



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

Tesina para obtener el título de
Especialización en Bioquímica Clínica

Comparación de la espectrometría de masas con la
identificación fenotípica en el diagnóstico de hemocultivos y
su impacto en la terapia antimicrobiana

Presenta: BQD Claudia Ivette Vázquez Duhart

Asesora: M en F María del Consuelo Velázquez Acosta

Instituto Nacional de Cancerología

México, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicada

A la memoria de

María Eugenia Vázquez Velázquez

y

Pedro Duhart Hernández

Agradecimientos

Señor cuando inicie este camino y te dije “Jesús, yo confié en tí” me contestaste “Tú puedes y siempre voy a ayudarte”, promesa a la cual nunca faltaste.

Es por ello que al final de este capítulo en mi vida quiero darte las gracias por las vivencias y las bendiciones otorgadas, pero sobre todo por las personas que formaron parte de este andar ya que a través de ellas me hiciste llegar tú amor, enseñanzas y ayuda, por favor bendícelas a cada momento.

Familia muchas gracias por estar siempre a mi lado, su amor, esfuerzo, comprensión, escucha, paciencia, risas y consejos fueron los obsequios más valiosos que he recibido; sobre todo a mis padres, abuelos y hermano. Por favor nunca olviden que los amo.

A mis profesores y al personal de laboratorio de las diversas estancias hospitalarias, gracias por sus enseñanzas. Con especial atención para el servicio de Microbiología del Instituto Nacional de Cancerología, particularmente para la M en F María del Consuelo Velázquez Acosta quien depositó su confianza en mí.

Este trabajo fue realizado en el área de Microbiología, perteneciente al departamento de Laboratorio clínico en el Instituto Nacional de Cancerología, bajo la asesoría de la M en F María del Consuelo Velázquez Acosta

Resumen

Las enfermedades infecciosas son de las principales causas de muerte a nivel mundial, por lo que una vez que se sospecha de ellas deben ordenarse las pruebas apropiadas que ayuden al diagnóstico.

La identificación fenotípica es el estándar de oro en bacteriología y permite poner de manifiesto las características expresadas por un genoma bacteriano, el proceso se divide en tres niveles; el primero clasifica provisionalmente al microorganismo a través de tinciones, el segundo identifica a nivel de género y el tercero busca determinar la especie (Biswas, y otros, 2012) (Fernández, y otros, 2010).

Actualmente existen equipos semiautomatizados y automatizados de identificación fenotípica, un ejemplo es el Phoenix® que realiza de manera simultánea la identificación y un análisis de susceptibilidad, considerándose esta última su principal ventaja (Becton Dickinson, 2011) (Crocker, y otros, 2005).

La espectrometría de masas es una técnica que permite analizar el conjunto de proteínas expresadas por un genoma bacteriano (huella proteómica) y se fundamenta en producir, separar, detectar y analizar iones en fase gaseosa en función de su carga y su masa (Gobernador, 2010). El espectrómetro con tecnología MALDI-TOF utiliza un proceso de ionización suave y su principal ventaja es poder realizar una identificación a partir de muestras sólidas o líquidas, en el caso de estas últimas prescindiendo del crecimiento en medios sólidos (Bailey, y otros, 2013) (García, y otros, 2012).

El presente trabajo se enfoca en el análisis microbiológico de hemocultivos, único estudio que permite el diagnóstico y monitoreo de bacteremias y sepsis (García, y otros, 2011) (Lopez-Hontangas, y otros, 2015). En México se calcula que la sepsis tiene una prevalencia de 40 casos por cada 100 mil habitantes, con una mortalidad de entre el 49-80%, sin embargo, existe evidencia de un sub-registro en los sistemas de salud (Carrillo, y otros, 2009). En el caso de pacientes oncológicos su estado de inmunosupresión los hace susceptibles de evolucionar a sepsis

presentando una mortalidad aproximada del 52% de los pacientes (Willam, y otros, 2004), por lo que se deben implementar tecnologías apropiadas para la detección temprana de bacteremia.

Este estudio busca evaluar el impacto de nuevas tecnologías complementarias como la espectrometría de masas (MALDI-TOF) en busca de optimizar los tiempos de diagnóstico, por lo que se presentan tres puntos de comparación con respecto a la identificación fenotípica (Phoenix ®):

- I. La sensibilidad y exactitud de los equipos: Ambos presentaron una sensibilidad del 93% y una exactitud del 96%, donde MALDI-TOF identifico correctamente el 98% de las bacterias gram negativas y el 91% de gram positivas, mientras que Phoenix® el 99% y 89% respectivamente.
- II. El tiempo que tardó en darse la identificación: La teoría indica que la diferencia de Phoenix® con respecto a MALDI-TOF debe ser de entre 12 a 24 horas dependiendo la metodología utilizada. En la práctica se observaron tiempos de 12 a 72 horas diferencia, donde el proceso de extracción disminuyo significativamente el tiempo requerido para diagnóstico definitivo.
- III. Impacto que tuvo el diagnóstico microbiológico en los pacientes del instituto: En este aspecto la espectrometría de masas con tecnología MALDI-TOF afecto positivamente el 51% de los pacientes, mientras que la identificación fenotípica en el 42% de ellos, por lo que la espectrometría fue superior a la identificación fenotípica en este aspecto.

Los resultados obtenidos a lo largo de este estudio demostraron que la espectrometría de masas es un buen complemento para la identificación fenotípica, permitiendo un diagnóstico pronto y oportuno de los pacientes.

Índice

Resumen	IV
Índice	VI
Índice de abreviaturas	VII
1 Introducción	1
1.1 Enfermedades infecciosas (definición e incidencia)	1
1.2 Diagnóstico bacteriológico	2
1.3 Identificación fenotípica	3
1.4 Espectrometría de masas	10
1.5 Comparación de la espectrofotometría y espectrometría	21
1.6 Hemocultivos	22
2 Justificación	27
3 Hipótesis	28
4 Objetivos	29
4.1 Objetivo general	29
4.2 Objetivos particulares	29
5 Materiales y métodos	30
5.1 Muestras	30
5.2 Equipos y materiales	31
5.3 Metodología	32
6 Resultados	33
6.1 Evaluación de la sensibilidad y especificidad de los equipos	33
6.2 Impacto en los pacientes	40
7 Discusión	44
7.1 Comparación de la espectrometría de masas y métodos fenotípicos	44
7.2 Tiempos de identificación	47
7.3 Impacto en los pacientes	48
8 Conclusiones	50
9 Referencias	51

Índice de abreviaturas

BAAR: Bacilos ácido alcohol resistentes

CAP: Colegio Americano de Patólogos

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CPS: Proteínas frías de shock (por sus siglas en ingles [cold shock protein])

m/z: Masa entre carga

m: Masa

MALDI: Espectrometría de masas de desorción/ionización mediante laser asistida por matriz (por sus siglas en ingles Matrix-asisted laser desorption)

mmHg: milímetros de mercurio

RHOVE: Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica

tc: t de Student calculada

TOF: Tiempo de vuelo (por sus siglas en ingles Time of flight)

UFC: Unidades formadoras de colonias

UTI: Unidad de terapia intensiva

z: Carga

1 Introducción

1.1 Enfermedades infecciosas (definición e incidencia)

A lo largo de la historia las enfermedades infecciosas han sido causa predominante de enfermedad y muerte, definiendo enfermedad infecciosa o infección, desde el punto de vista microbiológico, como la presencia de microorganismos con la capacidad de reproducirse en un tejido huésped, habitualmente estéril. Desde el punto de vista clínico, es la multiplicación de un patógeno o la acción de su(s) toxina(s) en un paciente, produciendo una enfermedad clínica o subclínica (Koneman, y otros, 2013) (Secretaria de Salud) (Secretaria de Salud). Existiendo tantas enfermedades infecciosas como agentes que la provocan ya que todo microorganismo es capaz de actuar como patógeno potencial¹ u oportunista² (Carrillo, y otros, 2009) (Tortora, y otros, 2007).

En el informe del 2012 de la Organización Mundial de la Salud, los países de ingresos bajos reportaron a las enfermedades infecciosas como causa predominante de defunción de manera conjunta, donde destacaron las infecciones de las vías respiratorias bajas, el VIH/SIDA, enfermedades diarreicas, paludismo y la tuberculosis. Mientras que en los países de ingresos altos las infecciones son la segunda causa de muerte siguiendo a las enfermedades crónicas (OMS, 2015) (Organización Mundial de la Salud, 2014).

En México no existe un reporte estadístico que englobe las enfermedades infecciosas ya que se analiza por patología o microorganismo causal, pero entre las primeras 10 causas de muerte se encuentra la influenza/neumonía, ocupando el noveno lugar, después de la diabetes mellitus, enfermedades del corazón, cerebrovasculares, cirrosis, entre otras enfermedades crónicas (Secretaria de Salud, 2014) (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2013).

¹ Se produce una enfermedad cada vez que invade al huésped (Koneman, y otros, 2013)

² Produce infección solo cuando el huésped esta inmunocomprometido (Koneman, y otros, 2013)

1.2 Diagnóstico bacteriológico

Una vez que se sospecha de una enfermedad infecciosa deben ordenarse las pruebas apropiadas que ayuden al diagnóstico. En el caso de las infecciones bacterianas, el laboratorio de microbiología tiene como tareas fundamentales implementar la metodología precisa para lograr identificar a nivel de género y especie el(los) agente(s) etiológico(s) y establecer una terapia antimicrobiana apropiada, en busca de una menor generación de resistencia a los fármacos. Además de monitorear la evolución clínica de los pacientes, realizar un seguimiento y control de las infecciones hospitalarias y detectar un posible brote infeccioso (Biswas, y otros, 2012) (Lopez-Hontangas, y otros, 2015).

Tomando en cuenta que no todos los microorganismos se pueden identificar de la misma manera se cuenta con una gama de tecnologías distintas, cuya combinación permite un resultado definitivo (Tabla 1). Motivo por el cual cada laboratorio implementa las técnicas que mejor le convengan dependiendo de sus propósitos y del tipo de pacientes que maneje (Gutiérrez, y otros, 2010) (García, y otros, 2012). En este trabajo se tiene mayor interés por los métodos de identificación fenotípica y la espectrometría de masas.

Métodos	Técnicas
<u>Identificación fenotípica</u>	Características microscópicas: Tinción diferencial Morfología Agrupación
	Características macroscópicas
	Metabolismo microbiano
	Resistencia a sustancias
Inmunológicos	Pruebas serológicas
Moleculares	Tipificación de fagos
	Detección molecular
Basados en la proteómica	Electroforesis
	<u>Espectrometría de masas</u>

1.3 Identificación fenotípica

1.3.1 Fundamento de los métodos de identificación fenotípica

Los métodos de identificación fenotípica son un conjunto de pruebas consideradas el “estándar de oro” para la identificación bacteriana (Biswas, y otros, 2012) (Lopez-Hontangas, y otros, 2015). Es necesario esclarecer que el “fenotipo” hace referencia a la manifestación externa de un genotipo, es decir, el conjunto de rasgos o características observables de tipo morfológicos o bioquímicos resultantes de la expresión del genoma (Hernández, y otros, 2012). Desde el punto de vista microbiológico son el conjunto de pruebas que permiten poner de manifiesto las características de cada genoma bacteriano, algunas de éstas serán comunes entre determinados géneros, mientras que otras permitirán realizar una identificación a nivel de especie (Bou, y otros, 2011).

De forma rutinaria la identificación se realiza al comparar las características que presentan las bacterias desconocidas con las expresadas por microorganismos previamente identificados, existiendo tablas de identificación que reportan las características de un gran número de bacterias. La fiabilidad del resultado estará en proporción al número de características similares (Fernández, y otros, 2010).

1.3.2 Procesamiento general para la identificación fenotípica

En este trabajo solo se busca dar una visión general del proceso de identificación fenotípica ya que para poder implementarlo se requiere de experiencia en el área, conocimiento de las pruebas (fundamento y alcance), así como conocer las características de los microorganismos y cuáles son los de relevancia clínica, para poder llevar a cabo un diagnóstico bacteriológico.

Es necesario tener en cuenta que todas las características bacterianas que se ponen de manifiesto son importantes, y que con la experiencia del microbiólogo, orientan que microorganismos requieren caracterización, como aislarlo, la realización de otras pruebas y la identificación definitiva, estableciéndose tres niveles de procesamiento (Fernández, y otros, 2010) (Gutiérrez, y otros, 2010) (Koneman, y otros, 2013) (Lopez-Hontangas, y otros, 2015):

a) Primer nivel de identificación:

Sitúa provisionalmente al microorganismo en uno de los grupos de importancia médica a través tinciones y características microscópicas, al mismo tiempo que orienta la selección de otras pruebas (Bou, y otros, 2011) (Gutiérrez, y otros, 2010).

El estudio microscópico con tinción de gram es el de mayor relevancia en microbiología y tiene por objeto la observación de la forma, agrupación y tamaño del microorganismo, al mismo tiempo que permite diferenciar y clasificar a las bacterias taxonómicamente en gram positivas (violeta-azulado) y gram negativas (rojo-rosado), de acuerdo a su capacidad para retener o no determinados colorantes (Lopez-Hontangas, y otros, 2015) (Tortora, y otros, 2007). (Koneman, y otros, 2013).

b) Segundo nivel de identificación:

Su objetivo es especificar el género del microorganismo, sumando a lo observado en el primer nivel las características macroscópicas y metabólicas del crecimiento en placa, junto con los resultados obtenidos en pruebas de lectura inmediata³ (catalasa, oxidasa, indol) (Bailon, 2003).

Las características macroscópica (presencia de hemolisis, tamaño, forma, textura y color de la colonia), aunado a si el crecimiento en placa se dio en ambiente aerobio, anaerobio facultativo o anaerobio, son características de gran utilidad para orientar un resultado definitivo (Fernández, y otros, 2010) (Lopez-Hontangas, y otros, 2015).

c) Tercer nivel de identificación:

Busca hacer la identificación a nivel de especie, utilizando pruebas bioquímicas secundarias que pongan de manifiesto características metabólicas o enzimáticas particulares, así como también la resistencia a sustancias (Bailon, 2003) (Bou, y otros, 2011).

Existe un gran número de ensayos para poner de manifiesto las características metabólicas (pruebas rápidas o lentas), algunos revelan características generales, como el metabolismo de los azúcares, y otros son más específicos, ejemplo la prueba de la coagulasa. También existen datos sobre su resistencia a determinadas sustancias o inhibición de su crecimiento ante otras (Fernández, y otros, 2010) (Gutiérrez, y otros, 2010), por lo que el uso adecuado de toda esta gama de ensayos permite llegar a una identificación definitiva.

³ Permiten evaluar la presencia de una enzima preformada (Fernández, y otros, 2010)

1.3.3 Sistemas automatizados de identificación fenotípica

1.3.3.1 Fundamento de los sistemas automatizados

En la actualidad existen numerosos sistemas o equipos multipuebas, semiautomatizados o automatizados, que superan a los métodos convencionales al permitir la realización de una batería de pruebas en un solo paso y de forma miniaturizada, algunos de ellos también tienen la capacidad de realizar, simultáneamente, pruebas de sensibilidad a antimicrobianos (Lopez-Hontangas, y otros, 2015) (Crocker, y otros, 2005) (Bou, y otros, 2011). Requiriéndose condiciones precisas en cuanto al inóculo, modo de inoculación, incubación y lectura, que de no seguirse da lugar a errores, por lo que es necesario apegarse a las condiciones que establece cada fabricante (Fernández, y otros, 2010).

Como resultado los equipos obtienen un patrón numérico, obtenido de agrupar de tres en tres las pruebas y cada trío produce un dígito (Fernández, y otros, 2010):

- Si la prueba es negativa se asigna valor de cero
- Si la primer prueba es positiva se asigna valor de 1
- Si la segunda prueba es positiva se asigna valor de 2
- Si la tercer prueba es positiva se asigna valor de 4

De modo que el código numérico se asigna sumando los valores de las tres pruebas, donde el valor mínimo es cero y el máximo 7, que al juntar se obtiene una serie numérica determinada (Bou, y otros, 2011).

Con este método numérico cada especie tiene su propio código y la comparación se da entre el código obtenido de la bacteria desconocida con los derivados de bacterias conocidas conservadas (cepas de referencia), que están almacenadas en los bancos de datos de los equipos (Crocker, y otros, 2005).

1.3.3.2 Equipo de identificación fenotípica Phoenix®

El equipo Phoenix® permite la identificación microbiana a nivel de especie con una sensibilidad del 94% y una exactitud mayor al 90%, al mismo tiempo que realiza el estudio de sensibilidad antimicrobiana (Fagundo, y otros, 2007) (García, y otros, 2012) (Silva, 2012).

Para la identificación se realizan las pruebas bioquímicas en una sola tarjeta multipuebas, que cuenta con los sustratos liofilizados y es inoculada con una suspensión bacteriana al 0.5 de MacFarland (5×10^5 UFC). Después de un periodo de incubación (dentro del equipo) para permitir que el microorganismo se desarrolle y exprese sus características, se determina la capacidad de fermentar, oxidar, degradar e hidrolizar sustratos utilizando sustancias reveladoras de tipo colorimétricas, cromogénicas y fluorescentes, que se leen por espectrofotometría (Becton Dickinson, 2011) (Crocker, y otros, 2005).

La sensibilidad antimicrobiana se lleva a cabo colocando de la suspensión bacteriana preparada para la identificación, junto con un indicador, en la parte de la tarjeta que contiene diluciones estandarizadas de distintos antibióticos, correspondientes a los puntos de corte de sensibilidad establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) (Becton Dickinson, 2011). En este caso la espectrofotometría (cambios en el indicador) y la nefelometría (turbidez por el desarrollo) logran detectar la concentración de antibiótico a la cual hubo crecimiento bacteriano y con ello conocer la concentración mínima inhibitoria (CMI) para el microorganismo (García, y otros, 2012).

1.3.3.3 Ventajas de la identificación fenotípica por sistemas automatizados

- La identificación fenotípica es la base de cualquier laboratorio de microbiología para lograr un diagnóstico, por lo que el desarrollo de sistemas automatizados ha permitido reducir costos al requerirse menor material para la preparación y realización de las distintas pruebas, así como también una cantidad menor de muestra para el mismo número de pruebas (Crocker, y otros, 2005) (Silva, 2012).
- Los equipos semiautomatizados y automatizados han logrado disminuir los tiempos para la obtención de un diagnóstico, logrando pasar de un periodo de entre 12 a 24 horas con métodos manuales a uno de 8 a 10 horas (tras el ingreso al equipo) (Crocker, y otros, 2005) (Gutiérrez, y otros, 2010) (Silva, 2012).
- Estos equipos son de fácil implementación y utilización, por lo que es sencillo la capacitación del personal para su manejo (Bou, y otros, 2011).
- La obtención de un cultivo puro permite la identificación del microorganismo y el estudio de su sensibilidad a diferentes antibióticos de manera simultánea (Jordan-Lluch, y otros, 2012); esto último es un beneficio que hasta el momento solo los equipos automatizados de identificación fenotípica han permitido, lo cual se considera una clara ventaja para la implementación de un tratamiento con respecto al resto de los métodos de identificación que existen (Biswas, y otros, 2012).

1.3.3.4 Desventajas de la identificación fenotípica por sistemas automatizados

- Para lograr la identificación es necesario obtener un cultivo puro, lo cual puede tardar de 12 a 24 horas dependiendo de las necesidades del microorganismo, los recursos y las metodologías de cada laboratorio, que sumado al periodo de 8 a 10 horas adicionales dentro del equipo (en el caso de microorganismos fastidiosos hasta 12 horas), supone un tiempo mínimo aproximado de entre 24 a 78 horas totales para la emisión de un resultado definitivo haciendo de este un proceso lento para casos de urgencia como lo es la bacteremia (Gutiérrez, y otros, 2010).
- En algunos casos la recuperación del microorganismo (por sus exigencias) es escasa, impidiendo contar con la cantidad necesaria para el diagnóstico por métodos fenotípicos, de modo que solo es posible reportar los resultados obtenidos en el primer nivel de identificación (Biswas, y otros, 2012) (Fernández, y otros, 2010).
- En ocasiones no es posible la recuperación del microorganismo, imposibilitando un diagnóstico bacteriológico a través cualquier prueba fenotípica (Biswas, y otros, 2012), por lo que se requiere la implementación de otras metodologías, como las mencionadas en la Tabla 1, donde las pruebas serológicas y moleculares son las de mayor utilidad para lograr un diagnóstico oportuno (Poggi, y otros, 2009).

1.4 Espectrometría de masas

1.4.1 Fundamento y componentes del espectrómetro de masas

La espectrometría de masas se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, los cuales se separan de acuerdo a su masa y su carga, es decir, se trabaja con un equipo capaz de producir, separar y detectar iones en fase gaseosas (Gobernador, 2010) (Jordan-Lluch, y otros, 2012).

Existen distintos tipos de espectrómetros de masa y todos cumplen con el mismo proceso de análisis; llevar el compuesto a analizar a una fase gaseosa, las moléculas migran a la cámara de ionización para generar iones, los cuales son separados de acuerdo con la relación masa/carga (m/z) y un detector organizará los datos en formato de gráfica llamado espectro de masas. Es por ello que deben ser capaces de (Gobernador, 2010) (Plasencia Villa, 2003):

- a) Vaporizar sustancias de volatilidades muy diferentes
- b) Originar iones a partir de moléculas neutras en fase gaseosa
- c) Separar los iones en función de su relación masa/carga (m/z)
- d) Detectar y registrar la información adecuadamente

Funciones que se cumplen a través de cuatro componentes básicos: sistema de entrada, fuente de iones, analizador de masas y detector; que se acompañan de un sistema de vacío, el procesador de señal y un dispositivo de lectura, como componentes complementarios (Figura 1) (Gobernador, 2010).

1.1.1.1. Sistema de entrada

Su objetivo es introducir una pequeña cantidad de muestra (sólida o líquida) en el espectrómetro, para convertir sus componentes en moléculas neutras gaseosas, por lo que contiene un sistema para volatilizar las muestras. Este paso es crucial ya que si la muestra no se encuentra en estado gaseoso es imposible su análisis, por lo que se han diseñado varios tipos (Gomis, 2010) (Gobernador, 2010).

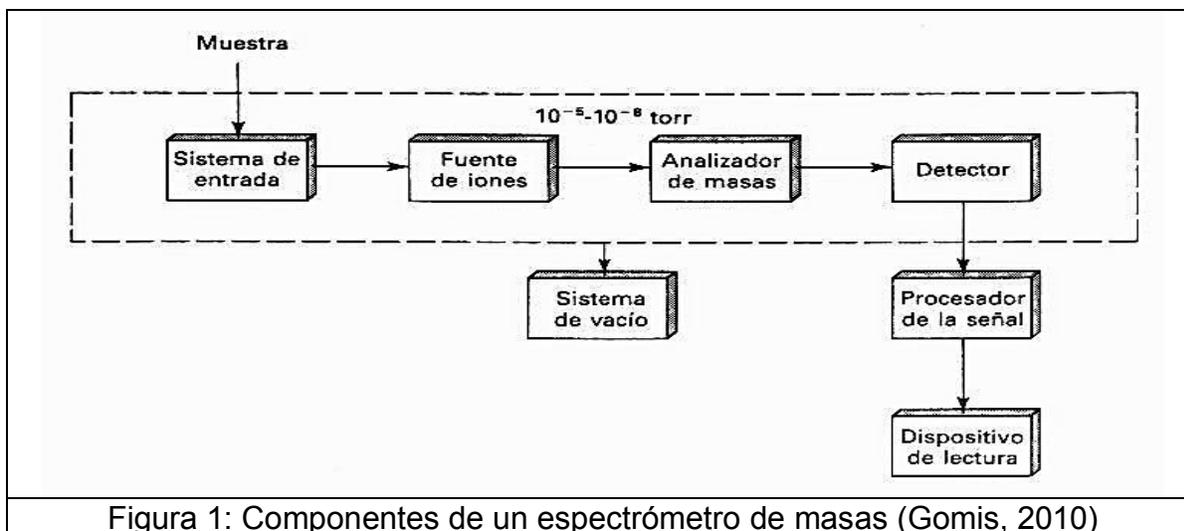


Figura 1: Componentes de un espectrómetro de masas (Gomis, 2010)

1.1.1.2. Fuente de iones

Convierte los componentes gaseosos neutros en iones al producir un exceso o pérdida de electrones. La técnica más común es la transferencia de energía para expulsar uno de sus electrones y obtener una partícula gaseosa con carga residual positiva (Plasencia Villa, 2003) (Welker, y otros, 2011).

1.1.1.3. Analizador de masas

Lleva a cabo la separación de los iones producidos, de acuerdo con su relación masa/carga, a través de campos eléctricos existiendo una variedad de estos (Gomis, 2010) (Plasencia Villa, 2003).

1.1.1.4. Detector

Convierte el haz de iones en una señal eléctrica que puede ser procesada, almacenada, mostrada y registrada de varias maneras (Gomis, 2010) (Plasencia Villa, 2003).

1.1.1.5. Sistema de vacío

Estos equipos requieren de un sistema al vacío para mantener bajas presiones, con el objetivo de asegurar la ausencia de colisiones por parte de los iones durante el proceso (Gobernador, 2010) (Gomis, 2010).

1.1.1.6. Procesador de señal y dispositivo de lectura

Estos trabajan de forma conjunta con el objetivo de transformar las señales eléctricas (análogas) en una representación gráfica (señal digital) llamada huella química o espectro de masas, encontrando en el eje de las ordenadas los valores de m/z (ordenados en forma creciente) y en el de las abscisas la intensidad o abundancia relativa (número de iones con determinada relación m/z) (Plasencia Villa, 2003). Al analizar estas características es posible diferenciar e identificar a los compuestos, debido a que están dadas en función de su estructura química, por lo cual cada compuesto tiene un espectro único y puede ser utilizado para su identificación (Bou, y otros, 2011) (Gomis, 2010) (Plasencia Villa, 2003).

En esta tecnología el tipo de sistema de entrada, fuente de ionización y de analizador de masas define el alcance del espectrómetro y la capacidad del sistema, por lo que la combinación de dichos elementos está en función de lo que se requiere analizar (Tabla 2) (Duncan, y otros, 2010) (Plasencia Villa, 2003)

Tabla 2: Variantes de los componentes del sistema de espectrometría de masas (Plasencia Villa, 2003)	
Componente	Variante
Sistema de entrada	Directo Columna capilar cromatografía líquida
Fuente de iones	Impacto eléctrico Ionización química Ionización de campo Desorción de campo Bombardeo de átomos rápidos Electrospray Matrix-asisted laser desorption (MALDI)
Analizador de masas	Cuadruplo Trampa de iones Tiempo de vuelo (TOF) Analizador FT-ICR

1.4.2 Espectrómetro de masa con tecnología MALDI-TOF

1.4.2.1 Método de ionización por pulsos MALDI

La espectrometría de masas tipo MALDI (por sus siglas en inglés Matrix-assisted laser desorption [espectrometría de masas de desorción/ionización mediante laser asistida por matriz]) recibe este nombre por la tecnología que utiliza como fuente de ionización, descrita por Karas y Hillenkamp en 1988 y actualmente es ampliamente utilizada para el análisis y cuantificación de proteínas, péptidos, toxinas, ácidos nucleicos, entre otros (Jordan-Lluch, y otros, 2012) (Plasencia Villa, 2003) (Theel, 2013)

Este tipo de espectrometría es una técnica de ionización suave (las muestras se ionizan sin sufrir apenas fragmentaciones) basada en disolver los compuestos a analizar en una solución orgánica con capacidad de absorber luz UV, llamada “matriz o matrix”, que al secarse se cristaliza con los analitos embebidos dentro de sí y al ser irradiada por pulsos láser de luz UV se genera una nube de partículas iónicas, de modo que la fuente de ionización está en el sistema de entrada, permitiendo el análisis de muestras sólidas y líquidas (Figura 2) (Biswas, y otros, 2012) (Jordan-Lluch, y otros, 2012) (Welker, y otros, 2011) (Dunne, y otros, 2013).

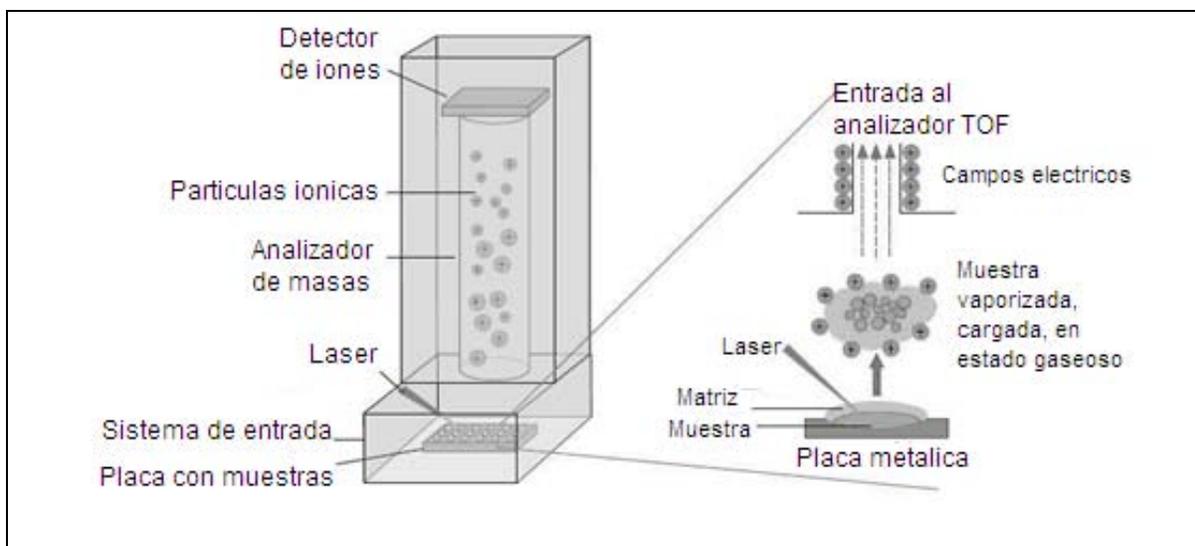


Figura 4: Representación del proceso de ionización en un equipo con tecnología MALDI (Theel, 2013)

La matriz tiene tres funciones fundamentales durante el proceso (García, y otros, 2012) (Plasencia Villa, 2003) (Theel, 2013):

- 1) Exponer las proteínas intracelulares mediante la ruptura de la membrana celular al momento de cristalizarse.
- 2) Absorber la energía láser para la vaporización de la muestra.
- 3) La ionización de moléculas al propiciar un ambiente ácido al momento de vaporizarse.

Los compuestos aromáticos más utilizados en la composición de la matriz son una solución saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (como compuesto base), acompañada de acetonitrilo y ácido trifluoroacético, aunque también puede utilizarse el ácido 2,5-dihidroxibenzoico o el ácido sinapínico como base.

1.4.2.2 Analizador tipo TOF

El analizador tipo TOF (Tiempo de vuelo por sus siglas en inglés) es el que se adapta mejor a los métodos de ionización por pulsos MALDI, ya que tiene una alta transmisión de iones; lo que lo convierte en el más rápido en su clase; además de contar con el rango de masas más amplio (Plasencia Villa, 2003).

El principio de operaciones de este tipo de analizador involucra la medición del tiempo requerido por un ion para viajar desde la fuente de iones hasta el detector. En este caso, todos los iones reciben una energía cinética durante su aceleración, pero debido a que su carga (z) y masa (m) son distintas se separan en grupos de acuerdo con su velocidad y por lo tanto a su relación m/z (Gobernador, 2010) (Plasencia Villa, 2003).

Los iones generados por MALDI poseen una sola carga ($z=1$) de modo que la relación m/z equivale a la masa, es decir, la separación se realiza de acuerdo con la masa de los iones generados, donde los de menor masa llegan primero que aquellos con una masa mayor (Burker-Daltonics, 2011) (Jordan-Lluch, y otros, 2012) (Plasencia Villa, 2003).

1.4.3 La espectrometría de masas en microbiología

En 1975 Anhalt y Fenselau utilizaron la espectrometría de masas con pirolisis⁴ para la identificación de microorganismos liofilizados, observando que se generaba un espectro único por cada extracto bacteriano, llegando a la conclusión de que cada género y especie tenía su propio espectro o huella proteómica (Biswas, y otros, 2012). De esta forma se introdujo la espectrometría en el laboratorio de microbiología para la identificación de microorganismos, sin embargo presentaba un rango pequeño de masas, requiriéndose estudios adicionales (Jordan-Lluch, y otros, 2012).

En 1996 se publicaron los primeros estudios en los que se analizaban células bacterianas intactas mediante la tecnología MALDI-TOF, en la actualidad es considerada la mejor opción para el análisis de proteínas bacterianas debido a su proceso de ionización es suave y eficiente, además de contar con un amplio rango de detección de proteínas (2 000- 20 000 Da), existiendo varias plataformas como MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics)[®] (Biswas, y otros, 2012) (Fernández, y otros, 2010) (García, y otros, 2012) (Jordan-Lluch, y otros, 2012).

Estudios de proteómica han demostrado que las principales proteínas analizadas son ribosomales, aunque también se hacen presentes proteínas frías de shock (CPS por sus siglas en inglés [cold shock protein]), factores de modulación ribosomales, entre otras, garantizando una huella proteómica propia para cada microorganismo (García, y otros, 2012) (Welker, y otros, 2011).

⁴ Es la descomposición química de materia orgánica causada por el calentamiento a altas temperaturas en ausencia de oxígeno causando cambios químicos y físicos irreversibles (Hernández, y otros, 2012).

1.4.4 Métodos de identificación con MALDI-TOF

De manera general la identificación microbiana por MALDI-TOF consta de cuatro pasos:

- 1) Recuperación del microorganismo.
- 2) Realización del espectro de masas.
- 3) Comparación con la base de datos.
- 4) Entrega de resultados.

Existiendo dos métodos de trabajo:

A. Método de transferencia directa:

Para este método se parte de un crecimiento bacteriano en medios de cultivo sólidos, donde la colonia aislada en estudio se coloca sobre una placa de metal pulido, es tratada con la matriz y finalmente se introduce al equipo para su identificación (García, y otros, 2012) (Welker, y otros, 2011).

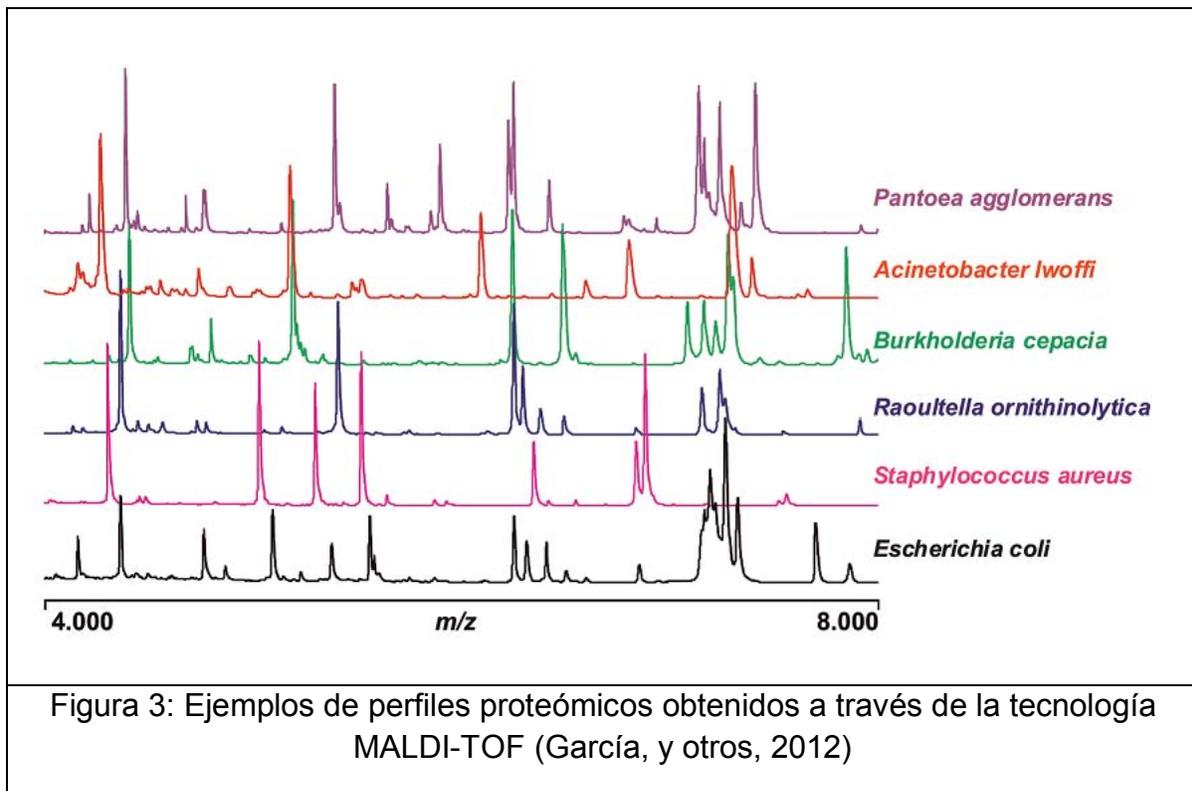
B. Método de extracción:

La tecnología MALDI-TOF al permitir el análisis de muestras líquidas, facilita el estudio de muestras clínicas como orina y líquidos estériles, sin un cultivo previo en placa, limitándose a aquellas identificadas como positivas por un procedimiento previo (Fernández, y otros, 2010) (Bou, y otros, 2011) (Kok, y otros, 2011).

Una vez confirmada la positividad de la muestra un mililitro es sometido a lavados y extracciones orgánicas para eliminar partículas no proteínicas interferentes, tras lo cual un microlitro es colocado en la placa metálica, es tratado con la matriz y procesado en el equipo (Kok, y otros, 2011).

Este método tiene como limitante que en las muestras polimicrobianas no es posible la identificación correcta de los microorganismos o sólo se identifica al microorganismo que se encuentra en mayor abundancia (con un bajo rendimiento) (Bailey, y otros, 2013) (Fernández, y otros, 2010).

Para ambos casos, la identificación se logra comparando el espectro obtenido del análisis de la muestra con los espectros existentes de microorganismo conocidos, arrojando una identificación aunada a un valor indicativo de la fiabilidad de dicha identificación (Figura 3) (Biswas, y otros, 2012) (Jordan-Lluch, y otros, 2012).



El valor indicativo de la fiabilidad de la identificación es una puntuación bioestadística generada por el equipo para cada comparación (como logaritmo natural de la puntuación), la cual tiene como función establecer la similitud de los espectros, donde la mayor puntuación a obtener es tres y la menor es cero, dividiéndose en tres intervalos (Tabla 3) (García, y otros, 2012) (Jordan-Lluch, y otros, 2012) (Burker-Daltonics, 2011).

Tabla 3: Intervalo de fiabilidad de la identificación	
Rango	Grado de fiabilidad
2-3	Muy fiable a nivel de especie
1.7-1.9	Parentesco muy cercano, con identificación confiable de genero pero no especie
Menor de 1.7	Identificación poco fiable
■	No identificado

Si el resultado obtenido no es satisfactorio (identificación poco fiable) existen protocolos alternativos con ácido fórmico al 70% y acetonitrilo (1:1), que permiten exponer las proteínas para facilitar la identificación (Fernández, y otros, 2010) (Burker-Daltonics, 2011) (Kok, y otros, 2011).

Cuando el resultado obtenido indica “No identificado” quiere decir que no existe una puntuación bioestadística por falta de comparación, esto puede darse por dos razones, primera el espectro obtenido no es bueno⁵, haciendo imposible la comparación y segunda el espectro obtenido es bueno, pero el espectro del microorganismo no está en la base de datos y al no tener contra que comparar se imposibilita la identificación (Bou, y otros, 2011).

⁵ Un espectro se considera bueno cuando presenta abundantes picos, bien definidos, estrechos, con intensidades elevadas (Fernández, y otros, 2010)

1.4.5 Ventajas de MALDI-TOF en microbiología

- Dado que la identificación se basa en la detección de proteínas y su expresión es independiente del medio de cultivo o tiempo de incubación, esta tecnología hace posible la identificación del microorganismo a partir de cualquier medio de cultivo apenas se presente un crecimiento, recomendándose el análisis de colonias jóvenes (García, y otros, 2012) (Burker-Daltonics, 2011) (Legarra, y otros, 2013).
- Es posible analizar colonias bacterianas aisladas, aun cuando el crecimiento en placa no sea puro, o bien se puede partir de muestras líquidas. Esto permite reducir el tiempo de obtención de los resultados y ofrece la posibilidad de mejorar el manejo clínico del paciente (Bailey, y otros, 2013) (Jordan-Lluch, y otros, 2012).
- Permite identificar bacterias de difícil recuperación, de crecimiento lento microorganismos anaerobios y micobacterias de crecimiento rápido (no incluidos en sistemas automatizados de identificación fenotípica), lo cual es de gran importancia ya que muchos de estos son patógenos con potencial resistencia a antibióticos (Biswas, y otros, 2012) (Legarra, y otros, 2013).
- Requiere una preparación mínima y simple, sumado a un bajo consumo de reactivos, al trabajar a escala de microlitros (García, y otros, 2012) (Bailey, y otros, 2013) (Legarra, y otros, 2013).
- Se requieren de 10 a 15 minutos para la preparación de la muestra por el método de transferencia directa y de 20 a 30 minutos por el método de extracción. Una vez en el equipo, el análisis tarda aproximadamente dos minutos por muestra (Bailey, y otros, 2013).

1.4.6 Desventajas de MALDI-TOF en microbiología

- Existen errores de identificación con bacterias estrechamente relacionadas, por presentar proteomas parecidos, por lo que se recomienda confirmar por métodos fenotípicos (Jordan-Lluch, y otros, 2012) (Burker-Daltonics, 2011).
- Los espectros de masa presentan picos distintos en las bacterias que presentan resistencia a antibióticos; como lo es *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; impidiendo una identificación correcta, dado que muchos de estos mecanismos se deben a la presencia de un material genético extra modificando la expresión proteómica, sin embargo identificar estos microorganismos podría ser una aplicación futura ayudando a la implementación de antibióticos (Bailey, y otros, 2013).
- Es crucial mantener el vacío que el espectrómetro requiere para trabajar, ya que para alcanzar las presiones adecuadas se sufren demoras considerables en el procedimiento (Bou, y otros, 2011).
- En la actualidad no existe un control de calidad externo para asegurar que no existan errores sistemáticos en el procedimiento, pero se está trabajando en su implementación (Fernández, y otros, 2010) (Legarra, y otros, 2013).

1.5 Comparación de la espectrofotometría y espectrometría

Los espectrómetros⁶ son análogos a los espectrofotómetros⁷ sin embargo presentan diferencias esenciales (Tabla 5) (Gobernador, 2010).

Tabla 5: Comparación de la espectrofotometría y espectrometría		
Características	Espectrofotometría	Espectrometría de masas
Inicia	Luz visible: Diferentes longitudes de onda	Mezcla de iones: Diferentes relaciones masa/carga
Separación	Un prisma separa las longitudes de onda	Campos electromagnéticos separan los iones
Selección	Una salida selecciona la longitud de onda	Una hendidura selecciona los iones
Detección	Intensidad de luz	Corrientes de iones
	Absorbancia	Impacto de iones
Muestra	Previo al prisma	Al inicio del proceso
	Sin modificaciones	Modificación química ⁸
	Líquida	Gaseosa
Sistema de vacío	No utiliza	Si utiliza
Muestra departida en microbiología	Suspensión bacteriana a partir de un cultivo puro	Una colonia pura/ 1ml de muestra positiva
Uso en bacteriología	Identificación y sensibilidad	Identificación

⁶ Utilizados en la espectrometría de masas

⁷ Utilizados en la identificación fenotípica automatizada

⁸ La muestra se modificación para obtener los iones, por lo que no es recuperable, sin embargo esto no es un inconveniente ya que la cantidad necesaria es del orden de microgramos (Gobernador, 2010).

1.6 Hemocultivos

1.6.1 Definición de hemocultivo y utilidad clínica

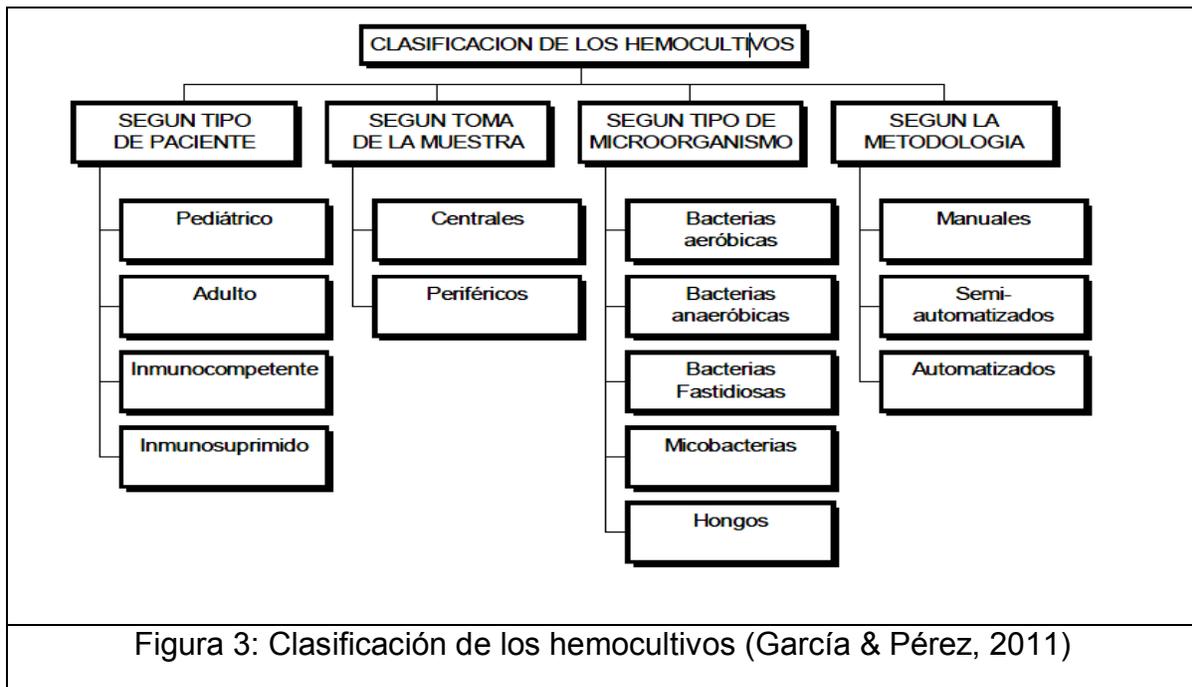
Desde el punto de vista bacteriológico un hemocultivo se define como el cultivo microbiológico de una muestra sanguínea obtenida de un sitio de punción independiente, considerándose el único examen que permite la confirmación y diagnóstico de bacteremia o septicemia (González, y otros, 2011).

Los hemocultivos además de establecer el(los) agente(s) causal(es) de la enfermedad tiene como función definir los patrones de susceptibilidad microbiana para establecer un tratamiento adecuado. La realización de hemocultivos de forma subsecuente al establecimiento del diagnóstico permite monitorear la evolución del paciente hasta su recuperación (García, y otros, 2011) (Cisneros, y otros, 2007).

Para maximizar la utilidad de esta prueba es necesario que la muestra sea tomada de forma adecuada y puede ser obtenida de una punción periférica venosa o arterial, debiendo ser la primera muestra si existen indicaciones de otros exámenes, o bien de catéter venoso central; en este caso se deben tomar las precauciones necesarias para discernir si los microorganismos son propios del catéter o bien provenientes de torrente sanguíneo (Ramírez, y otros, 2010).

1.6.2 Clasificación de los hemocultivos

Los hemocultivos se pueden clasificar según el tipo de pacientes, toma de la muestra, tipo de microorganismo y de acuerdo con la metodología utilizada para su análisis (Figura 3), considerándose esta última la clasificación más importantes por contar con distinta sensibilidad y rapidez en la detección de los microorganismos (García, y otros, 2011)(García & Pérez, 2011).



I. Sistemas manuales:

Se utilizan medios de cultivo con 0.05% de polianetol sulfato de sodio (SPS) como anticoagulante, junto con un caldo nutritivo capaz de permitir el crecimiento de cualquier microorganismo de importancia clínica, donde la elección del medio de cultivo, temperatura y atmósfera de incubación es decisión del microbiólogo (García, y otros, 2011).

El método se basa en la observación macroscópica de los signos de crecimiento, sin embargo, es lento y presenta una importante cantidad de falsos positivos y negativos, obligando a una complementación microscópica, resultando en un alto grado de contaminación (Loza, y otros, 2003).

II. Semiautomatizados:

En este método se puede optar por la lisis y filtrado de las células sanguíneas para retener las bacterias; o una centrifugación a alta velocidad para concentrar el microorganismo en el sedimento y realizar una siembra. Este estudio cuantitativo⁹ permite una mejor recuperación de los microorganismos, pero presenta un alto grado de contaminación debido a la manipulación continua (García, y otros, 2011) (Loza, y otros, 2003).

III. Sistemas automatizados:

Consisten en botellas con diversos medios de cultivo (aerobios, anaerobios, hongos, micobacterias y con resinas que captan antibióticos) que se incuban en equipos de agitación continua y cuentan con un sistema de detección de CO₂ cuya presencia se relaciona con el metabolismo de microorganismos (García, y otros, 2011) (Loza, y otros, 2003). Entre las marcas lo que difiere es el método de detección, pudiendo ser colorimétrico, manométrico o fluorescencia, un ejemplo de este último es el Bactec Fx (Becton Dickinson) ® (Becton Dickinson, 2013) (BioMérieux, 2015).

⁹ Aporta información para el diagnóstico de bacteremia relacionada a catéter venoso central

1.7 Definición de bacteremia y sepsis

El término de sepsis y bacteremia suele utilizarse como sinónimo, pero un consenso realizado en 1992 estableció sus diferencias, definiendo bacteremia como aquella enfermedad en la que un microorganismo invade el torrente sanguíneo y se multiplica a un ritmo que supera la capacidad del sistema retículo endotelial e inmunológico para eliminarlo, siendo la consecuencia de un foco infeccioso, presentando una gran variedad de manifestaciones clínicas que pueden ser desde episodios leves hasta una evolución a sepsis, esta última es una respuesta inflamatoria sistémica consecuenta de una infección que produce una inflamación generalizada y puede llegar a una disfunción orgánica múltiple (Blanco, y otros, 2010) (Fernández, y otros, 2003)(Martinez, y otros, 2014).

Los casos de bacteremia y su probable evolución a sepsis van en aumento debido a que existe una población con edad más avanzada, tenemos un mayor número de pacientes que se someten a cirugía y procedimientos invasivos, las estancias hospitalarias prolongadas van en aumento, existe un incremento de los pacientes trasplantados, con tratamientos de quimioterapia y radioterapia, cada vez es más frecuente el uso de esteroides y tratamiento de amplio espectro. Estas situaciones disminuyen la capacidad del sistema inmune para responder ante una invasión y propician la entrada de microorganismos a la sangre (González, y otros, 2002).

En la actualidad, a nivel mundial, existe un sub-registro del número de casos de bacteremia y sepsis debido a que son enfermedades que se presentan como consecuencia de una patología base, por lo que no siempre es notificada, reportándose una prevalencia aproximada de 54 a 97 casos de septicemia por cada 100 mil habitantes (Blanco, y otros, 2010) (García, y otros, 2011).

En Estados Unidos se estima que ocurren alrededor de 200 000 casos de septicemia al año con un 20-50% de mortalidad, ocasionando 210 000 decesos anuales aproximadamente (Bambra, y otros, 2012) (García, y otros, 2011). Mientras que en México, un estudio realizado en el 2009, reporto una estimación

de 40 casos de septicemia por cada 100 mil habitantes, asociándose a una mortalidad de entre el 49-80% de los pacientes, observando que al no tener bien establecido el diagnóstico de bacteremia y sepsis en nuestro país no contamos con datos concretos, ya que la bacteriemia se clasifica como bacteriemia primaria, bacteriemia secundaria y bacteriemia relacionada a catéter, dependiendo el origen de la enfermedad, aun cuando es la misma patología (Carrillo, y otros, 2009); de acuerdo a esta clasificación la Dirección General de Epidemiología, a través de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) reporta que en el 2011 las Unidades Médicas de Alta Especialidad presentaron 3.5 casos de bacteriemia relacionada a catéter por cada 1000 días catéter y 7.7 casos de bacteriemia primaria por cada 100 egresos hospitalarios (Secretaría de Salud, 2014) (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2013).

En el caso de pacientes oncológicos, cuyo tratamiento es con quimioterapia y radioterapia, en los que el uso de catéter venosos central es muy frecuente como vía de administración, hacen que sean pacientes altamente susceptibles de padecer infecciones oportunistas donde la inmunosupresión, dada por el padecimiento y el propio tratamiento, les imposibilita contener estos cuadros desarrollando bacteremia, por lo que se considera una población altamente vulnerable a evolucionar a sepsis. Los pacientes con cáncer presentan infecciones de 3 a 5 veces más frecuente que el resto de los pacientes y se calcula que de cada 1000 personas con esta patología 16 llegan a un estado de sepsis, con una mortalidad del 52%, no existiendo reportes sobre esta asociación en nuestro país (Willam, y otros, 2004), por su parte el Instituto Nacional de Cancerología reporto 556 casos de bacteriemia en el 2015 de acuerdo a la RHOVE (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2013).

2 Justificación

Los pacientes con una afectación oncológica son más susceptibles de padecer enfermedades infecciosas y su estado de inmunosupresión les impide contenerla, por lo que presentan un alto índice de evolución a sepsis con una mortalidad aproximada del 52% de los pacientes. El diagnóstico microbiológico rápido, con metodologías sensibles y específicas son indispensables para la detección temprana de bacteriemia y así evitar su evolución a sepsis, sin embargo, en la actualidad la identificación por métodos fenotípicos pueden llegar a tardar hasta 48 horas dependiendo del microorganismo, los recursos y las metodologías propias de cada laboratorio, por lo tanto es necesario evaluar el impacto de nuevas metodologías complementarias como la espectrometría de masas, para optimizar los tiempos de diagnóstico, lo que repercutirá directamente en la administración oportuna y eficaz del tratamiento antimicrobiano en los pacientes.

3 Hipótesis

La espectrometría de masas tiene la misma sensibilidad y especificidad, pero mayor rapidez en la identificación bacteriana que los métodos fenotípicos semiautomatizados, por lo que brindara beneficios en el diagnóstico oportuno.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Comparar la espectrometría de masas con la identificación fenotípica en el diagnóstico microbiológico de hemocultivos positivos, así como evaluar su impacto sobre la implementación o modificación de la terapia antimicrobiana en los pacientes del Instituto Nacional de Cancerología

4.2 Objetivos particulares

- Realizar un análisis retrospectivo de los hemocultivos positivos analizados mediante espectrometría de masas con tecnología MALDI-TOF y métodos fenotípicos en el Instituto Nacional de Cancerología.
- Evaluar la sensibilidad y especificidad del espectrómetro de masas MALDI-TOF Biotyper® y el equipo de identificación fenotípica Phoenix ®.
- Comparar los tiempos de diagnóstico bacteriológico al utilizar la espectrometría de masas y la identificación fenotípica.
- Realizar un análisis de expedientes clínicos, de las muestras evaluadas, para evaluar si la identificación por espectrometría de masas influyo en la implementación o modificación de la terapia antimicrobiana.

5 Materiales y métodos

5.1 Muestras

Partiendo de una prevalencia estimada (p) de 16 casos de sepsis por cada 1000 pacientes con cáncer, considerando un nivel de fiabilidad (t) del 95% y un margen de error (m) del 5%, el número de muestras calculadas (n) es (Hernández, y otros, 2003):

$$n = \frac{t^2 p(1-p)}{m^2} = 118 \text{ muestras}$$

Para este trabajo se analizaron 236 muestras de los 407 hemocultivos positivos procesados entre el mes de enero y julio de 2015 en el Instituto Nacional de Cancerología, donde los criterios de exclusión para las muestras fueron:

- Cultivos que no se procesaron por ambas tecnologías
- Las muestras cuyo diagnóstico final se consideró contaminación (por mala toma de muestra)
- Muestras que presentaron más de dos microorganismos en el aislamiento
- Cultivos relacionados con micosis (observación de levaduras en la tinción de gram y/o con crecimiento de levaduras)

En el caso de la revisión de expedientes (análisis de tiempo e impacto en el paciente) se excluyeron:

- Expedientes relacionados con muestras que solo se identificaron por un equipo o presentaron discrepancias durante el análisis microbiológico.
- Aquellos donde se desconoce si existió o no una implementación y/o cambio de la terapia antimicrobiana tras el diagnóstico microbiológico.

5.2 Equipos y materiales

Los equipos utilizados fueron:

- Phoenix® (Becton Dickinson): Para realizar el diagnóstico por medio de identificación fenotípica
- MALDI-TOF Biotyper® (Bruker Daltonics): Para hacer el diagnóstico con espectrometría de masas (método de transferencia directa y de extracción)
- Bactec Fx® (Becton Dickinson): Para la detección de hemocultivos positivos.

Se trabajó con los reactivos que cada casa comercial otorga para sus equipos.

Las discrepancias de identificación (a nivel de género y especie) se corroboraron a través de pruebas bioquímicas manuales, aunado a su repetición por ambos equipos.

Para ambos equipos se analizaron cepas de referencia como control de calidad interno y para la evaluación externa de la calidad se cuenta con el CAP.

5.3 Metodología

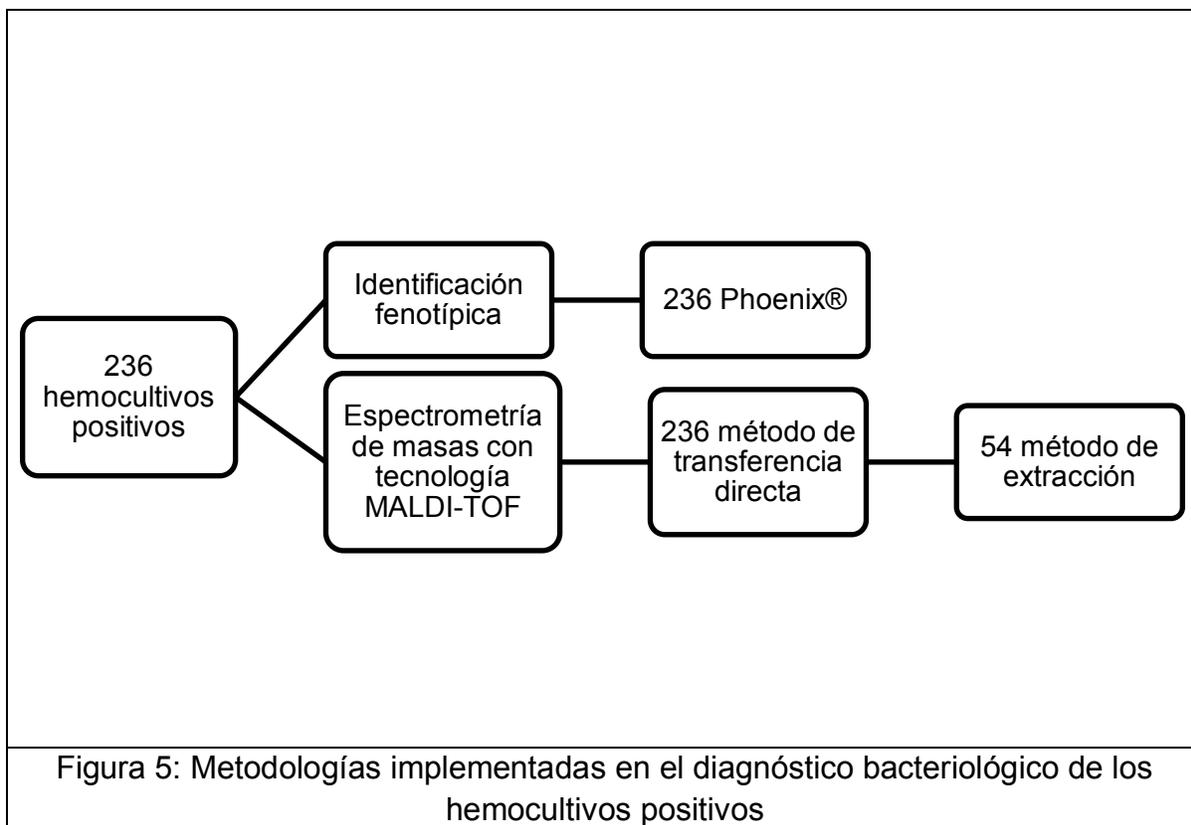
Método cualitativo y cuantitativo que se dividió en tres fases:

1. Análisis de 236 hemocultivos positivos obtenidos entre enero y julio de 2015 en el Instituto Nacional de Cancerología, recopilando los resultados de identificación en ambos equipos para cada muestra, así como un registro del tiempo presentado para la identificación definitiva por ambos métodos.
2. Examinación de los expedientes clínicos relacionados a las muestras analizadas, para evaluar como afecto el diagnóstico microbiológico en el tratamiento del paciente.
3. Estudio de la información recopilada utilizando estadística descriptiva, frecuencias simples (especificidad) y t de Student (comparación utilizando un nivel de significancia de 0.01).

6 Resultados

6.1 Evaluación de la sensibilidad y especificidad de los equipos

Los 326 hemocultivos positivos analizados se procesaron por Phoenix® y MALDI-TOF Biotyper® con método de transferencia directa, de los cuales 54 (de manera adicional) se trabajaron en MALDI-TOF Biotyper® por método de extracción partiendo del hemocultivo (Figura 5), por lo que el análisis de sensibilidad y especificidad se divide en dos partes para hacer las diferencias de cada método de espectrometría de masas.



6.1.1 Identificación fenotípica y MALDI-TOF por transferencia directa

6.1.1.1 Sensibilidad de los equipos

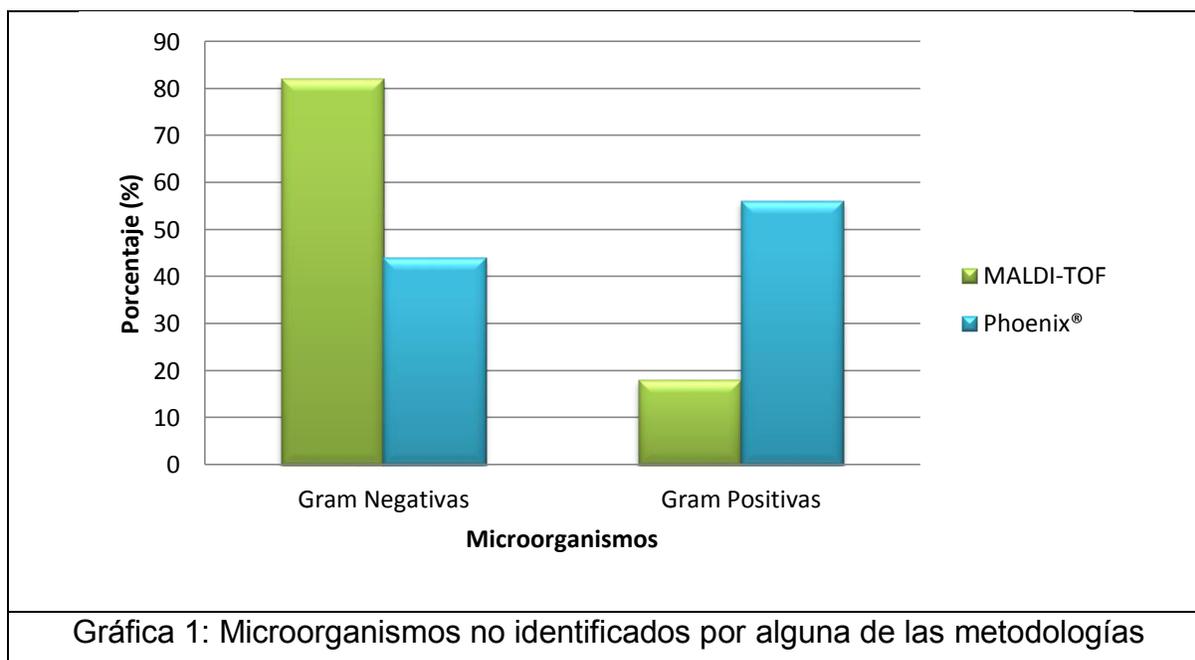
De los 236 hemocultivos MALDI-TOF permitió la identificación de 219 muestras, mientras que Phoenix® 220, quedando sin identificar 17 y 16 muestras respectivamente, obteniendo una $t_c = -0.0178$ al comparar entre equipos (Tabla 5).

Tabla 5: Número de muestras identificadas por cada equipo			
Equipo	Número de muestras identificadas	Número de muestras no identificadas	Sensibilidad de los equipos (%)
MALDI-TOF	219	17	92.7*
Phoenix®	220	16	93.2**

* $t_c = -0.0178$; ** $t_c = -1$ respecto a la literatura

6.1.1.2 Muestras no identificadas

Respecto a las muestras que no lograron identificar los equipos, MALDI-TOF dejó sin identificar 14 (82%) microorganismos gram negativos y 3 (18%) gram positivos ($t_c = 23.3$), mientras que Phoenix® no identificó 7 (44%) microorganismos gram negativos y 9 (56%) gram positivos ($t_c = -1.41$) (Gráfico 1).



En este aspecto no existió prevalencia de ningún microorganismo gram positivo no identificado pero sí entre los gram negativos, en el caso de Phoenix® *Acinetobacter lwoffii* (57%) resulto el de mayor frecuencia, mientras que para MALDI-TOF *Pseudomona sp.* (36%) (Tabla 6).

Tabla 6: Microorganismos que se quedaron sin identificar por alguna metodología				
	MALDI-TOF		Phoenix®	
	Microorganismo	Porcentaje (%)	Microrganismo	Porcentaje (%)
Gram positivos	<i>Streptococcus mitis</i>	67	<i>Streptococcus oralis</i>	22
	<i>Micrococcus lylae</i>	33	<i>Staphylococcus caprae</i>	22
			<i>Bacillus cereus</i>	22
			<i>Rothia mucilaginosa</i>	33
			<i>Micrococcus lentus</i>	
			<i>Aerococcus viridans</i>	
Gram negativos	<i>Pseudomona sp</i>	36	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	57
	<i>Escherichia coli</i>	29	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	29
	<i>Klebsiella sp.</i>	21	<i>Pantoea calida</i>	14
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	14		
	<i>Serratia marcescens</i>			

6.1.1.3 Muestras identificadas

De las 203 muestras identificadas por ambos equipos 187 (92%) presentaron el mismo resultado de identificación y 16 (8%) mostraron discrepancias, 4 (25%) a nivel de género y 12 (75%) a nivel de especie (Tabla 7).

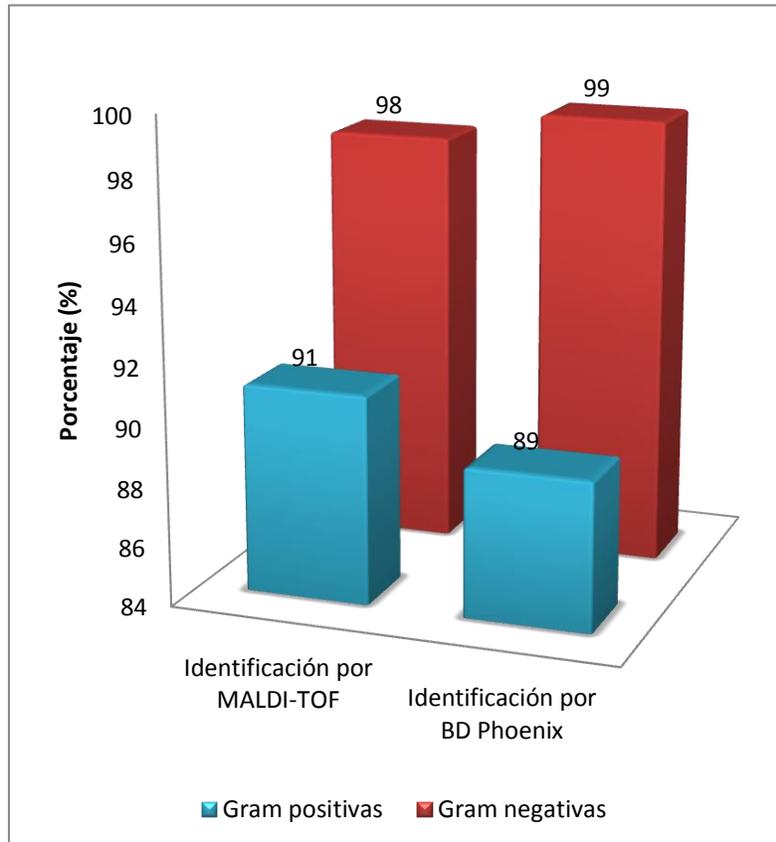
Tabla 7: Discrepancias de identificación a nivel de género y especie		
	Género	Especie
Gram positivas	1	12
Gram negativas	3	--
Total de muestras	4	12
Porcentaje	25%	75%
ID correcta por MALDI-TOF	2 (50%)	6 (50%)
ID correcta por Phoenix®	2 (50%)	6 (50%)

A nivel de género existió una discrepancia de gram positivas (*Bacillus cereus*), cuya identificación correcta fue dada por MALDI-TOF, y tres gram negativas (enterobacterias), de las cuales una se identificó correctamente por MALDI-TOF y dos gracias a Phoenix®, de acuerdo a las pruebas manuales (Tabla 7).

En el caso de las discrepancias a nivel de especie todas fueron gram positivas, 6 (50%) era estreptococos alfa hemolíticos y 6 (50%) estafilococos coagulasa negativos, cuya identificación correcta se obtuvo gracias Phoenix® y MALDI-TOF respectivamente.

6.1.1.4 Especificidad de los equipos

Los resultados arrojados por ambos equipos muestran que se identificó correctamente el 96% de los microorganismos para ambos casos. El sistema MALDI-TOF identificó el 98% de las bacterias gram negativas y el 91% de gram positivas; mientras que Phoenix® en un 99% y 89% respectivamente (Gráfica 2)



Gráfica 2: Porcentaje de identificación bacteriana por MALDI-TOF Biotyper® y Phoenix®

6.1.2 Identificación por método de extracción

En el caso de las 54 muestras sometidas al método de extracción, 37 eran muestras monomicrobianas¹⁰ y 17 polimicrobianas¹¹. En el primer caso se logró identificar al 89% de las bacterias, mientras que en las polimicrobianas sólo en un 65% se identificó el microorganismo de mayor abundancia (tc=-11.3 y -36.7 respectivamente al comparar con la literatura) (Tabla 8)

Tipo de muestra	Total	Muestras no ID	Muestras ID
Monomicrobiana	37(68%)	4(11%)	33 (89%)*
Polimicrobiana	17 (32%)	6 (35%)	11 (65%)+
Total	54 (100%)	10 (18%)	44 (82%)

* tc= -11.3; + tc= -36.7

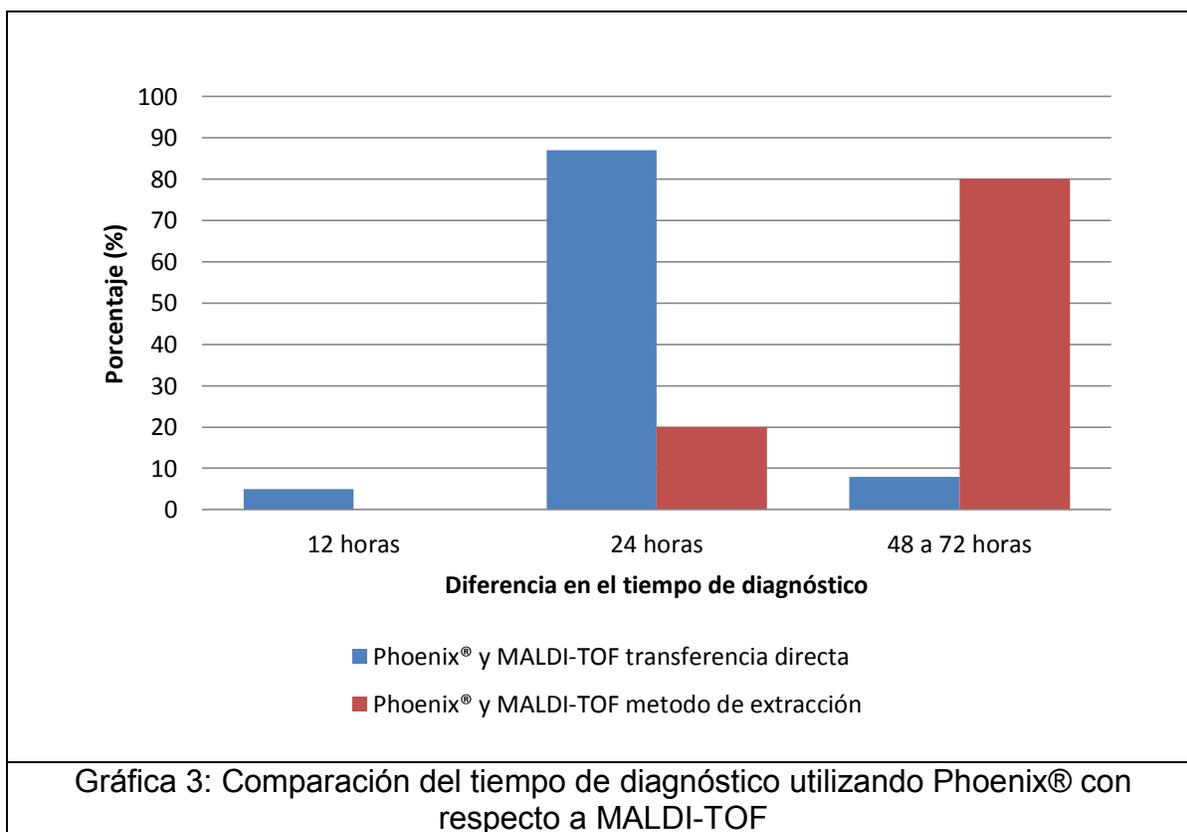
De manera conjunta se llegó a identificar el 82% de las muestras trabajadas, no presentando discrepancias a nivel de género, pero sí dos a nivel de especie, ambas relacionadas con estreptococos alfa hemolíticos, donde las pruebas manuales concordaron con la identificación dada por Phoenix®, resultando en una especificidad del 95%, obteniendo una tc=-1 con respecto a lo obtenido en este estudio en las otras metodologías.

¹⁰ Con un microorganismo

¹¹ Presencia de dos microorganismos

6.1.3 Tiempo de identificación

Tomando en cuenta el tiempo que transcurrió desde la detección del hemocultivo positivo hasta la obtención de un diagnóstico bacteriológico definitivo, se comparó el tiempo requerido para obtener un diagnóstico bacteriológico utilizando Phoenix® con respecto a MALDI-TOF por método de transferencia directa y por método de extracción, encontrando que puede ir desde 12 hasta 72 horas de diferencia (Gráfica 3).



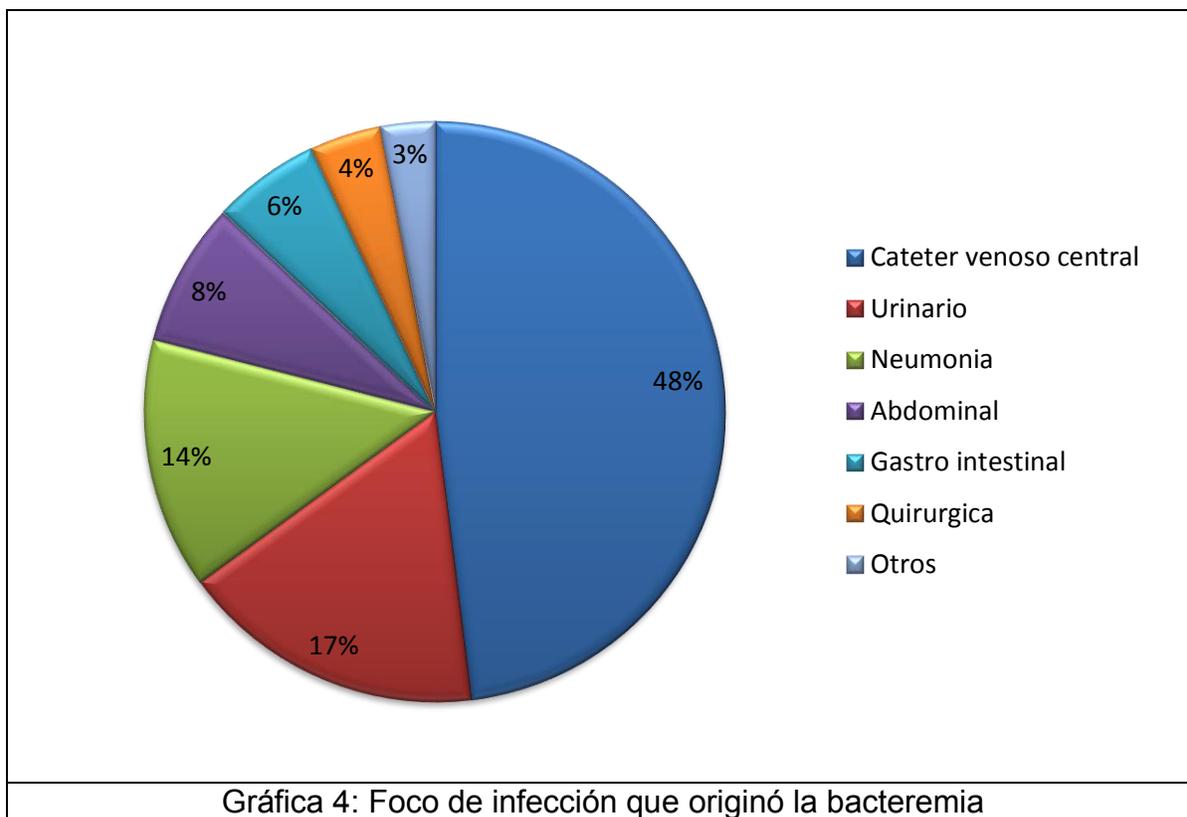
Del total de las identificaciones con 48 a 72 horas de diferencia de Phoenix® respecto a MALDI-TOF método de transferencia directa el 100% se asocia a muestras polimicrobianas, mientras que con el método el 69% eran monomicrobianas y 31% polimicrobianas.

6.2 Impacto en los pacientes

6.2.1 Generalidades de los pacientes

Las 187 muestras analizadas corresponden a 182 pacientes, de los cuales 94 (52%) son mujeres y 88 (48%) son hombres, con un rango de edad de entre 15 y 89 años y un promedio de 47 años (± 20). El padecimiento de base era cáncer no hematológico en 109 pacientes (60%) y cáncer hematológico en 73 (40%) de ellos.

El foco de infección microbiológico que llevó al estado de bacteremia fue variado, siendo el de mayor prevalencia el relacionado con el uso de catéter venoso central (48% de los pacientes) (Gráfica 4).



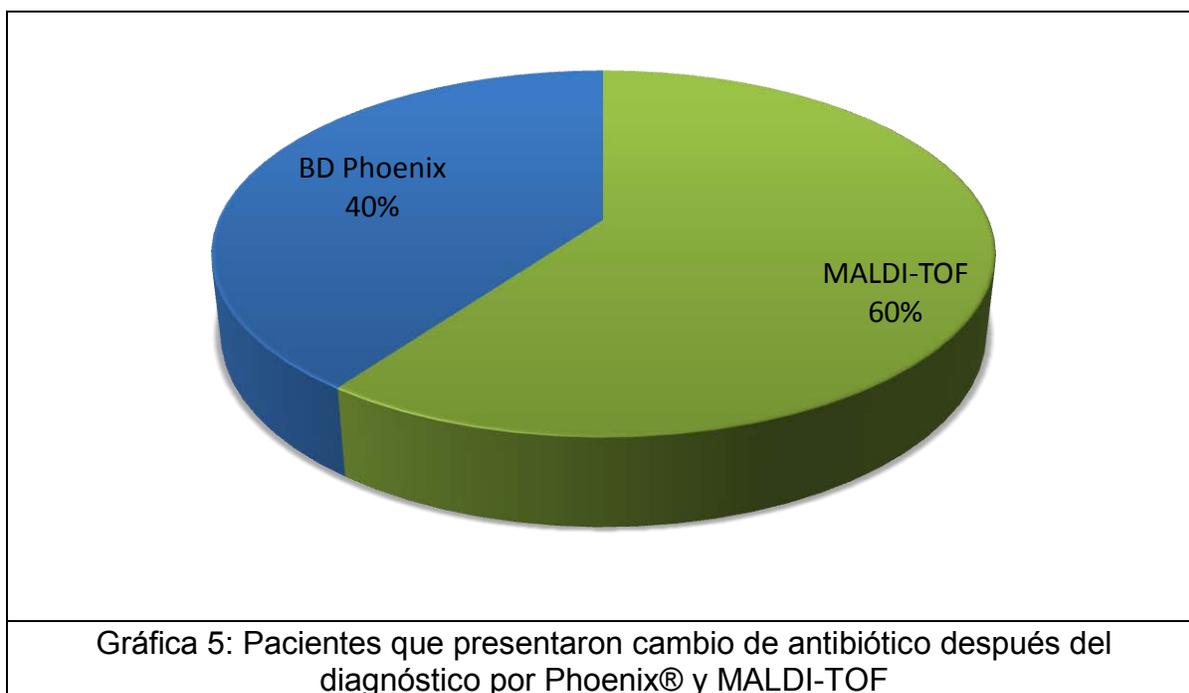
6.2.2 Impacto del diagnóstico microbiológico en el tratamiento

Para evaluar el impacto del diagnóstico microbiológico en el paciente se hicieron dos grupos de análisis:

- I. Grupo 1: Incluye pacientes que presentaron un cambio de antibiótico tras el diagnóstico bacteriológico, constituido por 92 personas (51%).
- II. Grupo 2: Pacientes que no tuvieron un cambio de tratamiento antimicrobiano posterior a la identificación bacteriológica, abarcando un total de 90 personas (49%).

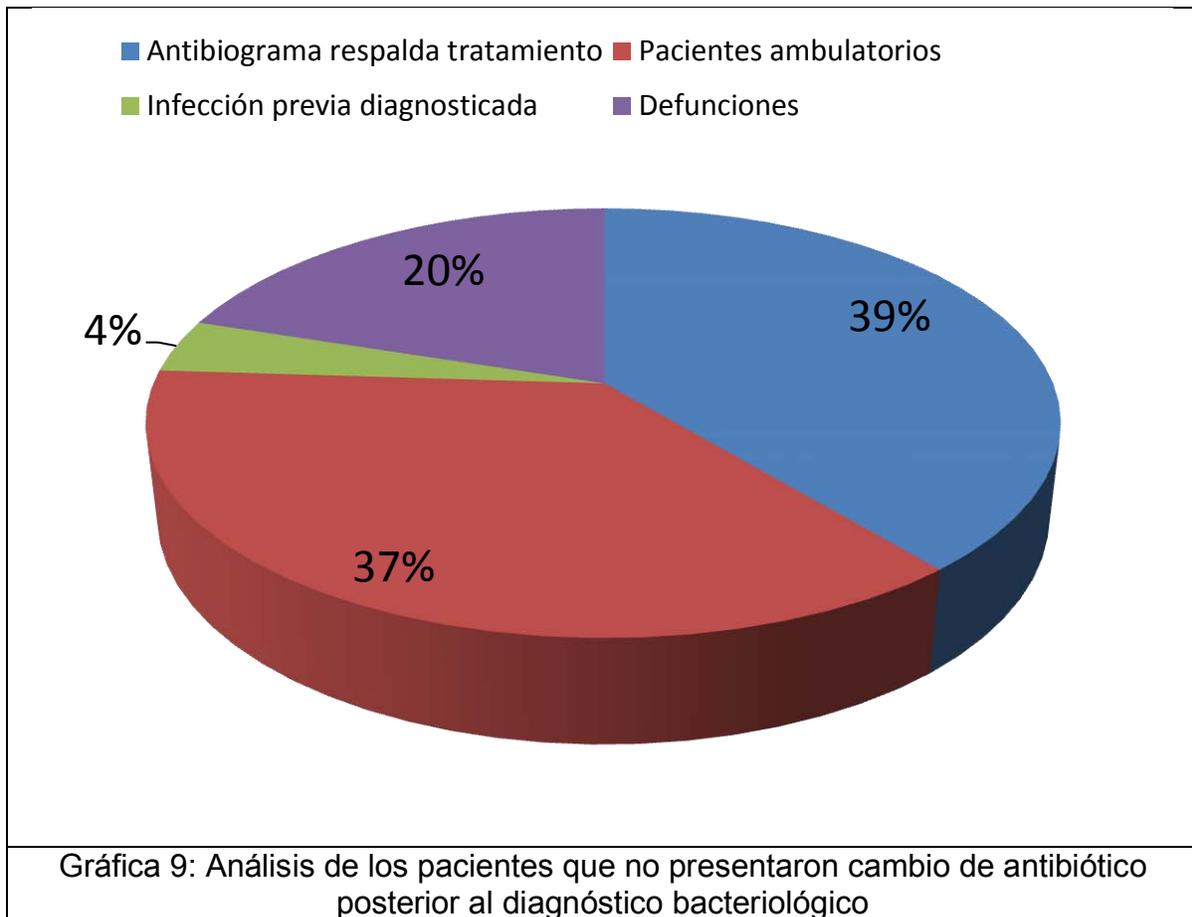
6.2.2.1 Pacientes con cambio de antibiótico

De los 92 casos en los que si se observó un cambio de antibiótico el 40% se relaciona con el resultado de identificación y antibiograma obtenido por Phoenix®; mientras que el 60% se dio con la identificación de MALDI-TOF, aun cuando no se contaba con antibiograma ($t_c=25.4$ entre metodologías). De estos últimos el 90% se mantuvo y el 10% requirió de un reajuste de antibiótico de acuerdo al antibiograma obtenido por Phoenix® (Gráfica 5).



6.2.2.2 Pacientes que no presentaron cambio de antibiótico

De los 90 pacientes que no presentaron un cambio de antibiótico (Gráfica 6) el 39% se relacionan con el mantenimiento del tratamiento antimicrobiano por apoyo del antibiograma otorgado por Phoenix®; un 37% se trató de pacientes ambulatorios, donde la identificación realizada por MALDI-TOF propició la localización del paciente para comenzarles un tratamiento; mientras que en un 4% la identificación dada por MALDI-TOF indicó que el microorganismo del hemocultivo era el mismo que el identificado de manera previa en el foco de infección por lo que se continua con el tratamiento ya establecido.



Finalmente el 20% de estos pacientes fallecieron de manera previa al diagnóstico microbiológico, correspondiendo al 10% del total de los pacientes (Tabla 9).

Tabla 9: Características de los decesos				
Padecimiento	Mujeres	Hombres	Promedio de edad	Total de fallecidos
Hematológico	5 (28%)	3 (16%)	43 ± 14.5	8 (44%)
No hematológico	6 (34%)	4 (22%)	53±17	10 (56%)
Total	11 (61%)	7 (39%)	--	18 (100%)

7 Discusión

7.1 Comparación de la espectrometría de masas y métodos fenotípicos

7.1.1 Análisis de MALDI-TOF por método de transferencia directa

La espectrometría de masas con tecnología MALDI-TOF Biotyper®, permitió identificar al 92.7% de las muestras estudiadas, por lo que se puede decir que cuenta con una sensibilidad del 93% (Tabla 5), resultado similar a lo reportado por otras investigaciones (Counturier, y otros, 2011).

Respecto al 7.3% de las muestras no identificadas (Gráfica 1), el 28% eran bacterias gram positivas sin prevalencia de alguna de ellas, mientras que el 82% eran gram negativas, donde *Pseudomona sp* (36%) resulto la más frecuente (Tabla 6), seguida de *E. coli* y *Klebsiella sp.*, deficiencias similares a las presentadas en estudios previos que informan problemas para identificar a estos microorganismos y reportan que un proceso de extracción con un ácido débil, previo al montaje en la placa, mejora la exposición y ionización de las proteínas, propiciando mejores resultados de identificación (Bessede, y otros, 2011) (Bizzini, y otros, 2010) (García, y otros, 2012), por lo que se podría considerar su implementación en los casos que se sospeche de alguno de estos microorganismos para mejorar el análisis.

7.1.2 Análisis de Phoenix®

La identificación fenotípica por Phoenix® permitió identificar al 93.2% de los microorganismos (Tabla 5), es decir, presento una sensibilidad del 93%, resultado similar a lo obtenido en MALDI-TOF método de transferencia directa y a la literatura que reporta valores del 94% (tc= -1)(García, y otros, 2012).

De las 6.8% muestras no identificadas (Gráfica 1) no se encontró una diferencia significativa entre microorganismos gram positivos y negativos (tc=-1.41), existiendo una predominancia entre estos últimos, donde el de mayor frecuencia es *Acinetobacter lwoffii* (57%) (Tabla 6), pudiendo adjudicar estos resultados a errores aleatorios, problemas para el aislamiento puro de los microorganismos o

fallas durante el proceso como por ejemplo una exposición prolongada del panel a la luz (Biswas, y otros, 2012) (Becton Dickinson, 2011).

7.1.3 MALDI-TOF método de transferencia directa y Phoenix®

Al comparar el número de microorganismos no identificados por parte de ambos equipos, se puede mencionar presentan la misma sensibilidad (del 93%).

Respecto a los microorganismos identificados, el 8% presentó discrepancias, 25% a nivel de género y 75% a nivel de especie (Tabla 7). En el caso de las discrepancias a nivel de género el 25% eran gram positivos y 75% gram negativos sin prevalencia específica para ambos casos, donde la identificación correcta (de acuerdo a pruebas manuales) fue dada en un 50% por MALDI-TOF y 50% por Phoenix®, siendo igual para ambos equipos. Los errores a este nivel casi siempre se relacionan con el hecho de que la espectrometría de masas tiene problemas para identificar bacterias a con perfiles de proteínas muy similares por estar filogenéticamente relacionadas (García, y otros, 2012) (Saffert, y otros, 2011), al mismo tiempo que Phoenix® tiene problemas para identificar a nivel de género cuando los cultivos de partida no están totalmente puros (Silva, 2012).

A nivel de especie todas las discrepancias están relacionadas con microorganismos gram positivos (Tabla 7), el 50% corresponden a estreptococos alfa hemolíticos y el 50% a estafilococos coagulasa negativos, los primeros identificados correctamente por Phoenix® (en su totalidad) y los segundos por MALDI-TOF (en su totalidad); es decir, presentaron el mismo porcentaje de discrepancias a nivel de especie, logrando complementarse mutuamente. En el caso de los estreptococos alfa hemolíticos la identificación por MALDI-TOF es limitada pues su perfil proteico es similar entre sí (Saffert, y otros, 2011) (Veen, y otros, 2010); mientras que en el caso de los estafilococos coagulasa negativos estudios previos reportan que la identificación por Phoenix® presenta un porcentaje bajo de especificidad a nivel de especie (del 75%), como lo observado en este estudios (Veen, y otros, 2010).

Por otra parte Phoenix® y MALDI-TOF Biotyper® presentaron la misma especificidad al identificar correctamente el 96% de las muestras trabajadas, existiendo reportes de que debe ser mayor del 90% para Phoenix® (Silva, 2012) y del 95% para MALDI-TOF (Bailey, y otros, 2013), por lo que los resultados obtenidos se encuentran en el rango de lo reportado; además los estándares de nuestro país establece que si un equipo identifica correctamente el 90% o más de los aislamientos comunes o inusuales se puede considerar altamente específico y recomendable para su uso dentro del laboratorio (Fagundo, y otros, 2007). En este aspecto MALDI-TOF logró identificar correctamente el 91% de gram positivos y el 98% de gram negativos, mientras que Phoenix® el 89% y el 99% respectivamente (Gráfico 2), similar a lo previamente reportado (91, 98% Vs 88, 97% comparativamente) (Silva, 2012) (Bizzini, y otros, 2010).

7.1.4 MALDI-TOF método de extracción

De las 54 muestras analizadas por método de extracción (Tabla 8), el 68% eran muestras monomicrobianas y el 32% polimicrobianas, obteniendo un porcentaje de identificación del 85% y 65% respectivamente, cuando investigaciones previas reportan un porcentaje de identificación del 97% y 91% para cada caso (Kok, y otros, 2011), resultados que están por debajo de lo reportado de manera significativa ($t_c = -11.3$ mono, $t_c = -36.7$ poli). Problemas con la técnica suelen ser la principal limitante para obtener una identificación correcta, haciendo necesario estandarizarla para establecer las condiciones más óptimas de trabajo (Kok, y otros, 2011), sin embargo, el tamaño de la muestra no es significativo para proporcionar un resultado concluyente.

De manera conjunta el proceso de extracción identificó al 82% de las muestras analizadas, resultado similar a lo observado en otros estudios que establecen una sensibilidad del 80% (Kok, y otros, 2011), donde el mayor impacto estuvo dado en muestras monomicrobianas ya que en las polimicrobianas solo identifico uno de los microorganismos presentes.

Esta metodología no presentó discrepancias de identificación a nivel de género, pero sí 2 a nivel de especie, en ambas estreptococos alfa hemolíticos, mismo

problema que se observó en el método de transferencia directa, resultando en una especificidad del 95%, que al comparar con la obtenida en este trabajo por el método de transferencia directa y Phoenix® podemos observar que es equiparable ($t_c = -1$).

7.2 Tiempos de identificación

La teoría nos indica que el tiempo aproximado de identificación con MALDI-TOF método de transferencia directa es de 20 a 30 minutos a partir de que se cuenta con el hemocultivo positivo, mientras que para MALDI-TOF método de transferencia directa tarda de 10 a 15 minutos tras contar con un crecimiento en medio sólido, que tarda de 10-12 (Bailey, y otros, 2013) (Kok, y otros, 2011). Por su parte Phoenix® tarda un periodo de entre 8 a 12 horas tras el ingreso al equipo dependiendo el microorganismo (Gutiérrez, y otros, 2010), por lo que la diferencia de tiempo para obtener un resultado definitivo debería ser de alrededor de 12 horas al comparar Phoenix® con respecto a MALDI-TOF método de transferencia directa y de aproximadamente 24 horas con respecto a MALDI-TOF método de extracción.

En la práctica al comparar Phoenix® con MALDI-TOF método de transferencia directa (Gráfica 3) solo el 5% de las identificaciones mostraron la diferencia de tiempo esperada de acuerdo a la teoría. El 87% presentaron 24 horas debido a las metodologías propias del laboratorio, que de contarse con personal capacitado las 24 horas en el área de microbiología se podría disminuir. En esta comparación el 8% de los resultados definitivos tardaron de 48 a 72 horas extra, todas las muestras se asocian a crecimientos polimicrobianos, donde el proceso de purificación de las cepas retraso el proceso por Phoenix® (Gráfica 3).

Al comparar el tiempo que tardo Phoenix® con respecto a MALDI-TOF método de extracción (Gráfica 3) el 20% de las identificaciones (todas monomicrobianas) presentaron 24 horas de diferencia, conforme a lo esperado; mientras que en el 80% el resultado definitivo tardo 48 a 72 horas más (Gráfica 3). Respecto a estas últimas 69% de las muestras eran monomicrobianas y 31% polimicrobianas, lo cual nos indica que el método de extracción disminuyo de manera significativa el

tiempo de identificación en las muestras monomicrobianas y permitió la identificación oportuna de uno de los dos microorganismos en polimicrobianas.

7.3 Impacto en los pacientes

El rango de edad de los pacientes es de 15 a 89 años, el 52% mujeres y 48% hombres, no existiendo una predominancia de edad ni de género para este padecimiento (Willam, y otros, 2004). El 60% se asocian con cáncer no hematológico y un 40% con cáncer hematológico.

Los principales focos infecciosos que llevaron al desarrollo de bacteremia (Gráfica 4) fueron catéter venoso central (48%), urinario (17%) y neumonía (14%), concordando con otros estudios que mencionan el catéter venoso central como el principal foco infeccioso (14-52%), seguido del urinario (18-39%) y neumonía (10-16%) (Gobernador, 2010), aunque los focos infecciosos pueden variar dependiendo de la edad, tipo de pacientes y los métodos invasivos (Carrillo, y otros, 2009).

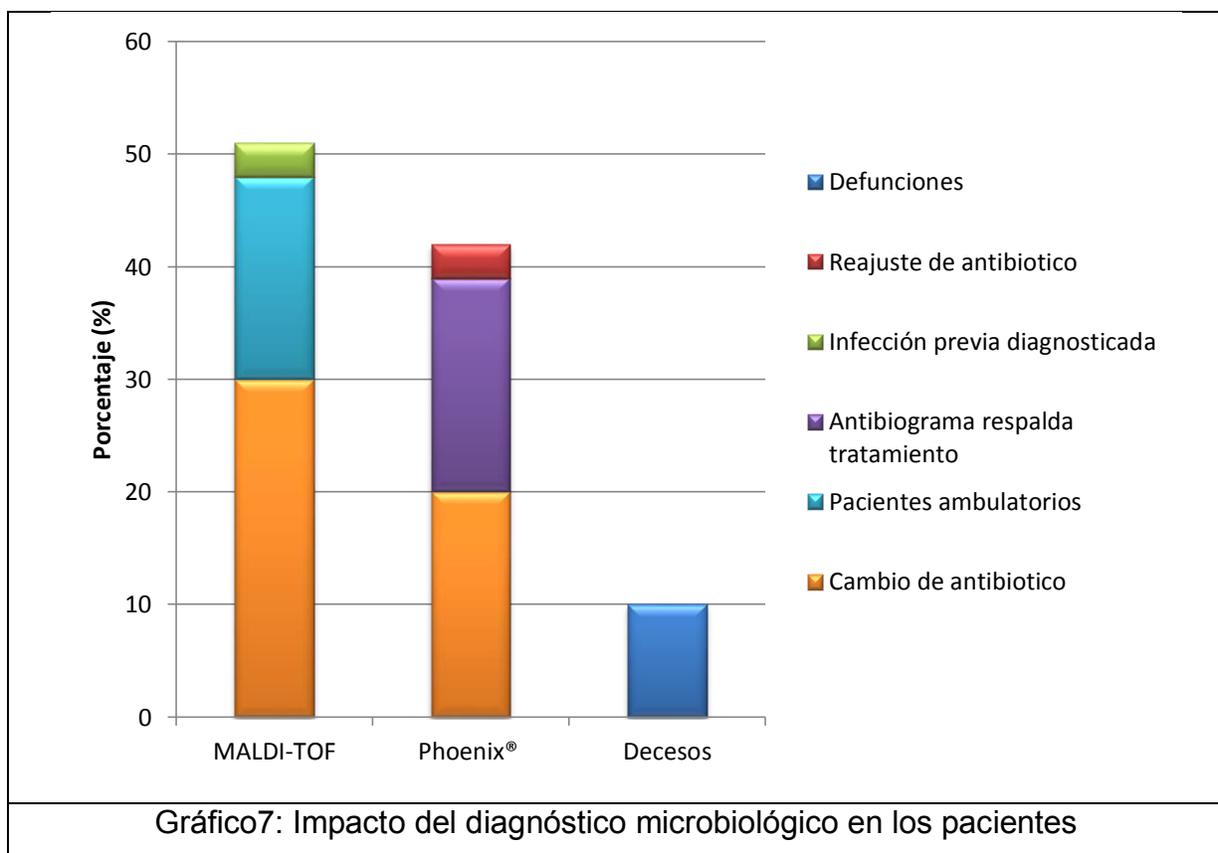
Los pacientes se analizaron en dos grupos, el primero incluye a pacientes que sufrieron un cambio de antibiótico tras el diagnóstico microbiológico (51%) (Gráfico 5), donde el 60% de los cambios se dieron posterior a la identificación por MALDI-TOF sin tener un antibiograma y el 40% se realizaron tras la identificación con Phoenix® contando con un antibiograma. Los resultados mostraron una diferencia significativa entre los métodos de identificación ($t_c=25.4$) pudiendo adjudicar la mayoría de los cambios a la espectrometría de masas, de los cuales el 90% se mantuvieron y el 10% presentaron un reajuste, es decir, un segundo cambio de antibiótico con base al antibiograma.

El segundo grupo son los pacientes que no presentaron un cambio de antibiótico tras el diagnóstico microbiológico (49%) (Gráfico 6): en el 39% de los casos el antibiograma obtenido con Phoenix® respaldó el tratamiento establecido inicialmente; el 37% se relaciona con pacientes ambulatorios¹² y la identificación

¹² A este tipo de pacientes se les realizan hemocultivos de control por ser portadores de catéter venoso central

con MALDI-TOF propició la localización e inicio de tratamiento; el 4% MALDI-TOF identificó a un microorganismo observado anteriormente en el foco de infección, continuando con el tratamiento ya establecido. El 20% restante se trata de los decesos previos a contar con un diagnóstico microbiológico, correspondiendo al 10% del total (Tabla 9).

Tomando en cuenta el aporte de cada equipo a cada grupo de pacientes (Gráfico 7) MALDI-TOF impactó en el 51% de los pacientes y Phoenix® en el 42% de ellos con una diferencia significativa ($t_c = 19.09$) en la que el aporte de la espectrometría de masas es mayor.



Finalmente MALDI-TOF y Phoenix® son equipos que se complementan mutuamente y sus ventajas (realización de antibiograma y velocidad diagnóstica) logran impactar, de manera conjunta, en el 90% de los pacientes, permitiendo afirmar que ambos métodos son herramientas de gran utilidad para el diagnóstico bacteriológico pronto y oportuno, aportando grandes beneficios para los pacientes del instituto.

8 Conclusiones

- La identificación fenotípica automatizada por Phoenix® y la espectrometría de masas con MALDI-TOF Biotyper® cuentan con la misma sensibilidad y especificidad en el diagnóstico microbiológico de muestras clínicas.
- Ambos equipos presentaron dificultades en la identificación a nivel de especie de microorganismos gram positivos, en el caso de MALDI-TOF para estreptococos alfa hemolíticos y Phoenix® en estafilococos coagulasa negativos, haciendo necesario conocer y contar con pruebas adicionales para lograr la identificación definitiva.
- El proceso de extracción de MALDI-TOF reduce significativamente el tiempo de identificación, sin embargo, en muestras polimicrobianas solo identifica uno de los microorganismos presentes.
- El factor humano durante la separación de los microorganismos propicia que el tiempo requerido para un diagnóstico bacteriológico definitivo sea mayor.
- La identificación con espectrometría de masas impactó de manera significativa, al propiciar diagnósticos oportunos, influyendo en cambios de tratamiento antimicrobiano, el inicio más temprano de terapia antimicrobiana, así como en la relación de los microorganismos identificados con los de otro sitio de infección.
- El impacto de la identificación fenotípica con Phoenix® está directamente relacionado con su capacidad de realizar antibiogramas, por lo que no se debe desestimar la necesidad de este método durante el diagnóstico microbiológico.
- La espectrometría de masas es una buena herramienta de complementación para la identificación fenotípica, ya que su uso conjunto facilitó que el laboratorio de microbiología realizara un diagnóstico bacteriológico rápido y oportuno.

9 Referencias

Bailey D. y Diamandis E. Uso de MALDI-TOF en el diagnóstico de infecciones microbianas [Publicación periódica]. - Estados Unidos : Clinical Chemistry, 2013. - 10 : Vol. 59. - 1435–1441.

Bailon L Atlas de pruebas bioquímicas para identificación bacteriana [Libro]. - DF : Universidad Nacional Autónoma de México, 2003.

Bambra M., Flores J. y Ramirez K. Incidencia y mortalidad de bacteremia en un hospital clínico docente en Santiago de Chile [Publicación periódica] // Rev Med Chile. - 2012. - págs. 859-866.

Becton Dickinson BD BACTEC™ FX Blood Culture System [En línea]. - BD, 2013. - Noviembre de 2015. - <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9866>.

Becton Dickinson Manual de usuario del sistema BD-Phoenix. - 2011.

Bessede E., Angla-Gre M. y Delagarde S. Matrix-assisted laser-desorption/ionization biotyper: experience in the routine of a University hospital [Publicación periódica] // Clin Microbiol Infect. - 2011. - Vol. 17. - págs. 533-538.

BioMérieux BioMérieux.com [En línea]. - Abril de 2015. - <http://www.biomerieux.com>.

Biswas Silpak y Rolain Jean-Marc Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture [Publicación periódica] // Journal of Microbiological Methods. - [s.l.] : ELSEVIER, 2012. - Vol. 92. - págs. 14-24.

Bizzini A., Durussel C. y Bille J. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory [Publicación periódica] // Clin Microbiol. - [s.l.] : 48, 2010. - págs. 1549-1554.

Blanco M., Scandizzo M. y Gonzalez E. Frecuencia de aislamientos microbiológicos en hemocultivos [En línea]. - 2010. - <http://www.hospitalelcruce.org/revis10/nota2.pdf>.

Bou G., Fernández A. y García C. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología [Publicación periódica] // Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. - [s.l.] : Elseviere, 2011. - 8 : Vol. 29. - págs. 601-608.

Burker-Daltonics Flex control 3.4 user manual [Libro]. - Estados Unidos : Bruker, 2011.

Carrillo-Esper R., Carrillo-Córdoba R. y Carrillo-Córdoba D. Estudio epidemiológico de la sepsis en unidades de terapia intensiva mexicanas [Publicación periódica] // Cri. Ciruj. - 2009. - Vol. 77. - págs. 301-308.

Cisneros J., Cobo J. y Pujol M. Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. Guías de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) [Publicación periódica] // Enferm Infecc Microbiol Clin. - España : [s.n.], 2007. - 2 : Vol. 25. - págs. 111-130.

Counturier M., Mehinovic E. y Croft A. Identification of HACEK clinical isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry [Publicación periódica]. - EU : [s.n.], 2011. - Vol. 49. - págs. 1104-1106.

Crocker J. y Burnett D. La ciencia del diagnóstico de laboratorio [Libro] / trad. Amador Carina. - D.F : McGrawHill, 2005. - segunda.

Duncan M., Roder H. y Hunsucker S. Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization for mass spectrometry [Publicación periódica] // Annu Rev Anal Chem.. - 2010. - págs. 231-254.

Dunne M, Greub G. y Novak S. Automatización en el laboratorio de microbiología clínica [Publicación periódica] // Clinical Chemistry. - 2013. - 12 : Vol. 59. - págs. 1696-1702.

Fagundo Sierra R. y Cerros Santos M. A. Evaluación del instrumento automatizado Phoenix en la identificación y antibiograma de bacterias de origen clínico [Publicación periódica]. - México : Medigraphic, 2007. - 2 : Vol. 32.

Fernández A., García C. y Saénz J. Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología [Sección de libro]. - España : Recomendaciones de la sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 2010.

Fernández E., Planes A. y Rodriguez A Hemocultivos [Sección de libro]. - España : Recomendaciones de la sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y irobiología Clínica, 2003.

García Castellanos T., Castillo Marshall A. y Salazar Rodriguez D. Impacto de la automatización en el diagnóstico de enfermedades infecciosas [Conferencia] // Memorias Convención Internacional de Salud Pública. - Cuba : Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", 2012. - págs. 1-9.

García F., Pastor I. y Cebrian M Protocolo de hemocultivos [En línea]. - 2011. - <http://www.chospab.es/publicaciones/protocolosEnfermeria/documentos/efc12e2775f30aa8d12296f81eba0357.pdf>.

García P. y Pérez C. Hemocultivos [En línea]. - 2011. - http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/proc_emo.pdf.

García P., Allende F. y Legarrada P. Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI [Publicación periódica] // Rev Chilena Infectología. - 2012. - 3 : Vol. 29. - págs. 263-272.

Gobernador M Espectrometría de masas [En línea]. - Octubre de 2010. - http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf.

Gomis Yagües Tema 5: Espectrometría de masas [En línea]. - Junio de 2010. - <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8249/4/T5masas.pdf>.

González A. y Conde J. Cuidados intensivos en el paciente séptico [Libro]. - México : Prado México, 2002.

González F. y López M. Protocolo: Obtención de muestras de hemocultivo [En línea]. - 2011. - <http://www.sanatorioallende.com/FILES/Archivos/docs/5-%20Protocolo%20-%20Obtenci%C3%B3n%20de%20Muestras%20de%20Hemocultivo.pdf>.

Gutiérrez S. y Vizcarrondo M. Identificación microbiana mediante métodos basados en sistemas de utilización de sustratos, inmunoensayos y detección molecular [En línea]. - 2010. - http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_12_identificaci%C3%B3n.pdf.

Hernández A. y Luque J. Texto ilustrado e interactivo de Biología molecular e ingeniería genética [Sección de libro]. - México : Elsevier, 2012.

Jordan-Lluch E., Martró Catalá E. y Ausina Ruiz V. La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica [Publicación periódica] // Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. - [s.l.] : ELSEVIERE, 2012. - 10 : Vol. 30. - págs. 635-644.

Kok J., Thomas L. y Olma T. Identification of bacteria in blood culture broths using Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Sepsityper and Time of Flight Mass Spectrometry [Publicación periódica]. - Estados Unidos : Plos one, 2011. - 8 : Vol. 6.

Koneman E., Washington W. y Stephen A. Koneman Diagnóstico microbiológico, texto y atlas [Libro]. - México : Editorial medica panemricana, 2013. - sexta.

Legarra P., Morga M. y Lam M. Impacto de la espectrometría de masas por MALDI-TOF MS en la identificación rápida de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia clínica [Publicación periódica] // Rev Chilena Infectología. - 2013. - 2 : Vol. 30. - págs. 140-146.

Lopez-Hontangas J., Castillo F. y Salavert M. Capitulo 3 Técnicas de Identificación bacteriana [En línea]. - Agosto de 2015. - <http://media.axon.es/pdf/65248.pdf>.

Loza E., Planes A. y Rodriguez M. Procedimientos en microbiología clínica [Sección de libro]. - España : Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2003.

Martinez F., Domínguez A. y Vázquez D. Sepsis [Publicación periódica] // Med Int Méx. - 2014. - Vol. 30. - págs. 159-157.

OMS Organización Mundial de la Salud [En línea]. - Enero de 2015. - <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/index2.html>.

Organización Mundial de la Salud World Healt Statistics [Libro]. - [s.l.] : World Healt Organization, 2014.

Plasencia Villa G. Espectrometria de masas [Libro]. - México : UNAM, 2003.

Poggui H., Guzman M. y Garcia P. PCR universal o de amplio espectro. Un aporte a la identificación y detección de bacterias y hongos en la práctica clínica [Publicación periódica] // Rev. Medica Chilena. - 2009. - págs. 1122-1125.

Ramírez F., De Leon N. y Esqueda R. Utilidad de hemocultivos tomados en pico febril y bajo antibiotivoterapia en pacientes hospitalizados del Antiguo Hospital Civil de Guadalajara [Publicación periódica] // Revista Medica. - 2010. - 6 : Vol. 1. - págs. 5-10.

Saffert R., Cunningham S. y Ihde M. Comparison of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometer to BD Phoenix automated microbiology system for identification of gram negative bacilli [Publicación periódica] // Clin Microbiol. - [s.l.] : Clin Microbiol, 2011. - págs. 887-892.

Secretaria de Salud Dirección general de epidemiología [En línea]. - enero de 2014. - noviembre de 2015. - <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/>.

Secretaria de Salud Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA-2012. Para vigilancia epidemiológica. - [s.l.] : Diario Oficial.

Secretaria de Salud Norma Oficial Mexicana NOM-045-SSA-2006. Para la vigilancia epidemiológica y control de las infecciones nosocomiales. - [s.l.] : Diario Oficial.

Silva Ojeda F. Phoenix versus Vitek 2 en la identificación bacteriana [Publicación periódica] // Revista Chilena de Infectología. - 2012. - 1 : Vol. 29. - pág. 118.

Theel E. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Bacterial and Yeast Isolates [En línea]. - Febrero de 2013. - <http://www.mayomedicallaboratories.com/articles/communique/2013/01-maldi-tof-mass-spectrometry/>.

Tortora G., Funke R. y Case L. Introducción a la microbiología [Libro]. - México : Editorial Medica Panamericana, 2007. - 9na.

Veen S., Claas E. y Kuijper E. High through put identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories [Publicación periódica] // Clin Microbiol. - 2010. - Vol. 48. - págs. 900-907.

Welker M. y Moore E. Applications of whole cell matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry in systemic microbiology [Publicación periódica] // Syst Appl Microbiol. - 2011. - Vol. 34. - págs. 2-11.

Willam M., Braun L. y Cooper L Hospitalized cancer patients with sever sepsis: analysis of incidence, mortality, and associated cost of care [Publicación periódica] // Critical Care. - 2004. - 5 : Vol. 8. - págs. 291-296.