg/dL)	52 (12–721)	28 (14–147)*	62 (17–539)	36 (17–680)*
Cellularity (cells/µL)	14 (0–593)	39 (1–1617)*	11 (0–3570)	161 (4–472)
% mononuclear cells	87 (4–100)	55 (10–80)*	90 (1–100)	68 (32–100)
% polynuclear cells	14 (0–94)*	45 (20–90)*	10 (0–99)	32 (0–68)
Red blood cells (cells/µL)	23 (0–40,200)	5 (0–16,000)	5 (0–12,107)	6 (0–2000)

EV, enterovirus; CSF, cerebrospinal fluid

^a Data available in $n = 72$ and $n = 37$ of the training and test data sets, respectively

* P value < 0.05 by means of the chi-square test and the Mann–Whitney U test for categorical and continuous variables, respectively

nature of this study, the Ethics committee at the Hospital Clínico Universitario deemed the collection of informed consent unnecessary.

Sample processing for MALDI-TOF-MS analysis

Total CSF proteins were precipitated following a protocol detailed elsewhere [19]. Briefly, 100 μL of CSF was mixed with 400 μL of methanol and then centrifuged for 10 s. Next, a volume of 100 μL of chloroform was added. The mixture was centrifuged again for 10 s, and 300 μL of distilled water was added. After vigorous vortexing, the mixture was centrifuged at $9000 \times g$ for 1 min to yield three phases, and the top aqueous phase was carefully removed. Finally, 300 μL of methanol was added, and the solution was centrifuged for 2 min. The supernatant was removed, and the protein pellet was solubilized in 10 μL of 70% formic acid and 10 μL of 99.9% acetonitrile (both from Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

MALDI-TOF-MS analysis

A volume of 1 μL of protein precipitate was spotted (seven spots per sample) onto a stainless steel MALDI target plate. This was dried at room temperature and then coated with 1 μL of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix solution (5 mg/mL in 50% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid). MS analysis was performed in a low (2–20 kDa) molecular weight range using a MicroFlex LT mass spectrometer (Bruker Daltonics); spectra were acquired using FlexControl software (v.3.4.135.0) following automatic-mode acquisition (linear positive-ion mode with a laser frequency of 60 Hz and 240 laser shots in 40 shot steps); and every replicate was acquired three times in order to obtain a total of 21 spectra per sample. After acquisition, the spectra were visualized using FlexAnalysis software (v.3.4.76.0). In accordance with a previous publication [20] in order to ensure reproducibility, only samples with at least 15 spectra (70%) were finally included in the study. High- and low-frequency interference was removed using the Savitzky–Golay smoothing algorithm and baseline subtraction methods. Raw peak lists were introduced into Mass-Up software [21] for further pre-processing. Consensus spectra were obtained for every sample including peaks present only in 75% of replicates and following MALDIquant criteria (tolerance value for considering two peaks the same set at 0.002 ppm). For biomarker discovery, 33 out of 403 peaks displaying best p and q values (Fisher's exact test of independence and the Benjamini Hochberg FDR, respectively) were finally selected for further analysis by logistic regression.

CSF spiking with coxsackievirus B3

An aliquot (1 mL) of coxsackievirus B3 purified from HeLa-infected cell supernatants (5.6×10^8 TCID₅₀/mL) was available for the experiments described below. First, we subjected 100 μL of the supernatant to protein precipitation and MALDI-TOF analysis (three replicates acquired three times each) to obtain a virus-representative spectrum. Second, we spiked a CSF sample drawn from a patient with no suspicion of infectious meningoencephalitis (and testing negative for bacteria by routine culture, and for EV, HSV-1, VVZ, and HHV6 by real-time PCR) with coxsackievirus B3 at increasing concentrations (10^4 , 10^5 , and 10^6 TCID₅₀/mL). Each aliquot was processed following the protocol previously described. The spectra obtained from the non-spiked CSF sample were used as a control.

Statistical analysis

Differential MALDI-TOF-MS peaks were selected by backward stepwise logistic regression, following the Akaike information criterion. The estimated probability that a given sample would be EV-positive was provided by the regression coefficients of the logistic regression model and was calculated using the eq. $P = 1/(1 + e) - (\alpha + \beta x)$. The presence or absence of a given peak was introduced in the equation as 1 and 0, respectively. Specimens with a $P > 0.5$ were classified as positive specimens. The beta coefficients reflected the differential contribution (value and sign) of each peak. Peaks with positive and negative beta coefficients contributed to the probability (odds logarithm) for a sample to be categorized as EV-positive or EV-negative, respectively. The α coefficient constitutes the intercept of the logistic regression. Samples with total absence of peaks were categorized as EV-positive or EV-negative depending on the coefficient value for the intercept. The proportion of the variation explained by the model was given by the Cox–Snell residual and Nagelkerke's R^2 (both with a maximum value of 1). To assess the discriminatory ability of the model, the peaks eventually included in the model by using the “mixOmics” package in R (R-project.org) were analyzed in a partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) plot. Continuous variables were compared with the non-parametric Mann–Whitney U test; P values < 0.05 were deemed to be significant. All statistical analyses were performed using the statistical software SPSS (v.19.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Results

Relevant clinical, biochemical, and cellularity data of patients in both sets are summarized in Table 1. Patients with EV meningitis were younger and had increased cellularity in

CSFs. Patients with EV meningitis included in the training set also displayed lower levels of glucose and proteins in the CSF samples. Of relevance, the cellularity in CSFs was no different between patients who tested positive for EV and those who did so for other viral agents ($P = 0.86$).

Analysis of the MALDI-TOF spectra produced by the CSF samples included in the training set revealed up to 403 peak signals with a relative intensity $\geq 10\%$. Backward/forward step-wise logistic regression analyses identified 30 peaks that were differentially present in EV-positive and EV-negative specimens (Table 2) and which we used to build a model. The model

displayed a Cox–Snell R^2 of 0.68 and a Nagelkerke's R^2 of 0.92. We showed its discriminatory ability in a PLS-DA plot analysis (Fig. 1). Of note, none of these peaks could fully distinguish positive specimens individually; rather, the combination of differentially expressed signals allowed the CSF samples to be correctly categorized. Three representative spectra from EV-positive CFS are shown in Fig. 2.

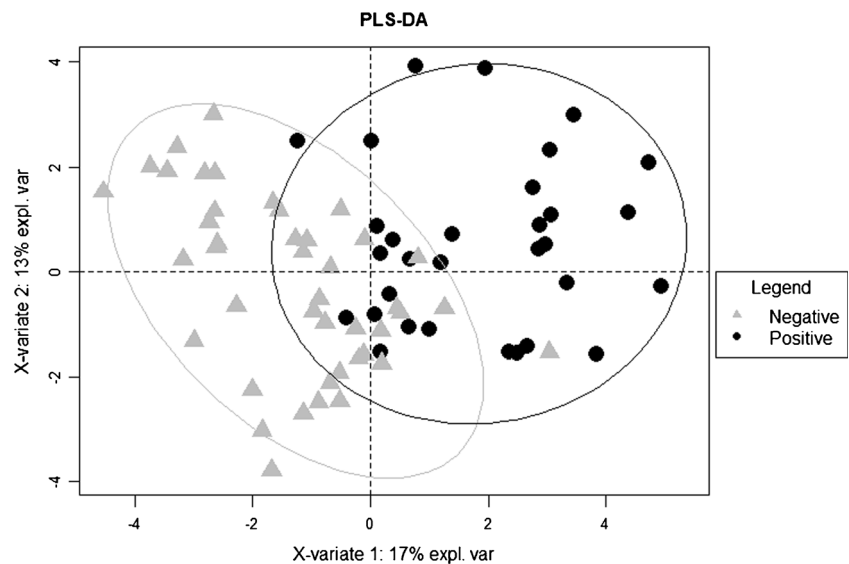
Our model displayed a high predictive ability and had a high overall classification accuracy (Table 3). In fact, the model was able to correctly classify 42 out of 45 EV-negative samples (three false-positive results) and 29 out of 31 EV-positive specimens

Table 2 Parameters of the model and presence of discriminant peaks in enterovirus positive and enterovirus negative cerebrospinal fluid samples in the training and validation sets

Peak (m/z)	Coefficient (beta value) ^a	Percentage in EV-positive (training)	Percentage in EV-negative (training)	Percentage in EV-positive (validation)	Percentage in EV-negative (validation)
1990	-72	25.8	2.2	12.5	0
2413	24	16	0	18.8	9.1
2425	-48	3.2	22.2	18.8	22.7
2435	10	9.7	0	0	0
2601	40	9.7	0	6.3	4.5
2761	-86	22.6	4.4	12.5	9.1
2837	105	22.6	2.2	6.3	4.5
3038	12	9.7	0	6.3	0
3232	19	32.3	44.4	37.5	68.2
3272	4	0	8.9	6.3	18.2
3283	-36	19.4	37.8	31.3	59.1
3441	34	41.9	26.7	68.8	22.7
3868	19	9.7	37.8	25	50
3948	36	9.7	40	37.5	45.5
3989	18	38.7	17.8	43.8	27.3
4151	42	9.7	0	31.3	4.5
4301	-23	6.5	44.4	18.8	54.5
4455	-107	0	13.3	6.3	9.1
4587	2	83.9	66.7	81.3	72.7
5751	-6	0	8.9	0	18.2
5829	-19	0	20	0	13.6
5865	33	64.5	75.6	37.5	81.8
5873	72	25.8	0	0	4.5
6277	33	41.9	4.4	6.3	4.5
6622	-2	74.2	55.6	62.5	54.5
6631	-1	3.2	22.2	12.5	18.2
7817	-37	6.5	35.6	25	50
7892	-2	6.5	33.3	31.3	31.8
7975	0.12	45.2	15.6	43.8	18.2
8930	-30	0	11.1	6.3	40.9
Constant	-34				

^a Coefficients of logistic regression. These coefficients provide the magnitude (value and sign) of the contribution of each variable to the model. The beta coefficient informs about the contribution ("weight") of a given peak included in the model for classifying a sample as being EV-positive (positive sign) or EV-negative (negative sign). The total absence of peaks categorizes a sample as EV-negative, since the coefficient of the intercept in the model is -34

Fig. 1 Differentiation of enterovirus PCR-positive and PCR-negative cerebrospinal fluid samples in the training set by supervised partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) score plot analysis



(two false-negative results). We then tested the discriminatory ability of the model by using a validation set consisting of 38 CSF specimens containing 22 EV RNA-negative and 16 EV RNA-positive samples. As shown in Table 3, the model correctly classified 19 out of 22 (three false-positive results) and 13 out of 16 (three false-negative results). The sensitivity and specificity of the model were 93.5% and 93.3% for the training dataset, and 81.3% and 86.4% for the validation dataset. In addition, this model correctly categorized 18 out of the 19 specimens that tested positive for HSV-1, VVZ, or HHV-6 DNA as negative for EV RNA. Overall, a total of six samples were categorized as false-positive results (one of which tested positive for HSV-1), and five samples were categorized as false-negative results. Of interest, spectra obtained from CSF specimens testing positive for viruses other than EV were rather heterogeneous, and no typical protein profile for a given virus could be recognized (not shown).

The MALDI-TOF-MS profile obtained from the coxsackievirus B3-spiked CSF specimens did not contain any of the peaks included in the model (Fig. 3A–C) and were comparable to that of the non-spiked CSF specimen (Fig. 3D). Of note, the spectra directly obtained from the coxsackievirus B3 preparation included a total of 27 peaks which were not present in the model described herein (Fig. 3E).

Discussion

The potential use of MALDI-TOF-MS for direct virus detection in clinical specimens is severely limited by its relative low sensitivity [22]. To date, virus identification in clinical samples using this methodological approach has been achieved only after cell culture, or by coupling MALDI-TOF-MS with nucleic acid amplification [3–13]. In particular, multiplex PCR with MALDI-TOF-MS technology has been used to

detect coxsackievirus, poliovirus, and echovirus in stool specimens [23, 24]. However, to our knowledge, this is the first study that sought to identify undigested small proteins present in CSF samples that are differentially expressed between patients with or without EV meningitis by using direct MALDI-TOF mass spectroscopy profiling.

An exploratory analysis allowed us to build a model incorporating 30 peak signals that may allow discrimination between CSF specimens testing positive or negative for EV RNA by real-time PCR. The fact that the presence or absence of a given peak in the specimen provides relevant but not definitive information as to its final categorization as being EV-positive or EV-negative must be highlighted; in fact, the relative contribution of each peak to the model is weighted taking into consideration the rest of the peaks upon which the model is built. The overall accuracy of the model was around 93%, and notably, it correctly categorized 93% and 93% of EV-positive and EV-negative specimens.

The discriminatory ability of the model was confirmed using a set of validation specimens, for which the accuracy was slightly 84% lower, perhaps owing to the smaller size of the cohort. Moreover, this method was able to correctly call all but one EV-negative specimen that tested positive for herpesviruses which frequently cause meningitis or encephalitis. The method described herein can be completed in less than 40 min at a very low cost (approximately €3 per specimen), which is substantially less than that of commercially available real-time PCR assays. The protein precipitation protocol takes less than 10 min and employs products that are available in every laboratory, and the MALDI-TOF-MS analysis is performed under the conditions used for routine bacterial and yeast identification.

Theoretically, the peak signals contributing to our model may correspond to integral virus particle components, cellular proteins, or both. In a recent study [5], the protein profiles obtained

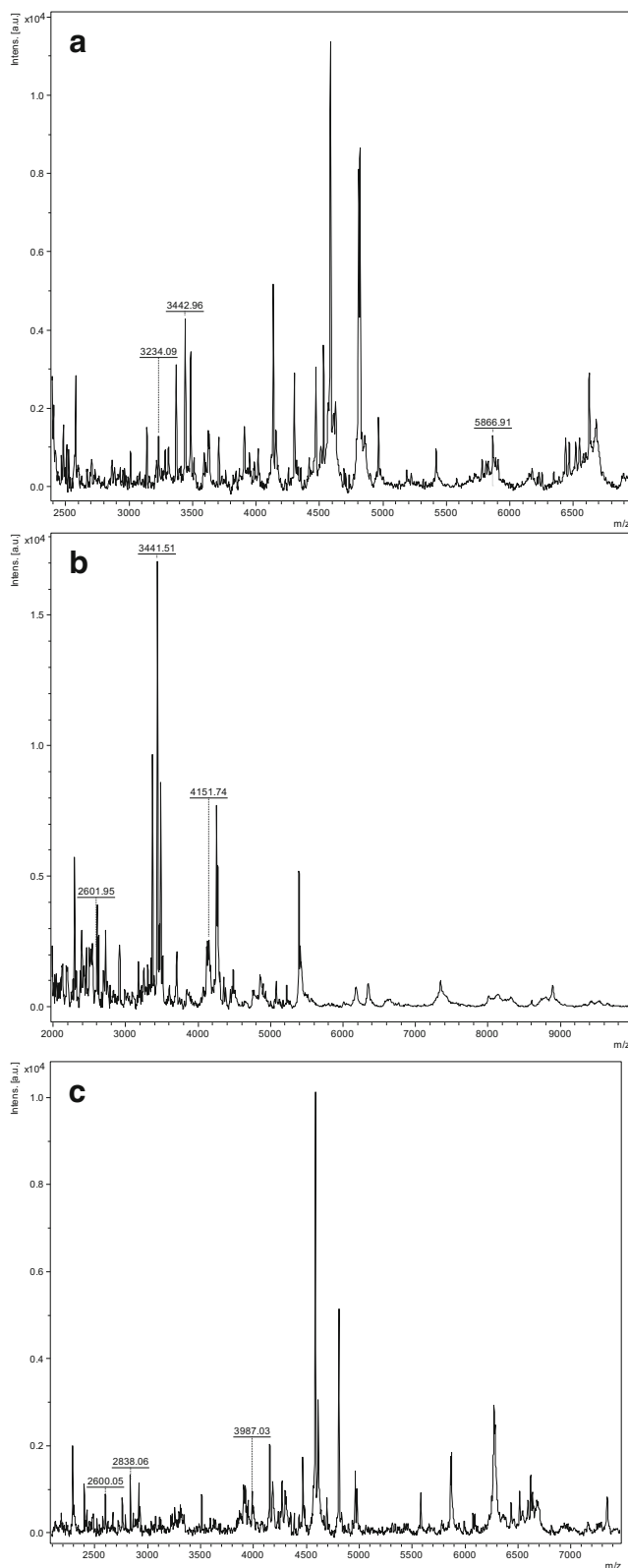


Figure 2 A–C Representative MALDI-TOF-MS spectra of three CSF specimens testing positive for EV RNA by real-time PCR. Peaks contributing to the model (2601, 2838, 3234, 3442, 3987, 4151, and 5866 m/z) are highlighted

by MALDI-TOF could correctly discriminate between different EVs grown in cell culture, and all the spectra had two common peaks signals at about 3700 and 7500 m/z corresponding to VPg and VP4 proteins, the most abundant EV structural proteins. Here, we did not find any of these peaks to be present in EV-positive specimens. It is certainly possible that the integrity of the viral proteins used in these matrices may substantially differ: For instance, viral proteins in CSF may have been highly fragmented because of the activity of local proteases, in contrast to what one might expect from purified virus preparations. Nevertheless, challenging the possibility of viral proteins contributing to this CSF profile is the presumed low EV titer in CSF samples which likely fell below the detection limit of MALDI-TOF-MS technology [1, 2]. In line with this, we observed that spectra obtained from spiked CSF samples at different EV concentrations (ranging from 10^4 to 10^6 TCID₅₀/mL) neither retrieved any of the peaks included in the model, nor those present in the spectrum profile of purified virions. These data reinforce the idea that the sensitivity of the MALDI-TOF technique may not be sufficient to detect EV in CSF specimens. Thus, it is likely that the proteins contributing to the model were of cellular origin. In line with this, infection of neuronal SK-N-MC cell lines with the neurovirulent EV-A71 strain (EV-A71/UH1) resulted in a specific cellular response in which a number of apoptosis, stress, cytoskeletal, and energy metabolism proteins were upregulated [25]. Therefore, this suggests that infection of the central nervous system by EVs may be associated with a characteristic CSF protein profile such as that which may be represented in our 30-peak MS profile. Nevertheless, whether a common cellular response is driven by the multiple EV strains belonging to A–D clades that may cause CNS disease in humans is certainly unknown. Unfortunately, genotypic characterization of EV strains in this cohort was not carried out because of logistic reasons (unavailability of a sufficient volume of specimens). This precludes drawing any conclusion on this matter.

On the other hand, it is of note that we were unable to identify a representative spectrum identifying CSF specimens testing positive for either HSV or VZV DNA; naturally, the scarce number of samples of this kind included in the study precluded any meaningful analysis.

Potential confounding factors in this current study include (i) differences in the length of sample storage time, which might impact the protein stability [26]; (ii) total protein concentration and white cell counts present in the CSF samples differing across groups; (iii) variability in the EV load in each CSF sample; and (iv) heterogeneity in the control group in terms of patient demographics and underlying disease. In addition, the study has several limitations that should be underlined. First, there were significant differences between EV-positive and EV-negative samples with regard to the total number of leukocytes; the possibility exists that the differentiating peaks may correspond to leukocyte proteins, whose concentrations scale with leukocyte abundance rather than to

Table 3 Assessment of the performance of the model for the discrimination between enterovirus positive and enterovirus negative in cerebrospinal fluid samples in the training and validation sets

Variable	Training data set (n = 76)		Validation data set (n = 38)	
	EV-negative	EV-positive	EV-negative	EV-positive
Predicted result				
Positive	3	29	3	13
Negative	42	2	19	3
Correct classification (%)	93.3	93.5	86.4	81.3
Accuracy (%)	93.4		84.2	
AUC (95%CI)	0.99 (0.98–1.00)		0.81 (0.66–0.97)	
Sensitivity, % (95%CI)	93.5 (79–98)		81.3 (57–93)	
Specificity, % (95%CI)	93.3 (82–98)		86.4 (67–95)	

AUC, area under the curve; CI, confidence interval; EV, enterovirus

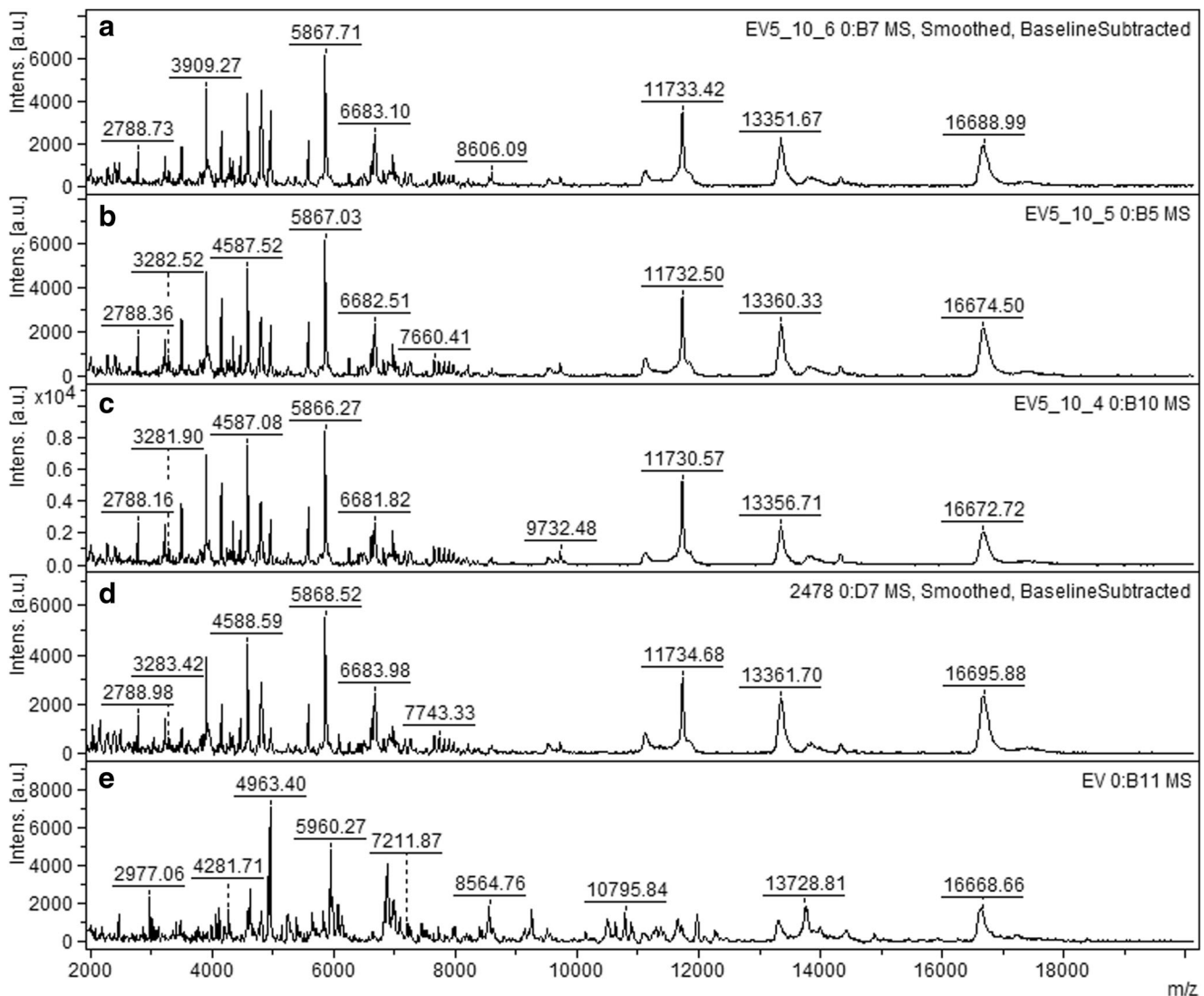


Fig. 3 Representative MALDI-TOF-MS spectra obtained from a CSF specimens spiked with coxsackievirus B3 at 10^6 (A), 10^5 (B), and 10^4 (C) TCID₅₀/mL; unspiked CSF (D) and coxsackievirus B3 preparation containing 10^8 TCID₅₀/mL (E)

EV-specific protein expression signatures. Nevertheless, we believe this possibility to be unlikely since the model was able to correctly call most CSFs from patients with herpesvirus meningitis/encephalitis with comparable (or even higher) cell counts than CSFs from EV-positive patients. Second, due to the small volumes of CSFs available for analyses, no attempt was made to investigate the nature of the proteins represented by the 30 peaks contributing to the model (i.e., by a top-down or bottom-up proteomics approach). Third, a relatively small number of specimens from patients with meningitis/encephalitis caused by viruses other than EVs were included. Fourth, no CSF specimens from patients with “decapitated” bacterial meningitis (partially treated with antibacterial agents), which may produce a biochemical and cellularity profiles similar to that in EV meningitis, were included in the analyses. Fifth, again, genetic characterization of EVs was not done.

In summary, in this proof-of-concept study, we showed that direct profiling of small proteins in CSF samples by MALDI-TOF-MS may allow diagnosis of EV meningitis. Given the potential relevance of our findings in the diagnostic virology field, further prospective studies using fresh rather than cryopreserved CSF specimens and involving homogeneous test and control patient cohorts are warranted to validate this model. Moreover, had the peaks in our predictive model been fully profiled, identification of cellular proteins (if any) contributing to it would have likely helped us to gain deeper insight into the pathogenesis of EV central nervous system infections. In turn, it is entirely possible that this would ultimately translate into significant improvements in the clinical management of these diseases.

Acknowledgments We are grateful to the residents of the Microbiology Service of Hospital Clínico Universitario. Estela Giménez holds a Rio Hortega research contract from the Carlos III Health Institute (ISCIII (CM16/00200)). We thank Ron Geller for providing the coxsackie B3 virus preparation.

Compliance with ethical standards

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

Ethical statement The Ethical Committee of Hospital Clínico Universitario Fundación INCLIVA deemed unnecessary specific approval for this study.

Informed consent Not applicable (as discussed with the institutional medical ethical committee).

References

- Doern CD, Butler-Wu SM (2016) Emerging and future applications of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn* 18(6):789–802
- Angeletti S (2017) Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J Microbiol Methods* 138:20–29
- Erukhimovitch V, Karpasasa M, Huleihel M (2009) Spectroscopic detection and identification of infected cells with herpes viruses. *Biopolymers* 91(1):61–67
- Cobo F (2013) Application of maldi-tof mass spectrometry in clinical virology: a review. *Open Virol J* 7:84
- Calderaro A, Arcangeletti M-C, Rodighiero I, Buttrini M, Gorrini C, Motta F, Germini D, Medici M-C, Chezzi C, De Conto F (2014) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. *Sci Rep* 4:6803
- Majchrzykiewicz-Koehorst JA, Heikens E, Trip H, Hulst AG, de Jong AL, Viveen MC, Sedee NJ, van der Plas J, Coenjaerts FE, Paauw A (2015) Rapid and generic identification of influenza A and other respiratory viruses with mass spectrometry. *J Virol Methods* 213:75–83
- Sjöholm MI, Dillner J, Carlson J (2008) Multiplex detection of human herpesviruses from archival specimens by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 46(2):540–545
- Cricca M, Marasco E, Alessandrini F, Fazio C, Prossomariti A, Savini C, Venturoli S, Chieco P, De Carolis S, Bonafè M (2015) High-throughput genotyping of high-risk human papillomavirus by MALDI-TOF mass spectrometry-based method. *New Microbiol* 38(2):211–223
- Jurinke C, Zöllner B, Feucht H-H, Jacob A, Kirchhübel J, Lüchow A, Van den Boom D, Laufs R, Köster H (1996) Detection of hepatitis B virus DNA in serum samples via nested PCR and MALDI-TOF mass spectrometry. *Genet Anal: Biomol Eng* 13(3):67–71
- Luan J, Yuan J, Li X, Jin S, Yu L, Liao M, Zhang H, Xu C, He Q, Wen B (2009) Multiplex detection of 60 hepatitis B virus variants by maldi-tof mass spectrometry. *Clin Chem* 55(8):1503–1509
- Peng J, Yang F, Xiong Z, Guo J, Du J, Hu Y, Jin Q (2013) Sensitive and rapid detection of viruses associated with hand foot and mouth disease using multiplexed MALDI-TOF analysis. *J Clin Virol* 56(2):170–174
- Zhang C, Xiao Y, Du J, Ren L, Wang J, Peng J, Jin Q (2015) Application of multiplex PCR coupled with matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight analysis for simultaneous detection of 21 common respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 53(8): 2549–2554
- Iliina EN, Malakhova MV, Generozov EV, Nikolaev EN, Govorun VM (2005) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (mass spectrometry) for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol* 43(6):2810–2815
- King A, Adams M, Carstens E, Lefkowitz E (2011) The international code of virus classification and nomenclature. Virus taxonomy—ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses Elsevier/Academic Press, London:1273–1277
- Rudolph H, Schrotten H, Tenenbaum T (2016) Enterovirus infections of the central nervous system in children: an update. *Pediatr Infect Dis J* 35(5):567–569
- Huang H-I, Shih S-R (2015) Neurotropic enterovirus infections in the central nervous system. *Viruses* 7(11):6051–6066
- von Neuhoff N, Oumeraci T, Wolf T, Kollwe K, Bewerunge P, Neumann B, Brors B, Bufler J, Wurster U, Schlegelberger B (2012) Monitoring CSF proteome alterations in amyotrophic lateral sclerosis: obstacles and perspectives in translating a novel marker panel to the clinic. *PLoS One* 7(9):e44401
- Liguori M, Quattieri A, Tortorella C, Drenzo V, Bagala A, Mastrapasqua M, Spadafora P, Trojano M (2014) Proteomic profiling in multiple sclerosis clinical courses reveals potential biomarkers of neurodegeneration. *PLoS One* 9(8):e103984

19. Mather CA, Werth BJ, Sivagnanam S, SenGupta DJ, Butler-Wu SM (2016) Rapid detection of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 54:883–890. <https://doi.org/10.1128/JCM.02428-15>
20. Wessel D, Flügge U (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138(1):141–143
21. López-Fernández H, Santos H, Capelo JL, Fdez-Riverola F, Glez-Peña D, Reboiro-Jato M (2015) Mass-Up: an all-in-one open software application for MALDI-TOF mass spectrometry knowledge discovery. *BMC Bioinformatics* 16(1):318
22. Vila J, Zboromyrska Y, Burillo A, Bouza E (2016) Future applications of mass spectrometry in microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 34:53–58
23. Thao NTT, Ngoc NTK, Tú PV, Thúy TT, Cardoso MJ, McMinn PC, Phuektes P (2010) Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous identification of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16. *J Virol Methods* 170(1–2):134–139
24. Piao J, Jiang J, Xu B, Wang X, Guan Y, Wu W, Liu L, Zhang Y, Huang X, Wang P (2012) Simultaneous detection and identification of enteric viruses by PCR-mass assay. *PLoS One* 7(8):e42251
25. Chan SY, Sam I-C, Lai JK, Chan YF (2015) Cellular proteome alterations in response to enterovirus 71 and coxsackievirus A16 infections in neuronal and intestinal cell lines. *J Proteome* 125:121–130
26. Simonsen AH, Bahl JM, Danborg PB, Lindstrom V, Larsen SO, Grubb A, Heegaard NH, Waldemar G (2013) Pre-analytical factors influencing the stability of cerebrospinal fluid proteins. *J Neurosci Methods* 215(2):234–240