



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Formación médica continuada: Métodos de diagnóstico rápido en Microbiología Clínica

Métodos moleculares para el diagnóstico de septicemia



Francesc Marco^{a,b}

^a Servicio de Microbiología, Centro de Diagnóstico Biomédico, Hospital Clínic, Barcelona, España

^b ISGlobal, Barcelona Institute for Global Health, Hospital Clínic-Universitat de Barcelona, Barcelona, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 3 de marzo de 2017

Aceptado el 6 de marzo de 2017

On-line el 17 de abril de 2017

Palabras clave:

Septicemia

Diagnóstico molecular

Diagnóstico rápido

Keywords:

Sepsis

Molecular diagnostics

Rapid diagnostics

R E S U M E N

La septicemia es una de las causas más importantes de muerte en pacientes hospitalizados. El hemocultivo es el método de referencia para detectar el agente etiológico responsable, pero el resultado definitivo depende de la velocidad de crecimiento del microorganismo. En los últimos años el empleo de diversas tecnologías como la espectrometría de masas (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*), la hibridación del ADN, los *microarrays* o las reacciones de PCR rápidas han disminuido de forma considerable el tiempo necesario para la identificación de los microorganismos y la detección de genes de resistencia a partir de hemocultivos positivos. El diagnóstico molecular de una septicemia directamente de la sangre del paciente permite conocer el resultado en pocas horas, aunque todavía existen diversas limitaciones que dificultan su empleo. En esta revisión se exponen los diversos métodos moleculares disponibles (LightCycler SeptiFast, Magicplex sepsis real time, Septitest, VYOO, PCR/ESI-MS análisis, T2Candida) y su posible utilidad.

© 2017 Elsevier España, S.L.U.

y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Molecular methods for septicemia diagnosis

A B S T R A C T

Septicemia remains a major cause of hospital mortality. Blood culture remains the best approach to identify the etiological microorganisms when a bloodstream infection is suspected but it takes long time because it relies on bacterial or fungal growth. The introduction in clinical microbiology laboratories of the matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry technology, DNA hybridization, microarrays or rapid PCR-based test significantly reduce the time to results. Tests for direct detection in whole blood samples are highly desirable because of their potential to identify bloodstream pathogens without waiting for blood cultures to become positive. Nonetheless, limitations of current molecular diagnostic methods are substantial. This article reviews these new molecular approaches (LightCycler SeptiFast, Magicplex sepsis real time, Septitest, VYOO, PCR/ESI-MS analysis, T2Candida).

© 2017 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Introducción

El diagnóstico microbiológico precoz de una infección del sistema circulatorio producida por bacterias (bacteriemia), hongos (fungemia) o virus (viremia) debe ser un objetivo prioritario de cualquier laboratorio de microbiología. En los cuadros clínicos severos que evolucionan hacia una situación grave de septicemia con

shock, la adopción de medidas terapéuticas adecuadas y la administración de un tratamiento antimicrobiano correcto lo más precoz posible son imprescindibles para disminuir la elevada morbimortalidad que se observa en estos casos¹. La septicemia es una de las causas más importantes de muerte en los pacientes hospitalizados. De acuerdo con los datos recogidos en diversas publicaciones, en las que se incluyen pacientes europeos y norteamericanos, el número de enfermos fallecidos atribuibles a esta entidad clínica se estima en 400.000 cada año²⁻⁴. Desde un punto de vista clínico, la forma de presentación de una septicemia es un síndrome impreciso cuyo

Correo electrónico: fmarco@clinic.ub.es

diagnóstico se fundamenta en la sospecha clínica de infección combinada con signos de disfunción orgánica. La confirmación de una septicemia requiere la identificación del agente etiológico. Hasta ahora, la metodología estándar recomendada descansa en la realización de hemocultivos que, en caso de ser positivos y empleando métodos tradicionales, requieren un mínimo de 48-72 h para tener el resultado de la identificación del microorganismo responsable y su sensibilidad a los antibióticos. El rendimiento de los hemocultivos es variable. Si se obtienen de 2 a 4 hemocultivos (40-80 ml de sangre) antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano, se detecta el agente etiológico entre el 80-96% de los casos^{5,6}. Sin embargo, los hemocultivos son negativos en una proporción elevada de casos (50%) cuando el paciente tiene una septicemia grave⁷. Ello puede deberse a varios factores, como tratamiento antimicrobiano previo, escaso número de microorganismos circulantes en la sangre o microorganismos no cultivables o de crecimiento lento. Por otra parte, en los pacientes con shock séptico se estima que por cada hora que transcurre desde el inicio de la hipotensión hasta la administración de antibióticos activos se produce un descenso medio de la supervivencia del 7,6%⁸. Como el tratamiento antimicrobiano es un determinante crítico en la supervivencia de los pacientes con septicemia, se suelen emplear inicialmente antibióticos de amplio espectro para cubrir todos los agentes patógenos posibles y posteriormente, en función de los resultados de los hemocultivos, adaptar el tratamiento. Por ello es obvio que el objetivo que deberíamos conseguir sería acortar el tiempo necesario para llegar al diagnóstico microbiológico de una septicemia. Ante este reto se plantean dos opciones. La primera de ellas —y que en teoría es la más deseable por la inmediatez del diagnóstico— implica identificar el microorganismo responsable de la septicemia directamente a partir de la sangre del paciente. La segunda opción persigue identificar el agente etiológico lo más pronto posible una vez el hemocultivo se ha hecho positivo. En ambos casos también debería ser posible la detección de los genes de resistencia a los antibióticos más frecuentes y/o determinar la sensibilidad a los antibióticos.

Diagnóstico directo a partir de sangre

La aplicación de técnicas moleculares directamente en muestras de sangre completa ofrece la posibilidad de identificar el agente etiológico responsable de la septicemia en un corto periodo de tiempo. Además, según la metodología empleada, es posible detectar la presencia de determinados genes de resistencia a los antibióticos, facilitando la elección del tratamiento antimicrobiano más adecuado. Esta opción diagnóstica se ha visto beneficiada en los últimos años por las modificaciones aplicadas en las técnicas que permiten extraer los ácidos nucleicos, sus métodos de amplificación y la posibilidad de utilizar reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) múltiples que aumentan las opciones diagnósticas. Sin embargo, y *a priori*, el empleo de estas técnicas moleculares debe hacer frente a diversos inconvenientes. En la sangre del paciente hay gran cantidad de ADN humano, así como ADN contaminante y la persistencia de ADN procedente de microorganismos muertos. También hay que tener en cuenta la presencia de inhibidores de la PCR, como el ión hierro o las inmunoglobulinas⁹. La cantidad de ADN presente se puede reducir mediante una extracción de leucocitos o bien empleando métodos que permitan extraerlo o degradarlo de forma específica. Así mismo, se deben evitar anticoagulantes como la heparina por el riesgo que inhiba la PCR, y se empleará EDTA. El segundo inconveniente que debe tenerse en cuenta es el bajo número de microorganismos circulantes en la sangre en un episodio de bacteriemia y que se estima entre 1 y 10 UFC/ml¹⁰. Estos valores se basan en estudios cuantitativos realizados con métodos convencionales que quizá no representen el número real de microorganismos circulantes y viables. Bacconi

et al.¹¹ sugieren que para métodos como la PCR es mejor considerar el número de copias genómicas (CG) de un microorganismo presentes en una muestra. Este concepto también tendría en consideración el ADN de bacterias muertas o las capturadas por células fagocíticas circulantes. De acuerdo con esta opción, se estima que en un episodio de bacteriemia el número de CG circulantes sería entre 10^3 y 10^4 /ml. Este valor estaría por encima del límite de detección de la mayoría de las PCR.

Se han comercializado diversos sistemas que pueden utilizarse en el diagnóstico directo a partir de sangre completa. La técnica ideal debería contemplar las siguientes características: rapidez, sensibilidad y especificidad elevada, capacidad para detectar microorganismos no cultivables, detección de diversos mecanismos de resistencia, la mayor automatización posible, fácil de implementar en la rutina diaria de un laboratorio de microbiología y ser coste-efectiva. Cumplir todos estos requisitos es difícil, y además debemos tener en cuenta que su empleo tiene ciertos inconvenientes, como no disponer del microorganismo identificado o contaminación del proceso con material genético externo, lo que dificultaría su interpretación. Todos los estudios realizados hasta ahora con estos nuevos métodos moleculares plantean ciertas dudas relacionadas con su sensibilidad real, ya que se comparan con el hemocultivo estándar, que probablemente no es lo suficientemente sensible como para ser considerado el método de referencia en el diagnóstico de una septicemia. Por lo que hemos comentado, la opción más sensata sería emplear ambos métodos y valorar los resultados en función de la situación clínica del paciente.

LightCycler SeptiFast

El sistema LightCycler SeptiFast (Roche Molecular System, Suiza) fue el primero en comercializarse y ha sido evaluado en diversos estudios clínicos¹²⁻¹⁶. Permite detectar e identificar directamente a partir de la sangre 25 agentes patógenos que suponen un 90% de los agentes etiológicos más frecuentes en una septicemia. En el panel de estudio se incluyen bacilos gramnegativos: *Escherichia coli*, *Klebsiella (pneumoniae/oxytoca)*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter (cloacae/aerogenes)*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia*; cocos grampositivos: *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulasa negativa, *Streptococcus pneumoniae*, otras especies de *Streptococcus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, así como *Candida* spp. (5 especies) y *Aspergillus fumigatus*. Además, tiene la posibilidad de detectar la presencia del gen *mecA*, responsable de la resistencia a la meticilina. Solo requiere 1,5 ml de sangre completa y el proceso de detección tiene una duración de 3,5 a 6 h según los resultados. El sistema utiliza como diana para identificar las bacterias las secuencias localizadas entre el 16S y el 23S del ADN ribosomal, y para los hongos las situadas entre el 18S y el 5,8 S. Una vez se ha extraído el ADN, se purifica y se realizan 3 PCR múltiples (bacterias gramnegativas, grampositivas y hongos) que permiten identificar los microorganismos incluidos en el panel a nivel de género y especie según el análisis de los puntos de fusión de los amplicones obtenidos. El límite de detección del método es de 3-30 UFC/ml para las bacterias y de 100 UFC/ml para las levaduras.

Se han comunicado los resultados de diversos estudios clínicos realizados en pacientes con septicemia grave^{13,14}, pacientes neutropénicos con fiebre^{13,15}, pacientes pediátricos¹⁶ o pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos¹³. Los datos de especificidad y sensibilidad observados son variables, probablemente porque la población estudiada es diferente. Chang et al.¹⁷ efectuaron una revisión sistemática de los datos publicados en la literatura y realizaron un metaanálisis que evaluó un total de 8.438 episodios de sospecha de septicemia en 6.012 pacientes. La sensibilidad global para detectar una septicemia fue del 75% y la especificidad, del 92%.

Si se analizan solo las bacteriemias, la sensibilidad fue del 80% y la especificidad, del 95%. Para las fungemias, los resultados fueron del 61 y del 95%, respectivamente. En una revisión sistemática reciente efectuada por Dark et al.¹⁸ de 41 estudios en fase III que valoraron la precisión diagnóstica comparando SeptiFast con el hemocultivo estándar, la sensibilidad fue del 68% y la especificidad, del 86%.

Magicplex Sepsis Real-Time

El sistema Magicplex Sepsis Real-Time ha sido desarrollado por Seegene (Corea del Sur) y permite identificar más de 90 microorganismos. El panel de detección incluye 73 microorganismos grampositivos, 12 gramnegativos, 6 hongos y 3 genes determinantes de resistencia (*vanA*, *vanB* y *mecA*). Solo es necesario un volumen de sangre de 1 ml y el resultado final se puede obtener en 3-6 h. Tras la extracción del ADN la muestra es sometida a una PCR convencional y en una segunda fase a otra PCR en la que se emplea una sonda de oligonucleótidos dual que, al estar marcados con una sustancia fluorescente, permite la detección a tiempo real del amplicón obtenido.

Carrara et al.¹⁹ valoraron la utilidad de esta metodología en un estudio en el que se incluyeron 267 pacientes procedentes de unidades de cuidados intensivos (UCI) y de los servicios de urgencias del hospital. Fueron positivas 98 muestras (37%); de ellas, 63 se consideraron positivos verdaderos y el resto, contaminantes. De las muestras positivas, 23 (36%) lo fueron tanto con el Magicplex como con los hemocultivos, 22 (35%) solo mediante hemocultivos y 18 (25%) solo con Magicplex. La sensibilidad y la especificidad fueron del 65 y del 92%, respectivamente, para Magicplex, y del 71 y del 88%, respectivamente, para los hemocultivos. En el estudio de Loonen et al.²⁰ los valores de sensibilidad y especificidad observados aún fueron inferiores: 33 y 77%, respectivamente.

SepsiTest

SepsiTest, de la casa comercial Molzym (Alemania), es un sistema semiautomatizado basado en el empleo de una PCR que utiliza cebadores universales dirigidos a dianas del ARN ribosomal de bacterias (16S) y hongos (18S). El resultado de la PCR indica la posible presencia de bacteriemia o fungemia y, en el caso de ser positiva, el producto obtenido (amplicón) se secuenciará para obtener la identificación final. Permite la identificación de 345 agentes patógenos entre bacterias y hongos, y el límite de detección es de 20-460 UFC/ml²¹. El volumen de sangre necesario es de 1 ml, aunque pueden llegar a procesarse 10 ml, y ofrece una ventaja evidente, como es el hecho de que puede utilizarse en otros líquidos estériles. El proceso requiere 4 h para saber si hay algún agente etiológico presente en la muestra y 4 h más hasta conocer el resultado de la secuenciación. En un estudio multicéntrico²² se evaluó SepsiTest en 187 pacientes (382 muestras) con diversas patologías (pacientes neutropénicos con fiebre, septicemia, SIRS). Si se comparan los resultados con los hemocultivos positivos la sensibilidad fue del 87% y la especificidad, del 86%. Merece la pena comentar que SepsiTest detectó un 12,5% de pacientes con una infección polimicrobiana, mientras que en los hemocultivos convencionales el porcentaje fue del 7,4%. Además detectó bacterias anaerobias que no crecieron en los hemocultivos, así como otros microorganismos que fueron considerados contaminantes. De los 54 hemocultivos positivos, SepsiTest no detectó ningún microorganismo en 7 casos, y en los 288 hemocultivos negativos la PCR fue positiva en 41 muestras obtenidas en 31 pacientes. De estas muestras positivas por PCR se consideró que en 25 pacientes la bacteriemia era posible o probable, ya que la mayoría (17 de 25) habían recibido tratamiento antimicrobiano antes de la obtención de la muestra. Con estos datos, la rentabilidad diagnóstica de SepsiTest fue del 25,7% y la de los

hemocultivos, del 15,8%. Los resultados de diversos trabajos publicados indican que la sensibilidad y la especificidad es muy variable, entre el 21 y el 85% y el 58 y el 95%, respectivamente^{20,22-24}. Hasta ahora no se ha incluido en el sistema la detección de genes de resistencia.

VYOO

El sistema VYOO (Analytik Jena, Alemania) emplea una PCR múltiple que permite identificar los microorganismos más frecuentemente implicados en una septicemia: 34 bacterias y 7 hongos. Se incluye la detección de 5 marcadores de resistencia. Son necesarios 5 ml de sangre, y el resultado final se obtiene en 7 h. Una vez extraído el ADN, se somete a un proceso de enriquecimiento y posterior amplificación múltiple con sondas específicas e identificación mediante tecnología de *microarrays* (en el diseño original se empleaban geles de electroforesis). De acuerdo con los datos de la casa comercial el sistema tiene un límite de detección de 3-10 UFC/ml²⁵. El panel de microorganismos detectados es bastante completo e incluye, aparte de las bacterias más habituales, *H. influenzae*, *N. meningitis*, diversos anaerobios, *A. fumigatus* y *Candida* spp. (las cinco especies más frecuentes). Los genes de resistencia determinados son: *mecA*, *vanA*, *vanB*, así como genes de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): *blaSHV* y *blaCTX-M*, incluyendo algunas variantes.

En un estudio observacional²⁶ se comparó el rendimiento del sistema VYOO con la práctica de hemocultivos convencionales en 311 muestras de 245 pacientes con sospecha de septicemia. Según los resultados obtenidos, el 30,1% (94/311) de las PCR fueron positivas, mientras que solo fueron positivos el 14,5% (45/311) de los hemocultivos realizados. En 27 muestras (8,7%) fueron positivos los dos métodos, y en 199 muestras (64%) ambos métodos fueron negativos. En 27 (21,5%) muestras solo fue positivo el sistema VYOO, mientras que la situación inversa (hemocultivos positivos, sistema VYOO negativo) se observó en 18 muestras (5,8%). La sensibilidad global del método VYOO para detectar cultivos positivos por bacterias fue del 60% y la especificidad, del 75%. Según los autores, el tiempo requerido hasta la obtención del resultado por el método VYOO fue de 7,2 h, mientras que para los hemocultivos positivos fue de 68,8 h, y de 191 h en los hemocultivos negativos. Schreiber et al.²³ compararon en un estudio observacional el rendimiento de 3 sistemas automatizados de PCR (VYOO, SepsiTest y SeptiFast) con la práctica de hemocultivos. Se incluyeron 50 pacientes con sospecha de septicemia, sepsis grave o shock séptico. Trece hemocultivos (26%) fueron positivos, pero solo 8 se consideraron valorables. Los 3 métodos moleculares no identificaron ningún microorganismo en 5 de los 8 hemocultivos positivos. Hubo 32 casos negativos tanto por hemocultivo como por los 3 métodos de PCR. El método SepsiTest detectó 6 positivos (12%), cuyos microorganismos coincidieron con los recuperados en 6 hemocultivos positivos. Cinco muestras (10%) fueron positivas por el sistema VYOO, de las cuales 4 se consideraron valorables pero ninguna coincidió con los hemocultivos positivos. SeptiFast identificó 8 microorganismos en 7 muestras, pero la concordancia con los hemocultivos positivos solo tuvo lugar en 3 casos. En algunos estudios^{26,27} el sistema VYOO es más sensible que los hemocultivos como referencia para valorar los resultados si se emplean la información clínica y marcadores como la procalcitonina. Esta mayor sensibilidad podría deberse a su bajo límite de detección (3-10 UFC/ml), asociado con un volumen de sangre más elevado (5 ml).

PCR/ESI-MS análisis

Esta metodología combina el empleo de una PCR que detecta el ADN del agente patógeno con el análisis posterior del amplicón

obtenido mediante espectrometría de masas. Para ello, se utiliza una técnica conocida como ionización por electrospray (ESI-MS) que consiste en la aplicación de una elevada carga eléctrica a un líquido que permite la creación de aerosoles que contendrían los iones que se generan a partir de las moléculas existentes en el líquido analizado y que serían detectados mediante el análisis con espectrometría de masas. En la actualidad el sistema más desarrollado es la plataforma IRIDICA (Abbott)¹¹, pero ha tenido diversos predecesores como TIGER²⁸, Ibis T5000²⁹ o Ibis-Abbott PLEX-ID³⁰. En el proceso se emplean múltiples pares de cebadores destinados a amplificar regiones seleccionadas del genoma bacteriano o fúngico como el ADN que codifica el ARN ribosomal o el de diversos genes constitutivos. Después de la amplificación, el análisis mediante ESI-MS permitirá conocer la composición de bases (A,G,C,T) existente en cada amplicón que se comparará con una base de datos para conocer el microorganismo detectado. El sistema permite identificar cerca de 800 microorganismos, incluyendo 9 especies de *Candida* spp., además de informar sobre la presencia de 4 genes de resistencia (*mecA*, *vanA*, *vanB* y *bla_{KPC}*). El volumen de sangre necesario es de 5 ml y el tiempo requerido para obtener el resultado final es de 6 h. Los estudios realizados para determinar el límite de detección del sistema indican que para bacterias es de 16 UFC/ml, y de 4 UFC/ml para *Candida*. Esta metodología tiene la capacidad de detectar bacteriemias polimicrobianas, y también puede aplicarse en otras muestras diferentes de la sangre, como líquidos estériles, o en el diagnóstico de infecciones respiratorias, ampliando el número de microorganismos identificados a casi 1.000 entre bacterias, hongos y virus. En un reciente estudio multicéntrico observacional realizado en pacientes ingresados en áreas de cuidados intensivos se comparó la utilidad de esta metodología en el diagnóstico de bacteriemia con los hemocultivos convencionales³¹. La sensibilidad de la técnica fue del 81% y la especificidad, del 69%, con un valor predictivo negativo del 97%. Estos valores de sensibilidad y especificidad se pueden considerar bajos, pero hay que comentar que del total de las muestras comparadas (625) solo se detectaron 68 hemocultivos positivos, y mediante PCR-ESI/MS el número de positivos fue de 228, es decir, 3 veces más. Solo hubo 13 hemocultivos positivos que fueron negativos por PCR-ESI/MS. En el trabajo previo de Bacconi et al.¹¹ los valores de sensibilidad son similares (83%), pero la especificidad fue superior (94%). Jordana et al.³², después de aplicar criterios clínicos de infección a la hora de evaluar los resultados obtenidos, obtuvieron una sensibilidad y una especificidad del 90,5 y del 87,2%, respectivamente.

T2Candida

La metodología que emplea el sistema T2Candida test se conoce como resonancia magnética T2 (T2RM) y ha sido desarrollada por T2Biosystems (EE.UU.). Este sistema tiene una aproximación novedosa para detectar la presencia de especies de *Candida* directamente en una muestra de sangre del paciente. El método se fundamenta en una metodología convenientemente miniaturizada que por resonancia magnética es capaz de analizar cómo las moléculas de agua reaccionan en presencia de campos magnéticos. Tiene la capacidad de detectar una amplia variedad de dianas, como ADN (dianas moleculares) y proteínas que tienen utilidad en inmunodiagnóstico³³. El ensayo T2Candida permite identificar las 5 especies de *Candida* más frecuentes: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*. Para ello emplea cebadores específicos complementarios de las secuencias del ARN ribosomal 5,8S y 28S que amplifican la región ITS2 del genoma de *Candida* que posteriormente se unen a nanopartículas paramagnéticas recubiertas con una sonda complementaria. Una vez se produce la hibridación las nanopartículas se agrupan alrededor de la diana detectada y se modifica la señal magnética en la muestra con

cambios microscópicos en el agua de la muestra, lo que indica la presencia de la diana buscada³³. La variación en la señal, conocida como relajación T2, se mide con el instrumento T2Dx. Se trata de un instrumento completamente automatizado, capaz de realizar varios test a la vez y en un tiempo de 3 a 5 h. El límite de detección del método T2Candida, según la casa comercial, es de tan solo 1 UFC/ml. Neely et al.³⁴ evaluaron el rendimiento del método T2Candida en un estudio ciego en el que se incluyeron 24 muestras de sangre de varios pacientes que presentaban síntomas atribuibles a una septicemia. Ocho muestras procedían de 3 pacientes con candidemia, 8 de pacientes con bacteriemia (n=8) y otras 8 de pacientes con hemocultivos negativos (n=8). En todas las muestras procedentes de pacientes con candidemia el método T2Candida detectó las especies responsables. De forma adicional se analizaron 21 muestras de sangre de 3 pacientes con *C. albicans* que fueron recogidas de forma seriada. Tanto los hemocultivos como el método T2Candida detectaron la presencia de *C. albicans* en la sangre del paciente. A las 24 h de iniciar el tratamiento antifúngico los hemocultivos fueron negativos pero el método T2Candida seguía siendo positivo, indicando la posible detección de ADN procedente de células muertas. En el mismo trabajo los autores estudiaron diferentes concentraciones de las especies de *Candida* que puede detectar el sistema y observaron que el límite de detección era de 3 UFC/ml para *C. albicans* y *C. tropicalis*, de 2 UFC/ml para *C. glabrata* y *C. krusei* y de 1 UFC/ml para *C. parapsilosis*. Beyda et al.³⁵ compararon el método T2Candida con la práctica de hemocultivos. Añadieron diferentes concentraciones (entre 3 y 11 UFC/ml) de las 5 especies que detecta el método T2Candida a muestras de sangre y analizaron un total de 90 muestras. La sensibilidad del método fue del 100% y la especificidad, del 98%, ya que hubo 4 falsos positivos que los autores atribuyeron a una posible contaminación al preparar las muestras. El tiempo requerido para obtener los resultados fue de 3 a 5 h para el método T2Candida, mientras que la media del resultado del hemocultivo fue de 63 h. En el estudio multicéntrico de Mylonakis et al.³⁶ la sensibilidad y la especificidad global fueron del 99,4 y del 91,1%, respectivamente. Además, los autores estiman un valor predictivo negativo entre el 99,5 y el 99% para una población de estudio con una prevalencia de candidemia entre un 5 y un 10%, respectivamente. T2Biosystems está actualmente desarrollando un método para la detección de bacterias (T2Bacteria) que incluiría la mayoría de los agentes patógenos asociados a un cuadro séptico y con un rendimiento similar al observado con el método T2Candida.

Nuevas tecnologías

La compañía DNA Electronics Ltd (www.dnae.com) ha diseñado un instrumento (Genalysis) enfocado al diagnóstico rápido de la septicemia que permite identificar el agente etiológico y los genes de resistencia a los antibióticos en un tiempo de 2-3 h.

Esta tecnología combina la secuenciación del ADN en una plataforma electrónica (semiconductores) junto con un sistema de captura inmunomagnético del agente patógeno que lo detecta en menos de 30 min. Se utiliza un volumen de 10 ml de sangre y tiene una sensibilidad de 1 UFC/ml.

El sistema vivoDx, desarrollado por la compañía GeneWEAVE, que ha sido adquirida por el grupo Roche, está enfocado a la detección directa de microorganismos en diversas muestras patológicas y al mismo tiempo determinar su sensibilidad a los antibióticos en menos de 4 h, aunque no hay datos sobre su posible aplicación en sangre completa (www.rochemicrobiolytests.com). Emplea la tecnología SmarticlesTM, una herramienta innovadora de diagnóstico molecular que combina biopartículas que contienen ADN específico diseñado para detectar el microorganismo mediante la expresión de luciferasa.

Diagnóstico directo a partir de hemocultivos positivos

Después de conocer el resultado de la tinción de Gram de un hemocultivo positivo, el laboratorio de microbiología debe plantearse qué opciones diagnósticas puede emplear para identificar el microorganismo visualizado lo más pronto posible sin esperar el resultado de los cultivos convencionales. También debe considerar la posibilidad de emplear técnicas que, al mismo tiempo que identifican el microorganismo, detecten la presencia de determinados genes de resistencia a los antibióticos. En la actualidad se dispone de diversos sistemas para identificar de forma rápida los microorganismos detectados en los hemocultivos positivos. Sin duda, el empleo de la espectrometría de masas (*matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight* [MALDI-ToF]) es la opción por la que optan la mayoría de laboratorios, ya que en menos de una hora se puede identificar el agente etiológico. El funcionamiento y la utilidad del MALDI-ToF se comentan ampliamente en un artículo específico de esta revista³⁷.

Kaleta et al.³⁸ utilizaron la metodología PCR/ESI-MS para identificar los microorganismos aislados en un hemocultivo positivo, obteniendo una elevada concordancia con los métodos fenotípicos de identificación. Sin embargo, la complejidad de este sistema no justifica su empleo en este campo si lo comparamos con la sencillez del MALDI-ToF.

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) permite la identificación de un determinado número de agentes patógenos. Este sistema se fundamenta en la unión específica de sondas de ácidos nucleicos fluorescentes con secuencias complementarias de ADN del microorganismo (16S ARNr para bacterias y 18S ARNr para hongos). La elección de una sonda concreta depende del resultado de la tinción de Gram: estafilococos (*S.aureus*/estafilococos coagulasa negativa), enterococos (*E.faecalis*, *E.faecium*), bacilos gramnegativos (*E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*) o *Candida* spp. El resultado se obtiene en menos de 3 h³⁹. Desde el año 2013 está disponible una versión más rápida de esta metodología denominada Quick-FISH que reduce el tiempo a unos 30 min⁴⁰. La sensibilidad y la especificidad de ambas técnicas oscilan entre el 97-100% y el 90-100%, respectivamente^{39,40}. La compañía AccelerateDiagnostics INC (EE. UU.) ha desarrollado un sistema automatizado (Accelerate ID/AST) que emplea la tecnología FISH para identificar el microorganismo aislado en el hemocultivo positivo en 1 h aproximadamente y puede determinar la sensibilidad a los antibióticos en 6 h⁴¹. Permite identificar las especies y géneros de bacterias grampositivas y gramnegativas más frecuentes, aunque hacen falta más estudios para validar su utilidad.

La bacteriemia por *S.aureus* es una entidad grave con una importante mortalidad y un elevado riesgo de complicaciones⁴². La detección precoz de estos microorganismos y al mismo tiempo su sensibilidad o resistencia a la oxacilina se pueden llevar a cabo en aproximadamente 1 h mediante diversas técnicas de PCR rápidas como GeneXpert MRSA/SA BC (Cepheid) o GenomERA MRSA/SA (Abacus). Los valores de sensibilidad y especificidad de ambas metodologías son elevados (> 95%) y su automatización facilita su empleo en la rutina diaria de un laboratorio de microbiología^{43,44}. Otros sistemas, como BD GeneOhm MRSA o BD Max MRSA^{45,46}, también han demostrado ser útiles pero requieren más tiempo para su realización: 120-140 min. Tanto *S.aureus* como los estafilococos coagulasa negativa (ECN) son agentes etiológicos frecuentes de la bacteriemia asociada a catéteres intravenosos. Zboromyrska et al.⁴⁷ han demostrado la utilidad del sistema GeneXpert MRSA/SA BC en la detección de *S.aureus* (sensible y resistente a la oxacilina) y ECN resistentes a oxacilina directamente en la sangre obtenida a través de un catéter infectado sin tener que esperar al resultado del hemocultivo.

Eazyplex MRSA (Amplex ByoSystems GmbH) es un ensayo comercializado recientemente que emplea la metodología

loop-mediated isothermal amplification (LAMP) para detectar *S.aureus* y ECN, así como el gen *mecA* y el *mecC*⁴⁸ en menos de 30 min. En el trabajo de Rödel et al.⁴⁸ la sensibilidad y la especificidad para detectar *S.aureus* fue del 100 y del 98,2%, respectivamente, y del 100% en ambos parámetros en las cepas resistentes a oxacilina. El empleo de la metodología LAMP también ha demostrado su utilidad en la detección de genes de resistencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas (KPC, VIM, NDM, IMP) directamente a partir de hemocultivos positivos⁴⁹ con una sensibilidad y especificidad del 100%. Además, ofrece la posibilidad de que cada laboratorio pueda diseñar sondas específicas para detectar aquellos microorganismos que considere de interés.

El sistema AccuProbe (Gen-Probe, EE.UU.) identifica directamente a partir de hemocultivos positivos mediante el empleo de una sonda de ADN específica diversos microorganismos grampositivos: *S.pneumoniae*, *S.aureus*, *Enterococcus* spp., *S.pyogenes* y *S.agalactiae*. La sensibilidad y la especificidad son superiores al 97% excepto para *S.aureus*, cuya especificidad es del 80,8% y la sensibilidad, del 99,8%⁵⁰.

En los últimos años se han desarrollado métodos moleculares basados en el empleo de PCR múltiples y posterior hibridación en paneles de *microarrays* que permiten la identificación de gran parte de los microorganismos responsables de una septicemia a partir de hemocultivos positivos. El sistema Verigene (Nanosphere, EE. UU.) ha creado un panel para microorganismos grampositivos (n = 13: 9 especies y 4 géneros) y otro para bacilos gramnegativos (n = 9: 5 especies y 4 géneros) con una sensibilidad del 81-100% y una especificidad superior al 98%⁵¹. El sistema también permite detectar diversos genes de resistencia: *mecA*, *vanA*, *vanB*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA}* y *bla_{CTX-M}*, y el tiempo necesario es de 2,5 h.

La plataforma diseñada por Biofire Diagnostics (bioMérieux, Francia) efectúa de forma totalmente automatizada la extracción y la purificación de los ácidos nucleicos y utiliza diversas PCR múltiples anidadas para identificar el agente etiológico en 1 h. El panel FilmArray Blood Culture Identification para hemocultivos abarca 26 microorganismos (11 especies y 15 géneros de bacterias grampositivas y gramnegativas) además de las 5 especies de *Candida* más frecuentes y 4 genes de resistencia (*mecA*, *vanA*, *vanB*, *bla_{KPC}*). La sensibilidad para identificar estos microorganismos es > 90%^{52,53} y del 100% para detectar los genes de resistencia⁵³. El sistema Prove-it Sepsis (Mobidiag, Finlandia) también combina el empleo de una PCR con *microarrays* con una sensibilidad y una especificidad del 95 y del 99%, respectivamente, pero el tiempo empleado es de 3,5 h⁵⁴. El ensayo Sepsis Flow Chip (SFC, Master Diagnostica, España) se basa en una metodología que consiste en la detección simultánea de al menos 36 especies bacterianas y varias fúngicas mediante PCR múltiple seguida de hibridación automática en membrana con sondas de ADN específicas mediante la tecnología DNA-Flow (hybriSpot HS24). Además permite detectar 20 marcadores de resistencia (*mecA*, *vanA*, *vanB* y diversos genes de betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas de clase A, B y D) en un tiempo que se aproxima a las 4 h^{55,56}.

Conclusiones

Las diferentes tecnologías desarrolladas para identificar de forma directa en la sangre del paciente el agente etiológico de una septicemia tienen el potencial de reducir el tiempo necesario para llegar al diagnóstico microbiológico definitivo. La información que proporcionan tiene relevancia clínica pero no sustituye la conseguida con la práctica de los hemocultivos habituales. En la actualidad son métodos complementarios y hacen falta estudios que valoren el posible impacto que pueden tener en el manejo de los pacientes con septicemia. Además, deben valorarse otros

aspectos, como el número de muestras a analizar, su frecuencia o la interpretación de los resultados desde un punto de vista clínico y microbiológico. Tampoco debe olvidarse que el empleo de estas tecnologías supone un coste económico añadido que debe justificarse con un beneficio clínico claro.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Mayr F, Yende S, Angus D. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*. 2013;5:4–11.
- Pherson D, Griffiths C, Williams M, Baker A, Klodawski E, Jacobson B, et al. Sepsis-associated mortality in England: An analysis of multiple cause of death data from 2001 to 2010. *BMJ Open*. 2013;3, <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2013-002586>
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001;29:1303–10.
- Vincent JL, Sakr Y, Sprung L, Ranieri M, Reinhart K, Gerlach H, et al. Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study. *Crit Care Med*. 2006;34:344–53.
- Cockerill F, Wilson J, Vetter E, Goodman K, Torgerson C, Harmsen W, et al. Optimal testing parameters for blood cultures. *Clin Infect Dis*. 2004;38:1724–30.
- Riedel S, Bourbeau P, Swartz B, Brecher S, Carroll K, Stamper P, et al. Timing of specimen collection for blood cultures from febrile patients with bacteremia. *J Clin Microbiol*. 2008;46:1381–5.
- Dellinger R, Levy M, Carlet J, Bion J, Parker M, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med*. 2008;34:17–60.
- Kumar A, Roberts D, Wood K, Light B, Parrillo J, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med*. 2006;34:1589–96.
- Al-Soud WA, Rådström P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol*. 2001;39:485–93.
- Wain J, Diep TS, Ho VA, Walsh AM, Nguyen TT, Parry CM, et al. Quantitation of bacteria in blood of typhoid fever patients and relationship between counts and clinical features, transmissibility, and antibiotic resistance. *J Clin Microbiol*. 1998;36:1683–7.
- Bacconi A, Richmond G, Baroldi M, Laffer T, Blyn L, Carolan H, et al. Improved sensitivity for molecular detection of bacterial and *Candida* infections in blood. *J Clin Microbiol*. 2014;52:3164–74.
- Bloos F, Hinder F, Becker K, Sachse S, Dessap AM, Straube E, et al. A multicenter trial to compare blood culture with polymerase chain reaction in severe human sepsis. *Intensive Care Med*. 2010;36:241–7.
- Bravo D, Blanquer J, Tormo M, Aguilar G, Borrás R, Solano C, et al. Diagnostic accuracy and potential clinical value of the LightCycler SeptiFast assay in the management of bloodstream infections occurring in neutropenic and critically ill patients. *Int J Infect Dis*. 2011;15:e326–31.
- Fernández-Cruz A, Marin M, Kestler M, Alcalá L, Rodríguez-Creixems M, Bouza E. The value of combining blood culture and SeptiFast data for predicting complicated bloodstream infections caused by Gram-positive bacteria or *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 2013;51:1130–6.
- Lamoth F, Jatón K, Prod'homme G, Senn L, Calandra T, et al. Multiplex blood PCR in combination with blood cultures for improvement of microbiological documentation of infection in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol*. 2010;48:3510–6.
- Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, Pizzorno B, Putignano L, Bernaschi P, et al. Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis. *J Clin Microbiol*. 2011;49:2252–8.
- Chang S-S, Hsieh W-H, Liu T-S, Lee S-H, Wang C-H, Chou H-C, et al. Multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis—A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. 2013;8:e62323.
- Dark P, Blackwood B, Gates S, McAuley D, Perkins GD, McMullan R, et al. Accuracy of LightCycler® SeptiFast for the detection and identification of pathogens in the blood of patients with suspected sepsis: A systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med*. 2014;41:21–33.
- Carrara L, Navarro F, Turbau M, Seres M, Morán I, Quintana I, et al. Molecular diagnosis of bloodstream infections with a new dual-priming oligonucleotide-based multiplex PCR assay. *J Med Microbiol*. 2013;62:1673–9.
- Loonen A, de Jager C, Tosserams J, Kusters R, Hilbink M, Wever P, et al. Biomarkers and molecular analysis to improve bloodstream infection diagnostics in an emergency care unit. *PLoS ONE*. 2014;9:e87315.
- Mühl H, Kochem A-J, Disqué C, Sakka SG. Activity and DNA contamination of commercial polymerase chain reaction reagents for the universal 16S rDNA real-time polymerase chain reaction detection of bacterial pathogens in blood. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;66:41–9.
- Wellinghausen N, Kochem A-J, Disqué C, Mühl H, Gebert S, Winter J, et al. Diagnosis of bacteremia in whole-blood samples by use of a commercial universal 16S rRNA gene-based PCR and sequence analysis. *J Clin Microbiol*. 2009;47:2759–65.
- Schreiber J, Nierhaus A, Braune SA, de Heer G, Kluge S. Comparison of three different commercial PCR assays for the detection of pathogens in critically ill sepsis patients. *Med Klin Intensivmed Notfmed*. 2013;108:311–8.
- Orszag P, Disqué C, Keim S, Lorenz MG, Wiesner O, Hadem J, et al. Monitoring of patients supported by extracorporeal membrane oxygenation for systemic infections by broad-range rRNA gene PCR amplification and sequence analysis. *J Clin Microbiol*. 2014;52:307–11.
- Sachse S, Straube E, Lehmann M, Bauer M, Russwurm S, Schmidt KH. Truncated human cytidylate-phosphate-deoxyguanylate-binding protein for improved nucleic acid amplification technique-based detection of bacterial species in human samples. *J Clin Microbiol*. 2009;47:1050–7.
- Bloos F, Sachse S, Kortgen A, Pletz MW, Lehmann M, Straube E, et al. Evaluation of a polymerase chain reaction assay for pathogen detection in septic patients under routine condition: An observational study. *PLoS ONE*. 2012;7:e46003.
- Fitting C, Parlato M, Adib-Conquy M, Memain N, Philippart F, Misset B, et al. DNAemia detection by multiplex PCR and biomarkers for infection in systemic inflammatory response syndrome patients. *PLoS ONE*. 2012;7:e38916.
- Hofstadler SA, Sampath R, Blyn LB, Eshoo MW, Hall TA, Jiang Y, et al. TIGER: The universal biosensor. *Int J Mass Spectrom*. 2005;242:23–41.
- Ecker DJ, Sampath R, Massire C, Blyn LB, Hall TA, Eshoo MW, et al. Ibis T5000: A universal biosensor approach for microbiology. *Nat Rev Micro*. 2008;6:553–8.
- Jacob D, Sauer U, Housley R, Washington C, Sannes-Lowery K, Ecker DJ, et al. Rapid and high-throughput detection of highly pathogenic bacteria by Ibis PLEX-ID technology. *PLoS ONE*. 2012;7:e39928–37.
- Vincent JL, Brealey D, Libert N, Abidi N, O'Dwyer M, Zacharowski K, et al. Rapid diagnosis of infection in the critically ill. A multicenter study of molecular detection in bloodstream infections, pneumonia, and sterile site infections. *Crit Care Med*. 2015;43:2283–91.
- Jordana-Lluch E, Giménez M, Quesada MD, Rivaya B, Marcó C, Domínguez MJ, et al. Evaluation of the broad-range PCR/ESI-MS technology in blood specimens for the molecular diagnosis of bloodstream infections. *PLoSOne*. 2015;10:e0140865–140913.
- Pfaller MA, Wolk DM, Lowery TJ. T2MR and T2Candida: Novel technology for the rapid diagnosis of candidemia and invasive candidiasis. *Future Microbiol*. 2011;11:103–17.
- Neely LA, Audeh M, Phung NA, Min M, Suchocki A, Plourde D, et al. T2 magnetic resonance enables nanoparticle-mediated rapid detection of candidemia in whole blood. *Sci Transl Med*. 2013;5:182ra54.
- Beyda ND, Alam MJ, Garey KW. Comparison of the T2Dx instrument with T2Candida assay and automated blood culture in the detection of *Candida* species using seeded blood samples. *Diag Microbiol Infect Dis*. 2013;77:324–6.
- Mylonakis E, Clancy C, Ostrosky-Zeichner L, Garey K, Alangaden G, Vazquez J, et al. T2 magnetic resonance assay for the rapid diagnosis of Candidemia in whole blood: A clinical trial. *Clin Infect Dis*. 2015;60:892–9.
- Siller-Ruiz M, Hernández-Egido S, Sánchez-Juanes F, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. Métodos rápidos de identificación de bacterias y hongos. Espectrometría de masas MALDI-ToF, medios cromogénicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.12.010>
- Kaleta EJ, Clark AE, Johnson DR, Gamage DC, Wysocki VH, Cherkaoui A, et al. Use of PCR coupled with electrospray ionization mass spectrometry for rapid identification of bacterial and yeast bloodstream pathogens from blood culture bottles. *J Clin Microbiol*. 2011;49:345–53.
- Martinez RM, Bauerle ER, Fang FC, Butler-Wu SM. Evaluation of three rapid diagnostic methods for direct identification of microorganisms in positive blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2014;52:2521–9.
- Deck MK, Anderson ES, Buckner RJ, Colasante G, Coull JM, Crystal B, et al. Multicenter evaluation of the *Staphylococcus* QuickFISH method for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci directly from blood culture bottles in less than 30 minutes. *J Clin Microbiol*. 2012;50:1994–8.
- Chantell C. Multiplexed automated digital microscopy for rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of bacteria and yeast directly from clinical samples. *Clin Microbiol News*. 2015;37:161–7.
- Laupland KB, Ross T, Gregson DB. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: Risk factors, outcomes, and the influence of methicillin resistance in Calgary, Canada, 2000–2006. *J Infect Dis*. 2008;198:336–43.
- Pence MA, McElvania TeKippe E, Burnham CA. Diagnostic assays for identification of microorganisms and antimicrobial resistance determinants directly from positive blood culture broth. *Clin Lab Med*. 2013;33:651–84.
- Hirvonen JJ, Kaukoranta S-S. GenomEra MRSA/SA, a fully automated homogeneous PCR assay for rapid detection of *Staphylococcus aureus* and the marker of methicillin resistance in various sample matrices. *Expert Rev Mol Diag*. 2014;13:655–65.
- Stamper PD, Cai M, Howard T, Speser S, Carroll KC. Clinical validation of the molecular BD GeneOhm StaphSR assay for direct detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in positive blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2007;45:2191–6.
- Dalpkpe AH, Hofko M, Hamilton F, Mackenzie L, Zimmermann S, Templeton K. Evaluation of the BD Max StaphSR Assay for rapid identification of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* in positive blood culture broths. *J Clin Microbiol*. 2015;53:3630–2.
- Zboromyrska Y, de la Calle C, Soto M, Sampietro-Colom L, Soriano A, Alvarez-Martinez MJ, et al. Rapid diagnosis of staphylococcal catheter-related bacteraemia in direct blood samples by real-time PCR. *PLoS ONE*. 2016;11:e0161684–161711.

48. Rödel J, Bohnert JA, Stoll S, Wassill L, Edel B, Karrasch M, et al. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for the rapid identification of bacteria and resistance determinants in positive blood cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017, <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-016-2888-1>
49. Zboromyrska Y, Vergara A, Cosgaya C, Verger G, Mosqueda N, Almela M, et al. Rapid detection of β -lactamases directly from positive blood cultures using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based assay. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46:355–6.
50. Lindholm L, Sarkkinen H. Direct identification of gram-positive cocci from routine blood cultures by using AccuProbe tests. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5609–13.
51. Mancini N, Infurnari L, Ghidoli N, Valzano G, Clementi N, Burioni R, et al. Potential impact of a microarray-based nucleic acid assay for rapid detection of Gram-negative bacteria and resistance markers in positive blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2014;52:1242–5.
52. Altun O, Almuhayawi M, Ullberg M, Ozenci V. Clinical evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification Panel in identification of bacteria and yeasts from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* 2013;51:4130–6.
53. Blaschke AJ, Heyrend C, Byington CL, Fisher MA, Barker E, Garrone NF, et al. Rapid identification of pathogens from positive blood cultures by multiplex polymerase chain reaction using the FilmArray system. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2012;74:349–55.
54. Tissari P, Zumla A, Tarkka E, Mero S, Savolainen L, Vaara M, et al. Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: An observational study. *Lancet.* 2010;375:224–30.
55. Galiana A, Carrero-Lérida J, Azrak S, Olmo A, Rodríguez JC. Sepsis Flow Chip: A new molecular system for simultaneous detection of the main pathogens responsible for nosocomial infections. 26th ECCMID, Amsterdam. EP036.
56. Galiana A, Carrero-Lérida J, Olmo A, Azrak S, Rodríguez JC. Evaluating the Sepsis Flow Chip kit for detecting multidrug resistant bacteria. 26th ECCMID, Amsterdam. P0955.