

Dinamización del diagnóstico de bacteriemias mediante el uso de nuevas tecnologías

Tesis doctoral

Mikel Joseba Urrutikoetxea Gutiérrez

Bilbao, 2023

Agradecimientos

El proceso de realización de una Tesis Doctoral puede ser arduo y tedioso, sobre todo cuando este viaje comienza en los inicios de una residencia, en los que el entusiasmo por la primicia que todo un campo de estudio tan amplio como es la microbiología puede llevar a cometer errores y dilatar esta jornada por la falta de experiencia. O cuando una tormenta como la causada por la pandemia de SARS-CoV-2 arrecia y en ocasiones parece que nos fuerce a cambiar el rumbo. No obstante, y con todo ha sido un viaje en el que he aprendido y disfrutado independientemente del resultado y que no hubiera sido posible sin el apoyo de muchas personas.

En primer lugar, a mis directores de Tesis Doctoral, Miren y Ramón. Ramón principal culpable de mi inscripción en el programa de doctorado y Miren que recogió el testigo y que ha sido un pilar tanto administrativa como académicamente.

Este trabajo no hubiera sido posible tampoco sin el trabajo del gran equipo que formamos todos los compañeros del servicio de microbiología clínica del Hospital Universitario Basurto en los que siempre he podido confiar a lo largo de este tormentoso periplo, con incendio, inundaciones, obras y pandemia incluidos. Pero entre todos ellos es imposible no mencionar a Matxalen, claro modelo a seguir, y a Mónica y Juan Carlos, sin los cuales es este trabajo no sería posible. También quiero agradecer a José Luís por su ayuda mejorando la calidad del manuscrito y por apostar por mí y la secuenciación, aunque no haya sido siempre fácil. No me quiero olvidar de Rosi, quien se embarcó al mismo tiempo en esta aventura conmigo y en la que creo que nos hemos ayudado mutuamente.

Parte de esta Tesis también pertenece a mis amigos, en especial a Alex, quien me ha ayudado siempre en todo lo que le he pedido dando soporte (en algunos casos literalmente) en todas los problemas técnicos y personales que me he encontrado durante estos años. Pero también a muchos otros.

Nire senideei ere, daudenei eta utzi gaituztenei, eskertu nahi diet hain beste laguntzeagatik, baina batez ere gurasoei haien hezkuntzagatik hona heldu naizelako. Eta Unai ere biziki eskertu nahi dut, berarekin beti kontatu ahal izan dudalako.

I sobretot a l'Ana, companya d'aventures i desventures dins i fora de la Microbiologia.

Resumen

La sepsis, una disfunción orgánica potencialmente letal causada por una respuesta desregulada frente a una infección, es una de las entidades nosológicas con mayor morbilidad y mortalidad a nivel global. Pese a ser secundaria a una infección solo se identifica el agente causal en el 60 % de los casos y de estos hasta en un 40 % se aíslan en el torrente sanguíneo. Debido a ello, el estudio de la presencia de bacterias en la sangre, la bacteriemia, es una de las principales preocupaciones de la microbiología clínica.

En este proyecto se ha desarrollado una nueva técnica de extracción bacteriana abreviada aprovechando las características líticas de algunos frascos de hemocultivos: el método Ultrarrápido o método UF. Este método ha sido empleado para la utilización de los frascos de hemocultivo positivos directamente en la identificación de los microorganismos causantes de la bacteriemia, para la realización de estudios de sensibilidad y para la realización de secuenciación de genoma completo.

La espectrometría de masas y en especial el MALDI-TOF (del inglés *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight*) ha supuesto una revolución en la identificación de microorganismos en microbiología, en este estudio se ha empleado el método UF para la realización de MALDI-TOF desde hemocultivos positivos con buenos resultados. El método UF ha conseguido mejores resultados que el método empleado previamente en nuestro laboratorio, el método de doble centrifugación, siendo además más económico y rápido.

El método UF también ha tenido un rendimiento no inferior al método establecido previamente, el método del tubo separador de suero, para la realización de estudios de sensibilidad automatizados mediante el sistema Phoenix BD, reduciendo también el coste económico y agilizando el proceso.

La secuenciación bacteriana de genoma completo permite recuperar toda la información genética contenida en una determinada cepa bacteriana. En este caso mediante el método UF se consigue obtener el material genético bacteriano presente en un hemocultivo positivo y secuenciarlo obteniendo un genoma con una calidad y cobertura suficientes para su estudio. Mediante este sistema se consigue recuperar información sobre el secuenciotipo bacteriano, los determinantes de resistencia y virulencia y las estructuras plasmídicas que permiten vehicularlos.

Índice de contenidos

Abreviaturas	iii
Índice de Figuras	vi
Índice de Tablas	vii
1 Introducción	1
1.1 <i>De Sepsis y Bacteriemias</i>	2
1.2 <i>Etiología de la bacteriemia</i>	6
1.2.1 Resistencia antimicrobiana	8
1.3 <i>Hemocultivo</i>	10
1.4 <i>Frascos líticos</i>	11
1.5 <i>Identificación</i>	12
1.5.1 Tinción de Gram	12
1.5.2 Métodos fenotípicos.....	13
1.5.3 Espectrometría de masas	14
1.6 <i>Sensibilidad antimicrobiana</i>	22
1.6.1 Métodos de difusión.....	23
1.6.2 Métodos de dilución.....	25
1.6.3 Sensibilidad antimicrobiana de hemocultivo directo	27
1.7 <i>Secuenciación masiva</i>	29
1.7.1 Secuenciación de primera generación.....	29
1.7.2 Secuenciación de segunda generación.....	31
1.7.3 Secuenciación de tercera generación.....	35
1.7.4 Secuenciación masiva en Bacteriemias	39
2 Hipótesis y objetivos	41
2.1 <i>Hipótesis de trabajo</i>	42
2.1.1 Hipótesis principal	42
2.1.2 Hipótesis secundarias	42
2.2 <i>Objetivos del estudio</i>	43
2.2.1 Objetivo principal	43
2.2.2 Objetivos secundarios	43
3 Material y Métodos	44
3.1 <i>Evaluación del rendimiento del método UF para la identificación mediante MALDI-TOF</i>	45
3.1.1 Selección de las muestras.....	45
3.1.2 Identificación desde colonia	45
3.1.3 Método de centrifugación diferencial	46
3.1.4 Método Ultrarrápido	46
3.1.5 Análisis estadístico.....	48
3.2 <i>Evaluación del método UF para la realización de estudios de sensibilidad antimicrobiana</i>	48
3.2.1 Selección de muestras	48
3.2.2 Método estándar.....	48
3.2.3 Método del tubo separador de suero	48

3.2.4	Método Ultrarrápido	49
3.2.5	Interpretación de los resultados y análisis estadístico	51
3.3	<i>Evaluación del método UF para la preparación de librerías de secuenciación masiva</i>	51
3.3.1	Selección de muestras y preparación de los hemocultivos	51
3.3.2	Extracción de ADN	52
3.3.3	Preparación de librería, cebado de la <i>flowcell</i> y secuenciación	53
3.3.4	Análisis bioinformático	53
3.3.5	Valoración por el comité ético de investigación	57
4	Resultados	59
4.1	<i>Evaluación del rendimiento del método UF para la identificación mediante MALDI-TOF</i>	60
4.1.1	Concordancia general	61
4.1.2	Bacterias Gram negativas	61
4.1.3	Bacterias Gram positivas	61
4.1.4	Bacterias anaerobias	62
4.2	<i>Evaluación del método UF para la realización de estudios de sensibilidad antimicrobiana</i>	64
4.2.1	Identificación	64
4.2.2	Resistencia antimicrobiana	65
4.3	<i>Evaluación del método UF para la preparación de librerías de secuenciación masiva</i>	67
4.3.1	Concentración y calidad del ADN extraído	67
4.3.2	Número de lecturas y profundidad de secuenciación	69
4.3.3	Análisis de secuencias crudas (<i>raw sequences</i>)	69
4.3.4	Análisis de genomas ensamblados	71
5	Discusión	82
5.1	<i>Evaluación del rendimiento del método UF para la identificación mediante MALDI-TOF</i>	83
5.2	<i>Evaluación del método UF para la realización de estudios de sensibilidad antimicrobiana</i>	85
5.3	<i>Evaluación del método UF para la preparación de librerías de secuenciación masiva</i>	87
6	Conclusiones	95
7	Bibliografía	97
Anexo	119
<i>Anexo 1</i>	<i>120</i>

Abreviaturas

16S rARN: subunidad 16S del ácido ribonucleico ribosomal

ACCP: *American College of Chest Physicians*

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ATP: adenina trifosfato

ATU: *Area of Technical Uncertainty*

BLEE: betalactamasa de espectro extendido

CARD: *Comprehensive Antibiotic Resistant Database*

CC: complejo clonal

CGE: *Center for Genomic Epidemiology*

CHCA: 2.5-dihidroxi benzoico

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMI: concentración mínima inhibitoria

CMY: cefaciminasa

CTX-M: cefotaximasa

DC: método de centrifugación diferencial

ddNTP: didesoxinucleótido

DHA: betalactamasa de Dharan

dNTP: desoxinucleótido

ds: desviación estándar

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EPINE: Estudio de prevalencia de las infecciones nosocomiales en España

EUCAST: *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

GC: Guanina-Citosina

H⁺: Protón

HAC: *High Accuracy Basecalling*

HCCA: ácido α-ciano-4-hidroxicinámico

HSM: Hospital Santa Marina

HUB: Hospital Universitario Basurto

INR: *International Normalized Ratio*

IRAS: Infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria

ITU: Infección del tracto urinario

KPC: carbapenamasa de *Klebsiella pneumoniae*

lpm: latidos por minuto

MALDI-TOF: *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight*

ME: *major error*

mE: *minor error*

MGA: *Microdroplet Growth Assay*

MLST: *multilocus sequence typing*

MS: *mass spectrometry*

NDM: carbapenemasa Nueva Dehli

NGS: *next neneration sequencing*

ompK: *outer membrane protein Klebsiella*

ONT: *Oxford Nanopore Technologies*

OXA: Oxacilinas

PBP: *penicillin binding protein*

PCR: *polimerase chain reaction*

PPi: pirofosfato

qSOFA: *quick Sequential Sepsis-related Organ Failure Assesment Score*

RAST: *Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing*

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

SCCM: *Society of Critical Care Medicine*

SEIMC: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

SHV: betalactamasa sulfhidrilo variable

SOFA: *Sequential Sepsis-related Organ Failure Assesment Score*

SOLiD: *Sequencing by Oligo Ligation and Detection*

SRIS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

SST: *Serum Separator Tube*

ST: secuenciotipo

TEM: betalactamasa Temoneira

TOF: *Time Of Flight*

UF: método de extracción ultrarrápido

UFC: unidades formadoras de colonias

VFDB: *The Virulence Factor Database*

VIM: *Verona integron-encoded metallobetacalactamase*

VME: *very major error*

WGS: *Whole genome Sequencing*

WIMP: *“What’s in my pot?”*

ZMW: *Zero-mode-waveguide*

Índice de Figuras

Figura 1: Algoritmo diagnóstico de Sepsis (Sepsis-3).....	5
Figura 2:Esquema técnico del funcionamiento del MALDI-TOF.	17
Figura 3: Representación gráfica de los tiempos necesarios hasta la identificación definitiva en los diversos métodos presentados.....	20
Figura 4: Representación gráfica de las técnicas de determinación de la sensibilidad antimicrobiana más conocidos.	23
Figura 5: Representación gráfica de la base enzimática de la Pirosecuenciación.	32
Figura 6: Representación esquemática del proceso de secuenciación mediante la tecnología de Illumina.....	35
Figura 7: Principio de acción de la tecnología de secuenciación PacBIO.....	36
Figura 8: Funcionamiento de la Tecnología de Oxford Nanopore.	38
Figura 9: Representación esquemática de los tres métodos de identificación empleados.....	47
Figura 10: Diagrama de los tres flujos de trabajo	50

Índice de Tablas

Tabla 1: Criterios diagnósticos de sepsis (Sepsis-2)	3
Tabla 2: SOFA (Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Score)	4
Tabla 3: Porcentaje de sensibilidad de aislados de hemocultivos del Hospital Universitario de Basurto (HUB).....	8
Tabla 4: Porcentaje de sensibilidad de aislados de hemocultivos del Hospital Santa Marina (HSM).....	8
Tabla 5: Categorías de fiabilidad de la identificación para el sistema Bruker Biotyper	18
Tabla 6: Identificación definitiva de los 157 aislados analizados en este estudio	60
Tabla 7: Score medios y tasas de concordancia entre los métodos ultrarrápido (UF) y de centrifugación diferencial (DC) con el método de referencias.	63
Tabla 8: Identificación de los diferentes aislados incluidos en el estudio, así como el número de errores incluidos en las diferentes especies bacterianas.....	65
Tabla 9: Tasas de concordancia entre los métodos ultrarrápido (UF) y el tubo separador de suero (SST).....	66
Tabla 10: Resumen de datos de calidad de extracción y de secuenciación de las muestras analizadas.	68
Tabla 11: Asignación taxonómica de lecturas obtenidas mediante secuenciación por el programa WIMP comparada con la identificación mediante MALDI-TOF.....	70
Tabla 12: Comparación de los genes de betalactamasas encontrados en las diferentes bases de datos, con secuencias crudas o ya ensambladas	73
Tabla 13: Evaluación del tiempo necesario para la identificación de ST y genes de resistencia con respecto al resultado definitivo.....	74
Tabla 14: Comparación entre Fenotipo y Genotipo de resistencia antimicrobiana	76
Tabla 15: Tamaño de contigs, estructuras plasmídicas y determinantes de resistencia	78
Tabla 16: Determinantes de virulencia según las bases de datos Kleborate y VFDB.....	81

1 Introducción

1.1 De Sepsis y Bacteriemias

La propia definición de la sepsis ha ido evolucionando con el mayor conocimiento y experiencia adquiridos en el tratamiento y manejo de este síndrome y con numerosos estudios en el ámbito de los cuidados intensivos, bioquímica, inmunología y, por supuesto, también microbiología (1). Debido a la importancia clínica de esta entidad nosológica, y a la ausencia de definiciones consensuadas de la misma, en 1991 el *American College of Chest Physicians* (ACCP) y la *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) desarrollaron las definiciones del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), la sepsis, la sepsis grave, el *shock* séptico y el síndrome de disfunción multiorgánica en el documento Sepsis 1 (2). Además, en el consenso se determinaron cuatro criterios definitorios de SRIS: [1] temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$ o menor de 36°C , [2] taquicardia (> 90 latidos por minuto (lpm)), [3] taquipnea (> 20 respiraciones por minuto) o una $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg y [4] leucocitosis (> 12.000 leucocitos/ mm^3), leucopenia (< 4.000 leucocitos/ mm^3) o desviación izquierda (recuento de neutrófilos inmaduros en sangre periférica $\geq 10\%$). Según Sepsis 1, se trata de un SRIS ante la presencia de 2 o más de los criterios anteriores. Si además este SRIS se origina en respuesta a una infección sería una sepsis y, en caso de asociarse a datos de disfunción orgánica, hipoperfusión (con presencia de acidosis láctica, oliguria o alteración aguda del estado mental) o hipotensión se definiría como sepsis grave. El *shock* séptico queda definido como la hipotensión (presión arterial sistólica < 90 mmHg o una reducción ≥ 40 mmHg de la tensión arterial basal en ausencia de otras causas de hipotensión) secundaria a un cuadro séptico, refractaria a medidas de reanimación con líquidos adecuadas y con presencia de datos de hipoperfusión.

Estas definiciones supusieron un enorme avance en la estandarización de la descripción de los pacientes sépticos y han sido empleadas en numerosas ocasiones en la elaboración de guías terapéuticas y en el diseño de estudios. Son criterios muy sensibles, pero no tan específicos y es que cualquier paciente que presentase una infección y desarrollase por otra causa 2 criterios SRIS sería considerado como séptico, aunque no compartiera demasiadas características clínicas ni pronósticas con pacientes verdaderamente sépticos según definiciones más actualizadas.

Debido a estos posibles problemas, en 2001 se formó un nuevo comité de expertos que, sin variar las definiciones básicas desarrolladas en Sepsis 1, introdujo nuevos parámetros tanto clínicos como analíticos con la intención de reflejar con mayor fidelidad el diagnóstico dinámico del cuadro clínico a pie de cama en vez de funcionar como criterios de inclusión en ensayos clínicos (3). En este nuevo consenso el concepto de sepsis continúa siendo un cuadro clínico caracterizado por una respuesta inflamatoria sistémica secundaria a una infección, pero los 4 criterios SRIS de Sepsis-1 se amplían y se intentan adaptar también a la población pediátrica, tal

y como se indica en la Tabla 1 (Sepsis-2). Las definiciones de sepsis grave y *shock* séptico se mantienen.

Tabla 1: Criterios diagnósticos de sepsis (Sepsis-2)

La sepsis se define como la presencia de varios de estos parámetros en el contexto de una infección documentada o sospechada.	
Parámetros generales	<ul style="list-style-type: none"> • Fiebre (temperatura central > 38,3 °C) • Hipotermia (temperatura central < 36 °C) • Taquicardia (>90 lpm o > 2 desviaciones estándar por encima del valor normal para la edad) • Taquipnea (> 30 respiraciones por minuto) • Alteración del estado mental • Edemas importantes o balance hídrico positivo (> 20 ml/kg durante 24h) • Hiperglucemia (glucosa plasmática > 110 mg/dl) en ausencia de diabetes
Parámetros inflamatorios	<ul style="list-style-type: none"> • Leucocitosis (> 12.000 leucocitos/mm³) • Leucopenia (< 4.000 leucocitos/mm³) • Desviación izquierda (> 10 % de leucocitos inmaduros) • Proteína C reactiva elevada (> 2 desviaciones estándar por encima del valor normal) • Procalcitonina elevada (> 2 desviaciones estándar por encima del valor normal)
Parámetros hemodinámicos	<ul style="list-style-type: none"> • Hipotensión arterial (presión arterial sistólica <90 mmHg, presión arterial sistólica 2 desviaciones estándar por debajo de la normal para la edad, presión arterial media < 70 mmHg o una reducción de la presión arterial sistólica > 40 mmHg en adultos) • Saturación de oxígeno en sangre venosa mixta > 70 % (no útil en población pediátrica) • Índice cardiaco > 3,5 l/minuto/m²
Parámetros de disfunción orgánica	<ul style="list-style-type: none"> • Hipoxemia arterial (PaO₂/FIO₂ <30) • Oliguria aguda (< 0,5 ml/kg/h durante 2 horas) • Aumento de la creatinina ≥ 0,5 mg/dl • Anormalidades de la coagulación (INR (international normalized ratio) >1.5 o tiempo de coagulación de la tromboplastina parcial activada >60 s) • Íleo • Trombocitopenia (plaquetas < 100000/μl) • Hiperbilirrubinemia (Bilirrubina plasmática > 4 mg/dl)
Parámetros de hipoperfusión tisular	<ul style="list-style-type: none"> • Hiperlactatemia (> 3 mmol/l) • Disminución del relleno capilar o aparición de livideces

En la actualidad, según su definición más reciente publicada en 2016 en el tercer consenso internacional para la definición de la sepsis y del shock séptico (Sepsis-3), la sepsis es una disfunción orgánica potencialmente letal causada por una respuesta desregulada frente a una infección (3). Esta nueva definición se diferencia de los anteriores consensos en el concepto mismo de sepsis, que tanto en Sepsis-1 como Sepsis-2 estaba íntimamente relacionado con un

estado marcadamente proinflamatorio, y se desliga de los criterios SRIS como definitorios de sepsis. Como alternativa a estos criterios se implementan nuevas escalas que permiten estimar la disfunción orgánica. La escala SOFA (del inglés *Sequential Sepsis-related Organ Failure Assesment Score*) combina parámetros clínicos y analíticos (4), como se indica en la Tabla 2, y un aumento de 2 o más puntos en la misma como consecuencia de una infección permite identificar la disfunción orgánica secundaria a un cuadro séptico.

Tabla 2: SOFA (*Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Score*)

	Score				
Sistema	0	1	2	3	4
RESPIRATORIO					
PaO ₂ (mmHg)/FiO ₂ (mmHg)	≥ 400	< 400	< 300	< 200 (con soporte ventilatorio)	< 100 (con soporte ventilatorio)
COAGULACIÓN					
Plaquetas en 10 ³ /μl	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
HEPÁTICO					
Bilirrubina mg/dl	< 1,2	1,2-1,9	2-5,9	6-11,9	> 12
CARDIOVASCULAR					
Presión arterial media (PAM) o necesidad de drogas vasoactivas	PAM ≥ 70 mmHg	PAM < 70 mmHg	Dopamina < 5 μg/kg/min o dobutamina a cualquier dosis	Dopamina a 5,1-15 μg/kg/min o epinefrina o norepinefrina a ≤ 0,1 μg/kg/min	Dopamina a > 15 μg/kg/min o epinefrina o norepinefrina a > 0,1 μg/kg/min
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL					
Puntuación de la <i>Glasgow Coma Scale</i>	15	13-14	10-12	6-9	< 6
RENAL					
Creatinina sérica mg/dl	< 1,2	1,2-1,9	2-3,4	3,5-4,9	>5
Gasto urinario ml/d				< 500	< 200

Por el contrario, la escala qSOFA (del inglés *quick Sequential Sepsis-related Organ Failure Assesment Score*), mediante el uso de tres sencillos parámetros clínicos ([1] estado mental alterado, definido como un puntuación inferior a 15 en la *Glasgow Coma Score*, [2] taquipnea, definida como una frecuencia respiratoria mayor o igual que 22 respiraciones por minuto e [3] hipotensión, definida como una tensión arterial sistólica inferior o igual a 100

mmHg) es una herramienta muy sensible para reconocer a pie de cama la necesidad de intensificar las medidas aplicadas a un paciente en el contexto del manejo de una sepsis potencial (3). La presencia de al menos dos de los criterios permite identificar a pacientes con un elevado riesgo de necesidad de estancias prolongadas en unidades de cuidados intensivos o muerte, aunque puntuaciones inferiores no descartan la posibilidad de complicaciones y en este consenso se insta a realizar reevaluaciones repetidas del estado del paciente.

Como consecuencia de esta nueva definición desaparece el concepto previo de sepsis grave y el *shock* séptico se detalla como un subtipo de sepsis en el que las alteraciones circulatorias, metabólicas y celulares son lo suficientemente graves como para aumentar la mortalidad de forma considerable. Los pacientes con *shock* séptico pueden identificarse, en el contexto de un cuadro séptico, por la aparición de hipertensión persistente que requiere vasopresores para mantener una presión arterial media superior a 65 mmHg y un lactato sérico superior a 22 mmol/l pese a medidas adecuadas de resucitación hídrica y puede suponer un exceso de mortalidad hospitalaria de hasta el 40 % (3). Como algoritmo diagnóstico de la sepsis, en el consenso se propone en que se indica en la Figura 1 (3).

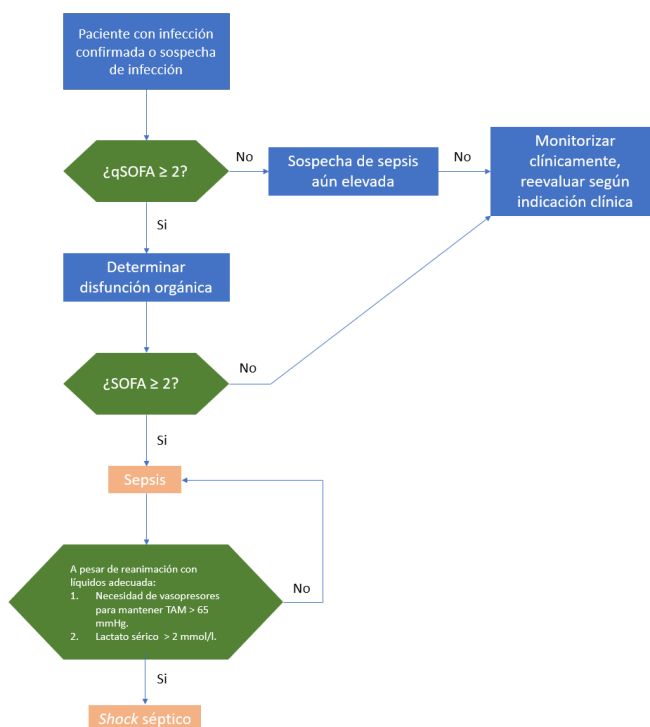


Figura 1: Algoritmo diagnóstico de Sepsis (Sepsis-3).

Pese al consenso existente en la importancia de la sepsis y de su impacto en la morbi-mortalidad de los pacientes, aun hoy es difícil estimar la carga real a nivel global de este

síndrome (5), pues la amplia mayoría de los estudios sobre su impacto están centrados en los países de rentas altas y existe una falta de información importante de los países de rentas medias y bajas. No obstante, se estima que en 2017 a nivel global se produjeron unos 50 millones de casos de sepsis (anteriormente conocidos como sepsis grave) que ocasionaron unos 11 millones de muertes (6). En el estado español la incidencia de sepsis en 2017 fue de 5,7 casos por cada 10000 habitantes con una mortalidad en torno al 31 % (7). Pese a que la sepsis está definida como una respuesta desregulada del organismo frente a una infección, el agente causal se identifica solamente en un 60 % de los casos, y de ellos, hasta en un 40 % de los pacientes ese microorganismo se aísla en la sangre (8).

El aislamiento de bacterias en muestras sanguíneas mediante el hemocultivo permite realizar el diagnóstico microbiológico de una bacteriemia (9). Del mismo modo, cuando el microorganismo aislado se trata de un hongo, típicamente del género *Candida* spp., se habla de fungemia o candidemia (10). La bacteriemia se puede producir no solo por la inoculación directa de bacterias al torrente sanguíneo, como puede ser el caso de las bacteriemias secundarias a catéter (11), sino por la traslocación de microorganismos desde otros focos infecciosos a la sangre, cuando éstos no son bien controlados. Este fenómeno es especialmente frecuente en las infecciones de tracto urinario complicadas que son la causa más frecuente de bacteriemias en los países desarrollados (12).

Pese a que en ocasiones se puedan dar bacteriemias secundarias, por ejemplo a infecciones periodontales o incluso al cepillado de dientes (13) que cursen de forma indolente y sean autolimitadas (14,15), la bacteriemia y la fungemia generalmente tienen una importante relevancia clínica por lo que centran muchos de los esfuerzos y recursos de los servicios de microbiología clínica en el mundo (9). Es más, los pacientes con bacteriemia presentan en algunos estudios una mortalidad a 30 días de hasta un 22 % (16), teniendo además una mayor mortalidad cuanto más se tarde en instaurar un tratamiento antimicrobiano adecuado (17,18). Precisamente, por el notable impacto en la salud de los pacientes de una correcta identificación del microorganismo causal y de la determinación de su sensibilidad antimicrobiana, se han desarrollado numerosas técnicas que buscan dinamizar el diagnóstico de las bacteriemias y los laboratorios de microbiología clínica centran sus esfuerzos en asegurar una asistencia de calidad de forma continuada y reducir el tiempo de emisión de informes microbiológicos (19).

1.2 Etiología de la bacteriemia

Los agentes nosológicos que con más frecuencia causan bacteriemias varían entre los diferentes estudios dependiendo tanto de las características epidemiológicas de la población

analizada como de las condiciones higiénico-sanitarias (20). Así, en la actualidad en países de rentas medias y bajas, como Malawi, los microorganismos más frecuentemente implicados en las bacteriemias son *Streptococcus pneumoniae* (en torno al 15 % de los aislados) y *Salmonella enterica* serovar Typhi (hasta el 40 % de los aislados en algunos trienios) (21), tendiendo un fuerte paralelismo con la situación etiológica de las bacteriemias en los países de rentas altas durante la primera mitad del siglo XX (22). En este caso, se tratan en su mayor parte de microorganismos con una elevada capacidad patogénica, que son adquiridos sin relación con la asistencia sanitaria en pacientes previamente sanos. Por el contrario, en la actualidad en los países de rentas altas los microorganismos más frecuentes son *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (23,24) y están asociados a pacientes más ancianos y frágiles; por lo que en estos países las bacteriemias secundarias a infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria (IRAS) son cada vez más frecuentes (25).

Entre los focos de origen de las bacteriemias comunitarias destacan el foco urinario y el foco abdominal, que en el Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España (EPINE) de 2021 representan más de la mitad de los casos (26). El foco urinario es de especial importancia, que a pesar de que tan solo alrededor del 3-4 % de los pacientes con infección del tracto urinario (ITU) desarrollan una bacteriemia secundaria (27), supone un gran número de casos dada la gran prevalencia de la ITU. Se estima que hasta un 60 % de las mujeres desarrollarán al menos un episodio de ITU durante su vida adulta (28). Por el contrario, las bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria están en su mayoría asociadas a catéteres y dispositivos médicos (26).

No obstante, algo preocupante a tener en cuenta es que, tanto en los países de rentas medias y bajas como en los de rentas elevadas, se está observando un aumento muy importante en la resistencia antimicrobiana (20). Este fenómeno, evidentemente, no es exclusivo de las bacteriemias, sino que se trata de un fenómeno global. Sin embargo, las infecciones del sistema circulatorio son de especial gravedad y, por tanto, la falta de tratamientos antimicrobianos efectivos para tratar estas infecciones alcanza una nueva dimensión (17,29).

De acuerdo con los datos del informe de sensibilidad de 2021, la epidemiología local en el Hospital Universitario Basurto (HUB) y en el Hospital Santa Marina (HSM), escenario en el que se ha llevado a cabo el estudio de la presente tesis doctoral, es muy similar a los otros hospitales del mismo entorno y los microorganismos más frecuentes son también *E. coli* y *S. aureus* (30). Por las características de los pacientes atendidos en ambos hospitales, destaca también una mayor proporción de aislamientos resistentes en el HSM que en el HUB, representando en 2021

S. aureus resistente a meticilina (SARM) un 53 % de los aislamientos de *S. aureus* en muestras sanguíneas en el HSM frente a un 24,2 % en el HUB. De igual manera, el 36,7 % de las bacteriemias causadas por *E. coli* en el HSM fueron debidas a productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), siendo éstas por el contrario el 9,8 % en el HUB, tal y como se aprecia en las tablas 3 y 4.

Tabla 3: Porcentaje de sensibilidad de aislados de hemocultivos del Hospital Universitario de Basurto (HUB).

BACILOS GRAM NEGATIVOS	n	BLEE	AMP	AMC	PTZ	CTX	ERT	MER	GN	CIP	SXT
<i>Escherichia coli</i>	280	9,3	51,7	68,9	97,3	91,9	100	100	93	79,7	74,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	48	14,5		69,4	81,6	83,7	93,9	97,9	85,7	76	81,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29	-			100	93,3 ₁		100	100 ₂	86,7	
COCOS GRAM POSITIVOS	n	PEN	CLO	CD	LNZ	DAP	VAN	TEI	GN	LEV	SXT
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	58	0	46,6	60,3	88,3	100	100	93,2	60,3	56,9	74,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	58	0	75,8	79,3	100	100	100	100	91,3	78,9	100
<i>S. aureus</i> meticilin sensible	44	0	100	75	100	100	100	100	93,1	97,7	100
<i>S. aureus</i> meticilin resistente	14	0	0	92,8	100	100	100	100	85,7	21,4	100
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	25	100	100 ₃	91,3	100	-	100	100	-	100	98

Leyenda: AMC (Amoxicilina-clavulánico), AMP (Ampicilina), BLEE (Betalactamasa de espectro extendido), CD (Clindamicina), CIP (Ciprofloxacino), CLO (Cloxacilina), CTX (Cefotaxima), DAP (Daptomicina), ERT (Ertapenem), GN (Gentamicina), LEV (Levofloxacino), LNZ (Linezolid), MER (Meropenem), PEN (Penicilina), PTZ (Piperacilina-tazobactam), SXT (Cotrimoxazol), TEI (Teicoplanina) y VAN (Vancomicina). ₁Dato de Ceftazidima. ₂Dato de Amikacina. ₃Dato de Cefotaxima.

Tabla 4: Porcentaje de sensibilidad de aislados de hemocultivos del Hospital Santa Marina (HSM).

BACILOS GRAM NEGATIVOS	n	BLEE	AMP	AMC	PTZ	CTX	ERT	MER	GN	CIP	SXT
<i>Escherichia coli</i>	41	36,6	26,8	48,8	85,3	64,8	97,6	100	87,8	51,2	69,3
COCOS GRAM POSITIVOS	n	PEN	CLO	CD	LNZ	DAP	VAN	TEI	GN	LEV	SXT
<i>Staphylococcus aureus</i>	19	0	47,3	73,6	100	100	100	100	78,9	57,8	100
<i>S. aureus</i> meticilin sensible	9	0	100	77,7	100	100	100	100	100	100	100
<i>S. aureus</i> meticilin resistente	10	0	0	70	100	100	100	100	60	20	100

Leyenda: AMC (Amoxicilina-clavulánico), AMP (Ampicilina), BLEE (Betalactamasa de espectro extendido), CD (Clindamicina), CIP (Ciprofloxacino), CLO (Cloxacilina), CTX (Cefotaxima), DAP (Daptomicina), ERT (Ertapenem), GN (Gentamicina), LEV (Levofloxacino), LNZ (Linezolid), MER (Meropenem), PEN (Penicilina), PTZ (Piperacilina-tazobactam), SXT (Cotrimoxazol), TEI (Teicoplanina) y VAN (Vancomicina).

1.2.1 Resistencia antimicrobiana

Muchos compuestos antimicrobianos disponibles en la actualidad, incluyendo la penicilina, tienen un origen natural, es más, tanto el desarrollo de sustancias antimicrobianas

como el desarrollo de resistencias a estos compuestos forman parte del proceso adaptativo natural de los microorganismos y este fenómeno ha sido descrito incluso en bacterias aisladas a partir de hielo de más de 12000 años de antigüedad (31). No obstante, a raíz del descubrimiento y explotación de muchos de estos compuestos por el ser humano, se observa un aumento notable en las tasas de resistencia antimicrobiana (32).

Los antibióticos de la familia de los betalactámicos son unos de los más extensamente utilizados en la práctica clínica habitual y la resistencia antimicrobiana a los betalactámicos es, por lo tanto, una de las más extensamente estudiadas (33). Este fenómeno se produce por diversos mecanismos incluyendo la síntesis de biopelículas, la pérdida de porinas, la sobreexpresión de bombas de expulsión o mutaciones en la diana (las *Penicillin binding proteins* o PBP), pero el principal mecanismo de resistencia a betalactámicos, incluidos los de amplio espectro, es la producción de betalactamasas, enzimas que hidrolizan estos antimicrobianos (34).

Muchas de estas enzimas tienen un espectro relativamente restringido y están codificadas en el cromosoma bacteriano como *bla_z* en *S. aureus* (35) o la betalactamasa sulfhidrilo variable SHV-1 producida por *K. pneumoniae* (36), pero variantes de la misma familia SHV pueden ser movilizadas mediante plásmidos y afectar a cefalosporinas de tercera generación. Es más, entre las principales BLEE descritas en enterobacterias, las SHV son uno de los tres principales grupos, junto a las TEM y las CTX-M (37). Otras enzimas que confieren resistencia a cefalosporinas de tercera generación son las cefalosporinasas de tipo AmpC que pueden ser tanto constitutivas en algunas especies de enterobacterias, como codificadas en genes plasmídicos como *bla_{CMY}*, *bla_{DHA}*, *bla_{FOX}* y *bla_{MOX}* (38).

Algunas betalactamasas son capaces también de hidrolizar carbapenems y son conocidas como carbapenemasas, las más importantes en el medio en el que se desarrolla el presente estudio son las pertenecientes a la familia OXA-48 , aunque otras carbapenemasas como las codificadas por los genes *bla_{KPC}* , *bla_{NDM}* o *bla_{VIM}* son cada vez más frecuentes (39,40).

La resistencia a las quinolonas ha sido también ampliamente estudiada y se han descrito alteraciones en las dianas tanto en la DNA-Girasa, codificada por los genes *gyrA* y *gyrB*, como en la Topoisomerasa IV codificada por *parC* y *parE* (41,42) relacionadas con la disminución de la sensibilidad a las quinolonas. También se han descubierto moléculas de la familia de los pentapéptidos que bloquean la unión de las quinolonas a sus dianas terapéuticas y son codificadas en elementos móviles por los genes *qnr* (43).

Por otro lado, también se han descrito mecanismos de resistencia que afectan no solo a una familia específica de antibióticos, si no que confieren resistencia a un gran número de sustancias y contribuyen a la disminución global de la sensibilidad en muchos aislados clínicos. Especialmente preocupantes son las alteraciones que pueden ser transmitidas mediante elementos móviles como es el caso de la porina OqxAB, codificada por los genes *oqxA* y *oqxB*, y confiere resistencia a varias familias antimicrobianas, detergentes y desinfectantes (44) o la variante de la acetilasa codificada por el gen *aac(6')-Ib-cr* que confiere resistencia simultánea a aminoglucósidos y quinolonas (45).

1.3 Hemocultivo

Desde los albores de la microbiología moderna se reconoce la utilidad del hemocultivo en relación al diagnóstico etiológico de la bacteriemia y la sepsis (46). La técnica actual es fruto de la optimización constante producida desde el cultivo directo en medios sólidos (47), pasando por la utilización de medios líquidos (48) y la detección de crecimiento mediante sistemas radiométricos (49) a los sistemas modernos con monitorización fluorimétrica constante de los niveles de CO₂ (50).

No obstante, es imprescindible recordar que el correcto procesamiento de los hemocultivos comienza mucho antes de su llegada al laboratorio de microbiología clínica y que una técnica correcta de extracción es indispensable para poder obtener resultados útiles y reducir las contaminaciones por microorganismos cutáneos, que tienen un impacto negativo en la salud de los pacientes (51,52). Por lo tanto, tal y como recomienda en la actualidad la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) (9), es de vital importancia que el profesional encargado de la toma del hemocultivo tenga formación actualizada sobre el momento y el lugar de extracción, la cantidad de sangre que hay que obtener, la atmósfera de los frascos de cultivo (aerobia y anaerobia), el número de extracciones y las condiciones de asepsia que hay que seguir. De hecho, varios estudios evidencian la utilidad de la formación continua específica en la técnica de extracción de hemocultivos para reducir la tasa de falsas bacteriemias, incluso sobre plantillas con amplia experiencia laboral (53–55).

Para diagnosticar una infección aguda, se debe extraer la sangre en el cenit de la concentración de bacterias viables en sangre, que generalmente precede a la aparición de la fiebre y se suele acompañar de escalofríos (56) y, siempre que la situación clínica lo permita, antes de la administración de tratamiento antibiótico. Las muestras deben ser obtenidas mediante venopunción y no a partir de dispositivos intravasculares, salvo cuando se intente

diagnosticar bacteriemias secundarias a dichos dispositivos y siempre que se acompañen también de hemocultivos periféricos obtenidos mediante venopunción (57).

El primer paso de la toma de hemocultivos debe ser la desinfección exhaustiva tanto de la piel del paciente como del tapón de los frascos de hemocultivo, preferiblemente con clorhexidina alcohólica al 2 % (58), esperando el tiempo adecuado para que el antiséptico desarrolle su efecto (unos 30 segundos en el caso de la clorhexidina). Además, es recomendable utilizar guantes estériles y mascarillas desechables durante la toma de la muestra, así como no manipular la aguja con gasas, algodón u otros materiales no estériles que puedan contaminarla.

Otro paso crítico en la extracción de hemocultivos es el volumen de sangre extraído. Por un lado, la sensibilidad de un hemocultivo aumenta cuanto mayor volumen se analice (59,60), pero por otro lado, no conviene inocular demasiado volumen de sangre en los frascos de hemocultivos para asegurar la acción de los medios incluidos en ellos. Por norma general se recomienda, siempre que la situación clínica lo permita, recoger en pacientes adultos 20 ml de sangre por venopunción e inocular 10 ml en los frascos aerobios y 10 ml en los anaerobios en al menos dos tomas separadas entre 10 y 30 minutos (9). En caso de no poder llevarse a cabo, por ejemplo, por tener que instaurar una terapia antimicrobiana de forma urgente, es recomendable realizar la extracción simultáneamente, pero de dos extremidades diferentes. Debido a su importancia, la medición del volumen de llenado de los hemocultivos está implantado en muchos de los distintos sistemas comerciales automatizados (61,62) y estos sistemas permiten implementar programas de formación continuada específica a los profesionales implicados que tienen un impacto positivo en el diagnóstico de las bacteriemias (63).

No retrasar la introducción de los frascos de hemocultivos en los sistemas de incubación automatizados es igualmente importante, ya que la demora en el procesamiento de estas muestras tiene consecuencias clínicas que pueden llegar a ser graves (64) y, es de nuevo, una razón de peso para justificar la atención continuada de los laboratorios de microbiología clínica (19).

1.4 Frascos líticos

Además del empleo de medios líquidos y de herramientas de monitorización del crecimiento en los sistemas de hemocultivos modernos, otra mejora sustancial en el diagnóstico de las bacteriemias la representa la evolución de los propios medios de cultivo utilizados. Durante los años 80 quedó probada la utilidad de la adición de resinas aniónicas a los medios.

Estas resinas neutralizaban los efectos de sustancias bactericidas que podían estar presentes en la sangre de los pacientes y mejoraban el rendimiento de los hemocultivos (65). Posteriormente, se observó que la adición de saponina a los medios aumentaba la recuperación de los microorganismos implicados debido, probablemente, a la liberación de factores de crecimiento y microorganismos intracelulares que se produce con la lisis de los eritrocitos (50). Esto produjo el consecuente desarrollo de medios de cultivo suplementados con saponina, como el Bactec Lytic/10 Anaerobic/F (Becton Dickinson, USA), que mejoraban no solo la recuperación de microorganismos con respecto a los medios anteriores sino también presentaban un tiempo medio de positivización inferior (66,67).

En la actualidad, la estrategia empleada en muchos centros, incluido el del presente estudio, es la combinación de frascos aerobios suplementados con resinas, como el BACTEC Plus Aerobic/F (Becton Dickinson, USA), y anaerobios suplementados con saponina como el mencionado previamente. Esta estrategia parece tener la mayor sensibilidad y el menor tiempo de positivización, sin suponer ningún compromiso aparente (68). Además, las características líticas de estos frascos permiten acortar los protocolos de extracción necesarios para realizar identificación directas desde hemocultivos positivos mediante espectrometría de masas (69,70).

1.5 Identificación

1.5.1 Tinción de Gram

Un aspecto fundamental para el óptimo manejo de los pacientes bacteriémicos es obtener información precoz y fiable sobre la efectividad del tratamiento antimicrobiano empírico que se ha establecido. En muchas ocasiones, la primera información al respecto es la propia identificación del microorganismo causante de la bacteriemia. En ese sentido, una prueba rápida muy extendida, por su sencillez y utilidad, es la realización de la tinción de Gram sobre el hemocultivo positivo. Esta técnica clásica en microbiología, descrita por primera vez en 1884 (71), permite la clasificación de las bacterias en dos grandes grupos dependiendo de las características de su membrana. Hoy en día, la técnica más extendida es una variación posterior de Burke en 1922 (72) que consiste en extender la muestra en un portaobjetos y fijarla mediante calor. A continuación, se añade un colorante azul-violeta (cristal violeta o violeta de genciana) y tras esperar un minuto se aclara con agua de forma indirecta para no desfijar la muestra. Posteriormente, se agrega Lugol durante un minuto y se lava con alcohol acetona. Se vuelve a aclarar el portaobjetos de forma indirecta con agua y finalmente se realiza la contratinción con safranina o fucsina básica durante un minuto, tras el cual se vuelve a aclarar con agua de forma indirecta.

Aquellas bacterias que cuentan con una membrana celular única envuelta en una gruesa capa de peptidoglicano, retienen el primer colorante azul al ser decolorados mediante el alcohol acetona, se visualizan azules y son consideradas Gram positivas (73). Por el contrario, otras bacterias con una capa de peptidoglicano más delgada entre una doble membrana, no consiguen retener el colorante azul y solo son teñidas por el contracolorante, por lo que se visualizan de color rosado y se conocen como Gram negativas (73). Algunas especies como las pertenecientes a los géneros *Mycobacterium* (74) o *Mycoplasma* (75), no pueden clasificarse mediante esta tinción por la estructura de la pared celular con ácidos micólicos de las primeras o por la ausencia de pared celular de las segundas.

Por lo tanto, esta técnica permite clasificar a los microorganismos en grupos por su morfología y las características de su membrana (cocos Gram positivos en racimos, cocos Gram positivos en cadenas, bacilos Gram negativos, levaduras...), además, ha demostrado ser de gran utilidad clínica y tener un impacto notable en la elección más adecuada del tratamiento empírico de las bacteriemias (76,77). Asimismo, esta preparación nos puede ayudar a discernir bacteriemias polimicrobianas en las que el retraso diagnóstico puede entorpecer la evolución clínica del paciente (78).

1.5.2 Métodos fenotípicos

No obstante, la tinción de Gram por sí sola no permite la identificación a nivel de especie de un microorganismo, lo cual es deseable conocer con la mayor presteza posible, puesto que microorganismos con morfologías similares no tienen por qué compartir fenotipos de sensibilidad esperada similares. Así, por ejemplo, ante la aparición de un hemocultivo positivo con bacilos Gram negativos es primordial poder distinguir con celeridad si la infección está causada por *Escherichia coli* y puede ser sensible a cefalosporinas de tercera generación o por *Pseudomonas aeruginosa* y debemos utilizar fármacos antipseudomónicos (79).

Clásicamente, la identificación bacteriana en los laboratorios de microbiología clínica se ha realizado mediante métodos fenotípicos, basados sobre todo en las diferentes capacidades metabólicas que presentan los microorganismos. Así, entre otras características se estudiaba la morfología de la colonia en la tinción de Gram, la hemólisis, la capacidad de crecer en medios diferenciales, el metabolismo de diversos azúcares o la reducción de nitratos. Estos perfiles bioquímicos son recogidos en tablas de frecuencia que permiten clasificar los microorganismos en especies (80,81).

Este amplio repertorio de diversas reacciones bioquímicas fue sintetizado posteriormente en dispositivos como, por ejemplo, el API®-20E (82) para la identificación de la familia *Enterobacteriaceae* o los paneles de identificación de los sistemas automatizados de sensibilidad como el Phoenix (83) (Becton Dickinson, USA), el Vitek (84) (Biomerieux, Francia) o el Microscan (85) (Siemens, Alemania).

Pese a que estos métodos son suficientemente sensibles y específicos para la identificación microbiana (82), la mayoría requiere de un tiempo de incubación moderado y en el caso de los hemocultivos deben ser realizados de subcultivos en medios sólidos para alcanzar una identificación de especie. Esto provoca una demora en la identificación de hasta 48 horas y, por ello, han ido siendo desplazados por técnicas más modernas y rápidas. Aunque indudablemente estas técnicas básicas aún son de enorme utilidad en los laboratorios de microbiología y hay situaciones en las que aún no pueden ser sustituidas, como por ejemplo en la diferenciación entre *Escherichia coli* y *Shigella* spp. (86).

Además, algunas de estas pruebas por su rapidez y sencillez de uso siguen siendo aún hoy utilizadas en muchos laboratorios de microbiología clínica como, por ejemplo, la prueba de la catalasa, la capacidad de reducción del peróxido de hidrogeno (87) o de la oxidasa (88).

1.5.3 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas y en particular el MALDI-TOF (del inglés *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight*) ha supuesto una de las mayores revoluciones en la microbiología clínica durante los últimos años. La facilidad de uso y la fiabilidad y rapidez de sus resultados, permiten la identificación de microorganismos a nivel de especie en cuestión de minutos y lo han convertido en una piedra angular de los laboratorios de microbiología modernos (89,90).

El desarrollo de la espectrometría de masas se le atribuye en gran medida a la química analítica, disciplina que desde el inicio del siglo XX ha impulsado grandes avances con respecto a la espectrometría. Lo que conllevó la entrega de varios Premios Nobel de Química, a Francis William Aston en 1922, por el uso de un espectrómetro de masas para descubrir un gran número de isótopos no radiactivos, a Hans Dehmelt y Wolfgang Paul en 1982 por el desarrollo de la trampa de iones, a John Bennet Fenn y Kochi Tanaka en 2002 por la ionización por “electrospray” y desorción por láser suave.

En microbiología, desde la segunda mitad del siglo XX queda probada la posibilidad de diferenciar microorganismos en función de su composición química. En un principio, se

introducen técnicas como la cromatografía de gases (91) y poco después se desarrollan técnicas de espectrometría de masas que describen espectros de masa únicos para diferentes géneros y especies de microorganismos (92). El descubrimiento de técnicas de desorción/ionización y sobre todo el desarrollo de procesos de ionización suave como el MALDI permitieron que en 1996 Holland *et al.* describieran la obtención de espectros característicos de bacterias intactas que permiten su clasificación (93). Este trabajo fue el punto de partida para la aparición de un gran número de otros proyectos que evidenciaron la utilidad del MALDI-TOF para la identificación de los microorganismos (94–98) y que propiciaron el desarrollo por parte de la industria de sistemas específicamente diseñados para su uso en el laboratorio de microbiología como el MALDI-Biotyper (Bruker, Alemania) (99) o el Vitek MS (Biomerieux, Francia) (100).

Un espectrómetro de masas como el MALDI-TOF se compone básicamente de: un láser que produce la ionización y desorción de la muestra gasificándola; de un tubo de vuelo que es capaz de clasificar esas moléculas en función de su relación masa-carga (m/z); y de un detector, en este caso del tiempo de vuelo (TOF) (Figura 2).

Un componente vital para el funcionamiento de estos equipos y su uso para identificar microorganismos es la propia matriz, que en el caso de la mayor parte de aplicaciones de microbiología se tratan de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) o 2.5-dihidroxi benzoico (CHCA). Estas sustancias están compuestas por ácidos de pequeño tamaño y con una absorción óptica elevada para la longitud de onda utilizada en el láser de MALDI-TOF que al cristalizar con la muestra permiten que se puedan volatilizar moléculas de elevado peso molecular, como pueden ser las proteínas, de forma íntegra (101).

Existen varios protocolos de preparación de la muestra para la identificación bacteriana. Uno de los más extendidos por su facilidad y rapidez es la transferencia directa (102). Este método recomendado por los fabricantes consiste en transferir en torno a 1 μ l de colonia directamente a la placa de MALDI-TOF y extenderla (Figura 2). Para procesar algunos microorganismos más resistentes a la lisis como, las levaduras o ciertos microorganismos Gram positivos, los fabricantes recomiendan añadir 1 μ l de ácido fórmico al 70 % y dejar secar a temperatura ambiente. Por último, añadir también 1 μ l de matriz y dejar secar.

Posteriormente, la placa se introduce en el espectrómetro de masas para ser procesada. Un láser vaporiza las moléculas presentes en la muestra cristalizada y éstas ionizadas y en forma gaseosa, son ordenadas en el tubo de vuelo por su relación m/z , para a continuación ser procesadas en el detector. Como resultado obtenemos un espectro en el que están

representados la m/z y la intensidad de cada pico, que puede ser entendido como la abundancia relativa de las moléculas que componen ese pico. (Figura 2)

Para la identificación de microorganismos mediante MALDI-TOF el rango de m/z comúnmente empleado es de 2 a 20 kDa (103), que se corresponde en su mayoría con las proteínas ribosomales (104), que son fácilmente ionizables. Éstas son una diana extensamente utilizada para la caracterización de microorganismos por otras técnicas como la secuenciación de la subunidad 16S del ácido ribonucleico ribosomal (16S rARN) y, además, su expresión no se ve tan influida por las condiciones de crecimiento del microorganismo (105). Todo ello explica la alta correlación observada entre las identificaciones mediante MALDI-TOF y otras técnicas de identificación de microorganismos, especialmente el tipado mediante la secuenciación del 16S rARN (106).

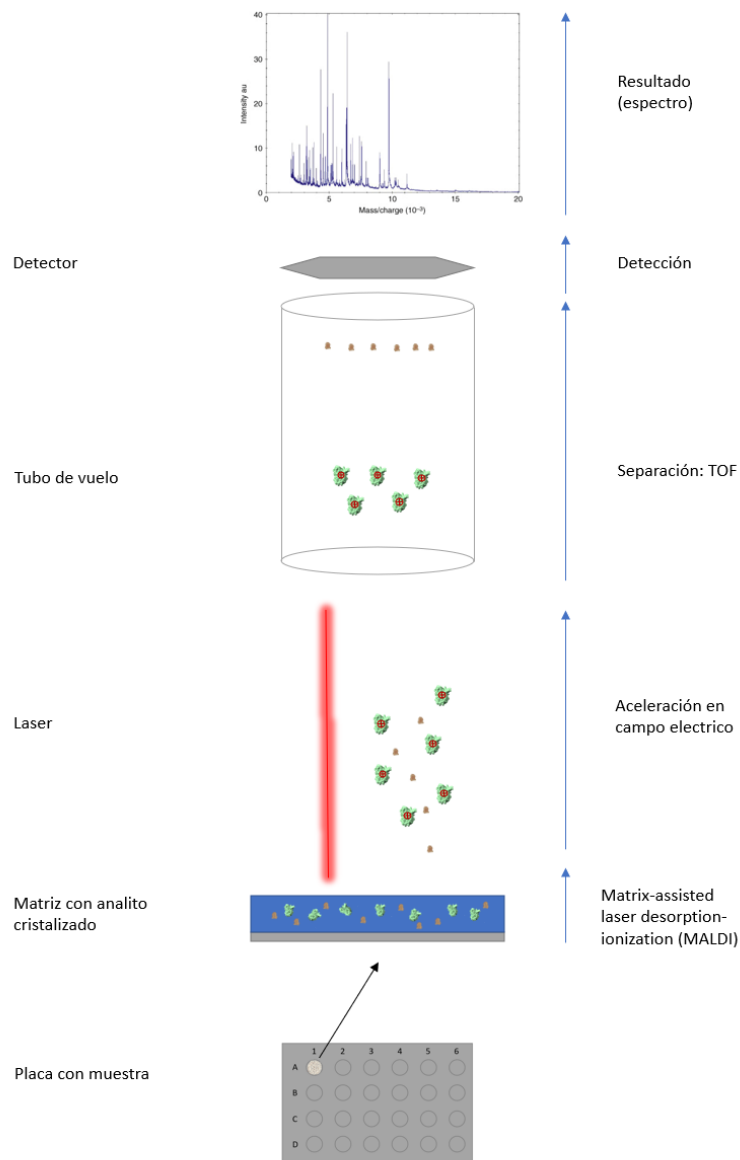


Figura 2: Esquema técnico del funcionamiento del MALDI-TOF.

La muestra se mezcla en una placa con la matriz y tras la cristalización se introduce en el equipo. Tras la generación de vacío la muestra es bombardeada con un láser que vaporiza y carga algunas moléculas de la muestra. Estas moléculas desorbidas e ionizadas se aceleran en un campo eléctrico de alto voltaje y se lanzan hacia un tubo de vuelo con vacío. Los iones de mayor tamaño vuelan más lento que los de menos tamaño hasta que llegan al detector. Los analitos son separados teniendo en cuenta su tiempo de vuelo (TOF) y se compone un espectro que aúna el ratio masa carga (m/z) con la intensidad y este espectro es comparado con una base de datos de la que se obtiene una identificación a nivel de especies. Adaptado de A. Croxatto et al (101).

Estos espectros son comparados con los de la base de datos y se otorga un valor numérico que representa la similitud del espectro obtenido con los presentes en la base de datos. Por ejemplo, en el sistema de Bruker el espectro se descompone en una lista de picos que posteriormente es comparada con la base de datos y otorga una razón logarítmica de similitud conocida como *score*. Esta puntuación tiene una magnitud de 0 a 3 y cuanto mayor es, más

similar es el espectro obtenido a los presentes en la base de datos. Una vez realizado este análisis el equipo señala por cada muestra analizada los diez resultados con un mayor *score*.

Este *score* permite, a su vez, una categorización de los resultados en función de su fiabilidad. En la actualidad, se consideran que los *scores* superiores a 2 son resultados fiables (Tabla 5). Los resultados con *scores* ente 1,70 y 1,99 son resultados de poca fiabilidad y se recomienda repetir la determinación con alguna extracción o pretratamiento previos. Por último, los resultados por debajo de 1,7 no se consideran fiables y el sistema los suele informar como “sin identificación posible”. No obstante, diversos autores han demostrado que en algunas situaciones especiales, como pueden ser la identificación de micobacterias y hongos filamentosos, incluso los valores por debajo de 1,7 pueden ser correctos y, por lo tanto, de utilidad clínica (107,108).

Tabla 5: Categorías de fiabilidad de la identificación para el sistema Bruker Biotyper

Rango	Interpretación	Color
2,00 - 3,00	Identificación de alta fiabilidad	Verde
1,70 - 2,00	Identificación de baja fiabilidad 1. En caso de haber obtenido este <i>score</i> mediante el método de transferencia directa, repetir la determinación mediante un método de extracción. 2. En caso de haber obtenido este <i>score</i> mediante un método de extracción, informar como “Identificación de baja fiabilidad”	Amarillo
< 1,70	Sin identificación posible 1. En caso de haber obtenido este <i>score</i> mediante el método de transferencia directa, repetir la determinación mediante un método de extracción. 2. En caso de haber obtenido este <i>score</i> mediante un método de extracción, informar como “Sin identificación posible”	Rojo

En definitiva, el MALDI-TOF acorta el tiempo necesario para obtener una identificación concluyente, desde las horas o incluso días necesarios para una identificación bioquímica fiable, a unos pocos minutos. En el caso concreto de los hemocultivos positivos, esto supone un cambio notable: de poder informar resultados fiables sobre la identificación en las 48 horas desde que el hemocultivo positiviza (con el método bioquímico) a tenerlos en las primeras 24 horas desde la positivización desde un subcultivo en medio sólido (109).

Sin embargo, mediante el MALDI-TOF es posible agilizar aún más la identificación de los microorganismos causantes de la bacteriemia (Figura 3). Uno de los métodos más sencillos y extendidos, conocido como “MALDI-gota”, consiste en realizar un subcultivo de un hemocultivo positivo con un alto inóculo en un medio de sólido, donde el objetivo no es tanto conseguir colonias aisladas como en un subcultivo tradicional, sino en conseguir una masa bacteriana suficiente en el menor tiempo posible (110). Generalmente, se procede a inocular al menos una gota de hemocultivo en agar chocolate sin extenderla y se incuba durante 3 horas a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO₂, para realizar la técnica de inoculación directa sobre la placa de MALDI-TOF descrita previamente (111). Este método tiene como ventaja más clara su sencillez y el bajo coste tanto material como personal para poder ser implantado, pero, por otro lado, requiere de algo más de 3 horas para obtener una identificación. Además, hay microorganismos que no crecen en esas condiciones de incubación (medio, atmósfera o tiempo de incubación) o situaciones en un laboratorio de microbiología donde no resulta práctico, como, por ejemplo, en aquellos centros de trabajo con horarios restringidos hasta las tres de la tarde en aquellos hemocultivos que positivicen a partir de las 12 de la mañana, donde evidentemente no otorgará ninguna ventaja con respecto a la identificación sobre un subcultivo tradicional.

Otro abordaje interesante para dinamizar el proceso diagnóstico etiológico de la bacteriemia mediante el MALDI-TOF es utilizar directamente el hemocultivo positivo para realizar la detección del microorganismo, prescindiendo así del subcultivo en medio sólido y mejorando, por lo tanto, el tiempo de obtención del resultado. Se han descrito numerosas y diferentes técnicas tanto de elaboración propia (112,113) como comerciales (114). Generalmente suelen consistir en medios, ya sea químicos o físicos, para conseguir separar en la medida de lo posible las células bacterianas de los componentes tanto de la sangre como del propio medio presente en los frascos de hemocultivos. Uno de los más extendidos, es el protocolo de centrifugación diferencial que se basa en medios físicos, con centrifugaciones con distinta intensidad, para conseguir un *pellet* en su mayoría bacteriano (115). En otros casos se opta por la utilización de saponina (116) como paso previo a la centrifugación para obtener también un producto lo más parecido a una colonia de microorganismo.

Las soluciones comerciales, como el Sepsityper (Bruker, Alemania) (117), pese a suponer un incremento notable en el precio por determinación, favorecen la estandarización de este tipo de técnicas y en este caso además, van acompañadas de soluciones a nivel de *software* interesantes. Este programa incluye un módulo de análisis dedicado exclusivamente a las bacteriemias, que mejora los *score* de los espectros obtenidos, elimina del análisis picos específicos presentes en hemocultivos que interfieren en el análisis de los espectros (118), o

intenta, incluso, subsanar una de las mayores limitaciones de este tipo de técnicas directas como son los hemocultivos mixtos (119).

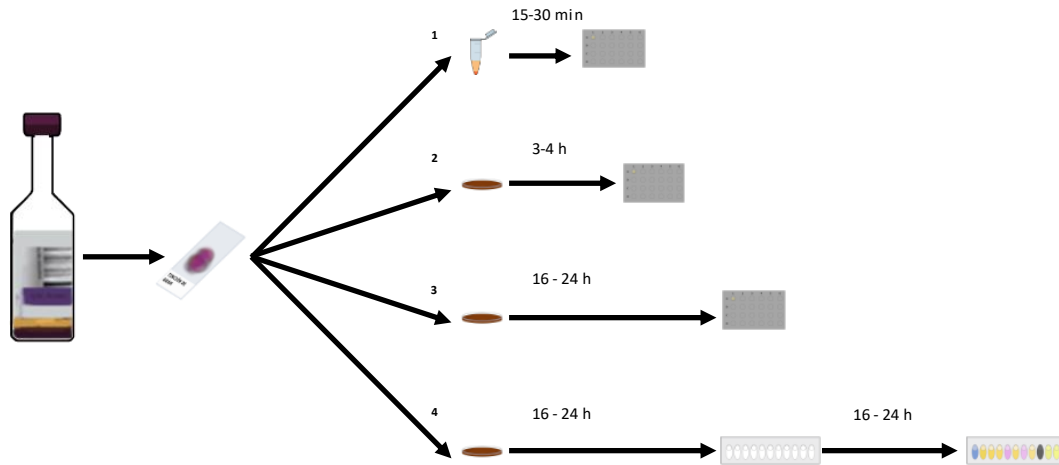


Figura 3: Representación gráfica de los tiempos necesarios hasta la identificación definitiva en los diversos métodos presentados.

(1) Método de identificación directa desde hemocultivo positivo requiere entre 15-30 min; (2) MALDI-gota con un tiempo hasta resultado de unas 4 horas; (3) Identificación de subcultivo en medio sólido que necesita unas 24 horas; (4) Método bioquímico que lleva unas 48 horas hasta obtener un resultado definitivo.

La utilidad del MALDI-TOF no se limita a permitir una identificación rápida y fiable, sino que esta técnica también permite inferir datos sobre la sensibilidad antimicrobiana utilizando diversos mecanismos como: la aparición de picos específicos que sirvan como marcador de cepas con una determinada resistencia, el análisis de los picos de los productos de hidrólisis de un determinado antibiótico o la detección de crecimiento en presencia de un determinado antibiótico.

Mediante el análisis detallado de los espectros de algunos microorganismos se han conseguido detectar marcadores de resistencia específicos que permiten generar modelos que diferencien los microorganismos resistentes de algunas especies bacterianas; por ejemplo, la presencia de un pico a 2415 m/z en espectros de *Staphylococcus* spp., se asocia a la presencia de la proteína PSM-mec que se puede encontrar en el casete genético de clase *mecA* lo que permite predecir la resistencia a meticilina de los mismos (120). Se han descrito técnicas similares para detectar la presencia de enzimas KPC en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (121,122), *vanA* en *Enterococcus faecium* (123) o CfiA en *Bacteroides fragilis* (124). Un abordaje similar permite reconocer el clon de alto riesgo ST175 de *Pseudomonas aeruginosa* mediante el

análisis de dos biomarcadores que pueden predecir la pertenencia de un aislado clínico a este clon (125). Algunos de estos mecanismos como la detección de la enzima KPC en Enterobacterales o la metalobetalactamasa CfiA en *B. fragilis* han sido incluidos en las propias bases de datos de los equipos MALDI-TOF.

Los antibióticos betalactámicos se consideran de primera elección en el tratamiento de muchas infecciones y debido a su importancia clínica las resistencias a los mismos son extensamente estudiadas. Uno de los mecanismos más importantes es la síntesis de enzimas que los hidrolizan, conocidas como betalactamasas. El MALDI-TOF permite revelar la presencia de estas enzimas mediante la detección de los productos de hidrólisis de determinados antibióticos. Para ello se incuba el microorganismo en una solución con el antibiótico y posteriormente se analiza para encontrar picos específicos que correspondan con el antibiótico hidrolizado. Para el análisis de la resistencia a cefalosporinas de tercera generación el compuesto más estudiado es la cefotaxima (126,127) y en el caso de las carbapenemasas el ertapenem (128) con una sensibilidad por encima del 90 % en una hora de incubación. En la actualidad, existen soluciones comerciales que estandarizan la técnica y facilitan su uso en los laboratorios de microbiología clínica, como son los kits MBT STAR®-Carba IVD y MBT STAR®-Cepha IVD (Bruker, Alemania) (129). Además, realizando este tipo de ensayos en presencia de inhibidores conocidos de ciertas enzimas es posible llegar a conocer el tipo de betalactamasa que se está detectando. Por ejemplo, realizando los ensayos de hidrólisis de cefotaxima en presencia y ausencia de ácido-clavulánico, si se produce la hidrólisis de cefotaxima pero solo en ausencia de ácido-clavulánico, se puede descartar la presencia de enzimas tipo AmpC y se tratarán probablemente de BLEEs (127,130). Así mismo, añadiendo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) Hoyos-Mallecot *et al.* consiguieron demostrar la presencia de carbapenemasas de la clase B de Ambler, también conocidas como metalobetalactamasas (131).

No obstante, ninguno de los métodos mencionados hasta ahora consigue aproximarse tanto a los métodos clásicos del estudio de la sensibilidad antimicrobiana como los ensayos de crecimiento en microgotas (MGA del inglés *Microdroplet Growth Assays*). En esta técnica se inoculan placas de MALDI-TOF con suspensiones de la cepa a estudio con diferentes concentraciones antimicrobianas. Se incuban durante 4 horas, posteriormente se retira el medio y se procesa la placa de MALDI. La primera concentración en la que no se consigue identificar correctamente el microorganismo es una buena aproximación a la concentración mínima inhibitoria (CMI) (132,133).

Los nuevos equipos de MALDI-TOF como el modelo MALDI Biotyper® Sirius (Bruker, Alemania) permiten invertir la polaridad del campo eléctrico y trabajar en modalidad iónica

negativa, lo que amplía las posibilidades de estos equipos pudiendo analizar lípidos. Estas modificaciones permiten, entre otras muchas posibilidades, la detección de la resistencia a colistina en *Acinetobacter baumannii* (134) y *E. coli* (135) mediante la detección de modificaciones en el lípido A y, en el caso de *E. coli*, diferenciar si el origen de la resistencia es cromosómico o plasmídico.

1.6 Sensibilidad antimicrobiana

Pese a los innegables avances realizados para obtener información rápida pero fiable sobre la sensibilidad antimicrobiana como, por ejemplo, los previamente mencionados mediante espectrometría de masas u otros métodos como los moleculares, hoy en día las técnicas que determinan la sensibilidad de las cepas de forma directa siguen siendo indispensables. En general se puede hablar de dos tipos de ensayos (136) como se observa en la Figura 4:

1. Métodos de difusión:
 - a. Antibiograma disco-placa
 - b. Épsilon test
2. Métodos de dilución:
 - a. Dilución en agar
 - b. Dilución en caldo

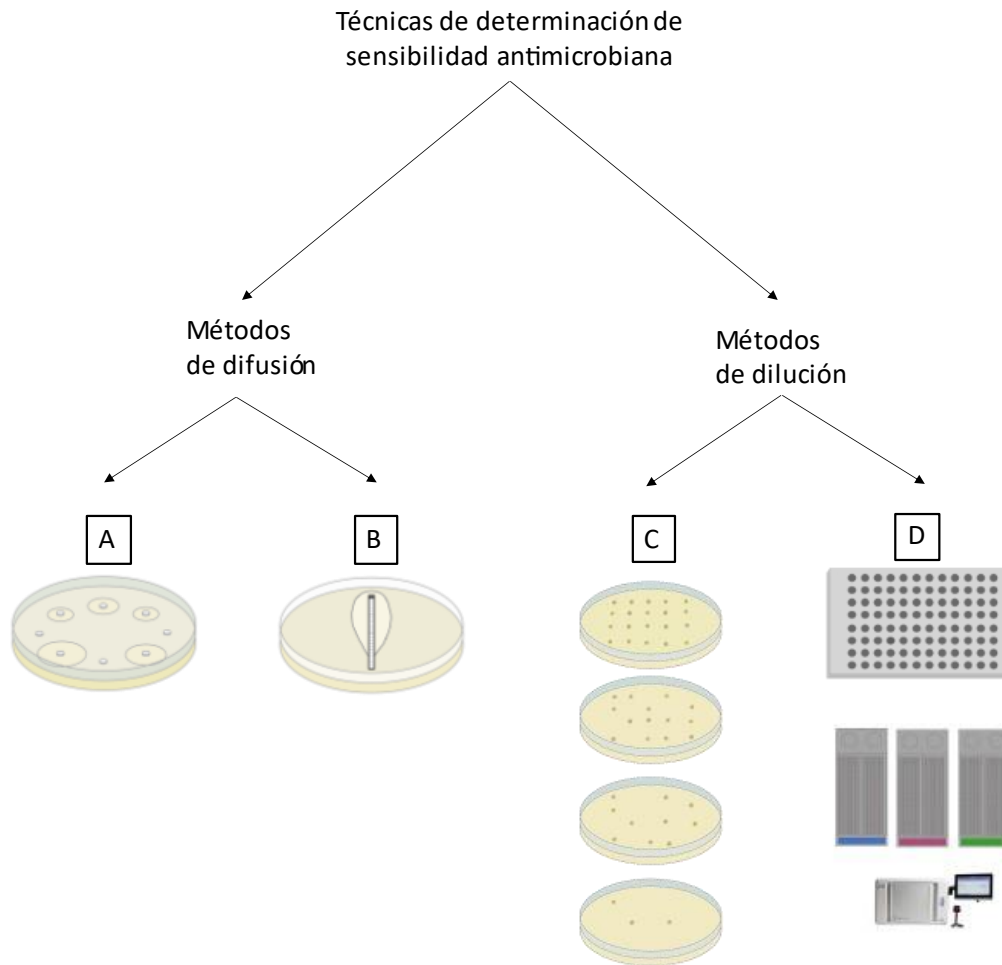


Figura 4: Representación gráfica de las técnicas de determinación de la sensibilidad antimicrobiana más conocidos.

(A) Método disco-placa o Kirby-Bauer, (B) Método de Épsilon test, (C) Dilución en agar; (D) Dilución en caldo con microdilución en placa de microtitulación y paneles comerciales automatizados del sistema Phoenix BD.

1.6.1 Métodos de difusión

1.6.1.1 Antibiograma disco placa

Las bases para los métodos de difusión se establecieron a finales del siglo XIX, incluso antes del descubrimiento de la penicilina por Fleming, puesto que en 1889 Beijerinck describió el efecto que producía la difusión de auxinas, un tipo de hormonas vegetales, en el crecimiento bacteriano (137). Además del propio descubrimiento de la penicilina, a Alexander Fleming también describió en 1929 uno de los primeros métodos de determinación de la sensibilidad antibiótica mediante difusión, el método “Ditch-plate”(138). Esta técnica consiste en producir una incisión en el agar que se inoculaba en los primeros casos con penicilina, aunque posteriormente con más antimicrobianos (139), para luego inocular los diferentes aislados

bacterianos perpendicularmente a la incisión y recoger posteriormente el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento. En la década de los años 40 del siglo XX con el auge del uso y la síntesis de nuevos compuestos antimicrobianos, se produjo un rápido desarrollo de las técnicas de difusión. En 1944 Vincent *et al.* introdujeron el uso de discos de papel de filtro impregnados en penicilina para el estudio de la sensibilidad de diferentes cepas midiendo los halos de inhibición (140). Posteriormente Bondi *et al.* establecieron los discos de 6 mm de diámetro que la actualidad se utilizan en muchos laboratorios (141). Kirby y Bauer trabajaron durante años en la estandarización de estos métodos (142), y es por ello, que esta técnica de antibiograma disco placa aún es conocida como Kirby-Bauer. Recientemente se han desarrollado sistemas que permiten la automatización del proceso, desde la inoculación y dispensación de los discos hasta la lectura e interpretación de los resultados (143), lo que permite escalar la cantidad de determinaciones que se realizan en un laboratorio.

La técnica estándar consiste en inocular, mediante un escobillón, una suspensión con una concentración conocida, generalmente se utiliza un 0,5 en la escala de turbidez de McFarland que se corresponde con $1,5 \times 10^8 \frac{UFC}{ml}$ (UFC: Unidades formadoras de colonias), cubriendo completamente la superficie de la placa. El medio de cultivo empleado, así como la combinación de los antimicrobianos estudiados, dependerá de la especie bacteriana, aunque el más común es el medio Mueller-Hinton II con cationes ajustados. Los discos deben ser colocados, bien con dispensadores o con pinzas estériles, a no menos de 15 mm del borde de la placa y con suficiente espacio entre ellos. Estas placas se incubarán durante 16-18 horas hasta ser leídas (136).

Para poder categorizar cada uno de los diámetros de inhibición en las categorías clínicas normalmente los laboratorios se adhieren a las recomendaciones de diferentes comités de realización del antibiograma. A nivel mundial las más establecidos son las del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (144) y del *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (145), donde además vienen recogidas las condiciones y medios de cultivo que deben ser empleados para poder interpretar las medidas del halo de inhibición con exactitud.

1.6.1.2 Épsilon test

El épsilon test o E-test es otra técnica de difusión, muy extendida elaborada durante los años 80 del siglo XX en Suecia, que consiste en una tira de plástico no poroso de 6 cm de longitud que incorpora un gradiente predefinido de un antimicrobiano en cuestión. Como ventaja frente al método Kirby-Bauer es que se obtienen medidas de CMI frente a diámetros de inhibición, que

son fácilmente extrapolables a las CMI obtenidas de los métodos de dilución que aún hoy se consideran el *gold standard* y que se explicará en el siguiente apartado (1.6.2.2.). Desde su utilización inicial en *P. aeruginosa* (146) su uso se ha ido extendiendo a prácticamente todos los microorganismos cultivables en medios sólidos incluyendo micobacterias (147) y levaduras (148). Además, se han desarrollado tiras de doble gradiente que permiten reconocer mediante el uso de inhibidores diferentes clases de betalactamasas y carbapenemasas (149). También se han descrito técnicas de combinación de antibióticos mediante E-test que permiten inferir la respuesta sinérgica de la combinación de diferentes antimicrobianos, lo que resulta muy útil en el tratamiento de infecciones por microorganismos extremadamente resistentes o panresistentes (150).

En la práctica, es una adaptación del método de disco placa en el que en vez de dispensar los discos se depositarán las tiras de E-test. Posteriormente, para ser interpretado se recogerá la primera dilución en potencia de 2 que quede dentro del halo de inhibición y ésta se considerará la CMI, lo que facilitará posteriormente la interpretación y la explotación estadística de esos datos. Igualmente, para la categorización se emplean generalmente los puntos de corte tanto EUCAST como CLSI.

1.6.2 Métodos de dilución

1.6.2.1 Dilución en agar

En la primera mitad del siglo XX, a raíz del descubrimiento sobre todo de la penicilina y derivados y de la popularización de su uso en la práctica clínica, se produjo también la necesidad de implementar nuevos métodos para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana. Uno de los pioneros en diluir antimicrobianos en agar fue Flemming. No obstante, fueron Schmith y Reymann en 1940 los primeros en usar diluciones de sulfapiridina en agar como método para determinar la CMI en *Neisseria gonorrhoeae* (151). Así mismo, a lo largo de la siguiente década se fue extendiendo el uso de la dilución en agar para la determinación de la CMI de los diversos antibióticos que se desarrollaron (152).

Para la realización de esta técnica se incorpora la solución antibiótica al medio de cultivo sin solidificar. El rango de concentración a estudiar condicionará el uso de placas. Posteriormente se inocula el microorganismo y, tras la incubación, se determina cuál es la mínima concentración que impide el crecimiento del microorganismo. La introducción de replicadores, que son dispositivos que permiten inocular entre 32 y 36 microorganismos de

forma simultánea (153), facilitó la realización de estos estudios; que a pesar de todo, siguen requiriendo una gran cantidad de trabajo, por lo que su uso en los laboratorios de microbiología en la práctica clínica habitual ha decaído. Sin embargo, para algunos fármacos como la fosfomicina se sigue considerando el *gold standard* (154). Además, en esencia perduran también en forma de concentraciones específicas que permiten categorizar a algunos aislados utilizando una o varias concentraciones en concreto, como por ejemplo en el agar MacConkey con Cefotaxima a 2 o 4 µg/ml utilizado en muchos laboratorios clínicos como cribado de enterobacterias productoras de BLEE (155) o los diversos medios cromogénicos que se utilizan de forma habitual en el estudio de portadores de microorganismos multirresistentes (156,157).

1.6.2.2 Dilución en caldo

El desarrollo de la dilución en caldo es coetáneo al del resto de las técnicas mencionadas previamente. Es también en la primera mitad del siglo XX cuando se describen los primeros métodos para realizar la determinación de la sensibilidad antimicrobiana a penicilina (158) o estreptomina (159). En un inicio, se utilizaban tubos con volúmenes relativamente grandes de caldo de cultivo, lo que ahora se conoce como método de macrodilución. Para ello se parte de una batería de tubos con 1 ml de medio estéril sin antimicrobiano, generalmente Mueller-Hinton, al que se le añade 1 ml de la solución de antimicrobiano obteniendo la concentración más elevada. Posteriormente, se realizan diluciones seriadas transfiriendo 1 ml de cada tubo al siguiente hasta completar el rango de concentración deseado. A continuación, se inoculan todos los tubos con una suspensión bacteriana estandarizada, incluyendo un tubo sin solución antimicrobiana que funcionará como control de crecimiento (136). La concentración mínima inhibitoria será la del primer tubo en el que no se observe crecimiento.

El perfeccionamiento de pipetas de precisión durante la segunda mitad del siglo XX permitió adaptar la dilución en caldo a formatos más contenidos con el desarrollo de lo que se conoce como método de microdilución (160). En este caso, en vez de tubos separados se preparan las diluciones en diferentes pocillos de placas de microtitulación con fondo en U. En la actualidad estas placas además de poderse preparar en los laboratorios pueden ser adquiridas a diferentes casas comerciales que las suministran con las diluciones de los antimicrobianos preparadas para ser inoculadas con el microorganismo a estudiar.

El método de microdilución en caldo ha sido probablemente el más automatizado de los mencionados previamente y, es por eso, por lo que es uno de los más utilizados en los laboratorios de microbiología clínica en todo el mundo. En ese sentido, hay una gran cantidad de diferentes sistemas de diversas casas comerciales que permiten automatizar en mayor o

menor medida todo el proceso, siendo los más utilizados los mencionados previamente: el sistema Microscan Walkaway (Beckman Coulter, USA), el sistema Vitek2 (Biomérieux, Francia) y el Sistema Phoenix BD (Becton Dickinson, USA).

1.6.3 Sensibilidad antimicrobiana de hemocultivo directo

Como se ha mencionado previamente, para el correcto tratamiento de las bacteriemias es indispensable obtener información sobre la sensibilidad de los microorganismos implicados de la forma más precoz posible. Por un lado, en las situaciones en las que el tratamiento empírico no es correcto, puesto que el microorganismo en cuestión presenta un fenotipo más resistente de lo esperado es vital conocer un compuesto activo lo antes posible (161), pero el estudio de sensibilidad antimicrobiana también es importante cuando existen alternativas al tratamiento empírico con un espectro antimicrobiano más reducido. Debido a ello, se han dedicado muchos esfuerzos al desarrollo de técnicas rápidas para la realización de antibiogramas de muestra directa en hemocultivos (162).

Una de las iniciativas más importantes es la llevada a cabo por parte de Jonansson *et al.* del laboratorio de desarrollo de EUCAST. En 2019 publicaron una nueva metodología basada en los protocolos de EUCAST previos para la realización e interpretación de antibiogramas disco-placa desde muestra directa de hemocultivos (163), conocida como *Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing* (RAST). Posteriormente este método fue validado por más de 50 laboratorios distintos de todo Europa con resultados muy prometedores (164).

Para realizar el RAST se inoculan 100 o 150 µL del hemocultivo positivo directamente sobre la placa de Mueller-Hinton II, sembrándose con la misma técnica aplicada en el método de Kirby-Bauer. En este método hay puntos de corte para las lecturas a las 4, 6, 8 horas y, desde la versión 5.0 de abril de 2022, también a las 16-20 horas (165). Los halos deben leerse siempre por el anverso de la placa y en caso de no existir un borde bien definido se debe esperar a la siguiente lectura para interpretarlo. Hasta la última versión 5.0 publicada, solamente se han desarrollado puntos de corte para algunas de las bacterias más importantes en las bacteriemias como son *A. baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. pneumoniae*. Además, el número de antibióticos de los que se dispone información también es limitado, por ejemplo, en *E. coli* solamente está validado para piperacilina-tazobactam, cefotaxima, ceftazidima, ceftazidima-avibactam, imipenem, meropenem, ciprofloxacino, levofloxacino, amikacina, gentamicina, tobramicina y trimetropim-

sulfametoxazol. No obstante, EUCAST se encuentra continuamente desarrollando y ampliando esta técnica a nuevos compuestos y especies microbianas.

Otro enfoque para ahorrar tiempo en la obtención de resultados de sensibilidad antimicrobiana fiables en bacteriemias ha sido la inoculación directa del hemocultivo positivo en los sistemas automatizados como el Phoenix BD (166) o el Microscan (167). Para ello, se suele procesar previamente la muestra en protocolos similares a los descritos previamente para la realización del MALDI-TOF directo con el objeto de eliminar muchos de los compuestos de los hemocultivos, entre ellos algunas resinas. Estas resinas se utilizan en muchos frascos de hemocultivos, por ejemplo, para neutralizar la acción de sustancias bactericidas que pueden estar presentes en la sangre del paciente y conseguir aumentar la recuperación de bacterias viables (168); pero tienen lógicamente un efecto indeseable a la hora de testar la sensibilidad de esas bacterias a diferentes antimicrobianos.

Uno de los métodos más extendidos en los laboratorios que emplean el sistema Phoenix BD es el de los tubos de separación de suero (166). Este método consiste en obtener 10 ml de hemocultivo positivo e inyectarlos en un tubo de separación de suero (SST, BD Diagnostic Systems, USA), para centrifugarlo y emplear el *pellet* generado en la capa de gel para realizar una suspensión de 0,5 McFarland en el caldo de cultivo e inocular el panel correspondiente como se realiza habitualmente.

En la mayoría de los sistemas de determinación de sensibilidad antimicrobiana hasta ahora mencionados el crecimiento de los microorganismos implicados se detecta mediante sistemas que requieren una cantidad de microorganismos elevada, ya sea la presencia de crecimiento visible en el RAST, un cambio en la turbidez en los sistemas de microdilución automatizados (Vitek2 y MicroScan) o por un cambio en un indicador *redox* (Phoenix). Debido a ello, una estrategia para reducir el tiempo necesario hasta obtener un resultado de sensibilidad antimicrobiana implica mejorar la capacidad de detección del crecimiento en presencia de antimicrobianos.

Uno de los sistemas desarrollados es el ensayo de crecimiento en microgotas mencionado previamente (133), en el que se emplea la espectrometría de masas para valorar el crecimiento bacteriano. Otros sistemas como el Accelerate Pheno (Accelerate Diagnostics, USA) utilizan la hibridación *in situ* para monitorizar la multiplicación bacteriana y de esa forma reducir el tiempo necesario para la obtención de un antibiograma completo (169). El sistema QuickMIC (Gradientech, Suecia) combina microfluídica para generar gradientes microscópicos análogos a las tiras de gradiente de los E-test con la microfotografía continua para, de nuevo, aportar

resultados de CMI de diversos antibióticos en un tiempo notablemente inferior (170). Otros métodos son el sistema BacterioScan FLLS (BacterioScan, USA) que utiliza la dispersión laser para reducir el límite de detección de sistemas de medición de la densidad óptica hasta en diez veces (171) o el SPECIFIC REVEAL™ (Specific, USA) que detecta la emisión de compuestos orgánicos volátiles que se producen durante la multiplicación bacteriana (172).

1.7 Secuenciación masiva

Se conoce como secuenciación masiva o secuenciación de próxima generación (NGS del inglés *Next Generation Sequencing*) a un conglomerado de tecnologías que surgen en los albores del nuevo milenio y permiten, como contrapartida a la secuenciación de primera generación, producir múltiples secuencias de manera simultánea.

1.7.1 Secuenciación de primera generación

Durante la segunda mitad del siglo XIX se dieron grandes avances en biología que permitieron al ser humano ir conociendo progresivamente los elementos y fundamentos mismos de la vida. En 1866, Haeckel postula que debido a la importancia de la división del núcleo en la división celular, es en este orgánulo donde debe hallarse el material que explique la herencia genética (173). Esto fue posteriormente demostrado de forma independiente por Hertwig, Strasburger, von Kölliker y Weismann. En 1869, Miescher consigue aislar por primera vez ácidos nucleicos, a los que da el nombre de nucleína, desde leucocitos provenientes de pus de heridas quirúrgicas mediante un protocolo para eliminar lípidos con una solución alcohólica y proteínas utilizando pepsina. Durante las siguientes décadas, experimentando con espermatozoides de salmón es capaz de extraer grandes cantidades de ácidos nucleicos y analizar su composición química, estableciendo que a diferencia de las proteínas, presentaban un alto contenido de ácido fosfórico y la ausencia de sulfatos (174). Adicionalmente, postuló que la nucleína se trataba de una macromolécula compuesta de cuatro bases diferentes y con un alto peso molecular. Posteriormente, Levene a principios del siglo XX describió esas bases como adenina, citosina, guanina y timina (175), además de la desoxirribosa y el grupo fosfato de la cadena lateral, proponiendo como estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN) un tetranucleótido, que posteriormente fue desestimado. Entre otros datos en contra de la teoría de Levene estaban los aportados por Zamenhof y Chargaff quienes descubrieron que la proporción de las diferentes bases variaba con la especie analizada, aunque siempre manteniendo un ratio fijo de adeninas y timinas y de citosinas y guaninas (176). Tanto es así, que a día de hoy el contenido guanina-

citosa (GC) de una muestra sigue siendo un parámetro imprescindible a tener en cuenta al revisar la calidad de una secuencia (177).

En 1953, utilizando las imágenes de cristalografía de rayos X obtenidas por Franklin y Wilkins, en las que se observaba una estructura repetitiva y helicoidal, Watson y Crick postulan la estructura tridimensional del ADN como una doble hélice en la que las adeninas siempre se enlazan a timinas y las citosinas a guaninas (178), trabajo por el cual recibieron el premio Nobel en 1962 los tres hombres, no así a Rosalind Franklin.

A pesar de que la estructura y la composición química de los ácidos nucleicos era conocida, su secuenciación seguía representando un enorme reto, ya que, a diferencia de las proteínas, los ácidos nucleicos están formados por secuencias más largas, más repetitivas y con componentes mucho más parecidos entre sí que los aminoácidos. Por lo tanto, los métodos que con tanto éxito se habían empleado para la caracterización de las proteínas no resultaban adecuados y se debían desarrollar nuevos métodos (179).

Por el contrario, el ácido ribonucleico (ARN), presentaba una estructura más sencilla y generalmente más corta y además se conocían enzimas, ARNasas que fragmentan secuencias específicas de ARN, a diferencia de enzimas equivalentes que usasen el ADN como sustrato. Debido a ello, muchos de los esfuerzos de secuenciación iniciales durante los años 60 se centraron en el análisis de secuencias de ARN. Se desarrollaron protocolos de secuenciación mediante fragmentación en dos dimensiones y el posterior análisis de los productos de digestión radiomarcados, lo que culminó en la primera secuenciación de un gen completo, el gen que codifica la envuelta del bacteriófago MS2, en 1972 (180).

A finales de los años 60, Wu y Kaiser describieron un método para secuenciar los extremos cohesivos del bacteriófago Lambda-DNA mediante el uso de una ADN-polimerasa y nucleótidos marcados con tritio. Este método fue posteriormente completado introduciendo cebadores o *primers* que eliminaban la restricción de los extremos y permitían la secuenciación de cualquier fragmento del genoma (181), aunque siempre restringido a fragmentos muy cortos de ADN.

A mediados de los años 70, el descubrimiento de los geles de poliacrilamida, con una mayor precisión a la hora de discriminar tamaños, permitió el desarrollo de técnicas que pudiesen emplear un único proceso de electroforesis. La primera en ser adoptada de forma generalizada fue la técnica de Maxam y Gilbert, que consistía en tratar las secuencias de ADN previamente marcadas con un fosfato radiomarcado con 4 tratamientos diferentes. La hidracina en medios muy salinos sólo es capaz de eliminar las citosinas, pero en soluciones ajustadas es

capaz de retirar todas las pirimidinas (citosina y timina). El dimetil sulfato es utilizado para retirar las guaninas y, por último, medios ácidos consiguen separar todas las purinas (adenina y guanina). En un segundo paso se utilizaba un disolvente como la piperidina para dividir el ADN en fragmentos de longitud variable. Posteriormente, en un gel de poliacrilamida se podía deducir la secuencia (182).

No obstante, la técnica que realmente revolucionó la secuenciación y que se ha convertido en el paradigma de las técnicas de primera generación fue descrita por Sanger *et al.* en 1977 (183) y se denominó en primera instancia como método de terminación de cadena, aunque hoy en día es más frecuentemente conocida como técnica de Sanger. Este protocolo consistía en un principio en cuatro reacciones paralelas donde se hacía uso de unos cebadores y una ADN-polimerasa con los cuatro nucleótidos (dNTP). En cada una de las reacciones adicionalmente se introducía un nucleótido radiomarcado al que le faltaba el grupo hidroxilo 3' (dideoxynucleotidos o ddNTP). Una vez unido a la cadena el ddNTP termina la elongación de la misma. Posteriormente, las cuatro reacciones migraban en un gel de agarosa y se podía conocer el nucleótido presente en cada posición. La sustitución de los ddNTPs radiomarcados por ddNTPs marcados con diferentes fluoróforos permitió la simplificación de este procedimiento pudiendo realizarse en una única reacción y facilitando secuenciadores automatizados como el ABI370 (Applied Biosystems, USA) (184). Adicionalmente, el desarrollo de la electroforesis capilar en sustitución de los geles tradicionales permitió el desarrollo de plataformas que podían realizar más secuencias, más rápido como el ABI 3130 (Applied Biosystems, USA) que permite el análisis simultáneo de hasta 16 muestras con lecturas de hasta 1000 pares de bases en unos 30 min.

1.7.2 Secuenciación de segunda generación

1.7.2.1 Pirosecuenciación

La primera tecnología de secuenciación conocida como de nueva generación propiamente dicha es la de la pirosecuenciación, desarrollada a finales del siglo XX por el grupo de Pål Nyrén (185). Esta técnica se basa en la actividad de una enzima, la luciferasa, que en presencia de adenina trifosfato (ATP) y luciferina es capaz de emitir luz y es el mecanismo molecular de la bioluminiscencia de las luciérnagas (186).

Para efectuar la secuenciación mediante esta técnica se requiere un paso previo de preparación del ADN, lo que en NGS se conoce como preparación de librerías. En concreto, para la pirosecuenciación se fragmenta el ADN mediante una trasposasa, que además de

fragmentarlo, añade a las secuencias a estudiar unos adaptadores. Estos adaptadores son secuencias complementarias a las presentes en unas partículas paramagnéticas, a las que se unen los fragmentos de ADN. Posteriormente, serán amplificados clonalmente en una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés *Polimerase Chain Reaction*) en una interfaz agua-aceite conocida como PCR de emulsión (187). Cada una de estas partículas con los fragmentos clonalmente amplificados se deposita en un micropocillo presente en la celda de flujo del secuenciador (*flowcell*).

Posteriormente, en cada uno de esos pocillos, además de la secuencia adherida a la partícula paramagnética se introduce un complejo enzimático que incluye ADN-polimerasa, una sulfurilasa, la propia luciferasa y una apirasa. A los pocillos se les va añadiendo secuencialmente diferentes dNTPs naturales, salvo el dATP que debe ser sustituido por un nucleótido modificado para que no funcione como sustrato de la luciferasa (dATP α S). Cuando se añade un nucleótido complementario, la ADN-Polimerasa lo une a la hebra. Esta síntesis 3'-OH de la cadena de nucleótidos en crecimiento ataca el α -fosfato del dNTP que se incorpora, lo que da como resultado un enlace fosfodiéster y la liberación de pirofosfato (PPi) y un protón (H⁺). El PPi es transformado por la sulfurilasa en ATP, que junto con la Luciferina actúan como sustrato de la luciferasa para emitir luz. Posteriormente los dNTPs no empleados son desnaturizados por la apirasa para evitar ser incorporados en reacciones posteriores. La emisión de luz es proporcional a la cantidad de ATP presente en el micropocillo por lo que una repetición de tres nucleótidos idénticos produce una emisión de luz más intensa que una incorporación de una única base. No obstante, una de las principales limitaciones de este método son las repeticiones de más de cuatro nucleótidos idénticos, que pueden producir lecturas erróneas (185). Este proceso está representado gráficamente en la Figura 5.

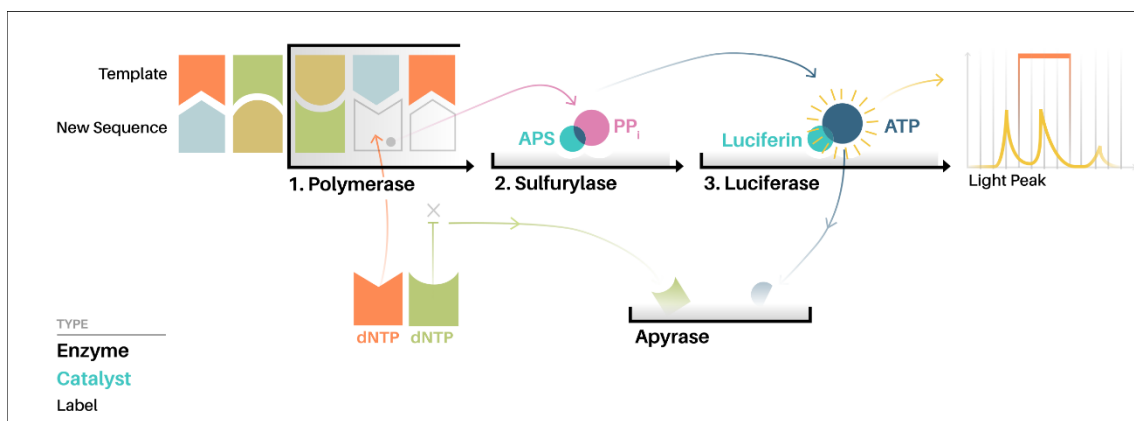


Figura 5: Representación gráfica de la base enzimática de la Pirosecuenciación.

Realizado por Jacopo Pompili, DensityDesign Research Lab". -How Pyrosequencing Works. Obtenido bajo licencia CC.

Esta tecnología fue producida bajo licencia por la compañía 454 Life Sciences (USA) que presentó al mercado los primeros secuenciadores NGS comerciales que permitieron aumentar de forma crítica la capacidad de secuenciación de muchas instituciones, facilitando y dinamizando el trabajo de secuenciación (188). No obstante, esta tecnología no tardó en ser sobrepasada por sistemas más capaces y en la actualidad está prácticamente obsoleta.

1.7.2.2 *Secuenciación de semiconductores de iones*

El funcionamiento es muy similar a la pirosecuenciación, pero a diferencia de ésta, se ha mantenido competitiva por su menor coste operacional y por mayor velocidad de secuenciación (189). En este caso, en los micropocillos se encuentra un semiconductor metal-óxido que es capaz de detectar con mucha precisión los cambios en el pH de una solución (190). Para su funcionamiento no es necesario ninguna acción enzimática aparte de la de la polimerasa, que al elongar la hebra con el dNTP correspondiente libera PPI y un H⁺, y es precisamente el aumento de concentración de H⁺ lo que mide el semiconductor con precisión. Esta tecnología es algo menos compleja que la pirosecuenciación debido a que, entre otras cosas, requiere menor maquinaria enzimática y no requiere de nucleótidos especiales, pero comparte el problema de la lectura errónea de homopolímeros. En la actualidad, es la tecnología con la segunda cuota de mercado más amplia disponiendo de secuenciadores de alta producción como el Ion GeneStudio S5 (ThermoFisher Scientific, USA).

1.7.2.3 *Secuenciación por ligación*

En 2005, Shendure *et al.* propusieron un nuevo método de secuenciación que utilizaba nonámeros degenerados fluorescentes con la base central como única diferencia en la que presentaba un nucleótido en particular, y éstos se unían al fragmento a secuenciar mediante una ligasa. Toda la reacción ocurría en una celda de flujo acoplada a un microscopio y mediante un software informático era posible ir registrando la fluorescencia para obtener posteriormente una secuencia (191). Basándose en este método, Applied Biosystems desarrolló una tecnología conocida como SOLiD (del inglés *Sequencing by Oligo Ligation and Detection*) en el que utilizaban octámeros marcados fluorescentemente, que en vez de un único nucleótido característico presentaban parejas de nucleótidos, bien en las posiciones 1 y 2 o en las 4 y 5, dependiendo del ciclo de secuenciación (192). Debido a la doble lectura de las posiciones se trata de un método con una alta fidelidad por nucleótido, pero que sin embargo requiere de un tiempo relativamente prolongado de hasta 6 días para obtener las secuencias. Además, si bien esta plataforma no sufre tanto con los homopolímeros como las mencionadas previamente produce

lecturas relativamente cortas, por lo que regiones con secuencias extensas muy repetitivas tampoco pueden ser secuenciadas con facilidad mediante este método. Debido a su precio muy competitivo, en los primeros años del siglo XXI fue una plataforma de secuenciación popular, aunque en los años 20 del siglo XXI su uso se encuentra en franco descenso.

1.7.2.4 Secuenciación Illumina

Probablemente la tecnología de secuenciación más extendida en la actualidad sea la desarrollada por Balasubramanian y Klenerman a finales del siglo XX, conocida primero como Solexa pero popularizada ya dentro de la compañía Illumina (193). En este método, en la preparación de la librería en vez de utilizar partículas paramagnéticas y una PCR de emulsión, como en la secuenciación 454 o en la secuenciación de semiconductores de iones, en la *flowcell* se encuentran un conjunto de oligonucleótidos complementarios a los adaptadores. En ella se produce una amplificación mediante una PCR en fase sólida, en lo que se conoce como amplificación en puente, en la que el fragmento a amplificar forma puentes al unirse por ambos extremos a la superficie de la *flowcell* mediante los adaptadores fijados a la misma para que se produzca la amplificación. Esta reacción genera una serie de agrupaciones o clústeres de secuencias clonales a partir de cada una de las moléculas de ADN originales que se han unido a la *flowcell* (194).

La secuenciación propiamente dicha ocurre utilizando secuencialmente dNTPs modificados en el que se añade el fluoróforo en el extremo 3' que impide la elongación de la hebra de ADN hasta que es eliminado después de la lectura, en lo que se conoce como secuenciación por síntesis mediante terminador reversible (195). Una vez producida la unión se excitan los fluoróforos con láseres específicos y así se consigue la secuenciación en cada una de las posiciones. Después de esta lectura se limpian los restos de ADN-polimerasa y los nucleótidos y se libera el extremo 3' para proseguir con el próximo ciclo. Típicamente los secuenciadores de Illumina secuencian primero en un sentido el fragmento de ADN y posteriormente en el contrario, por lo que se producen lecturas pareadas que aumentan la fiabilidad de las mismas y permiten identificar reorganizaciones genéticas con mayor precisión (196). En la Figura 6 está representado gráficamente el proceso.

Uno de los secretos del éxito de esta tecnología, además del alto grado de fiabilidad por base de las secuencias generadas, es el amplio abanico en el que se presentan los secuenciadores pudiendo contar con equipos compactos como el iSeq 100, que producen unos 1.2 Gb de información por *run*, hasta secuenciadores de producción industrial como el Novaseq 6000 que producen hasta 6000 Gb por *run*, pasando por una amplia gama de secuenciadores

intermedios.

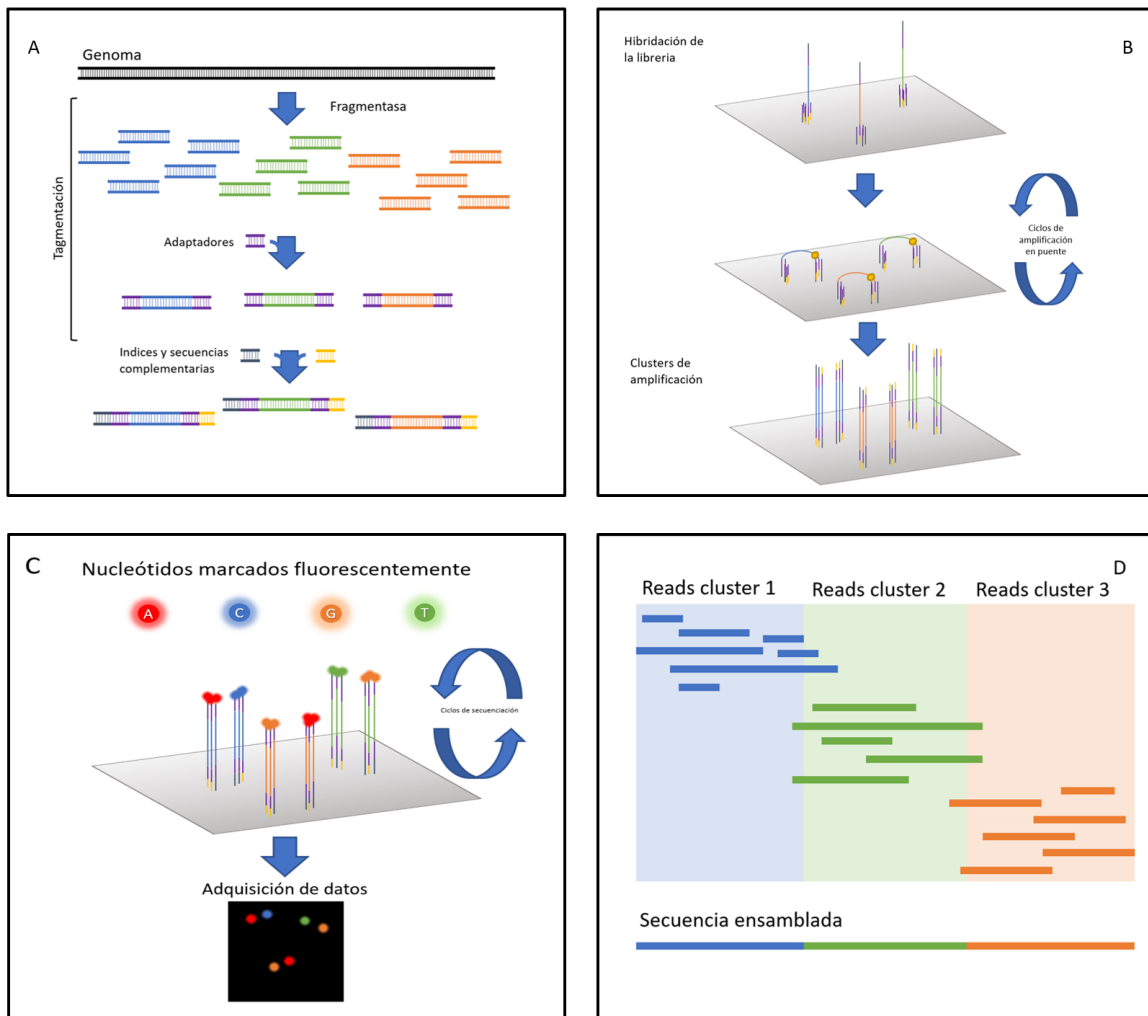


Figura 6: Representación esquemática del proceso de secuenciación mediante la tecnología de Illumina.

A) Preparación de la librería. B) Hibridación y amplificación de la librería. C) Secuenciación por síntesis. D) Ensamblado de la secuencia. Adaptado de Illumina

1.7.3 Secuenciación de tercera generación

La frontera entre las técnicas de segunda y tercera generación no está claramente establecida, sin embargo, se consideran técnicas de tercera generación a aquellas capaces de generar lecturas extremadamente largas que podrían ser empleadas para secuenciar moléculas completas de ADN en una única lectura (197).

1.7.3.1 Secuenciación PacBio

La tecnología de secuenciación PacBio (Pacific BioSciences, USA) trata de explotar la actividad enzimática de una ADN-Polimerasa a tiempo real. Para ello, hace uso de una estructura nanofotónica conocida como *zero-mode-waveguide* (ZMW) que permite el análisis de

volúmenes en torno al zeptolitro (10^{-21} litros) y, por lo tanto, de moléculas únicas de ADN. Por otro lado, debieron desarrollar dNTPs marcados con un fluoróforo en su grupo fosfato terminal, que no impide la elongación de la cadena. Estas dos innovaciones junto con el uso de una ADN-polimerasa especialmente diseñada para no perder actividad utilizando estos dNTPs modificados permite medir la fluorescencia producida cuando el dNTP marcado se une a su base complementaria y que desaparece al producirse el enlace fosfodiéster (198) tal y como se muestra en la Figura 7.

Si bien la calidad de las lecturas obtenidas es claramente inferior a las secuencias de Illumina, mediante esta tecnología se producen lecturas mucho más largas lo que es una clara ventaja a la hora de tratar de ensamblar y alinear las lecturas obtenidas (199).

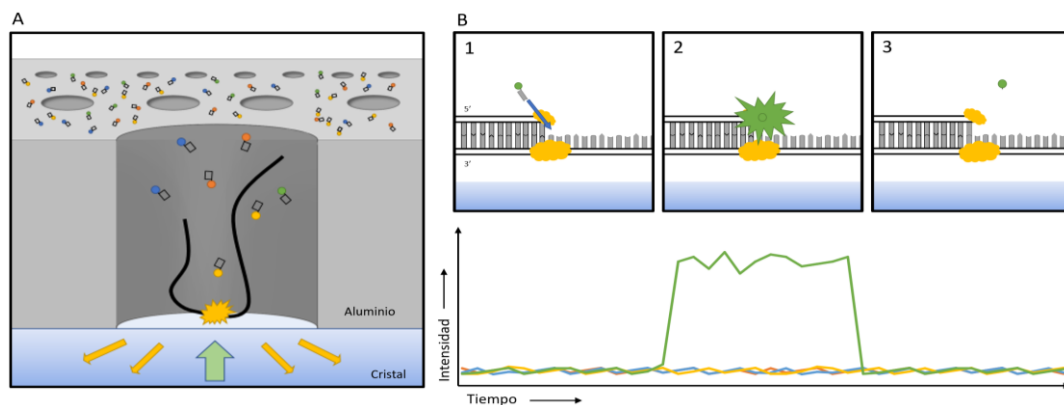


Figura 7: Principio de acción de la tecnología de secuenciación PacBio.

A) Nanoestructura zero-mode-waveguide (ZMW), que permite la excitación de volúmenes muy pequeños del orden del zeptolitro y por lo tanto permite la detección de la fluorescencia emitida por la unión de nucleótidos individuales. B) Representación esquemática de la incorporación de los dNTP en la secuenciación PacBio. (1) El dNTP correspondiente es incorporada por la polimerasa en su sitio activo, (2) causando una elevación de la fluorescencia en el canal correspondiente. (3) Tras producirse la unión fosfodiéster el residuo fluorescente se libera y es lavado de la ZMW permitiendo la incorporación de un nuevo dNTP y un nuevo ciclo. Adaptado de Eid et al. (198).

1.7.3.2 Secuenciación Nanopore

La tecnología de secuenciación patentada por Oxford Nanopore Technologies (ONT) es una de las más prometedoras y ha tenido un rol clave en el aumento de la capacidad de secuenciación en muchos servicios de microbiología clínica, especialmente posibilitando la realización de secuencias de genoma completo del virus SARS-CoV-2 (200).

El principio en el que se basa este tipo de secuenciación es radicalmente distinto a los anteriormente mencionados. Básicamente en las *flowcell* de Nanopore existen dos compartimentos separados por una membrana con diferente carga eléctrica, que están comunicados por un conjunto de poros a través de los cuales fluye corriente eléctrica. Esta corriente puede medirse en cada poro individualmente y se ve interrumpida cuando una

molécula penetra dentro del poro de diferente forma dependiendo de la molécula que esté atravesando el canal. El proceso de esta tecnología se indica con detalle en la Figura 8.

Los primeros pasos para la secuenciación mediante nanoporos se llevaron a cabo en 1996 por Kasianowicz *et al.* quienes demostraron en una prueba de concepto que era posible medir la interrupción de la corriente iónica que se producía cuando un polinucleótido atravesaba un poro, en este caso una α -hemolisina de *Staphylococcus aureus* (201). No obstante, estos nanoporos naturales no eran capaces de diferenciar entre las distintas bases, para lograrlo fue necesario, por un lado el desarrollo de un poro con unas características físicas más idóneas, lo que se logró con una α -hemolisina modificada (202), y combinarla con una proteína motora, como la phi29 ADN-Polimerasa, que enlentezca el transcurso de la molécula de ADN a través del poro. Esta combinación permite aumentar la sensibilidad de esta tecnología lo suficiente como para poder secuenciar moléculas de ADN con exactitud (203).

En 2014, basándose en estos avances, ONT comercializó su primer secuenciador el MinION, un dispositivo de un tamaño reducido y portable que ha permitido, por ejemplo, poder llevar a cabo un control *in situ* de la epidemia de Ébola a finales de 2014 (204). Desde entonces se han desarrollado equipos de mayor capacidad como el GridION o el PromethION que sitúan a estos secuenciadores a la par de otras plataformas de secuenciación (205). También se han desarrollado versiones reducidas de las *flowcell* utilizadas por estos equipos como la *flongle*, con una capacidad de unos 2 Gb, adecuada para la secuenciación de genomas bacterianos sin necesidad de multiplexar los experimentos sin aumentar excesivamente los costes (206).

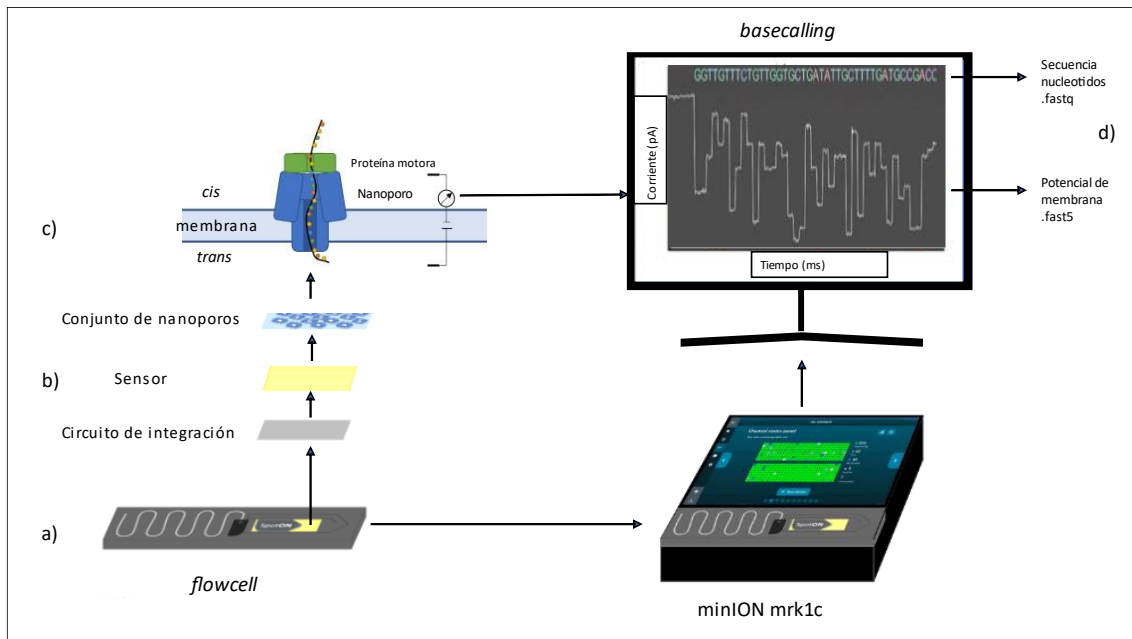


Figura 8: Funcionamiento de la Tecnología de Oxford Nanopore.

a) Cada flowcell de MinION contiene 512 canales con hasta 4 nanoporos por canal (máximo teórico de 2048 nanoporos por flowcell). b) Estos canales están embebidos en una membrana de un polímero electrorresistente y cuentan cada uno con un sensor individual, cuyas señales son recogidas en el circuito de integración. La corriente iónica transcurre a través del nanoporo porque se genera un potencial de membrana mediante un voltaje constante, siendo la región transmembrana positiva y la cis-membrana negativa. c) Cuando la molécula de ADN o ARN penetra en el nanoporo facilitada por la proteína motora se produce un cambio en la corriente que el sensor es capaz de registrar. d) En el caso del minION mrk1c, además de registrar los cambios en la corriente iónica en los archivos .fast5 este sistema es también de realizar el basecalling o llamada de bases y generar secuencias de nucleótidos en un formato .fastq.

Una de las desventajas de esta tecnología, al igual que con PacBio, es la relativa baja fiabilidad de las secuencias comparando con otras tecnologías más establecidas como Illumina. En el caso de Nanopore se han dado grandes avances: por un lado, en el desarrollo de nuevas versiones del nanoporo y la proteína motora; y por otro, con mejores algoritmos para la llamada de bases. En 2022, la versión de *flowcell* más extendida es la R9.4.1, que mantiene una fiabilidad notablemente mayor que las de las primeras versiones con una velocidad de secuenciación elevada, alrededor de 400 bases por segundo (205). Versiones posteriores como la R10.1 añaden un segundo lugar de medición de la corriente eléctrica lo que mejora la exactitud de las lecturas, en especial de homopolímeros, a coste de una menor velocidad de secuenciación y una menor cantidad total de lecturas (207).

Por otro lado, el proceso de convertir las interrupciones en la corriente iónica en bases, en lo que se conoce como proceso de llamada de bases o *basecalling* también ha sufrido notables mejoras a lo largo del tiempo. En especial con el desarrollo de nuevos y mejores modelos de inteligencia artificial que permiten una mejora de la exactitud y la velocidad del *basecalling* (208).

1.7.4 Secuenciación masiva en Bacteriemias

En cierta medida el desarrollo de la NGS en bacteriemias, puede ser comparable al acontecido con otras técnicas moleculares no basadas en la secuenciación e incluso otras tecnologías, ya que los desafíos técnicos que se deben solventar son parecidos. En los últimos años se han comercializado numerosas soluciones comerciales que pueden ser divididas en dos grandes grupos: aquellas que se pueden emplear con sangre directamente extraída del paciente y las que requieren de hemocultivos positivos. Las primeras tienen un interés indudable, al poder ofrecer resultados de forma aún más precoz, sin tener que esperar a la positivización del hemocultivo, pero de momento se dispone de menor experiencia clínica con ellas (209), por su escasa proyección comercial. Este hecho es debido a diversas razones, generalmente son técnicas con un elevado coste económico por prueba, que además en muchas ocasiones requiere de equipamiento especializado. Por ejemplo, el sistema T2Dx (T2 Biosystems, EE.UU) al ser en definitiva un aparato de resonancia magnética requiere hasta unas instalaciones propias análogas a las empleadas con los equipos de diagnóstico por imagen.

Dentro de las técnicas moleculares se pueden encontrar tanto aquellas diseñadas para la detección de un solo microorganismo, acompañada o no de determinantes de resistencia, como el cartucho Xpert® MRSA/SA Blood Culture del sistema GeneXpert (Cepheid, EE.UU) para la detección de *S. aureus* (210), como paneles sindrómicos que concentren la detección de los microorganismos implicados más frecuentemente en una bacteriemia como el Sepsis Flow Chip (Master Diagnostica, España) (211).

El potencial de la NGS para el diagnóstico de las bacteriemias es indiscutible y en un futuro cercano se podrá disponer de aplicaciones específicas para el diagnóstico de bacteriemias mediante NGS desde sangre directa, sin esperar a la positivización del hemocultivo, que puedan acelerar el diagnóstico de las mismas (212,213). No obstante, debido al relativo bajo inóculo bacteriano presente en la sangre, y a que, por tanto, el ADN bacteriano represente menos del 10 % de las lecturas secuenciadas de sangre directa (212), y a la presencia de numerosos inhibidores en la sangre, esto sigue resultando un enorme desafío.

Por otro lado, la secuenciación de los hemocultivos positivos resulta técnicamente más sencilla y puede dinamizar el diagnóstico de la bacteriemia acortando el tiempo hasta obtener resultados sobre la sensibilidad antibiótica, al poder obtener datos de lo que se conoce como resistoma (214–216). Además de ello, con las secuencias se obtiene también información sobre factores de virulencia (217) y permite el desarrollo de análisis filogenéticos que pueden ser útiles en el contexto de un brote de origen nosocomial (218). Al mismo tiempo, es fundamental

recordar que en muchas ocasiones los métodos basados en NGS no son específicos de una especie bacteriana en concreto, por lo que son útiles también para el diagnóstico de microorganismos menos habituales, que no se incluyan en paneles sindrómicos, pero que pueden ser de interés clínico.

2 Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis de trabajo

2.1.1 Hipótesis principal

Los frascos de hemocultivo líticos, mediante un nuevo método de extracción ultrarrápido (UF), proporcionan un *pellet* bacteriano que puede ser empleado en estudios de identificación, determinación de la sensibilidad bacteriana y técnicas moleculares.

2.1.2 Hipótesis secundarias

- El uso de un nuevo protocolo de extracción UF para los hemocultivos líticos acelera la identificación del microorganismo causal de las bacteriemias.
- El método UF puede ser empleado para acelerar la preparación de los estudios de sensibilidad antimicrobiana automatizados.
- El método de extracción UF es un método válido para la preparación de librerías para la secuenciación desde hemocultivo positivo.

2.2 Objetivos del estudio

2.2.1 Objetivo principal

Comparar los resultados de identificación, sensibilidad antimicrobiana y secuenciación obtenidos a partir del *pellet* utilizando el nuevo método de extracción ultrarrápido (UF) con los obtenidos mediante el procesamiento habitual.

2.2.2 Objetivos secundarios

- Evaluar el rendimiento del método UF frente al método de doble centrifugación y a la identificación desde subcultivo en medio sólido para la identificación de microorganismos causantes de bacteriemia mediante MALDI-TOF.
- Evaluar el rendimiento del método UF frente al método del tubo separador de suero para la realización del inóculo bacteriano y al método de subcultivo en medio sólido para el estudio de sensibilidad mediante el sistema Phoenix BD.
- Evaluar la viabilidad del método UF como método previo a la extracción de ácidos nucleicos para la realización de secuenciación de genoma completo bacteriano mediante el secuenciador MinION.

3 Material y Métodos

3.1 Evaluación del rendimiento del método UF para la identificación mediante MALDI-TOF

3.1.1 Selección de las muestras

La evaluación del rendimiento del método UF se ha llevado a cabo en el laboratorio de microbiología clínica del Hospital Universitario Basurto: un hospital de tercer nivel con 680 camas en el que se procesan en torno a 18000 hemocultivos al año. Se seleccionaron todos los hemocultivos consecutivos con al menos un frasco positivo de BACTEC™ Lytic/10 Anaerobic/F flask (Becton Dickinson, EE.UU.) durante los meses de julio a octubre de 2020. Los hemocultivos polimicrobianos se excluyeron del análisis.

3.1.2 Identificación desde colonia

Siguiendo la práctica clínica habitual se realizó una tinción de Gram de todos los frascos positivos y un subcultivo en medio sólido en el agar BD Chocolate (36 ± 1 °C al 5 % CO₂) y BD Brucella con un 5 % de sangre de oveja, hemina y Vitamina K1 (36 ± 1 °C en atmósfera anaerobia). En caso de observar levaduras en la tinción de Gram se inoculó, adicionalmente, una placa de BD Chromagar Candida adicionalmente.

Tras 18 h de incubación se traspasaron colonias aisladas a la placa de MALDI-TOF MS. Cuando la colonia a identificar se trata de una levadura se dispensó 1 µl de ácido fórmico al 70 % sobre cada pocillo; y, tras dejar secar la solución, se depositó 1 µl de matriz HCCA. En el caso de identificar una bacteria solamente se utilizó 1 µl de matriz sin el paso previo con ácido fórmico (Figura 9).

Para el análisis MALDI-TOF MS se utilizó el sistema Microflex Smart LT (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) con el software propietario MALDI BIOTYPER 3.3 (Bruker Daltonics). Este método fue el *gold standard* en este estudio.

Tal y como se expuso en el apartado 1.5.3, en los sistemas MALDI-TOF MS de Bruker el nivel de similitud entre el espectro obtenido de un aislado clínico y el espectro de referencia se expresa mediante un *score*. Siguiendo las recomendaciones de Bruker, un *score* mayor de 2,0 indica una alta confianza en la identificación, un *score* entre 1,7 y 1,999 una de baja fiabilidad y con un *score* menor de 1,7 una identificación no fiable. Por lo tanto, en este trabajo sólo se han considerado los *scores* por encima de 1,7 como válidos.

3.1.3 Método de centrifugación diferencial

Para este método llamado de centrifugación diferencial (DC), se utilizaron 10 ml de hemocultivo positivo que se centrifugaron a 2000 rpm (750 x g) durante 10 min. El sobrenadante obtenido requiere de una nueva centrifugación a 13000 rpm (11000 x g) durante 2 minutos. Se descarta el sobrenadante y el *pellet* se resuspende en 1 ml de agua destilada. Esta solución se centrifuga nuevamente a 13000 rpm durante 2 min y tras descartar de nuevo el sobrenadante el *pellet* se deposita en la placa de MALDI como en el apartado 3.1.2. (Figura 9).

3.1.4 Método Ultrarrápido

Del frasco de hemocultivo positivo se obtiene 1 ml que se centrifuga a 13000 rpm (11000 x g) durante 2 minutos. Tras descartar el sobrenadante el *pellet* se deposita en la placa de MALDI igual que en los apartados previos (Figura 9).

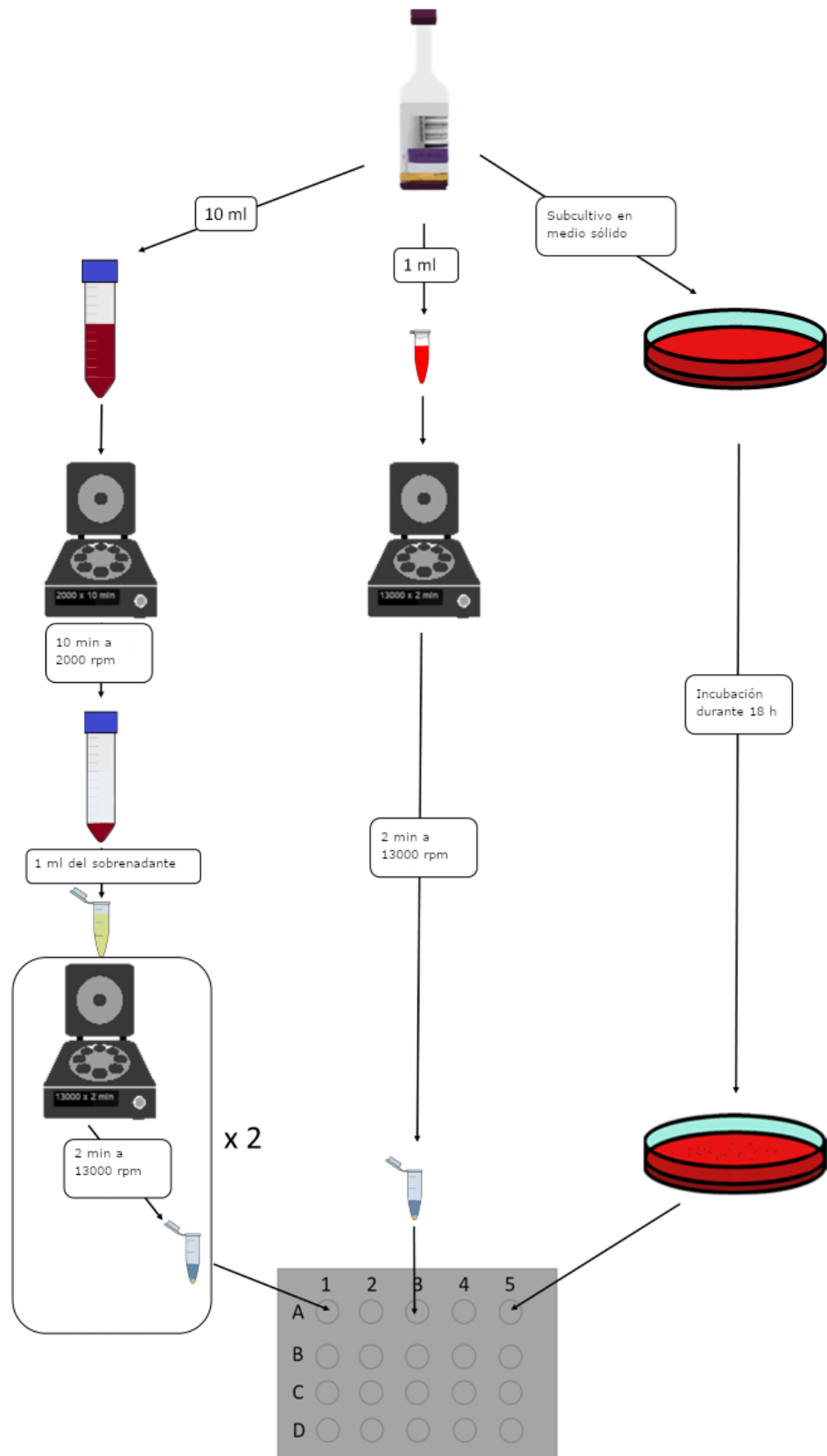


Figura 9: Representación esquemática de los tres métodos de identificación empleados.

A la izquierda el método de centrifugación diferencial, en el centro el método Ultrarrápido y a la derecha la identificación desde colonia considerada el gold standard en este estudio.

3.1.5 Análisis estadístico

Se calcularon las tasas de identificación de ambos métodos (método de centrifugación diferencial y método ultrarrápido), tanto a nivel de especie como a nivel de género, y se compararon con el *gold standard*, la identificación desde colonia. Así mismo, se calcularon las tasas específicas para las bacterias Gram negativas, Gram positivas y anaerobias. Adicionalmente se calcularon las tasas para *S. aureus*. La significación estadística se fijó con un valor de $p < 0,05$ para el test de Z. Los datos fueron analizados con el *software* IBM SPSS Statistics.

3.2 Evaluación del método UF para la realización de estudios de sensibilidad antimicrobiana

3.2.1 Selección de muestras

Para este apartado del estudio se seleccionaron todos los hemocultivos consecutivos con al menos un frasco BACTEC™ Lytic/10 Anaerobic/F positivo, independientemente del estado de su frasco aerobio emparejado, desde julio a agosto de 2021. Se excluyeron los hemocultivos polimicrobianos del análisis.

3.2.2 Método estándar

Se realizaron subcultivos en agar BD Chocolate (36 ± 1 °C al 5 % de CO₂) y en agar BD Brucella (36 ± 1 °C en atmósfera anaeróbica). Tras la incubación se seleccionaron colonias aisladas para realizar una suspensión 0,5 McFarland en el caldo ID BD Phoenix (Becton Dickinson, EE.UU) y se procesaron en el sistema Phoenix AP (Becton Dickinson, EE.UU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para los bacilos Gram negativos se utiliza el panel NMIC/ID-503, para *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp. el PMIC/ID-88 y para *Streptococcus* spp. el SMIC/ID-11. (Figura 10)

3.2.3 Método del tubo separador de suero

El método del tubo separador de suero (SST del inglés *Serum Separator Tube*) es el recomendado por el fabricante, Becton Dickinson, para la realización de estudios de sensibilidad

directamente desde el hemocultivo positivo (219). Para ello, se recogen 10 ml del hemocultivo positivo en un tubo separador de suero (Becton Dickinson, EE. UU.) y se centrifugan a $2000 \times g$ durante 10 minutos. Tras descartar el sobrenadante, el *pellet* obtenido se utiliza para preparar una suspensión 0,5 McFarland en el caldo ID BD Phoenix, para ser introducida en el sistema Phoenix AP (Figura 10).

3.2.4 Método Ultrarrápido

En este apartado el método UF es idéntico al descrito en el apartado 3.1.4, utilizando 2 ml del hemocultivo positivo y centrifugándolo a 13000 rpm ($11000 \times g$) durante 1 minuto. Tras descartar el sobrenadante, el *pellet* se utiliza para preparar una suspensión 0,5 McFarland en el caldo BD Phoenix apta para el sistema Phoenix AP (Figura 10).

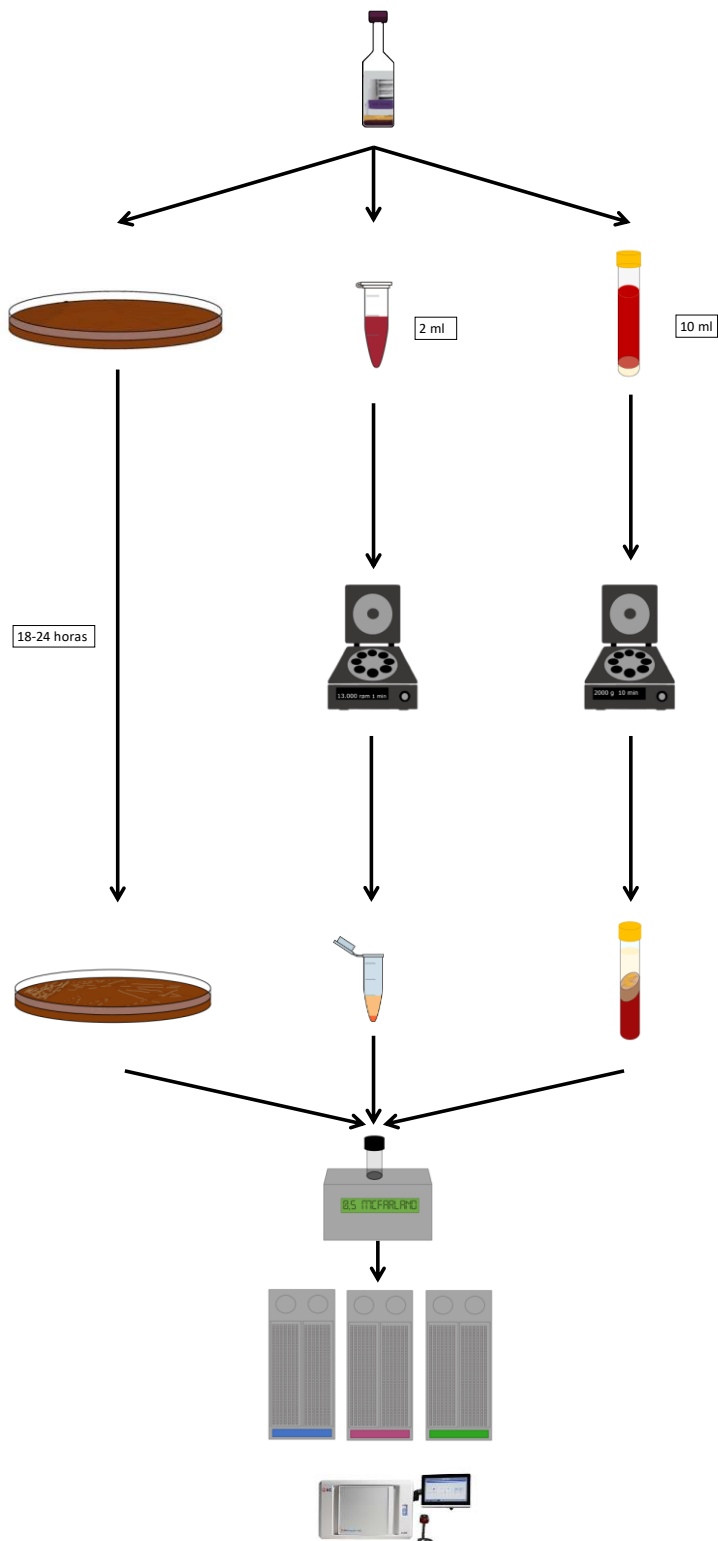


Figura 10: Diagrama de los tres flujos de trabajo

A la izquierda el método de subcultivo en medio sólido, en el centro el método Ultrarrápido UF y a la derecha el método del tubo separador de suero.

3.2.5 Interpretación de los resultados y análisis estadístico

Los resultados de sensibilidad antimicrobiana se interpretaron utilizando los puntos de corte de la versión 9.0 de EUCAST (220). Por lo tanto, para este estudio se definieron el acuerdo categórico (AC) cuando los resultados de las pruebas de sensibilidad están en la misma categoría. Los errores se clasificaron de la siguiente manera: errores fatales (VME del inglés *very major error*) cuando un resultado del SST o UF es sensible, pero mediante el método *gold standard* se obtiene un resultado resistente; errores mayores (ME del inglés *major error*) cuando el método SST o UF obtiene un resultado resistente y el método de referencia sensible; errores menores (mE del inglés *minor error*) cuando de uno de los métodos se obtiene un resultado intermedio y del otro un resultado resistente o sensible.

Debido a que el sistema Phoenix permite también la identificación del microorganismo, se analizaron los resultados de la identificación mediante tasas de concordancia entre los resultados obtenidos mediante el sistema Phoenix BD con los diferentes métodos y la identificación definitiva. Se fijó el nivel de significación estadística a $p < 0,05$ y ésta fue calculada mediante una prueba de X^2 .

3.3 Evaluación del método UF para la preparación de librerías de secuenciación masiva

3.3.1 Selección de muestras y preparación de los hemocultivos

Para el desarrollo de esta prueba de concepto se decidió realizar esta técnica con 11 aislados de *K. pneumoniae*, incluyendo 9 aislados clínicos productores de carbapenemasa aislados en el Hospital Universitario Basurto en el año 2021, un aislado clínico no productor de carbapenemasa y un control de calidad de la SEIMC, con un fenotipo de betalactamasa de espectro extendido con resistencia a inhibidores de betalactamasa. Además de la identificación mediante MALDI-TOF, el estudio de la sensibilidad mediante el sistema Phoenix BD y la detección de mecanismos de resistencia habituales, tres de los aislados estaban previamente caracterizados mediante secuenciación masiva en un sistema MiSeq de Illumina.

Las cepas estaban conservadas a -80 °C en una suspensión de glicerina y para recuperarlas se sembraron en un agar BD Chocolate ($36 \pm 1\text{ °C}$ al 5 % de CO_2 durante 18 h). Las tres muestras previamente caracterizadas fueron secuenciadas directamente desde la placa de chocolate.

Con las ocho cepas restantes y una de las secuenciadas previamente se realizó un hemocultivo simulado: tras realizar una suspensión 0,5 McFarland en suero fisiológico se

añadieron 100 µl a 5 ml de sangre de donante sano y todo ello se inoculó en el frasco de hemocultivo BD Bactec Lytic/10 Anaerobic/F. Estos hemocultivos se incubaron en las mismas condiciones que los hemocultivos de rutina en el sistema BD BACTEC FX hasta que el equipo los confirmó como positivos.

3.3.2 Extracción de ADN

Para la extracción desde hemocultivo positivo, al igual que en los apartados anteriores, se utilizó el método UF para la extracción del ADN. Para ello, 2 ml del hemocultivo positivo se centrifugaron durante 2 minutos a 13000 rpm (11000 x g). Tras descartar el sobrenadante el *pellet* se resuspendió en 400 µl de agua de grado. Ambas suspensiones tanto las realizadas desde colonia como las del método UF se extraen mediante el kit Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche, Suiza) en el equipo MagNA Pure (Roche, Suiza), obteniendo un volumen final de 100 µl.

Para obtener un eluido de mejor calidad y libre de inhibidores se optó por realizar una purificación adicional del ADN realizando un lavado con partículas magnéticas con NEBNext sample purification beads (New England Biolabs, EE.UU.), que consiste en mezclar 50 µL de eluido y 50 µL de las partículas magnéticas en un tubo transparente libre de nucleasas e incubarlas durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, el tubo se posiciona en un soporte magnético hasta que se forme un *pellet* y la solución quede totalmente transparente (unos 3 minutos). Sin retirar el tubo del soporte, se desecha el sobrenadante y se realizan dos lavados de 30 segundos con etanol al 80 % recién preparado. Tras retirar todo el volumen residual de alcohol, se saca el tubo del soporte magnético y el *pellet* se resuspende con 50 µL de agua libre de nucleasas y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente. Por último, nuevamente se posiciona el tubo en un soporte magnético hasta que la solución quede totalmente transparente y se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo libre de nucleasas.

A continuación, se cuantifica el ADN del eluido empleando el kit dsDNA HS (ThermoFisher Scientific, EE.UU.) en un dispositivo Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen, EE.UU.) y también en el equipo NanodropOne (ThermoFisher Scientific, EE.UU.), que además aporta información sobre la pureza del eluido obtenido. Se consideran válidos los valores de concentración obtenidos mediante la fluorometría, por ser más precisos (221). Para este estudio se consideraron muestras aptas para la secuenciación aquellas con un cociente A260/A280 entre 1,8 y 2,0, y cociente A260/A230 entre 2,0 y 2,2 según las recomendaciones establecidas para la secuenciación con los secuenciadores de Oxford Nanopore Technologies (222).

3.3.3 Preparación de librería, cebado de la *flowcell* y secuenciación

Para la preparación de la librería se utilizó el Rapid Sequencing Kit (ONT, Reino Unido) en su versión para *flongle* (FLO-001) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El protocolo consiste en: ajustar la concentración del ADN del eluido para obtener 400 ng de ADN en 7,5 µL de volumen, a los que se añadieron 2,5 µL de fragmentasa e incubación durante 1 min a 30 °C y 1 min a 80 °C. A continuación, se añadió 1 µL de *Rapid Adapter* y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Se prepara una solución con 117 µL de *Flush Buffer* y 3 µL de *Flush Tether* y se ceba la *flongle* con esos 120 µL. Por último, se prepara la librería final con 15 µL de *Sequencing Buffer*, 10 µL de *Loading Beads* y 5 µL de la solución incubada con el *Rapid Adapter*, para cargar finalmente los 30 µL de la librería en la *flongle*.

El experimento de secuenciación se mantiene durante 24h con el *basecalling* activado con el programa *High Accuracy Basecalling* (HAC) en el MinION mrk1c.

3.3.4 Análisis bioinformático

3.3.4.1 Control de calidad de los experimentos de secuenciación

La calidad de una secuencia se suele expresar como la probabilidad de acierto de cada nucleótido llamado en el *basecalling*. Una de las escalas de calidad más extendida es el nivel de calidad de Phred, que surgió en un principio como una medida de la probabilidad de acierto por base que tenía un algoritmo de *basecalling* llamado PHRED, pero en la actualidad es empleado en la mayoría de procesos de llamada de bases (223). Esta escala tiene una relación logarítmica con la probabilidad de fallar que tiene cada base y puede ser expresada con la siguiente fórmula:

$$P = 10^{\frac{-Q}{10}}.$$

Por lo tanto, cuando se indica que un nucleótido tiene un nivel de calidad de Phred de 10 (Q=10), indica que tiene una precisión del 90 %. En los archivos .fastq cada nucleótido viene acompañado de un valor Q, que puede ser consultado individualmente. Además, muchas plataformas de secuenciación (incluidas las de ONT) asignan un valor Q a cada una de las lecturas, que se corresponde a la media de los valores Q de los nucleótidos que las componen. En este estudio se ha mantenido el valor de Q recomendado por el fabricante, de Q = 8, para excluir las lecturas que no alcancen un 84,16 % de precisión.

Además de los valores de calidad de las lecturas, también se ha recogido el número total y la longitud de las mismas, expresado como media y mediana, también conocida como N50.

Estos datos han sido relacionados con el número de poros disponible al inicio de la secuenciación.

3.3.4.2 *Análisis de secuencias crudas (raw data)*

El *software* que gobierna los secuenciadores de ONT es conocido como MinKNOW y permite un grado elevado de personalización. En este caso, la *flongle* empleada al ser una *flowcell* de menor capacidad (produce unos 2 Gb de información en lugar de los 20 Gb que se pueden obtener de una *flowcell* completa), el MinION mrk1c es capaz de llevar a cabo el *basecalling* más avanzado y demandante de recursos, como es el HAC. Para esta aplicación se configuró el equipo para generar un archivo de datos separado cada 1000 lecturas, de manera que se van obteniendo datos de la secuenciación a tiempo real.

Estas secuencias en formato .fastq pueden ser analizadas con el programa EPI2ME, *software* propietario (es decir *software* no libre) de ONT, que permite la realización de multitud de análisis en línea de manera gratuita. Para ello, las secuencias son subidas a los servidores de Amazon cloud y se analizan utilizando la potencia computacional de los mismos, requiriendo apenas conocimientos bioinformáticos.

El *pipeline* que se seleccionó en este estudio es el protocolo “Fastq Antimicrobial Resistance” que realiza dos análisis sobre las lecturas (224,225). Por un lado, asigna cada una de las lecturas a una especie, ya sean de origen viral, bacteriano o incluso lecturas de origen humano, en un proceso conocido como WIMP (del inglés “*What’s in my pot?*”); y, por otro lado, en esas mismas lecturas realiza una búsqueda de alineamientos con genes de resistencia antimicrobiana presentes en la base de datos “*Comprehensive Antibiotic Resistant Database*” (CARD) (226).

En el presente estudio, se analizaron las lecturas obtenidas a las 1, 3, 6, 12 y 24 horas de inicio de la secuenciación.

3.3.4.3 *Ensamblado*

Se conoce como ensamblado al proceso de obtener una secuencia consenso desde múltiples fragmentos de una secuencia de ADN. En el presente estudio se realizó un ensamblado *de novo*. Para ello se utilizó la plataforma EPI2ME Labs, también *software* propietario de ONT. Este programa mediante el uso de Jupyter Notebooks, una aplicación que permite combinar líneas de código informático (por ejemplo, en Python) con elementos de texto enriquecido, pone

a disposición de usuarios con conocimientos intermedios, herramientas bioinformáticas más avanzadas sin prescindir del todo de una interfaz gráfica.

Esta plataforma dispone de varios tutoriales que guían en el uso de la misma, en concreto para esta aplicación se empleó una adaptación del *Assembly tutorial*, que realiza el ensamblado *de novo* mediante Flye (227). Este algoritmo, desarrollado en 2018 por Kolmogorov *et al.*, fue diseñado específicamente para el ensamblado de secuencias con lecturas largas como las que se obtienen de los secuenciadores de ONT.

La relativa abundancia de secuencias repetitivas presentes en muchos genomas representa uno de los mayores desafíos bioinformáticos con respecto al ensamblado de los mismos. A diferencia de los métodos basados en grafos de Bruijn, que emplean el solapamiento de k-meros para ensamblar secuencias desde lecturas cortas y una fidelidad por base muy alta (como las obtenidas de los secuenciadores Illumina), Flye utiliza gráficos de repetición. Para ello, el algoritmo genera en primera instancia una aproximación a la secuencia consenso obviando los fragmentos repetitivos en el genoma en una estructura que los autores denominan *disjointig*. A continuación, el algoritmo produce un alineamiento local de la secuencia consigo misma e identifica regiones repetitivas en ese mismo genoma. De ese alineamiento surge el grafo de repetición, en el que se representan los fragmentos repetidos flanqueados por nodos a los que llegan o de los que parten dos o más fragmentos no repetidos. A continuación, se procede a alinear las lecturas buscando aquellas que comprendan al menos dos nodos del grafo de repetición, conocidas como *bridged repeats* (repeticiones salvadas por lecturas que las atraviesan). Una vez resueltas, Flye intenta aclarar aquellas repeticiones que no tienen lecturas que discurran por dos de los nodos (*unbridged repeats*). Para ello busca lecturas que discurran por ambas secuencias de entrada y uno de los nodos, con el objetivo de reducir la secuencia repetida en longitud y poder encontrar lecturas que cubran el espacio entre los dos nuevos nodos (227).

Tras obtener una secuencia consenso mediante Flye se realizó una corrección de errores mediante Medaka (228), una red neuronal entrenada específicamente para la corrección de errores en el ensamblaje de genomas secuenciadas con tecnología de ONT y ensambladas mediante Flye, del que se obtiene finalmente una secuencia consenso en formato .fasta.

Para poder comprobar la fiabilidad de la secuencia consenso en algunas mutaciones puntuales se generó el archivo .bam que pueden ser visualizados utilizando Ugene (Unipro, Rusia) (229) para comprobar la cobertura existente en las mutaciones puntuales.

3.3.4.4 Análisis de secuencia consenso

Las secuencias consenso obtenidas fueron analizadas posteriormente mediante diversas bases de datos. Son todas ellas herramientas accesibles y gratuitas que permiten el análisis de genomas bacterianos en línea y sin necesidad de grandes capacidades de computación.

3.3.4.4.1 Identificación de especie y secuenciotipo MLST

Para la identificación a nivel de especie de las secuencias obtenidas se han utilizado dos herramientas: Pathogenwatch y SpeciesFinder. Pathogenwatch (<https://pathogen.watch/>) es una plataforma en línea que permite almacenar secuencias y relacionarlas con sus metadatos, especialmente de fecha y localización geográfica del aislado. Además, también permite la identificación a nivel de especie del genoma analizado, así como la realización *in silico* de la tipificación multilocus de secuencias (MLST del inglés *Multilocus Sequence Typing*). SpeciesFinder es una herramienta del *Center for Genomic Epidemiology* (CGE), un organismo dependiente de la Universidad Técnica de Dinamarca, que permite la identificación de especies bacterianas mediante el análisis del gen que codifica la subunidad 16S del ARN ribosómico (230).

Para la obtención del secuenciotipo MLST se han analizado las secuencias tanto con Pathogenwatch como una herramienta del CGE conocida como MLST 2.0 (231).

3.3.4.4.2 Detección de determinantes de resistencia

Para el análisis de los determinantes de resistencia se han comparado los resultados obtenidos desde las secuencias crudas con los obtenidos desde la secuencia consenso en tres bases de datos diferentes: Pathogenwatch, que incluye el análisis de los determinantes de resistencia para algunas especies bacterianas incluyendo *K. pneumoniae* complex, Resfinder (232) del CGE y CARD (226). Adicionalmente, se han comparado los determinantes de resistencia obtenidos mediante ResFinder con los datos de sensibilidad fenotípica de los aislados obtenidos del Sistema informático del laboratorio.

3.3.4.4.3 Detección de estructuras plasmídicas

Para la detección de genes relacionados con plásmidos en los genomas analizados en el presente estudio, principalmente complejos de incompatibilidad, se han utilizado tanto Pathogenwatch como una herramienta específica del CGE conocida como PlasmidFinder (233). Además, se han analizado la presencia de los complejos de incompatibilidad en los diferentes *contigs* y su relación con los determinantes de resistencia.

3.3.4.4.4 Detección de determinantes de virulencia

Klebsiella pneumoniae complex es un microorganismo con una actividad patogénica probada que es capaz de causar infecciones tanto comunitarias como IRAS, que incluyen infecciones del tracto urinario, neumonía, infecciones intraabdominales, bacteriemias, meningitis y abscesos hepáticos piógenos. Los principales determinantes de virulencia que presentan son la producción de cápsula, de lipopolisacáridos, de sideróforos (yersiniabactina, colibactina, salmochelina y aerobactina) y las fimbrias de tipo 1 y 3 (234). El fenotipo mucoso hipervirulento de *K. pneumoniae* se considera uno de los determinantes de virulencia más importantes y está regulado por los genes *rmpADC* y *rmpA2* con dos vías de actuación diferentes (235).

Pathogenwatch permite ejecutar de forma sencilla la herramienta Kleborate (236), que analiza varios de estos loci de virulencia y patogenicidad, incluyendo la presencia de sideróforos, los genes *rmpADC/rmpA2* y la predicción del capsulotipo K y O mediante Kaptive (237,238). Adicionalmente, se han utilizado la herramienta ABRicate (239) y la base de datos *The Virulence Factor Database* (VFBD) (240) para analizar los determinantes de virulencia de los aislados del presente estudio.

Se han comparado los resultados obtenidos mediante la herramienta web Pathogenwatch con los obtenidos mediante ABRicate.

3.3.5 Valoración por el comité ético de investigación

Algunos resultados parciales del presente estudio fueron presentados en el trabajo de fin de Máster de Juan Carlos Forero Niampira titulado “Identificación, detección de genes de resistencia de betalactamasas y tipado molecular de *Klebsiella pneumoniae* a partir de hemocultivo mediante secuenciación masiva” y ha sido evaluado por el comité ético de investigación del Hospital Universitario Basurto (120.22 CEIHUB), que considera que su realización no ha conllevado problemas éticos, ni ha vulnerado derechos y garantías de confidencialidad de los pacientes y se ha realizado según la legislación española de protección de datos tal y como se puede observar en el Anexo I. Además, se dispone de consentimiento informado y autorización expresa de los donantes sanos cuya sangre fue utilizada para la simulación del hemocultivo.

4 Resultados

4.1 Evaluación del rendimiento del método UF para la identificación mediante MALDI-TOF

Para evaluar el rendimiento del método ultrarrápido (UF) para la identificación directa de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF se ha comparado tanto con el método establecido previamente en el laboratorio, el método de centrifugación diferencial (DC), como con la identificación definitiva desde subcultivo en medio sólido.

Durante el periodo de estudio se han procesado un total de 176 hemocultivos con frascos Lytic/10 Anaerobic/F positivos. Se han excluido 19 hemocultivos polimicrobianos del estudio. Los aislados analizados se distribuyen de la siguiente manera: 75 microorganismos Gram negativos entre los cuales destaca *E. coli*, 72 Gram positivos siendo el más frecuente *S. epidermidis*, 8 bacterias anaerobias y 2 levaduras. Los resultados completos son los representados en la Tabla 6.

Tabla 6: Identificación definitiva de los aislados analizados en este estudio

Especie	n	Especie	n
Gram negativos	75	Gram positivos	72
<i>Enterobacter cloacae</i>	6	<i>Bacillus cereus</i>	1
<i>Enterobacter hormaechei</i>	2	<i>Corynebacterium</i> spp.	1
<i>Escherichia coli</i>	46	<i>Corynebacterium striatum</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	<i>Enterococcus faecalis</i>	3
<i>Proteus mirabilis</i>	6	<i>Enterococcus faecium</i>	1
<i>Salmonella enteritidis</i>	1	<i>Staphylococcus aureus</i>	16
Anaerobios	8	<i>Staphylococcus capitis</i>	4
<i>Anaerococcus lactolyticus</i>	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	25
<i>Anaerococcus nagyae</i>	1	<i>Staphylococcus hominis</i>	5
<i>Bacteroides fragilis</i>	3	<i>Staphylococcus intermedius</i>	1
<i>Clostridium innocuum</i>	1	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	1
<i>Eggertella lenta</i>	1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2
<i>Facklamia languida</i>	1	<i>Streptococcus anginosus</i>	2
<i>Peptoniphilus harei</i>	1	<i>Streptococcus cristatus</i>	2
Levaduras	2	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2
<i>Candida tropicalis</i>	2	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	1
		<i>Streptococcus oralis</i>	3
		<i>Streptococcus</i> spp.	1
TOTAL			157

4.1.1 Concordancia general

El *score* medio para ambos métodos, el UF y el DC, fue similar en torno a 1,81, aunque los resultados del método UF tienen una desviación estándar (ds) inferior a la del método DC, siendo de 0,36 y 0,4 respectivamente. (Tabla 7)

Si solo se comparan los *scores* > 1,7 como válidos, el método UF consigue 106 resultados (67,51 %). Todos ellos coinciden con la identificación final a nivel de género y 103 (97,17 %) también a nivel de especie. El método DC, por el contrario, solamente consigue 83 (53,5 %) muestras con resultados válidos de los cuales 83 (98,8 %) coinciden con la identificación definitiva a nivel de género y 81 (96,42 %) a nivel de especie. La diferencia entre ambos métodos es estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Durante el estudio se han detectado dos candidemias, ambas causadas por *Candida tropicalis*, aunque mediante ninguno de los dos métodos se ha conseguido obtener una identificación correcta.

4.1.2 Bacterias Gram negativas

Para este estudio se han incluido 75 hemocultivos positivos para bacterias Gram negativas. El rendimiento de ambas técnicas para este subgrupo es considerablemente superior que, para los otros subgrupos, teniendo un *score* medio de 2,01 (ds = 0,26) para el método UF y de 2,09 (ds = 0,28) para el DC. (Tabla 7)

Mediante el método UF se han obtenido 69 (92 %) resultados válidos (*score* > 1,7), de los cuales el 100 % coincide con la identificación definitiva a nivel de género y 67 (97,1 %) a nivel de especie. Por el contrario, utilizando el método DC se han conseguido 67 (97,1 %) resultados válidos, de los cuales 65 (98,5 %) concuerdan con la identificación definitiva a nivel de género y 64 (96,97 %) a nivel especie. Las diferencias entre los dos métodos no alcanzan la significación estadística.

4.1.3 Bacterias Gram positivas

En este estudio se han incluido 72 hemocultivos positivos para bacterias Gram positivas. El *score* medio para ambos métodos fue claramente inferior al de las bacterias Gram negativas siendo de 1,67 (ds = 0,34) para el método UF y 1,56 (ds = 0,31) para el DC. (Tabla 7)

El método UF solo obtiene 35 (48,6 %) resultados válidos, de los cuales el 100 % concuerdan a nivel de género con el método de referencia y 34 (97,14 %) a nivel de especie. Sin embargo, el método DC apenas consigue 17 (23,61 %) resultados válidos, coincidiendo todos

con la identificación definitiva a nivel de género y 16 (94,11 %) a nivel de especie. La diferencia entre ambos métodos es estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Entre estos resultados para las bacterias Gram positivas destacan los obtenidos para *S. aureus* de los cuales en este estudio se incluyen 16 hemocultivos positivos. El método UF consigue resultados válidos para 14 (87,5 %) de ellos, coincidiendo todos a nivel de género y especie mientras que el método DC solo logra una identificación válida para seis (37,5 %) de ellos, aunque coincidiendo todos a nivel de género y especie. La diferencia entre ambos métodos es estadísticamente significativa ($p < 0,05$)

4.1.4 Bacterias anaerobias

Durante la duración de este estudio se han analizado solo ocho hemocultivos positivos para bacterias anaerobias. Este subgrupo obtuvo un *score* medio de 1,69 ($ds = 0,31$) con el método UF y 1,54 ($ds = 0,30$) con el DC. El método UF logra cinco (62,5 %) resultados válidos mientras que el DC dos (25 %), coincidiendo todos en género y especie con la identificación definitiva. La diferencia entre ambos métodos no alcanza la significación estadística. (Tabla 7)

Tabla 7: Score medios y tasas de concordancia entre los métodos ultrarrápido (UF) y de centrifugación diferencial (DC) con el método de referencia.

		Método UF			Método DC		
Scores medios de MALDITOF (desviación estándar)	Total	1,81 (0,36)			1,81 (0,4)		
	Gram negativas	2,01 (0,26)			2,09 (0,28)		
	Gram positivas	1,67 (0,34)			1,56 (0,31)		
	Bacterias anaerobias	1,69 (0,31)			1,54 (0,3)		
Concordancia con método de referencia		<i>Id válidas *</i>	<i>Género</i>	<i>Especie</i>	<i>Id válidas *</i>	<i>Género</i>	<i>Especie</i>
	Total (157)	106 (67,51 %)	106 (100 %)	103 (97 %)	84 (53,50 %)	83 (98,8 %)	81 (96,42 %)
	Gram negativas (75)	69 (92 %)	69 (100 %)	67 (97,1 %)	66 (88 %)	65 (98,5 %)	64 (96,97 %)
	Gram positivas (72)	35 (48,6 %)	35 (100 %)	34 (97,1 %)	17 (23,61 %)	17 (100 %)	16 (94,11 %)
	Bacterias anaerobias (8)	5 (62,5 %)	5 (100 %)	5 (100 %)	2 (25 %)	2 (100 %)	2 (100 %)

* Considerando sólo los scores > 1,7 como identificaciones válidas.

4.2 Evaluación del método UF para la realización de estudios de sensibilidad antimicrobiana

Para evaluar el rendimiento del método UF para la realización de estudios de sensibilidad se han comparado los resultados obtenidos mediante el método UF con los obtenidos con el método previamente disponible en el laboratorio, el método del tubo separador de suero (SST), y ambos con los obtenidos del método de referencia, es decir, la realización del estudio de sensibilidad desde un subcultivo en medio sólido.

Durante el estudio se han analizado un total de 99 hemocultivos positivos; de los cuales, nueve tuvieron que ser excluidos: seis por tener al menos uno de los métodos evaluados con un resultado inválido y 3 por considerarse finalmente hemocultivos polimicrobianos.

4.2.1 Identificación

Con ambos métodos, tanto el UF como el SST, se han obtenido resultados de identificación bacteriana consistentes. Con el método UF se ha obtenido una concordancia con la identificación definitiva a nivel de género en 86 (95,55 %) de los 90 hemocultivos analizados, mientras que con el método SST 85 (94,44 %) muestras coincidieron con la identificación definitiva a nivel de género. Sin embargo, a nivel de especie mediante el método SST los resultados obtenidos han sido discretamente superiores a los del UF logrando 85 (94,44 %) resultados con una identificación correcta frente a 79 (87,77 %) con la técnica UF. No obstante, ninguna de estas diferencias es estadísticamente significativa. (Tabla 8)

Con el método UF el error más frecuente (63,63 %; 7/11) que se obtiene se corresponde con la identificación errónea de *S. aureus* como un estafilococo coagulasa negativo. En el presente estudio mientras que para *S. aureus* la tasa de identificación correcta es del 46,15 % (6/13) para el resto de los microorganismos fue del 93,93 % (62/66). Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0,05$). En la Tabla 8 se muestran los datos de la identificación de especies y los errores obtenidos con los métodos UF y SST.

Tabla 8: Identificación de los diferentes aislados incluidos en el estudio, así como el número de errores incluidos en las diferentes especies bacterianas.

Especie	n	Errores con UF	Errores con SST
<i>Enterobacter cloacae</i>	3		
<i>Enterococcus faecalis</i>	2		
<i>Enterococcus faecium</i>	1		
<i>Escherichia coli</i>	43	2	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4		
<i>Morganella morgani</i>	1		
<i>Proteus mirabilis</i>	8	1	1
<i>Providencia rettgeri</i>	1		
<i>Serratia marcescens</i>	2	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	7	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4		
<i>Staphylococcus hominis</i>	2		
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2		
Total	90	11	5

UF = Método Ultrarrápido; SST = Método del tubo separador de suero.

4.2.2 Resistencia antimicrobiana

La concordancia entre ambos métodos, el UF y el SST, es del 85,55 % (77/90). El método UF coincide con el método de referencia en 84 de las 90 (93,33 %) de las muestras analizadas. Entre los errores destacan una muestra con un VME (error fatal), dos muestras con ME (error mayor) y dos muestras con mE (error menor), aunque uno de ellos presenta dos mE diferentes. (Tabla 9)

El método SST por el contrario coincide con el de referencia en 80 de las 90 (88,88 %) muestras analizadas. Se han detectado una muestra con un VME, cinco muestras con ME (incluyendo una muestra con dos ME diferentes) y tres con mE, aunque una de ellas es la que presenta también un VME. (Tabla 9)

La CMI de ciprofloxacino en uno de los aislados está en el área de incertidumbre técnica (ATU del inglés *Area of Technical Uncertainty*) mediante ambas técnicas; mientras que con el método de referencia es sensible. Como las ATU no son consideradas como resultados informables, no se ha clasificado esta muestra ni como errónea ni como concordante.

Ninguna de las diferencias observadas es estadísticamente significativa.

Tabla 9: Tasas de concordancia entre los métodos ultrarrápido (UF) y el tubo separador de suero (SST).

Concordancia en Identificación		
Concordancia nivel de especie		
	<i>UF</i>	<i>SST</i>
<i>ERROR</i>	11	5
<i>ACIERTO</i>	79	85
<i>% Acierto</i>	87,77 %	94,44 %
Concordancia a nivel de género		
<i>ERROR</i>	4	5
<i>ACIERTO</i>	86	85
<i>% Acierto</i>	95,55 %	94,44 %
Concordancia en sensibilidad antibiótica		
<i>Concuerdan</i>	77 (85,55 %)	
<i>No concuerdan</i>	14	
Errores		
<i>VME</i>	1	1
<i>ME</i>	3	6
<i>mE</i>	3	5
<i>NE</i>	84 (93,33 %)	80 (88,88 %)
Total	90	90

UF = Método Ultrarrápido; SST = Método del tubo separador de suero; VME = error fatal; ME = error mayor; mE = error menor.

4.3 Evaluación del método UF para la preparación de librerías de secuenciación masiva

Para evaluar el rendimiento del método UF en la preparación de librerías de secuenciación masiva directamente desde el frasco de hemocultivo positivo, en primer lugar, se ha puesto a punto la técnica de la secuenciación de genoma completo (WGS del inglés *whole genome sequencing*) bacteriana mediante el secuenciador MinION mrk1c. En una segunda fase, se han secuenciado 8 cepas clínicas desde hemocultivos simulados, de los que se han obtenido datos sobre la calidad de las secuencias y la capacidad de obtener datos de importancia clínica desde la secuenciación de hemocultivo positivo directo.

4.3.1 Concentración y calidad del ADN extraído

La concentración de ADN obtenida desde colonia directa varía entre 44 y 112 ng/ μ l, mientras que la de las muestras de hemocultivos positivos es de 84 a 118 ng/ μ l, sin observarse grandes diferencias entre ambos métodos. Ambos métodos son adecuados para la realización de secuenciación masiva, mediante el protocolo de Rapid Sequencing Kit adaptado para *flongle*, donde se recomienda partir de 400 ng de ADN en 7,5 μ l.

No obstante, la calidad de los eluidos provenientes de hemocultivos positivos no se encontraba dentro de los rangos recomendados por ONT, particularmente el ratio A260/A230, lo que puede indicar la presencia de sustancias no deseadas en el eluido. Sin embargo, estos indicadores mejoraron tras la purificación mediante partículas magnéticas como se pueda apreciar en la Tabla 10.

Tabla 10: Resumen de datos de calidad de extracción y de secuenciación de las muestras analizadas.

Tipo de muestra	Muestra	Concentración de ADN (ng/μl)	Sin purificar		Purificado		Número de lecturas	Número de poros	Cobertura de profundidad media (x)	Longitud media de las lecturas (nº de bases)	Mediana de las lecturas N50 (nº de bases)	Índice de calidad de las lecturas Q
			A260/A280	A260/A230	A260/A280	A260/A230						
Desde colonia	1	44	2,01	1,95			229591	61	150	2793	1745	10,73
	2	112	1,90	1,91			10549	54	28	2991	1878	10,26
	3a	55,4	1,98	2,09			123969	97	138	6183	3929	11,94
Hemocultivo	3b	99,8	2,16	2,2	2,10	2,03	10350	93	5	3755	1709	11,65
	4	90,4	2,12	2,13	2,01	2,12	100350	62	63	5519	3467	11,42
	5	118	2,03	1,91	1,99	2,08	150960	61	74	4260	2661	11,76
	6	114	2,12	2,03	2,03	2,20	129000	86	111	3752	2384	12,02
	7	104	2,02	1,87	2,02	2,04	59800	44	45	7528	4598	11,56
	8	100	2,05	1,9	2,04	1,97	150800	31	114	6396	4246	11,7
	9	84,6	2,07	2,05	2,11	2,17	66110	61	50	7496	4503	11,74
	10	78,4	2,00	1,91	2,10	2,21	29140	54	29	7998	4795	11,87
	11	86,6	2,11	2,04	2,08	2,24	124680	84	98	6523	4228	11,78

4.3.2 Número de lecturas y profundidad de secuenciación

El número medio de lecturas por experimento de secuenciación es de 98774, si bien hay algunos experimentos que tienen un rendimiento claramente inferior como, por ejemplo, la muestra 2, secuenciada directamente desde colonia, o la 3b, desde hemocultivo (ver Tabla 10). Esta diferencia no parece que pueda ser explicada por la variabilidad del número de poros viables al inicio de la secuenciación, aunque debido al escaso número de muestras analizadas esta falta de relación no puede ser demostrada estadísticamente.

El N50, es decir la mediana de la longitud de las lecturas, se sitúa en un rango de bases entre 1709 y 4795 con una media de 3345, mientras que la media de la longitud de las lecturas varía entre 2793 y 7998 con una media de 5432 bases. La profundidad obtenida también varió dependiendo, como era de esperar, del número de lecturas logrado, entre apenas una cobertura media de 5X en algunos experimentos hasta resultados excelentes de 150X.

El índice de calidad Q medio de las lecturas se sitúa en un rango entre 10,26 u 12,02 con una media de 11,74, que se corresponde con una probabilidad de acierto de la llamada de bases de forma global del 93,3 %. Pese a no poder encontrar diferencias estadísticamente significativas, es llamativa la diferencia entre la calidad de las muestras secuenciadas desde colonia con una Q media de 10,97 y las realizadas desde hemocultivo positivo con una Q media de 11,72.

4.3.3 Análisis de secuencias crudas (*raw sequences*)

4.3.3.1 Identificación de especie

El *software* WIMP clasifica las lecturas obtenidas según su procedencia en lecturas de origen bacteriano, viral, arqueano o humano, tal y como se puede apreciar en la Tabla 11. Las cepas secuenciadas desde colonia presentan más de un 99 % de lecturas asignadas a especies bacterianas, sin embargo, en las cepas realizadas desde hemocultivos este porcentaje varía entre el 70 % y el 99 % del total de las lecturas. La mayor parte de esas lecturas bacterianas son asignadas a la especie final, no obstante, un número variable de lecturas son asignadas a otras especies bacterianas estrechamente relacionadas, principalmente otras enterobacterias. También existe cierta presencia de lecturas de origen viral, que en su mayoría corresponden a diversos bacteriófagos, presentes en muchas bacterias. Además, también se pueden encontrar en esa porción variable (hasta un 30 % de las lecturas) secuencias de origen humano.

Tabla 11: Asignación taxonómica de lecturas obtenidas mediante secuenciación por el programa WIMP comparada con la identificación mediante MALDI-TOF.

Muestra	Asignación de lecturas	Lecturas asignadas a <i>Klebsiella pneumoniae</i> complex (%)	ID mediante WGS	ID mediante MALDI-TOF
1	99 % Bacteria 1 % <i>Homo sapiens</i> <1 % Virus <1 % Arquea	74,18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2	98 % Bacteria 2 % <i>Homo sapiens</i> <1 % Virus	89,52	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
3a	99 % Bacteria <1 % <i>Homo sapiens</i> <1 % Virus	95,52	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
3b	70 % Bacteria 30 % <i>Homo sapiens</i> <1 virus	69	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
4	99 % Bacteria <1 % <i>Homo sapiens</i> <1 % Virus	86,62	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
5	99 % Bacteria <1 % <i>Homo sapiens</i> <1 % Virus	87,48	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
6	96 % Bacteria 3 % <i>Homo sapiens</i> <1 % Virus	84,62	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7	91 % Bacteria 9 % <i>Homo sapiens</i> <1 % Virus	80,46	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
8	97 % Bacteria <3 % <i>Homo sapiens</i> <1 % Virus	89	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
9	94 % Bacteria <6 % <i>Homo sapiens</i> <1 % Virus	84,8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
10	85 % Bacteria <15 % <i>Homo sapiens</i> <1 % Virus	70,7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
11	96 % Bacteria <4 % <i>Homo sapiens</i> <1 % Virus	75	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

En 10 de los 12 experimentos de secuenciación realizados, la especie con mayor número de lecturas asignadas por WIMP coincide con la identificación obtenida mediante MALDI-TOF previamente. Los experimentos 3a (de colonia) y 3b (de hemocultivo), corresponden

originalmente al mismo aislado y ambos presentaban lecturas de *Klebsiella quasipneumoniae* como las más frecuentes, pese a estar identificada como *Klebsiella pneumoniae* mediante MALDI-TOF. En todos los casos empleando las secuencias obtenidas durante la primera hora de la secuenciación fue posible identificar la especie bacteriana.

4.3.3.2 Detección de determinantes de resistencia

El flujo de trabajo de EPI2ME también enfrenta las secuencias crudas en formato .fastq a la base de datos CARD que permite identificar las betalactamasas presentes en todas las muestras analizadas en este estudio. Los genes de resistencia con mayor prevalencia fueron *bla*_{OXA-48} presente en el 66,6 % de las muestras, seguido de *bla*_{CTX-M-15} (58,3 %), *bla*_{OXA-1} (45,6 %) y *bla*_{SHV-28} (45,6 %).

Los genes de resistencia identificados mediante EPI2ME explican el fenotipo de resistencia analizado previamente, aunque en muchos casos mediante este método se obtienen alineamientos con múltiples variantes de las betalactamasas identificadas. Como se muestra en la Tabla 12, en la muestra 2 se detectaron 2 variantes de SHV (*bla*_{SHV-28} y *bla*_{SHV-106}) o en la muestra 4 en las que se detectaron hasta 4 variante *bla*_{OXA} (*bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-162} y *bla*_{OXA-244}).

Comparando los resultados obtenidos a los diferentes tiempos establecidos (1, 3, 6, 12 y 24 horas) en EPI2ME, se observa que, cuanto más tiempo transcurrido, mayor número de lecturas, mayor número de genes y alineamientos obtenidos. En la mayoría de los casos, a partir de la tercera o sexta hora, se consiguen aproximadamente 30000 lecturas y se pueden identificar los genes presentes al final de la secuenciación. Sin embargo, en las muestras 2 y 4, pese a tener un número de lecturas notablemente inferior, también fue posible identificar los principales genes de resistencia después de 3 horas.

4.3.4 Análisis de genomas ensamblados

4.3.4.1 Identificación de especie y secuenciotipo MLST

Todas las secuencias consenso obtenidas fueron reconocidas como *Klebsiella pneumoniae* complex según PathogenWatch y SpeciesFinder. La muestra 3 (3a y 3b) se identificó como *Klebsiella quasipneumoniae*. Todos los resultados coincidieron, por lo tanto, con los obtenidos mediante WIMP.

Mediante la secuencia consenso, se pudo recuperar el ST mediante el esquema MLST del Instituto Pasteur de todas las secuencias analizadas. El único ST presente en más de una muestra fue el ST307, perteneciente al complejo clonal (CC) 168, presente en el 50 % (5/10) de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* analizadas. Tal y como se puede observar en la Tabla 12 en los restantes aislados se identificaron los siguientes ST: ST11 (CC11), ST489, ST469 (CC469), ST422, ST5000 y ST1640 (CC350).

4.3.4.2 Detección de determinantes de resistencia

Se ha conseguido realizar un ensamblado *de novo* mediante Flye de todos los experimentos de secuenciación realizados en el presente estudio, incluyendo aquellas que presentaron un menor número de lecturas. Al reanalizar las mismas cepas una vez ensambladas sus secuencias, se puede observar una reducción notable de las variantes de genes de betalactamasas presentes en las mismas. Esto ocurre de forma notable en las muestras 2, 3a, 3b, 4, 5, y 6, para las variantes de OXA y SHV, que son identificados con mayor especificidad obteniendo alineamientos con un 100 % de identidad. De forma general, el análisis mediante CARD de las secuencias crudas consigue una determinación bastante precisa de al menos la familia de betalactamasas que porta la cepa en cuestión. Sin embargo, un análisis más exhaustivo con los genomas ensamblados permite una clasificación más precisa.

Respecto a los resultados obtenidos en las bases de datos CARD, Resfinder y Pathogenwatch (una versión propia de la base de datos de CARD) se han observado resultados similares en los genes de resistencia identificados con todas las bases de datos. *bla*_{OXA-48} es la betalactamasa más frecuente ya que está presente en el 66,6 % de las muestras analizadas, seguida de *bla*_{CTX-M-15} en el 58,3 %, y *bla*_{SHV-28} en el 33,3 %. A diferencia de lo que ocurre con estos genes, que se detectan en todas las bases de datos por igual, con las variantes de *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM} se han detectado diferencias en las distintas bases de datos. Por ejemplo, en la muestra 5 se identifican diferentes variantes de TEM (*bla*_{TEM-1} en CARD, *bla*_{TEM-1B} en Resfinder, *bla*_{TEM-1D} en Pathogenwatch). En este caso, mediante el análisis en profundidad de los archivos BAM y la secuencia consenso se han podido identificar la betalactamasa como *bla*_{TEM-1} al comparar los alineamientos frente a la secuencia consenso obtenidos de las distintas bases de datos, y se ha comprobado que las lecturas obtenidas de la muestra 5 correspondían a esa variante presentando los mismos SNP. (Tabla 12)

Tabla 12: Comparación de los genes de betalactamasas encontrados en las diferentes bases de datos, con secuencias crudas o ya ensambladas

Muestra	ST	Caracterización de determinantes de resistencia previa a WGS	Secuencias crudas		Genomas ensamblados	
			CARD	CARD	Resfinder	Pathogenwatch
1	11	OXA-48 like, CTX-M-15	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-4} , <i>bla</i> _{DHA-1}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-15} , <i>bla</i> _{SHV-11} , <i>bla</i> _{DHA-1}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{DHA-1}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{DHA-1}
2	307	KPC	<i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{TEM-4} , <i>bla</i> _{SHV-28} , <i>bla</i> _{SHV-106} , <i>bla</i> _{KPC-3}	<i>bla</i> _{TEM-1D} , <i>bla</i> _{SHV-28} , <i>bla</i> _{KPC-3}	<i>bla</i> _{SHV-28} , <i>bla</i> _{KPC-3}	<i>bla</i> _{TEM-1D} , <i>bla</i> _{SHV-28} , <i>bla</i> _{KPC-3}
3a	489	AmpCp	<i>bla</i> _{OXA-15} , <i>bla</i> _{OXA-161} , <i>bla</i> _{SHV-18}	<i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{SHV-18}	<i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{SHV-18}	<i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{SHV-18}
3b	489	AmpCp	<i>bla</i> _{SHV-18}	<i>bla</i> _{SHV-18}	<i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{SHV-18}	<i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{SHV-18}
4	307	OXA-48 like, CTX-M-15	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{OXA-162} , <i>bla</i> _{OXA-244} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-28} , <i>bla</i> _{SHV-106}	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-28}	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-28}	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-28}
5	307	CTX-M-15, AmpCp	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-28} , <i>bla</i> _{SHV-106} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CMY-59}	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-28} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CMY-2}	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-106} , <i>bla</i> _{TEM-1B}	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-28} , <i>bla</i> _{TEM-1D} , <i>bla</i> _{CMY-2}
6	469	OXA-48 like, CTX-M-15	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-11} , <i>bla</i> _{SHV-13} , <i>bla</i> _{SHV-70}	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}
7	422	OXA-48 like	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{SHV-1}	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{SHV-1}	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{SHV-}	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{SHV-1}
8	307	OXA-48 like, CTX-M-15	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-28} , <i>bla</i> _{TEM-4}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-28} , <i>bla</i> _{TEM-4}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-28} , <i>bla</i> _{TEM-4}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-28} , <i>bla</i> _{TEM-4}
9	307	OXA-48 like	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{SHV-28}	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{SHV-28}	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{SHV-28}	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{SHV-28}
10	5000	OXA-48 like, CTX-M-15	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-11}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-11}
11	1640	OXA-48 like	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-11}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-11}

4.3.4.3 Rendimiento con respecto al tiempo de secuenciación

Se analizaron las secuencias a 1, 3, 6, 12 y 24 horas del inicio de la secuenciación. En ninguna de las muestras se han observado diferencias significativas entre los resultados a las 12

y 24 horas consiguiendo el ST y los genes de resistencia con un 100 % de identidad en todos los casos. Al cabo de 6 horas se obtuvo la identificación en el 91 % de las muestras y en 3 horas tan solo en el 25 % de ellas. Sin embargo, en algunos casos el tiempo de identificación de genes y ST fue diferente, como la muestra 5, en la cual los genes de resistencia se identificaron a 3 horas y el ST a 6 horas, o bien la muestra 1, donde 3 de 4 genes de resistencia (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{DHA-1}, *bla*_{OXA-48}) tenían 100 % de identidad a las tres horas, y un gen (*bla*_{OXA-1}) y el ST se identificaron a la sexta hora. De nuevo, los resultados obtenidos dependen de la calidad de la secuenciación y número de poros activos. En el presente estudio la mayoría de las detecciones se realizaron en el rango de 20000 y 50000 lecturas con profundidad cercana a 20X aproximadamente, como se observa en la Tabla 13.

Tabla 13: Evaluación del tiempo necesario para la identificación de ST y genes de resistencia con respecto al resultado definitivo.

Muestra	Tiempo (horas)	Lecturas	Profundidad	Coincidencia con resultado definitivo			
				MLST	Genes de resistencia		
					CARD	Resfinder	Pathogenwatch
1	3	44000	19				
	6	88400	20				
2	6	8260	13				
3 ^a	3	29882	26				
3b	6	9300	5				
4	6	28288	23				
5	3	30290	17				
	6	54952	33				
6	3	59800	35				
7	6	19980	20				
8	6	48486	41				
9	6	20920	24				
10	12	19636	22				
11	3	22252	21				

En color verde se representan los escenarios que coinciden con el resultado definitivo y en rojo aquellos que no coinciden.

4.3.4.4 Comparación entre fenotipo y genotipo de resistencia antimicrobiana

Se ha correlacionado el patrón de sensibilidad fenotípico con los determinantes de resistencia detectados en los diferentes aislados (Tabla 14).

Mediante este análisis se ha observado que pese a contar todas las cepas con mutaciones en las porinas OmpK35 y OmpK36, frecuentemente relacionadas con un aumento de la resistencia a cefalosporinas de tercera generación, en ausencia de BLEE, éstas no condicionan una resistencia a cefalosporinas de tercera generación. Así mismo, todas las cepas menos la muestra 2, portadora de KPC-3, presentan numerosas y diferentes mutaciones tanto en OmpK35 como OmpK36 que se asocian a una mayor resistencia a carbapenems. Pese a ello, el aislado 2 presenta CMI por lo general más elevadas a carbapenems que muchos de los otros aislados.

La resistencia a los aminoglucósidos es variable y pese a detectar en la presente colección numerosos determinantes de resistencia, no se puede encontrar una clara relación entre el fenotipo y genotipo. Así mismo, la presencia del gen *fosA* por sí solo no es suficiente para predecir la resistencia a fosfomicina mediante el sistema Phoenix BD.

La resistencia a cotrimoxazol requiere la presencia de genes *sul1* o *sul2* y una variante de la dihidrofolato reductasa (*dfrA*) mutada. No obstante, la presencia de, por ejemplo, *dfrA14* en el aislado 2 podría ser responsable del incremento observado en los valores de CMI de cotrimoxazol, aunque se mantenga dentro de la categoría sensible.

La resistencia a quinolonas es generalizada en estos aislados y se ha podido justificar, tanto por mutaciones en las dianas de las quinolonas *gyrA*, *gyrB* (DNA-girasa) y *parC* (Topoisomerasa VI), a varias porinas como (OqxA y OqxB) como a elementos móviles portadores de diferentes variantes de *qnr* detectados en sus secuencias.

Tabla 14: Comparación entre Fenotipo y Genotipo de resistencia antimicrobiana

Muestra	ST	Betalactámicos										Carbapenems			Aminoglucósidos		Fosfomicina	Cotrimoxazol	Quinolonas																
		AMP	AMC	PTZ	CXM	FOX	CRO	CAZ	CZA	FEP	IPM	MER	ERT	CN	AK	FOS	STX	CIP																	
1	11	R	>8	R	>32/2	R	>16/4	R	>8	R	>16	R	>4	R	>8	S	1/4	R	>8	I	4	I	4	R	>1	S	<=1	S	<=4	R	>64	S	<=1/19	R	>1
		<i>bla_{SHV-12}, bla_{OXA-1}, bla_{OXA-2}, bla_{TEM-34}, bla_{CTX-M-15}, ompK35_{mut}, ompK36_{mut}</i>										<i>bla_{OXA-48}, ompK35_{mut}, ompK36_{mut}</i>			<i>aac(6')-Ib-cr, aph3-1a</i>		<i>fosA</i>	<i>sul1, oqxA, oqxB</i>	<i>qnrB4, gyrA_{mut}, parC_{mut}, aac(6')-Ib-cr, oqxA, oqxB</i>																
2	307	R	>8	R	>32/2	R	>16/4	R	>8	R	>16	R	>4	R	>8	S	1/4	R	>8	R	>8	R	>1	R	>8	S	<=1	S	<=4	S	<=16	S	2/38	R	>1
		<i>bla_{SHV-28}, bla_{CTX-M-15}, ompK35_{mut}, ompK36_{mut}</i>										<i>bla_{IPC-3}</i>					<i>fosA</i>	<i>dfrA14, oqxA, oqxB</i>	<i>qnrB1, gyrA_{mut}, parC_{mut}, oqxA, oqxB</i>																
3	489	R	>8	R	16/2	I	16/4	R	>8			R	>4	R	>8	S	1/4		<=1	S	<=0,25	S	<=0,125	S	<=0,25	R	>4	S	<=4		S	<=1/19	I	0,5	
		<i>bla_{SHV-19}, bla_{OXA-2}, bla_{CTX-B-7}, ompK35_{mut}, ompK36_{mut}</i>													<i>ant(2'')-Ia</i>		<i>fosA</i>	<i>sul1, oqxA, oqxB</i>	<i>oqxA, oqxB</i>																
4	307	R	>8	R	>32/2	R	>16/4	R	>8	S	8	R	>4	R	>16	S	0,25/4	R	>16	I	4	S	2	R	>1	S	<=1	S	<=4		R	>4/76	R	>1	
		<i>bla_{SHV-29}, bla_{OXA-1}, bla_{CTX-M-15}, ompK35_{mut}, ompK36_{mut}</i>										<i>bla_{OXA-48}, ompK35_{mut}, ompK36_{mut}</i>			<i>aac(3)-IIa, aac(6')-Ib-cr, strA, strB</i>		<i>fosA</i>	<i>dfrA14, sul2, oqxA, oqxB</i>	<i>qnrB1, gyrA_{mut}, parC_{mut}, aac(6')-Ib-cr, oqxA, oqxB</i>																
5	307	R	>8	R	>32/2	R	>16/4	R	>8			R	>4	R	>8	S	%	R	>8	S	0,5	S	<=0,125	S	<=0,25	S	0,5	S	<=0,125		R	>4/76	R	>1	
		<i>bla_{SHV-29}, bla_{OXA-1}, bla_{CTX-2}, bla_{CTX-M-15}, ompK35_{mut}, ompK36_{mut}</i>													<i>aac(3)-IIa, aac(6')-Ib-cr, strA, strB</i>		<i>fosA</i>	<i>dfrA14, sul2, oqxA, oqxB</i>	<i>qnrB1, gyrA_{mut}, parC_{mut}, aac(6')-Ib-cr, oqxA, oqxB</i>																
6	469	R	>8	R	>32/2	R	>16/4	R	>8			R	>4	R	>8	S	0,5/4	R	>8	I	4	I	8	R	>1	S	<=1	S	<=4		R	>4/76	R	>1	
		<i>bla_{SHV-12}, bla_{CTX-M-15}, ompK35_{mut}, ompK36_{mut}</i>										<i>bla_{OXA-48}, ompK35_{mut}, ompK36_{mut}</i>			<i>aadA2, strA, strB</i>		<i>fosA</i>	<i>dfrA12, sul1, sul2, oqxA, oqxB</i>	<i>qnrB1, oqxA, oqxB</i>																
7	422	R	>8	R	>32/2	R	>16/4	R	>8	S	16	S	<=1	S	<=1	En		S	<=1	R	8	I	4	R	>1	S	2	R	16	S	<=16	S	<=1/19	I	0,5
		<i>bla_{SHV-12}, ompK35_{mut}, ompK36_{mut}</i>										<i>bla_{OXA-48}, ompK35_{mut}, ompK36_{mut}</i>			<i>aac(6')-Ib, aac(6')-Ib-cr, aadA1</i>		<i>fosA</i>	<i>sul1, oqxA, oqxB</i>	<i>qnrB9, aac(6')-Ib-cr, oqxA, oqxB</i>																
8	307	R	>8	R	>32/16	R	>16/4	R	>8	S	<=8	R	>4	R	>16	S	0,5/4	R	>8	S	<=1	I	4	R	2	R	>4	S	<=8	S	<=32	R	>4/76	R	>1
		<i>bla_{SHV-29}, bla_{OXA-1}, bla_{CTX-M-15}, ompK35_{mut}, ompK36_{mut}</i>										<i>bla_{OXA-48}, ompK35_{mut}, ompK36_{mut}</i>			<i>aac(6')-IIa-cr, aac(6')-Ib-cr</i>		<i>fosA</i>	<i>dfrA14, sul2, oqxA, oqxB</i>	<i>qnrB1, gyrA_{mut}, parC_{mut}, aac(6')-Ib-cr, oqxA, oqxB</i>																
9	307	R	>8	R	>32/2	R	>16/4	R	>8	S	16	I	2	S	<=1	S	0,5/4	S	<=1	R	8	I	4	R	>1	S	<=1	S	<=4	S	<=16	S	<=1/19	R	>1
		<i>bla_{SHV-29}, ompK35_{mut}, ompK36_{mut}</i>										<i>bla_{OXA-48}, ompK35_{mut}, ompK36_{mut}</i>			<i>aac(6')-Ib, aac(6')-Ib-cr, aadA1</i>		<i>fosA</i>	<i>oqxA, oqxB</i>	<i>qnrB9, gyrA_{mut}, parC_{mut}, oqxA, oqxB</i>																
10	5000	R	>8	R	>32/2	R	>16/4	R	>8	R	>16	R	>4	R	>8	S	0,25/4	R	>8	I	4	I	4	R	>1	R	>4	S	<=4	R	64	R	>4/76	R	>1
		<i>bla_{SHV-12}, bla_{OXA-1}, bla_{CTX-M-15}, ompK35_{mut}, ompK36_{mut}</i>										<i>bla_{OXA-48}, ompK35_{mut}, ompK36_{mut}</i>			<i>aac(6')-Ib-cr, aadA2, strA, strB</i>		<i>fosA</i>	<i>dfrA12, sul1, oqxA, oqxB</i>	<i>qnrB1, gyrA_{mut}, parC_{mut}, aac(6')-Ib-cr, oqxA, oqxB</i>																
11	1640	R	>8	R	>32/2	R	>16/4	R	>8			R	>4	R	>8	S	2/4	R	>8	R	>8	R	>1	R	>1	S	<=1	S	<=4		S	<=1/19	R	>1	
		<i>bla_{SHV-12}, bla_{OXA-1}, bla_{CTX-M-15}, ompK35_{mut}, ompK36_{mut}</i>										<i>bla_{OXA-48}, ompK35_{mut}, ompK36_{mut}</i>			<i>aac(6')-Ib-cr</i>		<i>fosA</i>	<i>oqxA, oqxB</i>	<i>acrR_{mut}, aac(6')-Ib-cr, oqxA, oqxB</i>																

Leyenda: ¹ AK (Amikacina), AMP (Ampicilina), AMC (Amoxicilina-clavulánico), CAZ (Ceftazidima), CIP (Ciprofloxacino), CN (Gentamicina), CRO (Ceftriaxona), CXM (Cefuroxima), CZA (Ceftazidima-Avibactam), ERT (Ertapenem), FEP (Cefepime), FOS (Fosfomicina), FOX (Cefoxitina), IPM (Imipenem), MER (Meropenem), PTZ (Piperacilina-Tazobactam) y SXT (Cotrimoxazol). ² *ompK35_{mut}*, *ompK36_{mut}*, *gyrA_{mut}*, *parC_{mut}* y *acrR_{mut}*: gen que codifica variantes que presentan al menos un SNP que se asocia a una reducción de la sensibilidad de la clase de antibióticos en los que está incluida. ³ S (Sensible), I (Sensible, cuando se incrementa la exposición) y R (Resistente).

4.3.4.5 Detección de estructuras plasmídicas

En este estudio cuando la cobertura fue inferior a 60x (muestras 2, 7, 9 y 10) Flye generalmente produjo secuencias consenso con un mayor número de *contigs*. Estos *contigs* producidos fueron de tamaños muy variados, entre 1000 y 5000000 nucleótidos y frecuentemente no fueron acompañados de estructuras plasmídicas independientes. Por el contrario, cuando la cobertura de la secuencia fue mayor (muestras 1, 3, 4, 5, 6, 8 y 11) se redujo el número de *contigs* y en ellos se pudieron encontrar estructuras plasmídicas completas.

Los complejos de incompatibilidad más frecuentes en el presente estudio fueron la asociación IncFIB(K)/IncFII(K) presente en 9 de las 11 muestras analizadas. Sin embargo, los *contigs* en los que se encontraron son de un tamaño notablemente variable desde las 20 kilo bases (kb) hasta las 200 kb. Así mismo, los determinantes de resistencia presentes en estas estructuras también fueron altamente variables, tal y como se puede ver en la Tabla 15.

Los genes que codifican carbapenemasas detectados en los aislados del presente estudio siempre se han encontrado en *contigs* no identificados como cromosomas y van acompañados en el mismo *contig* por estructuras de origen plasmídico. El gen *bla*_{OXA-48}, el más frecuente en el presente estudio (8/11), ha sido detectado en el mismo *contig* que IncI en 6 ocasiones y que IncR en 2 ocasiones. En el caso del aislado productor de *bla*_{KPC-3}, el *contig* en el que se ha detectado la carbapenemasa presenta el complejo IncFIB(pQil)/IncFII(K).

Tabla 15: Tamaño de contigs, estructuras plasmídicas y determinantes de resistencia

Muestra	ST	Nombre contig	Tamaño contig (bases)	Complejo de incompatibilidad detectados	Cromosoma / Plásmido	Determinantes de resistencia
1	11	contig_1	5273937		Cromosoma	<i>bla_{SHV-11}</i> , <i>bla_{CTX-M-15}</i> [x 2], <i>fosA</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i>
		contig_3	179278	IncR	Plásmido	<i>bla_{OXA-48}</i>
		contig_4	21053	IncFIB(K)/IncFII(K)	Plásmido	<i>bla_{OXA-1}</i> , <i>bla_{DHA-1}</i> , <i>bla_{TEM-34}</i> , <i>qnrB4</i> , <i>qacE</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> ; <i>aph3-la</i> , <i>sul1</i> , <i>ARR-3</i> , <i>catB3</i>
2	307	contig_1	34595	IncFII(K)	Plásmido	
		contig_2	52329	IncFIB(K)	Plásmido	
		contig_3	52235	IncFIB(K)	Plásmido	
		contig_5	1286			
		contig_6	5374015			<i>bla_{SHV-28}</i> , <i>fosA</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i>
		contig_7	30775			
		contig_8	112178	IncFIB(pQil)/IncFII(K)	Plásmido	<i>bla_{KPC-3}</i> , <i>bla_{TEM-ID}</i>
		contig_9	142792	IncFII(K)	Plásmido	<i>qnrB1</i> , <i>dfrA14</i>
		contig_10	45258			
3	489	contig_1	77106	IncM1	Plásmido	<i>bla_{OXA-2}</i> , <i>bla_{SHV-18}</i> , <i>qacE</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>sul1</i>
		contig_2	5288183		Cromosoma	<i>bla_{OKP-B-7}</i> , <i>fosA</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i>
		contig_3	153059	IncFIB(K)/IncFII(K)	Plásmido	
4	307	contig_1	5311252		Cromosoma	<i>bla_{SHV-28}</i> , <i>bla_{CTX-M-15}</i> , <i>fosA</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i>
		contig_2	65489	IncL	Plásmido	<i>bla_{OXA-48}</i>
		contig_3	220383	IncFIB(K)/IncFII(K)	Plásmido	<i>bla_{OXA-1}</i> , <i>qnrB1</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>dfrA14</i> , <i>tet(A)</i> , <i>catB3</i>
		contig_4	200388	IncFIB(pNDM-Mar)/IncHI1B(pNDM-MAR)	Plásmido	
5	307	contig_1	5386953		Cromosoma	<i>bla_{SHV-28}</i> , <i>oqxA</i> ; <i>oqxB</i>
		contig_2	247580	IncFIB(K)/IncFII(K)	Plásmido	<i>bla_{OXA-1}</i> , <i>bla_{CTX-M-15}</i> , <i>qnrB2</i> , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>tet(A)</i> , <i>catB3</i>

		contig_3	11965			
		contig_4	94113	Inc1-(Alpha)	Plásmido	<i>bla</i> _{CMY-2}
6	469	contig_1	5114223		Cromosoma	<i>bla</i> _{SHV-11} , <i>fosA</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA15</i>
		contig_2	16396	Col(pHAD28)	Plásmido	
		contig_3	201763	IncFIB(K)(pCAV1099-114)	Plásmido	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>qnrS1</i> , <i>qacE</i> , <i>aadA2</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>mph(A)</i>
		contig_4	65502	IncL	Plásmido	<i>bla</i> _{OXA-48}
7	422	contig_1	6018			
		contig_2	347120	IncFIA(HI1)/IncFIB(pNDM-Mar)/IncR	Plásmido	<i>qnrB9</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>
		contig_3	5289001		Cromosoma	<i>bla</i> _{SHV-1} , <i>fosA5</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i>
		contig_4	109026	IncFIB(pKPHS1)	Plásmido	
		contig_5	213187	IncFIB(K)/IncFII(K)	Plásmido	<i>qacE</i> , <i>aadA1</i> , <i>sul1</i>
		contig_6	65479	IncL	Plásmido	<i>bla</i> _{OXA-48}
		contig_7	63403	IncFII	Plásmido	
8	307	contig_1	5302966		Cromosoma	<i>bla</i> _{SHV-28} , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i>
		contig_2	65497	IncL	Plásmido	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>aac(6')-Ila-cr</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>
		contig_3	247215	IncFIB(K)/IncFII(K)	Plásmido	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>qnrB1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA14</i> , <i>tet(A)</i>
		contig_4	199778	IncFIB(pNDM-Mar)/IncHI1B(pNDM-MAR)	Plásmido	
9	307	contig_1	66265	IncL	Plásmido	<i>bla</i> _{OXA-48}
		contig_2	197136	IncFIB(K)/IncFII(K)	Plásmido	<i>tet(D)</i>
		contig_3	347288	IncFIA(HI1)/IncFIB(pNDM-Mar)/IncR	Plásmido	<i>qnrB9</i> , <i>aac(6')-Ila-cr</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>
		contig_4	4870481		Cromosoma	<i>bla</i> _{SHV-28} , <i>fosA5</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i>
		contig_6	19630			<i>qacE</i> , <i>aadA1</i>
		contig_7	417964			
		contig_8	15967			
		contig_9	16944			
10	5000	contig_1	5018369		Cromosoma	<i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} [x3], <i>fosA</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i>
		contig_2	600609			
		contig_3	1156			
		contig_4	41211			<i>bla</i> _{CTX-M-15}

		contig_5	421136			
		contig_6	213017	IncFIB(K)/IncFII(K)	Plásmido	<i>qacE, aadA2, sul1, dfrA14, catA1</i>
		contig_7	65504	IncL	Plásmido	<i>bla_{OXA-48}</i>
		contig_8	46659	IncR	Plásmido	<i>bla_{OXA-1}, aac(6')-Ib-cr, catB3</i>
11	1640	contig_1	5191812		Cromosoma	<i>bla_{SHV-11}, bla_{CTX-M-15} [x 3], fosA, oqxA, oqxB</i>
		contig_2	32391	pKPC-CAV1193	Plásmido	<i>bla_{CTX-M-15}</i>
		contig_4	64214	IncR	Plásmido	<i>bla_{OXA-1}, bla_{OXA-48}, aac(6')-Ib-cr, catB3</i>

4.3.4.6 Detección de determinantes de virulencia

El serotipo más frecuente detectado fue el O2afg:K102 presente en 4 de las 11 cepas estudiadas, perteneciendo además todas al ST307. O2a:K24 representó el segundo serotipo más frecuente siendo el detectado en 3 aislados, seguido del O3b:K111 detectado en dos de las cepas. Otros serotipos presentes en el presente estudio fueron el O3/O3a:K53 y el O3b:K139. (Tabla 16)

Ninguna de las secuencias analizadas incluye el gen regulador del fenotipo mucoide a *rmpA2* ni el gen *rmpADC*, ambos estrechamente relacionados con el fenotipo mucoide hipervirulento de *K. pneumoniae*. Pathogenwatch identifica tres aislados (1, 10 y 11) productores del sideróforo yersiniabactina, concretamente del secuenciotipo ybt10 movilizados mediante ICEKp4, y no reconoce ningún otro determinante de virulencia en ninguna de las cepas. Por su parte VFDB detecta también el gen de la yersiniabactina en esos tres aislados. Además, esta base de datos identifica también la presencia del gen de la enterobactina en todos los aislados, así como del gen de la proteína de membrana externa A (*ompA*) y un homólogo del operón *ecpABCDE*.

Tal y como se puede observar en la Tabla 16 las tres cepas productoras de yersiniabactina son también las pertenecientes al serotipo O2a:K24.

Tabla 16: Determinantes de virulencia según las bases de datos Kleborate y VFDB

Muestra	ST	Pathogenwatch (Kleborate)								VFDB																					
		K locus	O locus	Serotipo	Yersiniabactina	Coilbactina	Aerobactina	Salmochelina	rmpABC/rmpAZ	Enterobactina			Yersiniabactina									ompA	ecpABCDE								
										entA	entB	fepC	fyuA	irp1	irp2	ybA	ybE	ybP	ybQ	ybS	ybT		ybU	ybX	yagV/ecpE	yagW/ecpD	yagY/ecpC	yagY/ecpB	yagZ/ecpA	ykgV/ecpR	
1	11	KL24	O1/O2v1	O2a:K24	ybt 10 / ICEKp4	-	-	-	-	99,3	99,1	94,61	100	100	99,9	100	100	99,9	100	100	100	100	100	99,9	100	99,6	100	99,92	100	98,64	98,31
2	307	KL102	O1/O2v2	O2afg:K102	-	-	-	-	-	99,2	99,1	94,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	99,7	100	99,96	100	98,64	98,31
3	489	KL53	O3/O3a	O3/O3a	-	-	-	-	-	99,6	99,3	94,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	99,7	100	99,96	100	98,64	98,31
4	307	KL102	O1/O2v2	O2afg:K102	-	-	-	-	-	99,2	99,1	94,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	99,7	100	99,96	100	98,64	98,31
5	307	KL102	O1/O2v2	O2afg:K102	-	-	-	-	-	99,2	99,1	94,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	99,7	100	99,96	100	98,64	98,31
6	469	KL139	O3b	O3b:K139	-	-	-	-	-	99,2	99,1	94,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	99,7	100	99,96	100	98,64	98,31
7	422	KL111	O3b	O3b:K111	-	-	-	-	-	99,2	99,1	94,49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	99,7	100	99,96	100	98,64	98,31
8	307	KL102	O1/O2v2	O2afg:K102	-	-	-	-	-	-	99,1	94,49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	99,4	100	99,96	100	98,64	98,31
9	307	KL111	O3b	O3b:K111	-	-	-	-	-	99,2	99,3	94,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	99,6	100	99,96	100	98,47	98,31
10	5000	KL24	O1/O2v1	O2a:K24	ybt 10 / ICEKp4	-	-	-	-	99,3	99,1	94,61	100	99,9	99,9	100	100	100	100	100	100	99,8	100	100	100	99,7	100	99,96	100	98,64	98,31
11	1640	KL24	O1/O2v1	O2a:K24	ybt 10 / ICEKp4	-	-	-	-	99,3	99,1	94,61	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	99,7	100	99,96	100	98,64	98,31

5 Discusión

Las técnicas que permiten acelerar o dinamizar el diagnóstico etiológico de la bacteriemia tienen una enorme importancia en el manejo clínico de la sepsis. Prueba de ello es el esfuerzo mantenido en la optimización de su diagnóstico desde la mejora progresiva de los medios de cultivo, que permiten recuperar el agente causal en un mayor número de bacteriemias en un menor tiempo (66,67), pero también técnicas que se centran con mayor o menor fortuna en detectar estas bacterias sin necesidad de esperar a su crecimiento. En referencia a estas técnicas algunos ejemplos que se han utilizado son: el uso combinado de técnicas moleculares y espectrometría de masas que proponía el sistema IRIDICA (Abbot, EE.UU) con resultados prometedores (241), pero con limitada trayectoria comercial; sistemas que utilizan un sistema miniaturizado de resonancia magnética para detectar la presencia de algunas dianas específicas de ADN mediante la lectura de la respuesta de ciertas partículas paramagnéticas con la señal T2, como el sistema T2Dx (T2Biosystems, EE.UU) (242); o mediante el uso de secuenciación masiva o NGS directamente desde la muestra de sangre (213).

Otros abordajes utilizados se centran en el frasco de hemocultivo positivo para intentar acortar el proceso diagnóstico. En algunos casos utilizando soluciones moleculares como los populares paneles Filmarray, (BioFire, EE.UU) (243) validados para ser usados en hemocultivos positivos, pero también muchas soluciones comerciales que permiten acortar el tiempo para el procesamiento rutinario de los hemocultivos. En esta misma línea, pero como una solución no comercial, de bajo coste y bajo tiempo de preparación, se encuentra el método ultrarrápido (UF) que a lo largo de este trabajo se ha implementado para su posterior utilización en la identificación mediante MALDI-TOF, determinación de sensibilidad mediante el sistema Phoenix BD y, por último, también para la realización de WGS mediante un secuenciador ONT MinION.

5.1 Evaluación del rendimiento del método UF para la identificación mediante MALDI-TOF

En este estudio se ha desarrollado y evaluado el rendimiento de un nuevo método abreviado de preparación de los hemocultivos positivos para su identificación mediante MALDI-TOF (el método ultrarrápido, UF) comparándolo con el método establecido previamente en el laboratorio (el método centrifugación diferencial, DC). El principio de acción de este último es ampliamente conocido (115). La intención de la primera centrifugación de 10 min a 3000 rpm es separar el crecimiento bacteriano de los elementos celulares de la sangre y las resinas del frasco de hemocultivos, mientras que la segunda centrifugación a 10000 rpm forma un *pellet* bacteriano que puede ser directamente depositado en la tarjeta de MALDI-TOF.

Sin embargo, los frascos BACTEC™ Lytic/10 Anaerobic/F con saponina y su acción lítica otorgan una oportunidad única para acortar este procedimiento. Esta lisis permite prescindir de la primera centrifugación para eliminar los elementos formes de la sangre tal y como se ha realizado en otros protocolos de extracción proteica desde hemocultivos para MALDI-TOF basados en saponina (244). Sin embargo, este protocolo no se puede realizar con aquellos frascos no líticos que no incluyen saponina en su formulación, ya que en estos frascos el *pellet* formado se compone principalmente de glóbulos rojos y resinas que impiden su utilización para la determinación de la identificación bacteriana.

El método propuesto no requiere prácticamente ni equipo ni reactivos adicionales con respecto a la identificación estándar desde subcultivo en agar sólido, y consigue reducir de manera notable el tiempo requerido para la identificación del microorganismo.

Comparando con otros métodos, el método UF requiere un tiempo de preparación significativamente inferior. De hecho, el tiempo se reduce desde aproximadamente 25 min del método comercial Sepsityper (245) o los 15 min de otros métodos *in house* recientemente descritos (246) a 5 min; requiriendo, además, menos consumibles y ahorrando, por tanto, tiempo y dinero.

Además, el método UF funciona, de forma global y en todos los subanálisis realizados en este estudio, mejor que el método DC. Esta diferencia en rendimiento no siempre es estadísticamente significativa, pero en algunos casos, como el caso concreto de *S. aureus*, probablemente se debe al reducido número de muestras analizadas en el estudio. Estudios posteriores que apliquen este método puede que consigan alcanzar una diferencia significativa.

El umbral $> 1,7$ empleado para considerar los resultados como válidos y, por lo tanto, informables en este estudio, ha sido elegidos siguiendo las recomendaciones del fabricante. No obstante, estos límites pueden ser demasiado estrictos y, de hecho en la práctica clínica en situaciones especiales, como la identificación de micobacterias (107) y hongos filamentosos (108), estos umbrales se amplían con resultados satisfactorios. Unos umbrales menos estrictos aplicados a estos métodos ayudarían a mejorar sensiblemente el número de identificaciones correctas, teniendo siempre una mayor cautela al interpretar estos datos.

La limitación principal de este estudio es no poder comparar los resultados del presente estudio con soluciones comerciales que se sitúan a la cabeza en rendimiento en la literatura; como, por ejemplo, el kit Bruker MBT Sepsityper®. No obstante, este método consume notablemente más recursos tanto humanos como monetarios, al ser más laborioso y lento y tener que sumar el precio de adquisición de los reactivos. Otro método interesante para

comparar con el método UF es el realizado desde un subcultivo de 3h en medio sólido, conocido como MALDI gota (111,132), y muy extendido en los laboratorios de microbiología clínica. Este método, como el UF, no requiere de ninguna inversión extra. No obstante, en este caso el retraso diagnóstico es sustancial ya que sigue siendo un método basado en el cultivo.

Los resultados obtenidos en el método UF no son inferiores a los observados en otros estudios comparados en el metaanálisis de Ruiz-Aragón J, *et al.* (247), donde también se aprecia el peor rendimiento de estas técnicas para los microorganismos Gram positivos. El método UF utilizado en el presente estudio, consigue tasas de concordancia por encima de la media cuando se compara con otros métodos *in house*, recogidos en este metaanálisis.

Un valor añadido a este método es que también permite utilizar el *pellet* obtenido para otras aplicaciones: la realización de tests de hidrólisis de ciertos antibióticos en *Enterobacteriaceae* (126) o su uso para la realización de estudios de sensibilidad antimicrobiana o secuenciación masiva, siendo una aplicación importante a la hora de reconocer mecanismos de resistencia preocupantes como BLEE y carbapenemasas en bacterias causantes de bacteriemias.

5.2 Evaluación del método UF para la realización de estudios de sensibilidad antimicrobiana

Como se ha mencionado previamente, el método UF produce un *pellet* bacteriano cuya utilidad no se limita únicamente a la identificación de los hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF, sino que puede ser empleado para la realización de estudios de sensibilidad antimicrobiana. En este estudio se ha comparado el rendimiento del método UF con el método establecido en nuestro laboratorio (método de tubo separador de suero, SST) para la realización de estudios de sensibilidad antimicrobiana directamente del hemocultivo positivo.

Ambos métodos, tanto el UF como el SST funcionaron adecuadamente en este estudio y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en su rendimiento. No obstante, el método UF requiere de un tiempo de preparación significativamente inferior, acortando el proceso de diez minutos a uno. Asimismo, el método UF requiere menos material especializado, ya que solo es necesario un tubo de 2 ml en vez de un tubo separador de suero, más costoso y el volumen necesario de hemocultivo positivo también es menor, requiriendo solamente 2 ml en vez de 10 ml. Otro beneficio de este método es la posibilidad de combinar en un solo procedimiento, la generación de un *pellet* válido para la identificación bacteriana mediante MALDI-TOF descrito previamente (70) o para la preparación de librerías de secuenciación masiva

y una suspensión bacteriana para la realización de estudios de sensibilidad mediante el sistema Phoenix BD o cualquier otro sistema automatizado.

En los laboratorios de microbiología clínica se realizan cada vez un mayor número de determinaciones y este aumento no siempre es proporcional al aumento de plantillas (248). Por ello, el desarrollo de este tipo de técnicas más rápidas y que permiten simplificar los flujos de trabajo son especialmente importantes (249).

En el presente estudio se ha obtenido una tasa de concordancia con la identificación definitiva mediante Phoenix del 93,93 % para el método SST. Estos resultados son muy similares a los observados previamente por Funke *et al.* (219) que obtuvo un 92,88 % o por Yonetani *et al.* (250) con un 92,89 %. Por el contrario, con el método UF se obtuvo un rendimiento inferior (87,7 %), aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa y depende, en gran medida, de los problemas para identificar *S. aureus* mediante el método UF. Excluyendo este microorganismo la tasa de concordancia sería del 93,93 % al igual que para el método SST.

Estos problemas observados con la identificación de *S. aureus* mediante el método UF son sorprendentes con una tasa de acierto en la identificación de tan solo 46,15 % comparando con el 84,6 % del método SST. En la mayor parte de los casos, estos aislados fueron identificados erróneamente como estafilococos coagulasa negativos por método UF. Es posible que ciertos compuestos presentes en los frascos de hemocultivos líticos, incluyendo la saponina, no se eliminen mediante el método UF e interfieran con la identificación bioquímica que lleva a cabo el sistema Phoenix en el panel PMIC/ID-88. De hecho, en un estudio realizado por Lupetti *et al.* en el que emplearon saponina para lisar los hemocultivos como paso intermedio para la realización de paneles del sistema Phoenix obtuvieron también resultados subóptimos en la identificación de *Staphylococcus* spp (251). Sin embargo, en el presente estudio no se ha relacionado la identificación errónea de este género con ninguna prueba bioquímica de las incluidas en el panel PMIC/ID-88 en particular. Afortunadamente, en estos paneles no se han detectado problemas con el apartado de sensibilidad bacteriana. Debido a esto, y a la capacidad de realizar la identificación mediante MALDI-TOF mediante el método UF, una solución sería combinar la identificación mediante MALDI-TOF con los paneles de Phoenix BD que solo realizan estudios de sensibilidad antimicrobiana, ya que estos paneles al disponer de más pocillos o tener que utilizarlos para pruebas bioquímicas de identificación, permiten incluir en el panel más antibióticos a estudiar, siendo algunos de estos antibióticos de gran importancia clínica o microbiológica.

En cuanto al rendimiento en la determinación de la sensibilidad a diferentes antimicrobianos, en este estudio se ha observado que el 93,33 % de las muestras analizadas mediante el método UF concuerdan con el método de referencia, a diferencia del método SST en el que esta concordancia era solo del 88,88 %. Estos resultados son similares a los obtenidos por Yonetani *et al.* (250) del 92,7 %, aunque algo inferiores a los descritos por Funke *et al.* (219) del 95 %.

Como se ha comentado previamente, una de las principales limitaciones del estudio es no haber podido comparar los resultados de nuestro método con técnicas comerciales como, por ejemplo, el sistema FAST™ (Qvella Corporation, Canada) (252) que produce también, a partir de 2 ml de sangre y en 20 min, una suspensión bacteriana, denominada colonia líquida, apta para la realización de estudios de sensibilidad, identificación mediante MALDI-TOF (253) y preparación de librerías para secuenciación masiva (252). No obstante, pese a los resultados prometedores que este tipo de técnicas ofrecen, siguen implicando la adquisición de equipos y reactivos adicionales, con el consecuente impacto económico. Además, el sistema FAST™, a diferencia del método UF, está limitado a la realización únicamente de dos determinaciones simultáneas y requiere de un mayor tiempo tanto de preparación del cartucho (unos 2 min) como de proceso (unos 20 min).

Otra limitación del método UF es que solo puede emplearse a partir de frascos BACTEC™ Lytic/10 Anaerobic/F, debido a que su funcionamiento se basa en los compuestos líticos que se encuentran en estos medios. Esto supone una limitación a su posible implantación en la rutina, puesto que en ocasiones no se puede contar con este tipo de frasco, como, por ejemplo, en la población pediátrica en la que se emplean otro tipo especial de hemocultivos.

Por todo ello, se puede considerar que el rendimiento del método UF es al menos equivalente al método que hasta ahora era rutinario en nuestro laboratorio, el SST, y es una mejora sustancial al flujo de trabajo de los hemocultivos positivos en nuestro laboratorio.

5.3 Evaluación del método UF para la preparación de librerías de secuenciación masiva

Para evaluar el rendimiento del método UF como método previo a la extracción de ácidos nucleicos para la realización de secuenciación de WGS mediante el secuenciador MinION se ha realizado una prueba de concepto con 3 aislados bacterianos que han sido secuenciados desde colonia y nueve desde hemocultivo positivo simulado.

En el presente estudio no se han observado diferencias entre la concentración de ADN obtenida en las muestras extraídas de colonia (44-112 ng/μl) y la extraídas de hemocultivo positivo (84-118 ng/μl). En estudios previos en los que se realizaba secuenciación mediante el sistema MinION a partir de hemocultivos, las concentraciones fueron similares 17-60 ng/μl, aún empleado soluciones comerciales especialmente diseñadas para la extracción desde hemocultivos como el BiOstic Bacteremia DNA kit (Quiagen, Alemania) (254) o el kit MoLYsis Plus (Oasis Diagnostics, Canada) (216). Además, en este último caso es necesaria la realización de una lisis enzimática previa, lo que aumenta notablemente el tiempo de preparación más allá de las tres horas. La concentración de ADN obtenida es, además, suficiente para realizar WGS sin necesidad de realizar procedimientos adicionales como PCR para aumentar el rendimiento de las librerías (255), lo cual se traduce en una disminución del tiempo necesario para la preparación de las muestras. En el presente estudio, este tiempo es inferior a una hora, incluyendo desde la extracción de la sangre del hemocultivo positivo hasta la introducción de la librería en el propio secuenciador, por lo que convierte este método en una posibilidad viable para su realización rutinaria en los laboratorios de microbiología clínica.

Por otro lado, pese a que la concentración de ADN obtenida de la extracción directamente desde el *pellet* obtenido mediante el método UF era suficiente, se pudo observar que la calidad de ese ADN no se encontraba dentro de los rangos de absorbancia recomendados por el fabricante. Por ello, se optó por realizar un lavado del eluido con partículas magnéticas previo a la preparación de la librería. Más aún, en un ensayo anterior a este estudio se realizó un experimento de secuenciación sin esta purificación y se detectó que se producían errores de lecturas durante la secuenciación y, además, se observó que la obstrucción de los poros se produjo a una mayor velocidad causando un número de lecturas viables extremadamente bajo.

La saturación de poros puede deberse a la presencia de inhibidores en la sangre como la hemoglobina o la inmunoglobulina G, que son sobradamente descritos como problemáticos para la realización de PCR u otros procedimientos moleculares que emplean ADN que ha sido extraído de sangre (256). En nuestros resultados, los rangos de A260-A230 inferiores a 2,0 pueden estar relacionados con contaminación de alcoholes, fenoles y carbohidratos provenientes de la extracción que pueden interferir con los componentes de librerías como los adaptadores (222), aunque las muestras extraídas desde colonia no se vieron afectadas.

En otro estudio reciente realizado por Avershina *et al.* (257) en el que también emplean *flongle* para la secuenciación directa desde hemocultivos obtienen resultados similares a los que se observan en el presente estudio. Aunque en este caso utilizan otro kit de preparación de

librerías, el SQK-LSK110, consiguiendo valores de lecturas similares que tampoco se relacionan con la cantidad de poros disponibles al inicio de la secuenciación.

En los experimentos realizados desde colonia, se ha podido observar en WIMP una proporción de lecturas bacterianas superior al 99 %, mientras que en las realizadas desde hemocultivos este porcentaje varía entre el 70 % al 95 %. En estas muestras, a pesar de que la mayor parte del resto de lecturas alinean con *Homo sapiens* (Tabla 11), se demuestra que metodología utilizada en el presente estudio permite realizar, en gran medida, una correcta separación de los componentes y células presentes en la sangre dando como resultado una mayor proporción de ADN bacteriano. Finalmente, cerca del 3 % al 5 % del porcentaje neto asignado a bacterias, correspondía a otros taxones bacterianos relacionados, con los que posiblemente comparten genes o secuencias similares.

En los análisis realizados con lecturas crudas se ha podido observar que, tanto en la asignación de especie como en la detección de determinantes de resistencia, se pueden producir errores de asignación, con especies bacterianas estrechamente relacionadas en el WIMP o con otras variantes del mismo determinante de resistencia en la búsqueda en CARD (como ocurría con ciertas muestras con variantes de *bla_{SHV}* o *bla_{OXA}*). Por lo tanto, es recomendable seleccionar aquellos que cuentan con un mayor número de alineamientos; ya que muchas de las asignaciones realizadas con EPI2ME pueden tener tasas de error entre el 10 % y el 20 % con genes de elevada similitud (214,216) .

Mediante el análisis de secuencias crudas en EPI2ME se ha conseguido un perfil básico de genes de resistencia, pero es recomendable realizar un análisis a partir de secuencias consenso. A pesar de esto, este programa muestra un gran potencial para la detección rápida en los casos de infecciones graves. Además, presenta la ventaja de no requerir conocimientos avanzados en bioinformática ni el uso de grandes recursos informáticos facilitando el acceso a más personas y su implementación tanto en la rutina como en la atención continuada en microbiología clínica.

Otros estudios con la tecnología de ONT difieren del nuestro en algunos aspectos, ya que suelen emplear las más extendidas *flowcell* en lugar de *flongle* y se seleccionan alineamientos con menos del 100 % de identidad. Así, en el estudio de Cao *et al.* (258) describen que para la detección de genes de resistencia en la base de datos Resfinder de una cepa de *K. pneumoniae* secuenciada con MinION, el número de lecturas necesarias para la identificación de betalactamasas era entre 1200 y 25000 con profundidad de 4X a 7X en un tiempo entre 2 y 10 horas. Sin embargo, el autor señala detecciones erróneas debido a bajos valores de cobertura

y de rendimiento en la secuenciación. En el estudio de Avershina *et al.* (257) mencionado previamente describen también que los archivos recuperados durante las primeras 3 horas eran suficientes para realizar la identificación de genes de resistencia y las primeras secuencias fiables se obtenían con tan solo 3000 o 4000 lecturas.

En el presente estudio, el kit SQK-RAD004 empleado en *flongle* demostró un buen rendimiento tanto en subcultivos como en hemocultivos, debido a que se obtienen valores similares de número de lecturas y calidad en la secuenciación. Respecto a otros estudios, el tiempo necesario para la identificación de genes de resistencia fue mayor, ya que se valoraron genes de resistencia con una identidad del 100 %, lo cual requiere una mayor cobertura y número de lecturas. Pese a que se ha determinado que la secuenciación con ONT puede presentar tasas de error de hasta del 3 %, este tipo de secuenciación ofrece ventajas como permitir secuenciar fragmentos más largos de ADN, lo cual facilita y reduce el tiempo para el proceso de ensamblaje. Para mejorar el proceso de ensamblaje y reducir la tasa de errores, ONT ha mejorado su software bioinformático mediante una optimización en los algoritmos de alineación que favorece el aumento de la profundidad de las secuencias y la producción de una secuencia consenso más fiable (30x a 50x) (259).

En cuanto al secuenciotipo, el más frecuente, y, de hecho, el único presente en más de una muestra, incluyendo el único aislado productor de KPC-3, ha sido el ST307 (45,45 %). Este ST pertenece a un clon multirresistente que está asociado a la producción de carbapenemasas y ha emergido en varias partes del mundo, siendo actualmente un clon de alto riesgo (260). En España han sido descritos varios brotes asociados a este clon, incluyendo bacteriemias (261).

Pese a que se han dado grandes avances en los últimos años en la correlación entre genotipos y fenotipos de sensibilidad antibiótica, hoy sigue siendo complicado establecer con seguridad la resistencia a determinados antibióticos con la detección de ciertos genes. Para obtener una mayor precisión, en ocasiones, son necesarios estudios más exhaustivos del entorno genético de esos mismos genes y el estudio de otros factores relacionados. Esto aleja, en cierta manera a estas predicciones de la realidad clínica, aunque no dejan de tener una elevada importancia.

Este es el caso de *bla*_{OXA-48}, la carbapenemasa más frecuente en el presente estudio, que aun teniendo todos los aislados alteraciones en las porinas OmpK35 y OmpK36 presentaron diferentes niveles de resistencia a carbapenems. A diferencia del estudio de Lumbreras-Iglesias *et al.* (262), en nuestro estudio no se pudo relacionar esas mutaciones con los diferentes grados de sensibilidad a carbapenems.

Otro ejemplo en el que la relación entre genotipo y fenotipo no es clara, es el de la resistencia a fosfomicina. En todos los aislados de nuestro estudio encontramos *fosA* y, sin embargo, los datos de resistencia a fosfomicina obtenidos del sistema Phoenix BD son muy variables. Esto es similar a lo descrito por Elliot *et al.* que en un estudio con 70 enterobacterias positivas para *fosA* encontraron que las CMI variaban entre $\leq 0,5$ y $>1024 \mu\text{g/ml}$ (263).

Por el contrario, en el caso de la resistencia a cotrimoxazol en el presente estudio se pudo encontrar una relación directa en la presencia de genes que actúan en los dos componentes activos del antibiótico como son *dfrA* (trimetropim) y *sul* (sulfametoxazol) y la resistencia a cotrimoxazol. La presencia de ambos genes en los aislados clínicos de nuestro estudio se corresponde con la resistencia a ese antibiótico como ya fue descrito previamente en *Stenotrophomonas maltophilia* por Hu *et al.* (264).

El estudio de los plásmidos mediante secuenciación masiva puede ser un proceso arduo y, por ello, en muchas ocasiones se ha optado por aislar y extraer específicamente los plásmidos para su secuenciación (265). Incluso mediante aislamiento previo, el análisis de los plásmidos de más de 50 kb sigue representando un problema (266). Con el desarrollo de nuevas versiones de ensambladores y algoritmos específicos para el ensamblado de plásmidos como el plasmidSPADES (267), las perspectivas de utilizar plataformas de secuenciación de lecturas cortas como Illumina para su análisis han mejorado (268), pero realmente son las tecnologías de secuenciación de molécula única o de tercera generación las que realmente tienen el mayor potencial para resolver las estructuras plasmídicas correctamente. Una de las principales desventajas de estos métodos sigue siendo su relativa baja precisión por base, teniendo, por ejemplo, nuestras secuencias obtenidas mediante tecnología ONT puntuaciones de Phred (Q) medias de en torno a 13, mientras que las secuencias obtenidas mediante Illumina se pueden situar cerca de Q=30. Debido a esto, la estrategia más contrastada para el correcto análisis de las estructuras plasmídicas es combinar lecturas largas y cortas en lo que se conocen como ensamblajes híbridos (269). En este sentido, una estrategia viable sería utilizar en una primera instancia el método UF y la secuenciación mediante minION para facilitar una respuesta rápida en los hemocultivos positivos y, posteriormente, para completar el estudio combinar esas lecturas con las de una secuenciación mediante un método de lecturas cortas.

En este estudio solamente se han empleado lecturas de ONT, no obstante, en las cepas en las que se logró una profundidad de secuenciación por encima de 60x los resultados han sido altamente satisfactorios obteniendo un número reducido de *contigs* en los que siempre se ha encontrado complejos de incompatibilidad y, en muchos casos, determinantes de resistencia. Si

bien no se ha comprobado la existencia de dichos plásmidos mediante otras técnicas, es razonable pensar que los *contigs* que corresponden a estructuras genéticas más pequeñas que el cromosoma y que incluyen estructuras plasmídicas sean en efecto plásmidos.

Por el contrario, en las secuencias con una menor cobertura se pudo observar que aparecen un mayor número de *contigs*, de tamaños muy variados, que en ocasiones no portan complejos de incompatibilidad. En otras ocasiones en la misma secuencia aparecen dos o más *contigs* con el mismo complejo de incompatibilidad, lo que es un indicio claro de que esta secuencia no represente la estructura del genoma bacteriano en cuestión.

Los complejos de incompatibilidad más frecuente en los *contigs* de nuestros aislados fueron la asociación IncFIB(K)/IncFII(K), presente en 9 de 11 secuencias. Los plásmidos pertenecientes al complejo de incompatibilidad IncF son muy frecuentes en enterobacterias y, a menudo, pueden portar más de un replicón como en este caso. Estos plásmidos vehiculizan asiduamente multitud de determinantes de resistencia como *bla*_{CTX-M-15} o *qnrS1*, entre otros (270,271). En la secuencia 2 se pudo encontrar un *contig* que incluía un complejo de incompatibilidad IncF, en este caso IncFIB(pQil)/IncFII(K), acompañando a *bla*_{KPC-3}.

Con respecto a la carbapenemasa más frecuente en nuestro estudio, *bla*_{OXA-48}, siempre se ha podido encontrar en estructuras que se han considerado como posibles plásmidos. Más específicamente, en 6 de los 8 aislados en los que se detectó *bla*_{OXA-48}, ésta se encontraba en un *contig* de unos 65 kb que portaba también un IncL, similar a los descritos por Poirel *et al.* (272). No obstante, es necesario un análisis en mayor profundidad y posiblemente el uso de un ensamblaje híbrido para establecer el posible origen clonal de estos plásmidos.

La alta heterogeneidad que presenta *K. pneumoniae* en la producción de sus lipopolisacáridos que contienen diferentes variantes del antígeno O y de los polisacáridos capsulares correspondientes al antígeno K, dificultan en gran medida la creación de una vacuna realmente protectora frente a *K. pneumoniae* (273). Por ello, no resulta sorprendente que en nuestro estudio encontremos 5 serotipos diferentes analizando 11 muestras. Incluso dentro del mismo ST, en nuestro caso ST307, se pudieron detectar cepas que albergan diferentes loci tanto del antígeno K como O. En ninguna de nuestras cepas se detectó K1 o K2, estrechamente relacionadas con el fenotipo hipervirulento e hiperviscoso de *K. pneumoniae* (274).

Las cepas de *K. pneumoniae* incluidas en este estudio, salvo el aislado número 3 que es de un control de calidad de la SEIMC, son en su mayoría aislados clínicos de infecciones de orina o aislados provenientes de estudios de colonización, es decir, no son originalmente cepas con una alta capacidad invasiva. El aislado 2 es probablemente la cepa comercial de la American

Type Culture Collection ATCC 700603, debido a la alta homología de sus secuencias, y en origen esta cepa fue también aislada en el contexto de una infección de orina. Más que por su interés patogénico, estas cepas fueron seleccionadas por su perfil de resistencia antibiótica, y por suerte, hasta ahora en *K. pneumoniae* la multirresistencia y la elevada patogenicidad rara vez se dan juntas (275).

Por lo tanto, como era de esperar estas cepas no presentaban una gran dotación de determinantes de virulencia, siendo tan solo 3 de ellas productoras de yersiniabactina, como único determinante detectado en Kleborate. La yersiniabactina, a diferencia de otros sideróforos analizados, es relativamente frecuente en *K. pneumoniae* y no se encuentra asociada a plásmidos, sino a un elemento integrativo y conjugativo conocido como ICEKp (276) y en las secuencias analizadas en el presente estudio se encontraba en efecto en el *contig* identificado como cromosoma.

La base de datos VFDB identificó también la yersiniabactina en las mismas cepas que Kleborate, y además detectó la presencia de la proteína de membrana OmpA y la presencia de homólogo del operón *ecpABCDE* en todas las secuencias. La función de estas moléculas en la patogenia de *K. pneumoniae* es discutida, pero OmpA tiene entre otras funciones la capacidad de defender a la célula bacteriana de la acción de péptidos antimicrobianos (277) y *ecpABCDE*, que codifica para el pili común de *E. coli*, está involucrado en la formación de biopelículas en *K. pneumoniae* (278) junto con las fimbrias de tipo 1 y 3 (279,280).

El presente trabajo presenta limitaciones respecto al tipo de muestra empleado. Se utilizaron cepas conocidas que fueron inoculadas en hemocultivos, por lo cual no se evaluaron muestras clínicas en las cuales se pueden presentar cultivos mixtos, o con diferentes concentraciones de microorganismos. La sangre empleada era de voluntarios sanos y se desconoce de qué forma la sangre de pacientes con infección (mayor número de neutrófilos, respuesta inmune activada, tratamiento antibiótico) puede afectar a la extracción o a la secuenciación masiva.

En conclusión, pese a las limitaciones de este estudio y teniendo en cuenta la gran cantidad de información que se obtienen de este tipo de técnicas se puede considerar que su implantación en los servicios de microbiología clínica está plenamente justificada. Su impacto económico no es mayor que el de muchas técnicas rápidas que se utilizan hoy en día en los laboratorios de microbiología y la preparación de la librería y los primeros resultados que se obtienen no están muy alejados de los obtenidos por dichas técnicas rápidas. Además, si bien es cierto que, para el total aprovechamiento de los datos generados, sigue siendo necesario

contar con personal experto en bioinformática, con las plataformas como EPI2ME se pueden obtener datos de alta relevancia clínica (p. ej. identificación de los microorganismos implicados en una bacteriemia y determinantes de resistencia) sin necesidad de grandes conocimientos informáticos, en un informe similar al obtenido de otras técnicas rápidas. Esta tecnología supone la ventaja añadida de poder aprovechar posteriormente la información adicional generada para ampliar los estudios necesarios. Por otro lado, no se debe olvidar que, a diferencia de muchas otras técnicas rápidas, la realización de WGS desde el hemocultivo positivo directo no está restringida a unas especies bacterianas en concreto y puede funcionar para el diagnóstico de patógenos poco frecuentes.

6 Conclusiones

De los resultados obtenidos en el estudio realizado en el presente proyecto de Tesis Doctoral se puede extraer las siguientes conclusiones:

1. El nuevo método propuesto en este estudio, el método ultrarrápido UF, es un procedimiento barato, sencillo y que no requiere apenas de material adicional.
2. El método UF, comparado con el de doble centrifugación (DC), permite reducir en 10 minutos la identificación del microorganismo de un hemocultivo positivo mediante MALDI-TOF.
3. El método UF tiene un rendimiento superior al método DC tanto de forma global como en la identificación de microorganismos Gram positivos, Gram negativos y anaerobios.
4. El *pellet* obtenido mediante la técnica UF puede ser empleado para la realización de estudios de sensibilidad antimicrobiana automatizados directamente desde el hemocultivo positivo.
5. El método UF tiene un rendimiento equivalente al método del tubo separador de suero (SST) y al método de referencia desde colonia en la identificación bacteriana mediante el sistema Phoenix BD.
6. El método UF no es inferior al método SST en la realización de estudios de sensibilidad antimicrobiana automatizados directamente desde un frasco de hemocultivo positivo.
7. El método UF y los nuevos protocolos de preparación de librería rápidos de ONT permiten comenzar un experimento de secuenciación masiva desde frascos de hemocultivos positivos en menos de una hora.
8. Mediante el método propuesto se obtienen datos fiables y definitivos sobre secuenciotipo y determinantes de resistencia en menos de 7 horas desde la positivización del hemocultivo.
9. La secuencia obtenida es de una calidad y cobertura suficiente para el estudio de posibles estructuras plasmídicas y determinantes de virulencia.
10. La capacidad de inferir de manera fiable del fenotipo de resistencias a partir del genoma bacteriano obtenido de un frasco de hemocultivo positivo es cada vez más cercana, aunque son necesarios más estudios.

7 Bibliografía

1. Gul F, Arslantas MK, Cinel I, Kumar A. Changing definitions of sepsis. *Turk J Anesth Reanim.* 2017. 45(3):129–38.
2. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest.* 1992. 101(6):1644–55.
3. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016. 315(8):801–10.
4. Vincent JL, de Mendonça A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, *et al.* Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on “sepsis-related problems” of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med.* 1998. 26(11):1793–800.
5. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, *et al.* Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016. 193(3):259–72.
6. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, *et al.* Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet.* 2020. 395(10219):200–11.
7. Darbà J, Marsà A. Epidemiology, management and costs of sepsis in Spain (2008–2017): a retrospective multicentre study. *Curr Med Res Opin.* 2020. 36(7):1089–95.
8. Hagel S, Pletz MW, Brunkhorst FM, Seifert H, Kern WV. Bakteriämie und Sepsis. *Internist.* 2013. 54(4):399–407.
9. Rodríguez Díaz J, Guna Serrano R, Larrosa Escartín N, Marin Arriaza M. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R, editores. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC); 2017.
10. Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive candidiasis. *N Engl J Med.* 2015. 373(15):1445–56.
11. Chaves F, Garnacho-Montero J, del Pozo JL, Bouza E, Capdevila JA, de Cueto M, *et al.* Diagnosis and treatment of catheter-related bloodstream infection: Clinical guidelines of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology and (SEIMC) and the Spanish Society of Intensive and Critical Care Medicine and Coronary Units (SEMICYUC). *Med Intensiva.* 2018. 42(1):5–36.
12. Bonten M, Johnson JR, van den Biggelaar AHJ, Georgalis L, Geurtsen J, de Palacios PI, *et al.* Epidemiology of *Escherichia coli* bacteremia: A systematic literature review. *Clin Infect Dis.* 2021. 72(7):1211–9.
13. Lockhart PB, Brennan MT, Sasser HC, Fox PC, Paster BJ, Bahrani-Mougeot FK. Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. *Circulation.* 2008. 117(24):3118–25.
14. Huerta LE, Rice TW. Pathologic difference between sepsis and bloodstream infections. *J Appl Lab Med.* 2019. 3(4):654–63.

15. Minasyan H. Sepsis and septic shock: Pathogenesis and treatment perspectives. *J Crit Care.* 2017. 40:229–42.
16. Nielsen SL. The incidence and prognosis of patients with bacteremia. *Dan Med J.* 2015. 62(7):B5128.
17. Zilberberg MD, Shorr AF, Micek ST, Vazquez-Guillamet C, Kollef MH. Multi-drug resistance, inappropriate initial antibiotic therapy and mortality in Gram-negative severe sepsis and septic shock: a retrospective cohort study. *Crit Care.* 2014. 18(596).
18. Tang Y, Wu X, Cheng Q, Li X. Inappropriate initial antimicrobial therapy for hematological malignancies patients with Gram-negative bloodstream infections. *Infection.* 2020. 48(1):109–16.
19. Bou G, Calbo E, Crespo M, Cantón R, Álvarez de Luna FF, García Rodríguez J, *et al.* Justification for 24/7 clinical microbiology services. *Enfermedades Infecc Microbiol Clin Engl Ed.* 2022. 40(1):1–4.
20. Cross A, Levine MM. Patterns of bacteraemia aetiology. *Lancet Infect Dis.* 2017. 17(10):1005–6.
21. Musicha P, Cornick JE, Bar-Zeev N, French N, Masesa C, Denis B, *et al.* Trends in antimicrobial resistance in bloodstream infection isolates at a large urban hospital in Malawi (1998–2016): a surveillance study. *Lancet Infect Dis.* 2017. 17(10):1042–52.
22. McGowan JE Jr, Barnes MW, Finland M. Bacteremia at Boston City Hospital: Occurrence and mortality during 12 selected years (1935-1972), with special reference to hospital-acquired cases. *J Infect Dis.* 1975. 132(3):316–35.
23. Anderson DJ, Moehring RW, Sloane R, Schmader KE, Weber DJ, Jr VGF, *et al.* Bloodstream infections in community hospitals in the 21st century: a multicenter cohort study. *PLOS ONE.* 2014. 9(3):e91713.
24. de Kraker MEA, Jarlier V, Monen JCM, Heuer OE, van de Sande N, Grundmann H. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clin Microbiol Infect.* 2013. 19(9):860–8.
25. Cassini A, Plachouras D, Eckmanns T, Abu Sin M, Blank HP, Ducomble T, *et al.* Burden of six healthcare-associated infections on european population health: estimating incidence-based disability-adjusted life years through a population prevalence-based modelling study. Harbarth S, editor. *PLOS Med.* 2016. 13(10):e1002150.
26. Informe España: Prevalencia de infecciones (relacionadas con la asistencia sanitaria y comunitarias) y uso de antimicrobianos en hospitales de agudos. ESTUDIO EPINE-EPPS nº 31: 2021. Sociedad Española de Medicina Preventiva Salud Publica e Higiene; 2021.
27. Saint S, Kaufman SR, Rogers MAM, Baker PD, Boyko EJ, Lipsky BA. Risk factors for nosocomial urinary tract-related bacteremia: A case-control study. *Am J Infect Control.* 2006. 34(7):401–7.
28. Medina M, Castillo-Pino E. An introduction to the epidemiology and burden of urinary tract infections. *Ther Adv Urol.* 2019. 11:175628721983217.

29. Bassetti M, Peghin M, Vena A, Giacobbe DR. Treatment of infections due to MDR Gram-negative bacteria. *Front Med*. 2019. 6:74.
30. Vidal-Garcia M. Informe de sensibilidad acumulada 2021. OSI Bilbao-Basurto. 2021.
31. Paun VI, Lavin P, Chifiriuc MC, Purcarea C. First report on antibiotic resistance and antimicrobial activity of bacterial isolates from 13,000-year old cave ice core. *Sci Rep*. 2021. 11(1):514.
32. Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol*. 2010. 1(134).
33. Marín M, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2003. 21(1):42–55.
34. Poole K. Resistance to β -lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2004. 61(17):2200–23.
35. El Feghaly RE, Stamm JE, Fritz SA, Burnham CAD. Presence of the *bla_z* beta-lactamase gene in isolates of *Staphylococcus aureus* that appear penicillin susceptible by conventional phenotypic methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012. 74(4):388–93.
36. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 2018. 45:131–9.
37. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2017. 41(3):252–75.
38. Jacoby GA. AmpC β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009. 22(1):161–82.
39. Brolund A, Lagerqvist N, Byfors S, Struelens MJ, Monnet DL, Albiger B, *et al*. Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe, assessment by national experts from 37 countries, July 2018. *Eurosurveillance* [Internet]. 2019. 24(9). Disponible en: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.9.1900123>
40. Xanthopoulou K, Urrutikoetxea-Gutiérrez M, Vidal-Garcia M, Diaz de Tuesta del Arco JL, Sánchez-Urtaza S, Wille J, *et al*. First report of New Delhi Metallo- β -Lactamase-6 (NDM-6) in a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate from northern Spain. *Front Microbiol*. 2020. 11:589253.
41. Weigel LM, Steward CD, Tenover FC. *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998. 42(10):2661–7.
42. Bagel S, Hüllen V, Wiedemann B, Heisig P. Impact of *gyrA* and *parC* mutations on quinolone resistance, doubling time, and supercoiling degree of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999. 43(4):868–75.
43. Tran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci*. 2002. 99(8):5638–42.

44. Li J, Zhang H, Ning J, Sajid A, Cheng G, Yuan Z, *et al.* The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019. 8(1):44.
45. Kim YT, Jang JH, Kim HC, Kim HG, Lee KR, Park KS, *et al.* Identification of strain harboring both aac(6')-Ib and aac(6')-Ib-cr variant simultaneously in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *BMB Rep.* 2011. 44(4):262–6.
46. Ryttenberg C. On the value of the use of ammonium oxalate in blood culture technic. *J Med Res.* 1909. 20(1):79–93.
47. Johnston W, Mactaggart DD. On the difference between serum and blood solutions, the condition of the test culture and the significance of *Bacterium coli* infection in relation to typhoid diagnosis. *Indian Med Gaz.* 1897. 32(9):328–32.
48. Scott EG. A practical blood culture procedure. *Am J Clin Pathol.* 1951. 21(3_ts):290–4.
49. Renner ED, Gatheridge LA, Washington JA. Evaluation of radiometric system for detecting bacteremia. *Appl Microbiol.* 1973. 26(3):368–72.
50. Rohner P, Pepey B, Auckenthaler R. Advantage of combining resin with lytic BACTEC blood culture media. *J Clin Microbiol.* 1997. 35(10):2634–8.
51. van der Heijden YF, Miller G, Wright PW, Shepherd BE, Daniels TL, Talbot TR. Clinical impact of blood cultures contaminated with coagulase-negative staphylococci at an academic medical center. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2011. 32(6):623–5.
52. Self WH, Talbot TR, Paul BR, Collins SP, Ward MJ. Cost analysis of strategies to reduce blood culture contamination in the emergency department: sterile collection kits and phlebotomy teams. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2014. 35(8):1021–8.
53. Sánchez-Sánchez MM, Arias-Rivera S, Fraile-Gamo P, Jareño-Collado R, López-Román S, Vadillo-Obesso P, *et al.* Effect of a training programme on blood culture contamination rate in critical care. *Enferm Intensiva Engl Ed.* 2018. 29(3):121–7.
54. Roth A, Wiklund AE, Pålsson AS, Melander EZ, Wullt M, Cronqvist J, *et al.* Reducing blood culture contamination by a simple informational intervention. *J Clin Microbiol.* 2010. 48(12):4552–8.
55. Youssef D, Shams W, Bailey B, O'Neil TJ, Al-Abbadi MA. Effective strategy for decreasing blood culture contamination rates: the experience of a Veterans Affairs Medical Centre. *J Hosp Infect.* 2012. 81(4):288–91.
56. Taniguchi T, Tsuha S, Shiiki S, Narita M. High positivity of blood cultures obtained within two hours after shaking chills. *Int J Infect Dis.* 2018. 76:23–8.
57. Wilson ML, Clinical and Laboratory Standards Institute. Principles and procedures for blood cultures: approved guideline. Wayne, Pa.: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
58. Mimoz O, Karim A, Mercat A, Cosseron M, Falissard B, Parker F, *et al.* Chlorhexidine compared with povidone-iodine as skin preparation before blood culture: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med.* 1999. 131(11):834.

59. Gonsalves WI, Cornish N, Moore M, Chen A, Varman M. Effects of volume and site of blood draw on blood culture results. *J Clin Microbiol.* 2009. 47(11):3482–5.
60. Cockerill FR III, Wilson JW, Vetter EA, Goodman KM, Torgerson CA, Harmsen WS, *et al.* Optimal testing parameters for blood cultures. *Clin Infect Dis.* 2004. 38(12):1724–30.
61. Chang J, Park JS, Park S, Choi B, Yoon NS, Sung H, *et al.* Impact of monitoring blood volume in the BD BACTEC™ FX blood culture system: virtual volume versus actual volume. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015. 81(2):89–93.
62. Lee S, Kim S. Accuracy of BacT/Alert Virtuo for measuring blood volume for blood culture. *Ann Lab Med.* 2019. 39(6):590–2.
63. Khare R, Kothari T, Castagnaro J, Hemmings B, Tso M, Juretschko S. Active monitoring and feedback to improve blood culture fill volumes and positivity across a large integrated health system. *Clin Infect Dis.* 2020. 70(2):262–8.
64. Saito T, Iinuma Y, Takakura S, Nagao M, Matsushima A, Shirano M, *et al.* Delayed insertion of blood culture bottles into automated continuously monitoring blood culture systems increases the time from blood sample collection to the detection of microorganisms in bacteremic patients. *J Infect Chemother.* 2009. 15(1):49–53.
65. Appelbaum PC, Beckwith DG, Dipersio JR, Dyke JW, Salventi JF, Stone LL. Enhanced detection of bacteremia with a new BACTEC resin blood culture medium. *J Clin Microbiol.* 1983. 17(1):48–51.
66. Hollick GE, Edinger R, Martin B. Clinical comparison of the BACTEC 9000 Standard Anaerobic/F and Lytic/F blood culture media. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1996. 24(4):191–6.
67. Vetter E, Torgerson C, Feuker A, Hughes J, Harmsen S, Schleck C, *et al.* Comparison of the BACTEC MYCO/F lytic bottle to the isolator tube, BACTEC Plus Aerobic F/Bottle, and BACTEC Anaerobic Lytic/10 Bottle and comparison of the BACTEC Plus Aerobic F/Bottle to the isolator tube for recovery of bacteria, mycobacteria, and fungi from blood. *J Clin Microbiol.* 2001. 39(12):4380–6.
68. Bottino P, Rapallo F, Gamalero E, Rocchetti A. Performance of a new combination of blood culture vials in sepsis detection: a 2-year retrospective comparison. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019. 38(8):1435–41.
69. Almuhayawi M, Altun O, Abdulmajeed AD, Ullberg M, Özenci V. The performance of the four anaerobic blood culture bottles BacT/ALERT-FN, -FN Plus, BACTEC-Plus and -Lytic in detection of anaerobic bacteria and identification by direct MALDI-TOF MS. *PLoS One.* 2015. 10(11):e0142398.
70. Urrutikoetxea-Gutiérrez M, Sánchez Montiel M, Vidal-García M, Basaras M, Cisterna Cancer R, Díaz de Tuesta del Arco JL. Ultra-fast direct method for identifying microorganisms from BACTEC lytic/10 anaerobic/F flasks. *Future Microbiol.* 2021. 16(18):1381–7.
71. Gram HC. Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt und Trockenpräparaten. En: *Fortschritte der Medizin.* 1884. p. 185–9.

72. Burke V. Notes on the Gram stain with description of a new method. *J Bacteriol.* 1922. 7(2):159–82.
73. Popescu A, Doyle RJ. The Gram stain after more than a century. *Biotech Histochem.* 1996. 71(3):145–51.
74. Hinson JM, Bradsher R, Stanley B. Gram-Stain Neutrality of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am Rev Respir Dis.* 1981. (123):365–6.
75. Razin S, Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. The genus *Mycoplasma* and related genera (class *Mollicutes*). En: *The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. New York, NY: Springer US; 2006. p. 836–904.
76. Hautala T, Syrjälä H, Lehtinen V, Kauma H, Kauppila J, Kujala P, *et al.* Blood culture Gram stain and clinical categorization based empirical antimicrobial therapy of bloodstream infection. *Int J Antimicrob Agents.* 2005. 25(4):329–33.
77. 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(1):18–25.
78. Fukushima S, Hagiya H, Fujita K, Kamiyama S, Yamada H, Kishida M, *et al.* Clinical and microbiological characteristics of polymicrobial bacteremia: a retrospective, multicenter study. *Infection.* 2022.
79. Kang C, Kim S, Kim H, Park S, Choe Y, Oh M, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clin Infect Dis.* 2003. 37(6):745–51.
80. Ewing WH. Differentiation of Enterobacteriaceae by biochemical reactions. U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Center for Disease Control,; 1973.
81. Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G, Pfaller MA, Landry ML, Richter SS, *et al.* *Manual of Clinical Microbiology.* Washington, DC, USA: ASM Press; 2015.
82. Holmes B, Willcox WR, Lapage SP. Identification of Enterobacteriaceae by the API 20E system. *J Clin Pathol.* 1978. 31(1):22–30.
83. Stefaniuk E, Baraniak A, Gniadkowski M, Hryniewicz W. Evaluation of the BD Phoenix automated identification and susceptibility testing system in clinical microbiology laboratory practice. *Eur J Clin Microbiol Infect.* 2003. 22(8):479–85.
84. Ferraro MJ, Edelblut MA, Kunz LJ. Accurate automated identification of selected Enterobacteriaceae at four hours. *J Clin Microbiol.* 1981. 13(1):151–7.
85. Ombelet S, Natale A, Ronat JB, Vandenberg O, Hardy L, Jacobs J. Evaluation of MicroScan bacterial identification panels for low-resource settings. *Diagnostics.* 2021. 11(2):349.
86. van den Beld MJC, de Boer RF, Reubsaet FAG, Rossen JWA, Zhou K, Kuiling S, *et al.* Evaluation of a culture-dependent algorithm and a molecular algorithm for identification of *Shigella* spp., *Escherichia coli*, and enteroinvasive *E. coli*. *J Clin Microbiol.* 2018. 56(10):e00510-18.

87. Taylor WI, Achanzar D. Catalase test as an aid to the identification of Enterobacteriaceae. *Appl Microbiol.* 1972. 24(1):58–61.
88. Narayan KG, Guinée PAM, Mossel DAA. Use of reagent-impregnated (“Patho-Tec”) test papers in the identification of Enterobacteriaceae and similar bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1967. 33(1):184–8.
89. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2013. 26(3):547–603.
90. Wolk DM, Clark AE. Matrix-assisted laser desorption time of flight mass spectrometry. *Clin Lab Med.* 2018. 38(3):471–86.
91. Abel K, Deschmertzing H, Peterson’ JI. Classification of microorganisms by analysis of chemical composition. I. Feasibility of utilizing gas chromatography. *J Bacteriol.* 1963. 85(5):1039–44.
92. Anhalt JP, Fenselau Catherine. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem.* 1975. 47(2):219–25.
93. Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, *et al.* Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1996. 10(10):1227–32.
94. Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* 1996. 14(11):1584–6.
95. Krishnamurthy T, Ross PL. Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1996. 10(15):1992–6.
96. Haag AM, Taylor SN, Johnston KH, Cole RB. Rapid identification and speciation of *Haemophilus* bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 1998. 33(8):750–6.
97. Pribil P, Fenselau C. Characterization of Enterobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem.* 2005. 77(18):6092–5.
98. Pignone M, Greth KM, Cooper J, Emerson D, Tang J. Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2006. 44(6):1963–70.
99. Mellmann A, Cloud J, Maier T, Keckevoet U, Ramminger I, Iwen P, *et al.* Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol.* 2008. 46(6):1946–54.
100. Charnot-Katsikas A, Tesic V, Boonlayangoor S, Bethel C, Frank KM. Prospective evaluation of the VITEK MS for the routine identification of bacteria and yeast in the clinical microbiology laboratory: assessment of accuracy of identification and turnaround time. *J Med Microbiol.* 2014. 63(2):235–41.

101. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012. 36(2):380–407.
102. Martiny D, Busson L, Wybo I, El Haj RA, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012. 50(4):1313–25.
103. Dingle TC, Butler-Wu SM. MALDI-TOF mass spectrometry for microorganism identification. *Clin Lab Med.* 2013. 33(3):589–609.
104. Ryzhov V, Fenselau C. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. *Anal Chem.* 2001. 73(4):746–50.
105. 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(3):965–74.
106. Sárvári KP, Sóki J, Iván M, Miszti C, Latkóczy K, Melegh SZ, *et al.* MALDI-TOF MS versus 16S rRNA sequencing: Minor discrepancy between tools in identification of *Bacteroides* isolates. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2017. 65(2):173–81.
107. Rodriguez-Temporal D, Rodríguez-Sánchez B, Alcaide F. Evaluation of MALDI Biotyper interpretation criteria for accurate identification of nontuberculous Mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 2020. 58(10):e01103-20.
108. Normand AC, Cassagne C, Gautier M, Becker P, Ranque S, Hendrickx M, *et al.* Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. *BMC Microbiol.* 2017. 17(1):25.
109. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P, Rolain JM, *et al.* Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption time of flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis.* 2009. 49(4):543–51.
110. Sekercioglu A, Cekin Y, Ogunc D, Ongut G, Baysan B, Colak D, *et al.* Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI- TOF MS) for early identification of septic patients. *Clin Lab.* 2017. 63(04/2017).
111. 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. 115:45–6.
112. Azrad M, Keness Y, Nitzan O, Pastukh N, Tkhawkho L, Freidus V, *et al.* Cheap and rapid in-house method for direct identification of positive blood cultures by MALDI-TOF MS technology. *BMC Infect Dis.* 2019. 19(1):72.
113. La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PloS One.* 2009. 4(11):e8041.
114. Lagacé-Wiens PRS, Adam HJ, Karlowsky JA, Nichol KA, Pang PF, Guenther J, *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(10):3324–8.

115. March-Rosselló GA, Muñoz-Moreno MF, García-Loygorri-Jordán de Urriés MC, Bratos-Pérez MA. A differential centrifugation protocol and validation criterion for enhancing mass spectrometry (MALDI-TOF) results in microbial identification using blood culture growth bottles. *Eur J Clin Microbiol Infect.* 2013. 32(5):699–704.
116. Yonetani S, Ohnishi H, Ohkusu K, Matsumoto T, Watanabe T. Direct identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF MS using an in-house saponin method. *Int J Infect Dis.* 2016. 52:37–42.
117. Schubert S, Weinert K, Wagner C, Gunzl B, Wieser A, Maier T, *et al.* Novel, improved sample preparation for rapid, direct identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *J Mol Diagn.* 2011. 13(6):701–6.
118. Ponderand L, Pavese P, Maubon D, Giraudon E, Girard T, Landelle C, *et al.* Evaluation of Rapid Sepsityper[®] protocol and specific MBT-Sepsityper module (Bruker Daltonics) for the rapid diagnosis of bacteremia and fungemia by MALDI-TOF-MS. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2020. 19(1):60.
119. Scohy A, Noël A, Boeras A, Brassinne L, Laurent T, Rodriguez-Villalobos H, *et al.* Evaluation of the Bruker[®] MBT Sepsityper IVD module for the identification of polymicrobial blood cultures with MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018. 37(11):2145–52.
120. Rhoads DD, Wang H, Karichu J, Richter SS. The presence of a single MALDI-TOF mass spectral peak predicts methicillin resistance in staphylococci. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016. 86(3):257–61.
121. Youn JH, Drake SK, Weingarten RA, Frank KM, Dekker JP, Lau AF. Clinical performance of a matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry method for detection of certain *bla*_{KPC}-containing plasmids. *J Clin Microbiol.* 2015. 54(1):35–42.
122. 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. *J Clin Microbiol.* 2014. 52(8):2804–12.
123. Nakano S, Matsumura Y, Kato K, Yunoki T, Hotta G, Noguchi T, *et al.* Differentiation of vanA-positive *Enterococcus faecium* from vanA-negative *E. faecium* by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Int J Antimicrob Agents.* 2014. 44(3):256–9.
124. Wybo I, De Bel A, Soetens O, Echahidi F, Vandoorslaer K, Van Cauwenbergh M, *et al.* Differentiation of *cfiA* -negative and *cfiA* -positive *Bacteroides fragilis* isolates by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011. 49(5):1961–4.
125. Mulet X, Fernández-Esgueva M, Norte C, Zamorano L, del Barrio-Tofiño E, Oliver A. Validation of MALDI-TOF for the early detection of the ST175 high-risk clone of

Pseudomonas aeruginosa in clinical isolates belonging to a Spanish nationwide multicenter study. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2021. 39(6):279–82.

126. 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. *J Clin Microbiol*. 2012. 50(3):927–37.
127. Oviaño M, Gómara M, Barba MJ, Revillo MJ, Barbeyto LP, Bou G. Towards the early detection of β -lactamase-producing Enterobacteriaceae by MALDI-TOF MS analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2017. 72(8):2259–62.
128. Peaper DR, Kulkarni MV, Tichy AN, Jarvis M, Murray TS, Hodsdon ME. Rapid detection of carbapenemase activity through monitoring ertapenem hydrolysis in Enterobacteriaceae with LC–MS/MS. *Bioanalysis*. 2013. 5(2):147–57.
129. Anantharajah A, Tossens B, Olive N, Kabamba-Mukadi B, Rodriguez-Villalobos H, Verroken A. Performance evaluation of the MBT STAR®-Carba IVD assay for the detection of carbapenemases with MALDI-TOF MS. *Front Microbiol*. 2019. 10:1413.
130. Ota Y, Furuhashi K, Nagao Y, Nanba T, Yamanaka K, Ishikawa J, *et al*. Detection of extended-spectrum β -lactamases producing Enterobacteriaceae using a matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry based MBT STAR-BL software module with β -lactamase inhibition assay depends on the bacterial strains. *J Microbiol Methods*. 2019. 167:105734.
131. Hoyos-Mallecot Y, Cabrera-Alvargonzalez JJ, Miranda-Casas C, Rojo-Martín MD, Liebana-Martos C, Navarro-Marí JM. MALDI-TOF MS, a useful instrument for differentiating metallo- β -lactamases in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. *Lett Appl Microbiol*. 2014. 58(4):325–9.
132. Idelevich EA, Schüle I, Grünastel B, Wüllenweber J, Peters G, Becker K. Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. *Clin Microbiol Infect*. 2014. 20(10):1001–6.
133. Correa-Martínez CL, Idelevich EA, Sparbier K, Kostrzewa M, Becker K. Rapid detection of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) and AmpC β -lactamases in *Enterobacteriales*: development of a screening panel using the MALDI-TOF MS-based direct-on-target microdroplet growth assay. *Front Microbiol*. 2019. 10:13.
134. Dortet L, Potron A, Bonnin RA, Plesiat P, Naas T, Filloux A, *et al*. Rapid detection of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* using MALDI-TOF-based lipidomics on intact bacteria. *Sci Rep*. 2018. 8(1):16910.
135. 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. *J Antimicrob Chemother*. 2018.
136. Garcia Rodriguez JA, Cantón R, Gómez-Lus ML, Martínez Martínez L, Rodríguez-Avial C, Vila J. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2000.

137. Wheat PF. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. *J Antimicrob Chemother.* 2001. 48(suppl_1):1–4.
138. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol.* 1929. 10(3):226–36.
139. Rice WG, Mercedes Lonergan A. Ditch-plate method for testing bacterial resistance to antibiotics. *Am J Clin Pathol.* 1950. 20(1_ts):68–70.
140. Vincent JG, Vincent HW. Filter paper disc modification of the Oxford cup penicillin determination. *Exp Biol Med.* 1944. 55(3):162–4.
141. Bondi A, Spaulding EH. A routine method for the rapid determination of susceptibility to penicillin and other antibiotics. *Am J Med Sci.* 1947. 213(2):221–5.
142. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966. 45(4_ts):493–6.
143. Strauss M, Zoabi K, Sagas D, Reznik-Gitlitz B, Colodner R. Evaluation of Bio-Rad® discs for antimicrobial susceptibility testing by disc diffusion and the ADAGIO™ system for the automatic reading and interpretation of results. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020. 39(2):375–84.
144. Wayne PA. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
145. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0 [Internet]. 2022. Disponible en: <https://www.eucast.org/>
146. Joyce LF, Downes J, Stockman K, Andrew JH. Comparison of five methods, including the PDM Epsilon meter test (E test), for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 1992. 30(10):2709–13.
147. Hazbón MH, del Socorro Orozco M, Labrada LA, Tovar R, Weigle KA, Wanger A. Evaluation of Etest for susceptibility testing of multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2000. 38(12):4599–603.
148. Pfaller MA, Messer SA, Houston A, Mills K, Bolmstrom A, Jones RN. Evaluation of the Etest method for determining voriconazole susceptibilities of 312 clinical isolates of *Candida* species by using three different agar media. *J Clin Microbiol.* 2000. 38(10):3715–7.
149. Walsh TR, Bolmstrom A, Qvarnstrom A, Gales A. Evaluation of a new etest for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. *J CLIN MICROBIOL.* 2002. 40:5.
150. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996. 40(8):1914–8.
151. Schmith K, Reymann FE. Experimentelle og kliniske undersøgelser over gonococcers følsomhed overfor sulfapyridin. *Nord Med.* 1940. 8:2493–9.

152. Frank PF, WILCOX C, Finland M. In vitro sensitivity of coliform bacilli to seven antibiotics; penicillin, streptomycin, bacitracin, polymyxin, aerosporin, aureomycin, and chloromycetin. *J Lab Clin Med.* 1950. 35(2):188–204.
153. Steers E, Foltz EL, Graves BS. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot Chemother Northfield Ill.* 1959. 9(5):307–11.
154. Crougths PD, Konijnendijk-de Regt M, Yusuf E. Fosfomycin susceptibility testing using commercial agar dilution test. Shakir SM, editor. *Microbiol Spectr.* 2022. 10(2):e02504-21.
155. Jacob ME, Keelara S, Aidara-Kane A, Alvarez JRM, Fedorka-Cray PJ. Optimizing a screening protocol for potential extended- spectrum β -Lactamase *Escherichia coli* on MacConkey agar for use in a global surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2020. 58(9):9.
156. Nahimana I, Francioli P, Blanc DS. Evaluation of three chromogenic media (MRSA-ID, MRSA-Select and CHROMagar MRSA) and ORSAB for surveillance cultures of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2006. 12(12):1168–74.
157. Garcia-Quintanilla M, Poirel L, Nordmann P. CHROMagar mSuperCARBA and RAPIDEC® Carba NP test for detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018. 90(2):77–80.
158. Pope CG, Stevens MF. The assay of penicillin by the dilution method. *Bull Health Organ.* 1945. 12(2):274–83.
159. Donovan R, Hamre D, Kavanagh F, Rake G. A broth dilution method of assaying streptothricin and streptomycin. *J Bacteriol.* 1945. 50(6):623–8.
160. Chitwood LA. Tube dilution antimicrobial susceptibility testing: efficacy of a microtechnique applicable to diagnostic laboratories. *Appl Microbiol.* 1969. 17(5):707–9.
161. 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(1):146–55.
162. Inglis TJJ, Ekelund O. Rapid antimicrobial susceptibility tests for sepsis; the road ahead. *J Med Microbiol.* 2019. 68(7):973–7.
163. Jonasson E, Matuschek E, Kahlmeter G. The EUCAST rapid disc diffusion method for antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood culture bottles. *J Antimicrob Chemother.* 2020. 75(4):968–78.
164. Åkerlund A, Jonasson E, Matuschek E, Serrander L, Sundqvist M, Kahlmeter G. EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) in blood cultures: validation in 55 European laboratories. *J Antimicrob Chemother.* 2020. 75(11):3230–8.
165. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Zone diameter breakpoint tables for rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from blood culture bottles. Version 5.0 [Internet]. 2022. Disponible en: <https://www.eucast.org>

166. Beuving J, van der Donk CF, Linssen CF, Wolffs PF, Verbon A. Evaluation of direct inoculation of the BD PHOENIX system from positive BACTEC blood cultures for both Gram-positive cocci and Gram-negative rods. *BMC Microbiol.* 2011. 11:156.
167. Chung JW, Jeon HS, Sung H, Kim MN. Evaluation of MicroScan and Phoenix system for rapid identification and susceptibility testing using direct inoculation from positive BACTEC blood culture bottles. *Ann Lab Med.* 2009. 29(1):25–34.
168. Giordano L, Liotti FM, Menchinelli G, De Angelis G, D’Inzeo T, Morandotti GA, *et al.* Simulated pediatric blood cultures to assess the inactivation of clinically relevant antimicrobial drug concentrations in resin-containing bottles. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021. 11:649769.
169. Marschal M, Bachmaier J, Autenrieth I, Oberhettinger P, Willmann M, Peter S. Evaluation of the Accelerate Pheno system for fast identification and antimicrobial susceptibility testing from positive blood cultures in bloodstream infections caused by Gram-negative pathogens. McAdam AJ, editor. *J Clin Microbiol.* 2017. 55(7):2116–26.
170. Malmberg C, Yuen P, Spaak J, Cars O, Tängdén T, Lagerbäck P. A novel microfluidic assay for rapid phenotypic antibiotic susceptibility testing of bacteria detected in clinical blood cultures. Thierry B, editor. *PLOS ONE.* 2016. 11(12):e0167356.
171. Hayden RT, Clinton LK, Hewitt C, Koyamatsu T, Sun Y, Jamison G, *et al.* Rapid antimicrobial susceptibility testing using forward laser light scatter technology. Patel R, editor. *J Clin Microbiol.* 2016. 54(11):2701–6.
172. Tibbetts R, George S, Burwell R, Rajeev L, Rhodes PA, Singh P, *et al.* Performance of the Reveal rapid antibiotic susceptibility testing system on Gram-negative blood cultures at a large urban hospital. Simner PJ, editor. *J Clin Microbiol.* 2022. 60(6):e00098-22.
173. Haeckel E. *Generelle Morphologie der Organismen : allgemeine Grundzüge der organischen Formen-Wissenschaft, mechanisch begründet durch die von Charles Darwin reformirte Descendenz-Theorie.* Berlin : G. Reimer, 1866.; 1866.
174. Dahm R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Dev Biol.* 2005. 278(2):274–88.
175. Levene P. A., London E. J. On the structure of thymonucleic acid. *Science.* 1928. 68(1771):572–3.
176. Zamenhof S, Chargaff E, Brawerman G. Dissymetry in nucleotide sequence of Desoxyribose nucleic acids. *J Biol Chem.* 1950. 187(1):1–14.
177. Sheng Q, Vickers K, Zhao S, Wang J, Samuels DC, Koues O, *et al.* Multi-perspective quality control of Illumina RNA sequencing data analysis. *Brief Funct Genomics.* 2016. :elw035.
178. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 1953. 171(4356):737–8.
179. Hutchison CA. DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Res.* 2007. 35(18):6227–37.
180. Jou WM, Haegeman G, Ysebaert M, Fiers W. Nucleotide sequence of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein. *Nature.* 1972. 237(5350):82–8.

181. Sanger F, Donelson JE, Coulson AR, Kössel H, Fischer D. Use of DNA Polymerase I primed by a synthetic oligonucleotide to determine a nucleotide sequence in Phage ϕ 1 DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1973. 70(4):1209–13.
182. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci*. 1977. 74(2):560–4.
183. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*. 1977. 74(12):5463–7.
184. Wilson RK, Chen C, Avdalovic N, Burns J, Hood L. Development of an automated procedure for fluorescent DNA sequencing. *Genomics*. 1990. 6(4):626–34.
185. Ronaghi M, Uhlén M, Nyrén P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*. 1998. 281(5375):363–5.
186. Harvey EN. Studies on bioluminescence. *J Gen Physiol*. 1919. 1(3):269–93.
187. Tawfik DS, Griffiths AD. Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat Biotechnol*. 1998. 16(7):652–6.
188. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, *et al*. Genome sequencing in open microfabricated high density picoliter reactors. *Nature*. 2005. 437(7057):376–80.
189. Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, *et al*. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol*. 2012. 30(5):434–9.
190. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, *et al*. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011. 475(7356):348–52.
191. Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, Lin X, McCutcheon JP, Rosenbaum AM, *et al*. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science*. 2005. 309(5741):1728–32.
192. Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet*. 2008. 24(3):133–41.
193. Balasubramanian S. Solexa sequencing: decoding genomes on a population scale. *Clin Chem*. 2015. 61(1):21–4.
194. Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem*. 2009. 55(4):641–58.
195. Turcatti G, Romieu A, Fedurco M, Tairi AP. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. *Nucleic Acids Res*. 2008. 36(4):e25–e25.
196. Bashir A, Volik S, Collins C, Bafna V, Raphael BJ. Evaluation of paired-end sequencing strategies for detection of genome rearrangements in cancer. Ouzounis CA, editor. *PLoS Comput Biol*. 2008. 4(4):e1000051.

197. Schadt EE, Turner S, Kasarskis A. A window into third-generation sequencing. *Hum Mol Genet.* 2010. 19(R2):R227–40.
198. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, *et al.* Real-Time DNA Sequencing from single polymerase molecules. 2009. 323:7.
199. Wenger AM, Peluso P, Rowell WJ, Chang PC, Hall RJ, Concepcion GT, *et al.* Accurate circular consensus long-read sequencing improves variant detection and assembly of a human genome. *Nat Biotechnol.* 2019. 37(10):1155–62.
200. Oude Munnink BB, Nieuwenhuijse DF, Stein M, O'Toole Á, Haverkate M, Mollers M, *et al.* Rapid SARS-CoV-2 whole-genome sequencing and analysis for informed public health decision-making in the Netherlands. *Nat Med.* 2020. 26(9):1405–10.
201. Kasianowicz JJ, Brandin E, Branton D, Deamer DW. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc Natl Acad Sci.* 1996. 93(24):13770–3.
202. Stoddart D, Heron AJ, Klingelhofer J, Mikhailova E, Maglia G, Bayley H. Nucleobase recognition in ssDNA at the central constriction of the α -Hemolysin pore. *Nano Lett.* 2010. 10(9):3633–7.
203. Cherf GM, Lieberman KR, Rashid H, Lam CE, Karplus K, Akeson M. Automated forward and reverse ratcheting of DNA in a nanopore at 5-Å precision. *Nat Biotechnol.* 2012. 30(4):344–8.
204. Hoenen T, Groseth A, Rosenke K, Fischer RJ, Hoenen A, Judson SD, *et al.* Nanopore sequencing as a rapidly deployable Ebola outbreak tool. *Emerg Infect Dis.* 2016. 22(2).
205. Wang Y, Zhao Y, Bollas A, Wang Y, Au KF. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nat Biotechnol.* 2021. 39(11):1348–65.
206. Vereecke N, Bokma J, Haesebrouck F, Nauwynck H, Boyen F, Pardon B, *et al.* High quality genome assemblies of *Mycoplasma bovis* using a taxon-specific Bonito basecaller for MinION and Flongle long-read nanopore sequencing. *BMC Bioinformatics.* 2020. 21(1):517.
207. Huang YT, Liu PY, Shih PW. Homopolish: a method for the removal of systematic errors in nanopore sequencing by homologous polishing. *Genome Biol.* 2021. 22(1):95.
208. Wick RR, Judd LM, Holt KE. Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing. *Genome Biol.* 2019. 20(1):129.
209. Guna Serrano MR, Larrosa Escartín N, Marín Arriaza M, Rodríguez Díaz JC. Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica.* 2019. 37(5):335–40.
210. Reddy K, Whitelaw A. Can the Xpert MRSA/SA BC assay be used as an antimicrobial stewardship tool? A prospective assay validation and descriptive impact assessment study in a South African setting. *BMC Infect Dis.* 2021. 21(1):177.

211. Galiana A, Coy J, Gimeno A, Guzman NM, Rosales F, Merino E, *et al.* Evaluation of the Sepsis Flow Chip assay for the diagnosis of blood infections. Chang YF, editor. PLOS ONE. 2017. 12(5):e0177627.
212. Grumaz S, Stevens P, Grumaz C, Decker SO, Weigand MA, Hofer S, *et al.* Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in septic patients. *Genome Med.* 2016. 8(1):73.
213. Schmoch T, Westhoff JH, Decker SO, Skarabis A, Hoffmann GF, Dohna-Schwake C, *et al.* Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in pediatric sepsis. *Medicine (Baltimore).* 2021. 100(25):e26403.
214. Sakai J, Tarumoto N, Kodana M, Ashikawa S, Imai K, Kawamura T, *et al.* An identification protocol for ESBL-producing Gram-negative bacteria bloodstream infections using a MinION nanopore sequencer. *J Med Microbiol.* 2019. 68(8):1219–26.
215. Tamma PD, Fan Y, Bergman Y, Perteza G, Kazmi AQ, Lewis S, *et al.* Applying rapid whole-genome sequencing to predict phenotypic antimicrobial susceptibility testing results among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019. 63(1):e01923-18.
216. Taxt AM, Avershina E, Frye SA, Naseer U, Ahmad R. Rapid identification of pathogens, antibiotic resistance genes and plasmids in blood cultures by nanopore sequencing. *Sci Rep.* 2020. 10(1):7622.
217. Malberg Tetzschner AM, Johnson JR, Johnston BD, Lund O, Scheutz F. *In silico* genotyping of *Escherichia coli* isolates for extraintestinal virulence genes by use of whole-genome sequencing data. Dekker JP, editor. *J Clin Microbiol.* 2020. 58(10):e01269-20.
218. Greninger AL, Zerr DM. NGSocomial infections: high-resolution views of hospital-acquired infections through genomic epidemiology. *J Pediatr Infect Dis Soc.* 2021. 10(Supplement_4):S88–95.
219. Funke G, Funke-Kissling P. Use of the BD PHOENIX automated microbiology system for direct identification and susceptibility testing of Gram-negative rods from positive blood cultures in a three-phase trial. *J Clin Microbiol.* 2004. 42(4):1466–70.
220. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0 [Internet]. 2019. Disponible en: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf
221. Masago K, Fujita S, Oya Y, Takahashi Y, Matsushita H, Sasaki E, *et al.* Comparison between fluorimetry (Qubit) and spectrophotometry (NanoDrop) in the quantification of DNA and RNA extracted from frozen and FFPE tissues from lung cancer patients: a real-world use of genomic tests. *Medicina (Mex).* 2021. 57(12):1375.
222. Chemistry Technical Document. Oxford Nanopore Sequencing [Internet]. ONT; 2022. Disponible en: https://community.nanoporetech.com/docs/sequence/sequencing_software/chemistry-technical-document/v/chtd_500_v1_revae_07jul2016
223. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. I. accuracy assessment. *Genome Res.* 1998. 8(3):175–85.

224. Maguire M, Kase JA, Roberson D, Muruvanda T, Brown EW, Allard M, *et al.* Precision long-read metagenomics sequencing for food safety by detection and assembly of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in irrigation water. Fratamico P, editor. PLOS ONE. 2021. 16(1):e0245172.
225. Dai D, Brown C, Bürgmann H, Larsson DGJ, Nambi I, Zhang T, *et al.* Long-read metagenomic sequencing reveals shifts in associations of antibiotic resistance genes with mobile genetic elements from sewage to activated sludge. Microbiome. 2022. 10(1):20.
226. McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, *et al.* The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. Antimicrob Agents Chemother. 2013. 57(7):3348–57.
227. Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner PA. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. Nat Biotechnol. 2019. 37(5):540–6.
228. Medaka [Internet]. Oxford Nanopore Technologies; 2022. Disponible en: <https://github.com/nanoporetech/medaka>
229. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. Bioinformatics. 2012. 28(8):1166–7.
230. Larsen MV, Cosentino S, Lukjancenko O, Saputra D, Rasmussen S, Hasman H, *et al.* Benchmarking of methods for genomic taxonomy. Land GA, editor. J Clin Microbiol. 2014. 52(5):1529–39.
231. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, *et al.* Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. J Clin Microbiol. 2012. 50(4):1355–61.
232. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, *et al.* ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. J Antimicrob Chemother. 2020. 75(12):3491–500.
233. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, *et al.* BLAST+: architecture and applications. BMC Bioinformatics. 2009. 10(1):421.
234. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. Microbiol Mol Biol Rev. 2016. 80(3):629–61.
235. Rodríguez-Medina N, Martínez-Romero E, De la Cruz MA, Ares MA, Valdovinos-Torres H, Silva-Sánchez J, *et al.* A *Klebsiella variicola* plasmid confers hypermucoviscosity-like phenotype and alters capsule production and virulence. Front Microbiol. 2020. 11:579612.
236. Lam MMC, Wick RR, Watts SC, Cerdeira LT, Wyres KL, Holt KE. A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. Nat Commun. 2021. 12(1):4188.
237. Wyres KL, Wick RR, Gorrie C, Jenney A, Follador R, Thomson NR, *et al.* Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. Microb Genomics. 2016. 2(12).

238. Wick RR, Heinz E, Holt KE, Wyres KL. Kaptive Web: user-friendly capsule and lipopolysaccharide serotype prediction for *Klebsiella* genomes. *J Clin Microbiol.* 2018. 56(6):e00197-18.
239. Seemann T. ABRicate [Internet]. 2020. Disponible en: <https://github.com/tseemann/abricate>
240. Liu B, Zheng D, Zhou S, Chen L, Yang J. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res.* 2022. 50(D1):D912–7.
241. Tassinari M, Zannoli S, Farabegoli P, Pedna MF, Pierro A, Mastroianni A, *et al.* Rapid diagnosis of bloodstream infections in the critically ill: Evaluation of the broad-range PCR/ESI-MS technology. Galdiero M, editor. *PLOS ONE.* 2018. 13(5):e0197436.
242. Pfaller MA, Wolk DM, Lowery TJ. T2MR and T2Candida: novel technology for the rapid diagnosis of candidemia and invasive candidiasis. *Future Microbiol.* 2016. 11(1):103–17.
243. Schumann J, Johanns U, Ahmad-Nejad P, Ghebremedhin B, Woebker G. The impact of the FilmArray-based detection of microbial pathogens from positive blood culture vials on the time to optimal antimicrobial regimen in intensive care units of the Helios University Clinic Wuppertal, Germany. *J Clin Med.* 2021. 10(24):5880.
244. Meex C, Neuville F, Descy J, Huynen P, Hayette MP, De Mol P, *et al.* Direct identification of bacteria from BacT/ALERT anaerobic positive blood cultures by MALDI-TOF MS: MALDI Sepsityper kit versus an in-house saponin method for bacterial extraction. *J Med Microbiol.* 2012. 61(11):1511–6.
245. Machen A, Drake T, Wang YF (Wayne). Same day identification and full panel antimicrobial susceptibility testing of bacteria from positive blood culture bottles made possible by a combined lysis-filtration method with MALDI-TOF VITEK mass spectrometry and the VITEK2 System. *PLOS ONE.* 2014. 9(2):e87870.
246. Nomura F, Tsuchida S, Murata S, Satoh M, Matsushita K. Mass spectrometry-based microbiological testing for blood stream infection. *Clin Proteomics.* 2020. 17:14.
247. Ruiz-Aragón J, Ballester-Téllez M, Gutiérrez-Gutiérrez B, de Cueto M, Rodríguez-Baño J, Pascual Á. Direct bacterial identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry: A systematic review and meta-analysis. *Enfermedades Infecc Microbiol Clin Engl Ed.* 2018. 36(8):484–92.
248. Tripković K, Šantrić Miličević M, Mandić Miladinović M, Kovačević L, Bjegović Mikanović V, Vuković D. Implementation of the workload indicators of staffing need (WISN) method in determining staff requirements in Public Health laboratories in Serbia. *Disaster Med Public Health Prep.* 2022. 16(1):71–9.
249. Mitchell PS, Mandrekar JN, Yao JDC. Adoption of lean principles in a high-volume molecular diagnostic microbiology laboratory. Caliendo AM, editor. *J Clin Microbiol.* 2014. 52(7):2689–93.
250. Yonetani S, Okazaki M, Araki K, Makino H, Fukugawa Y, Okuyama T, *et al.* Direct inoculation method using BacT/ALERT 3D and BD Phoenix System allows rapid and accurate identification and susceptibility testing for both Gram-positive cocci and Gram-

negative rods in aerobic blood cultures. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012. 73(2):129–34.

251. Lupetti A, Barnini S, Castagna B, Nibbering PH, Campa M. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of Gram-positive cocci in blood cultures by direct inoculation into the BD Phoenix system. *Clin Microbiol Infect*. 2010. 16(7):986–91.
252. Kuo P, LeCrone K, Chiu M, Realegeno S, Pride DT. Analysis of the FAST™ system for expedited identification and antimicrobial susceptibility testing of bloodborne pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2022. :115783.
253. Grinberg S, Schubert S, Hochauf-Stange K, Dalpke AH, Narvaez Encalada M. Saving time in blood culture diagnostics: a prospective evaluation of the Qvella FAST-PBC Prep Application on the Fast System. *J Clin Microbiol*. 2022. 60(5):e02533-21.
254. Zhou M, Wu Y, Kudinha T, Jia P, Wang L, Xu Y, *et al*. Comprehensive pathogen identification, antibiotic resistance, and virulence genes prediction directly from simulated blood samples and positive blood cultures by Nanopore metagenomic sequencing. *Front Genet*. 2021. 12:620009.
255. Grumaz C, Hoffmann A, Vainshtein Y, Kopp M, Grumaz S, Stevens P, *et al*. Rapid next-generation sequencing–based diagnostics of bacteremia in septic patients. *J Mol Diagn*. 2020. 22(3):405–18.
256. Sidstedt M, Hedman J, Romsos EL, Waitara L, Wadsö L, Steffen CR, *et al*. Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. *Anal Bioanal Chem*. 2018. 410(10):2569–83.
257. Avershina E, Frye SA, Ali J, Taxt AM, Ahmad R. Ultrafast and Cost-effective pathogen identification and resistance gene detection in a clinical setting using Nanopore flongle sequencing. *Front Microbiol*. 2022. 13:822402.
258. Cao MD, Ganesamoorthy D, Elliott AG, Zhang H, Cooper MA, Coin LJM. Streaming algorithms for identification of pathogens and antibiotic resistance potential from real-time MinION™ sequencing. *GigaScience*. 2016. 5(1):32.
259. Delahaye C, Nicolas J. Sequencing DNA with nanopores: Troubles and biases. Andrés-León E, editor. *PLOS ONE*. 2021. 16(10):e0257521.
260. Villa L, Feudi C, Fortini D, Brisse S, Passet V, Bonura C, *et al*. Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone. *Microb Genomics*. 2017. 3(4).
261. Oteo-Iglesias J, Pérez-Vázquez M, Sola Campoy P, Moure Z, Sánchez Romero I, Sánchez Benito R, *et al*. Emergence of blood infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 in Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2020. 75(11):3402–5.
262. Lumbreras-Iglesias P, Rodicio MR, Valledor P, Suárez-Zarracina T, Fernández J. High-level carbapenem resistance among OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* with functional ompK36 slterations: maintenance of ceftazidime/avibactam susceptibility. *Antibiotics*. 2021. 10(10):1174.

263. Elliott ZS, Barry KE, Cox HL, Stoesser N, Carroll J, Vegesana K, *et al.* The role of *fosA* in challenges with fosfomycin susceptibility testing of multispecies *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 2019. 57(10):8.
264. Hu LF, Xu XH, Yang HF, Ye Y, Li JB. Role of *sul2* gene linked to transposase in resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole among *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Ann Lab Med.* 2016. 36(1):73–5.
265. Williams LE, Detter C, Barry K, Lapidus A, Summers AO. Facile recovery of individual high-molecular-weight, low-copy-number natural plasmids for genomic sequencing. *Appl Environ Microbiol.* 2006. 72(7):4899–906.
266. Smalla K, Jechalke S, Top EM. Plasmid Detection, Characterization, and Ecology. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2015. 3(1). Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.PLAS-0038-2014>
267. Antipov D, Hartwick N, Shen M, Raiko M, Lapidus A, Pevzner PA. plasmidSPAdes: assembling plasmids from whole genome sequencing data. *Bioinformatics.* 2016. :btw493.
268. Arredondo-Alonso S, Willems RJ, van Schaik W, Schürch AC. On the (im)possibility of reconstructing plasmids from whole-genome short-read sequencing data. *Microb Genomics.* 2017. 3(10).
269. Chen Z, Erickson DL, Meng J. Polishing the Oxford Nanopore long-read assemblies of bacterial pathogens with Illumina short reads to improve genomic analyses. *Genomics.* 2021. 113(3):1366–77.
270. Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009. 53(6):2227–38.
271. Hawkey J, Wyres KL, Judd LM, Harshegyi T, Blakeway L, Wick RR, *et al.* ESBL plasmids in *Klebsiella pneumoniae*: diversity, transmission and contribution to infection burden in the hospital setting. *Genome Med.* 2022. 14(1):97.
272. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012. 56(1):559–62.
273. Assoni L, Girardello R, Converso TR, Darrieux M. Current stage in the development of *Klebsiella pneumoniae* vaccines. *Infect Dis Ther.* 2021. 10(4):2157–75.
274. Remya P, Shanthi M, Sekar U. Occurrence and characterization of hyperviscous K1 and K2 serotype in *Klebsiella pneumoniae*. *J Lab Physicians.* 2018. 10(03):283–8.
275. Wyres KL, Wick RR, Judd LM, Froumine R, Tokolyi A, Gorrie CL, *et al.* Distinct evolutionary dynamics of horizontal gene transfer in drug resistant and virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*. Hughes D, editor. *PLOS Genet.* 2019. 15(4):e1008114.
276. Lam MMC, Wick RR, Wyres KL, Gorrie CL, Judd LM, Jenney AWJ, *et al.* Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations. *Microb Genomics.* 2018. 4(9).

277. Llobet E, March C, Giménez P, Bengoechea JA. *Klebsiella pneumoniae* OmpA Confers Resistance to Antimicrobial Peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009. 53(1):298–302.
278. Alcántar-Curiel MD, Blackburn D, Saldaña Z, Gayosso-Vázquez C, Iovine N, De la Cruz MA, *et al*. Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Virulence*. 2013. 4(2):129–38.
279. Schroll C, Barken KB, Krogfelt KA, Struve C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. 2010. 10(179).
280. Gual-de-Torrella A, Delgado-Valverde M, Pérez-Palacios P, Oteo-Iglesias J, Rojo-Molinero E, Macià MD, *et al*. Prevalence of the fimbrial operon mrkABCD, mrkA expression, biofilm formation and effect of biocides on biofilm formation in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates belonging or not belonging to high-risk clones. *Int J Antimicrob Agents*. 2022. 60(4):106663.

Anexo

Anexo 1



Osakidetza

BILBAO - BASURTO
ERAKUNDE SANITARIO INTEGRATUA
ORGANIZACIÓN SANITARIA INTEGRADA
BILBAO - BASURTO



DE: SECRETARÍA. CEI HOSPITAL UNIVERSITARIO BASURTO

A: **Dr. MIKEL JOSEBA URRUTIKOETXEA GUTIERREZ**
HOSPITAL UNIVERSITARIO BASURTO
OSI BILBAO BASURTO.
SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

28 de diciembre de 2022

Estimado Dr. Urrutikoetxea:

Le comunicamos que en la reunión del Comité Ético de Investigación (CEI) celebrada el día 21 de diciembre de 2022, analizada la documentación presentada y vistas las respuestas a las aclaraciones solicitadas, ha sido aprobado para su realización en la OSI BILBAO BASURTO el TRABAJO DE FIN DE MASTER que Ud. dirige y titulado:

**DINAMIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO DE BACTERIEMIAS
MEDIANTE EL USÓ DE NUEVAS TECNÓLOGÍAS**

(120.22 CEIHUB)

INFORME FAVORABLE

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Dr. **MIKEL JOSEBA URRUTIKOETXEA GUTIERREZ**

Nombre del alumno: JUAN CARLOS FORERO NIAMPIRA

HOSPITAL UNIVERSITARIO BASURTO. OSI BILBAO BASURTO
SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA

