



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

THE AMREICAN BRITISH COWDRAY MEDICAL CENTER, I.A.P.

**“IDENTIFICACIÓN Y PRUEBA DE SENSIBILIDAD DE  
MICROORGANISMOS OBTENIDOS DIRECTAMENTE DE FRASCOS  
DE HEMOCULTIVOS POSITIVOS, UTILIZANDO UN METODO DE  
LAVADO CENTRIFUGACIÓN, A TRAVÉS DE MALDI-TOF Y VITEK-  
2.”**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
ESPECIALISTA EN PATOLOGÍA CLÍNICA.

P R E S E N T A:

**KARINA ALEJANDRA CANCHÉ MENA**

TUTORES:

DRA. MARCELA ELIZABETH NUÑEZ MARTÍNEZ  
TUTOR PRINCIPAL Y TITULAR DEL CURSO  
SERVICIO DE PATOLOGÍA CLÍNICA,  
CENTRO MÉDICO ABC CAMPUS OBSERVATORIO

DR. VIRGILIO MELGAR MANZANILLA  
CENTRO MÉDICO ABC

DRA. BLANCA VELÁZQUEZ HERNÁNDEZ  
CENTRO MÉDICO ABC

CIUDAD DE MÉXICO A OCTUBRE 2018





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

DOCTOR  
AQUILES AYALA RUIZ  
JEFE DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA  
CENTRO MÉDICO ABC

DOCTORA  
MARCELA ELIZABETH NUÑEZ MARTINEZ  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE  
ESPECIALIDAD DE PATOLOGÍA CLÍNICA Y TUTOR PRINCIPAL  
CENTRO MÉDICO ABC

DOCTOR  
VIRGILIO MELGAR MANZANILLA  
ASESOR METODOLÓGICO  
CENTRO MÉDICO ABC

DOCTORA  
BLANCA VELAZQUEZ HERNANDEZ  
PROFESOR ASOCIADO DEL CURSO DE  
ESPECIALIDAD DE PATOLOGÍA CLÍNICA  
CENTRO MÉDICO ABC

## AGRADECIMIENTOS

A **DÍOS**, por ser esa fuerza que me ha mantenido para lograr cada uno de mis objetivos.

Un especial agradecimiento a la **Dra. Marcela Elizabeth Núñez Martínez** y a la **Dra. Blanca Velázquez Hernández** por el tiempo dedicado para la elaboración de este trabajo.

A **Ricardo**, mil gracias no solo por ser mi mano derecha en este proyecto, sino por ser un gran maestro y compañero de trabajo, no tengo palabras para agradecer el tiempo invertido.

A la **QFB Rosa Margarita Cebada López**, gracias mago por las enseñanzas y las risas, sin duda mi area preferida en el laboratorio.

A la **Dra. América Ramírez Carreño**, por cada porra y jalones de orejas cuando se ameritaba, gracias por ser una gran maestra y amiga.

A **Edson**, por los momentos vividos, por todas las pláticas y risas que hicieron estos últimos dos años mas ligeros.

Un agradecimiento enorme a mi viejito de oro, **mi Abuelo**, gracias por estar conmigo, por ser un excelente padre y ser uno de mis motores para realizar mis sueños, Gracias por cada enseñanza de vida.

A **mi Familia, Mi madre y chabela**, por todos los abrazos cálidos cada vez que llegaba a casa, por esas palabras lindas, pero a la vez fuertes que me hacían reaccionar en mis momentos de debilidad, a **mis sobrinos Jimena y Alex** gracias por ser esa alegría que me motivaba al salir de casa.

A **Virgilio** no solo por ser mi fiel acompañante en esta etapa, sino también mi maestro, esposo y amigo, sabes que tienes toda mi admiración. Gracias por las palabras de aliento, el amor y la ayuda brindada en este camino.

A mi **Dante**, por ser hoy por hoy mi más grande tesoro, por ser mi principal motor en esta vida y por llenar mis días de felicidad. Gracias por estar aquí.

## ÍNDICE

	TITULO	Pagina
	Resumen	5
	Antecedentes	7
	Pregunta de Investigación	13
	Planteamiento del problema	13
	Justificación	15
	Objetivos	16
	Hipótesis	16
	Material y métodos	17
	Diseño del estudio	17
	Universo de trabajo	17
	Población blanco	17
	Población de estudio	17
	Criterios de selección	17
	Materiales	18
	Variables de interés	19
	Descripción del estudio	20
	Análisis estadístico	22
	Calculo del tamaño de la muestra	23
	Factibilidad	23
	Aspectos éticos	23
	Cronograma de actividades	24
	Resultados	25
	Discusión	29
	Conclusión	31
	Bibliografía	32

## **RESUMEN**

Introducción: La identificación y pruebas de sensibilidad antimicrobiana son pivotes en el tratamiento de las infecciones del torrente sanguíneo ya que cada hora de retraso en la iniciación del antimicrobiano correcto aumenta la mortalidad de este padecimiento en 7.6%. Se han desarrollado técnicas para aislar microorganismos directamente de frascos de hemocultivos positivos para su identificación y pruebas de sensibilidad antimicrobiana, sin embargo, la concordancia con el método estándar ha sido variable.

Objetivo: Evaluar la identificación y prueba de sensibilidad antimicrobiana de bacterias y levaduras obtenidas directamente de frascos de hemocultivo positivos, utilizando una técnica de lavado-centrifugación, con el sistema MALDI-TOF MS y Vitek 2.

Material y Métodos: De febrero a agosto del 2017, 90 frascos de hemocultivo positivo fueron sujetos a identificación del microorganismo y prueba de sensibilidad antimicrobiana siguiendo el método estándar y el método directo. Los resultados de la identificación y pruebas de sensibilidad con ambas técnicas fueron comparados.

Resultados: Se identificaron ocho especies de bacterias en 80 frascos de hemocultivo y se evaluaron 1391 combinaciones microorganismo-antimicrobiano. La concordancia del método directo con el tradicional fue de 95.5% para la identificación y de 98.4% para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

Conclusión: Los resultados de la identificación y pruebas de sensibilidad antimicrobianos con el método directo son congruentes con las del método estándar y puede ser utilizado en el laboratorio clínico.

1.- Datos del alumno	
Apellido Paterno Apellido Materno Nombre Teléfono Universidad Facultad o escuela Carrera No de cuenta	Canché Mena Karina Alejandra 9997437856 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina Patología Clínica 513234916
2.- Datos del asesor	
Apellido Paterno Apellido Materno Nombre	Núñez Martínez Marcela Elizabeth  Melgar Manzanilla Virgilio  Velázquez Hernández Blanca
3.- Datos de la Tesis	
Título   Subtítulo  No de páginas Año NUMERO DE REGISTRO	“Identificación y prueba de sensibilidad de microorganismos obtenidos directamente de frascos de hemocultivos positivos, utilizando un método de lavado-centrifugación, a través de MALDENTIFICACIÓN Y PRUEBA DEMALDI-TOF Y VITEK-2.”     35 2018-2019 TABC-19-02

## **ANTECEDENTES**

Del 4 a 5% de todos los pacientes hospitalizados sufren de infecciones asociadas a los cuidados de la salud y de estos hasta el 47.2% (1) son infecciones del torrente sanguíneo (BSI del inglés blood-stream infections) sin embargo la incidencia puede ser hasta del 14.6% en pacientes hospitalizados en los servicios de cirugía (2). Las BSI son factores de mal pronóstico y su presencia se asocia a una mortalidad del 34-52% en su forma grave (2,3).

Inmediatamente después de que se sospecha una infección del torrente sanguíneo, o de forma rutinaria en pacientes con sepsis, choque séptico o sepsis grave; se recomienda iniciar esfuerzos para identificar el o los agentes causales. Esto se hace mediante la toma de hemocultivos en frascos para aerobios y anaerobios. Una vez tomadas las muestras de hemocultivos, se recomienda iniciar antibioticoterapia empírica contra los organismos que con más frecuencia se presentan en los pacientes, tomando en cuenta sus características clínicas. La antibioticoterapia debe evaluarse diariamente a la luz de la obtención de los resultados de las pruebas de identificación bacteriana y las ASTs (4).

El tiempo es crucial ya que el inicio del antibiótico correcto en la primera hora de reconocimiento del cuadro clínico se asocia a una sobrevivencia del 80% mientras que cada hora de retraso en la administración del antibiótico correcto se asocia a un aumento en la mortalidad de 7.6% (rango de 3.6-9.9%) (5). El uso del antimicrobiano apropiado se asocia a un riesgo relativo (RR) para mortalidad a 30 días y mortalidad intrahospitalario de 0.71 (I.C. 95%: 0.62-0.82) y 0.67 (I.C. 95%:0.56-0.80) respectivamente, comparado con el uso del antimicrobiano incorrecto (6,7)); lamentablemente el antibiótico empírico es incorrecto entre el 28.1



y 57.8% de las veces (6). La identificación del microorganismo y su susceptibilidad antimicrobiana es llevada a cabo en los departamentos de microbiología de los laboratorios clínicos y para esto se cuenta con diversos métodos.

El proceso de identificación bacteriana inicia con la inoculación de las botellas de hemocultivo con la sangre sospechosa. Estas botellas, de las cuales las más comúnmente utilizadas son el sistema Bactec (Beckton-Dickinson, EUA) y BactAlert/Virtuo systems (bioMérieux, Francia). Ambos sistemas se basan en la utilización de sustratos carbonados (carbohidratos) en el medio de cultivo y la subsecuente producción de CO<sub>2</sub> por el microorganismo en crecimiento. El CO<sub>2</sub> al ser un gas ácido, produce cambios en el pH, el cual es detectado por métodos colorimétricos y fluorescentes en el fondo de la botella del medio de cultivo. Ambos sistemas son similares en cuanto a su desempeño para la detección de microorganismos (8). Las botellas son habitualmente incubadas por 5-7 días. Durante este lapso un sistema automatizado es encargado de señalar a las botellas que se toman positivas (9,8).

Una vez que una botella es marcada como positiva, el siguiente paso habitual es la siembra en cajas de agar por 12 - 24 horas, con el fin de aumentar la concentración de bacterias y asegurar colonias puras y facilitar su identificación. Este último paso es lo característico de lo que llamaremos método tradicional. Posterior a la realización de una tinción de Gram, la identificación puede ser por métodos bioquímicos convencionales, MALDI TOF MS o métodos de ácidos nucleicos como

PCR (10). El método MALDI TOF MS es actualmente uno de los más utilizados en todo el mundo y también en nuestro centro (11).

La MS es una técnica analítica que identifica moléculas ionizadas, en estado gaseoso, por medio de su razón masa/carga ( $m/z$ ). La MS funciona por medio de tres pasos principales: ionización, separación de masas y detección. Estos tres pasos son realizados en 6 componentes principales del espectrómetro de masas: 1) sistema de introducción de la muestra, 2) fuente de iones donde la muestra es vaporizada y se producen los iones, 3) analizador de masas donde los iones son separados según su razón  $m/z$ , 4) detector de iones donde la intensidad de la señal de los valores  $m/z$  son determinados, 5) sistema de vacío necesarios para evitar la pérdida de iones por colisión con partículas inertes o componentes del equipo, 6) equipo de cómputo para controlar el funcionamiento del equipo, almacenar y procesar la información generada (12).

El primer espectrómetro de masas fue construido por J.J. Thompson en 1912 y su uso fue prácticamente exclusivo del área de la física, donde se utilizaba para estudiar elementos y sus isótopos o moléculas pequeñas termoestables (13). No fue hasta 1991, cuando se contaban con técnicas de ionización suaves como ESI por sus siglas en inglés Electrospray ionization (ionización por electrospray) o LDI por sus siglas en inglés Laser Desorption/Ionization (Desorción/Ionización por láser) que fue posible su aplicación para la identificación de biopolímeros (14). De estas dos técnicas la más exitosa fue la LDI que consiste en la utilización de energía en forma de láser con una longitud de onda ideal para ionizar sin fragmentar el biopolímero. Esta se aplica por medio de pulsaciones rápidas lo cual evita alzas

térmicas y la degradación del biopolímero; sin embargo, tenía una principal limitante; las moléculas mayores a 1000 Da no podían ser desorbidas como iones intactos. Esta limitante fue superada al combinar el analito con una matriz sólida o líquida con gran capacidad de absorción de energía lo cual protege a los biopolímeros de mayor tamaño de la fragmentación y facilita su ionización. A esta técnica de LDI asistida por matriz se le conoce como MALDI (12).

Una vez generado los iones estos tienen que ser dirigidos al analizador de masas el cual los separa según su  $m/z$ . Los analizadores de masas más comunes son el *sector magnético*, el *cuádruplo*, la *trampa iónica*, el TOF por sus siglas en inglés *Time Of Flight* (Tiempo de vuelo) y la *Transformada de Fourier de resonancia del ion ciclotrón*. Para la identificación de polímeros por medio de la técnica MALDI, el analizador de masas más utilizado es el TOF.

La medición del  $m/z$  para en el analizador TOF se basa en la ecuación  $KE=0.5mv^2$ , donde KE es la energía cinética, m es masa del ión y v es velocidad del ion. El tiempo que tomará el ion para alcanzar al detector de iones depende de su aceleración inicial (dada por el potencial del campo eléctrico (V) y de la carga del ion (z)) y de la distancia del detector de iones (L). Debido a que V y L son conocidos, se puede determinar la  $m/z$  a partir del tiempo entre la ionización y la detección (12,14).

La identificación bacteriana por el método de MS inicio con la utilización de esta técnica para identificar secuencias de DNA, obtenidos mediante PCR, únicas para cada bacteria. De esta forma se fue creando una biblioteca genética de las distintas bacterias lo cual hizo posible su identificación rápida (15). Otro método que fue utilizado para la identificación bacteriana rápida es la MS de los componentes

lipídicos de las bacterias; un área llamado quimiotaxonomía (16). Los primeros reportes de la utilización de la MS para la identificación de bacterias intactas basadas en su perfil proteómico fue reportado por Cain et al en 1994 (16,17).

Las células bacterianas consisten en aproximadamente 10% de lípidos y más de 50% de proteínas lo cual hace al análisis de proteínas ideal para la identificación bacteriana. Esta gran variedad de proteínas ha hecho posible su utilización para la identificación bacteriana sin embargo en la actualidad la identificación se centra en la caracterización de las proteínas ribosomales. La identificación se logra comparando el espectro de las proteínas de la muestra con bibliotecas de espectros de proteínas; como el VITEK 2 (11).

El método de obtención de las células bacterianas para su análisis por medio del MS clásicamente ha sido de una placa de agar donde son sembradas las botellas de hemocultivos positivos sin embargo en un esfuerzo por acortar los tiempos necesarios para la identificación se han desarrollado varios protocolos para la obtención de las bacterias directamente de las botellas de hemocultivos (18).

Varios autores han reportado la utilización del MALDI TOF MS para la identificación de microorganismos bacterianos obtenidos directamente de la botella de hemocultivo (19). A diferencia del método tradicional donde la preparación de la muestra de bacterias previo a su identificación es escasa, para la identificación directa de la botella de hemocultivo se requiere de una preparación más extensa ya que se tiene que eliminar eritrocitos y componentes del medio de cultivo ya que estos producen interferencia.

Los protocolos para este tratamiento pre análisis son diversos sin embargo la mayoría involucran los siguientes pasos: 1) recolección del espécimen; 2) remoción de eritrocitos; 3) precipitación de proteínas; y 4) extracción y solubilización de proteínas (20,19).

El desempeño reportado de este método de identificación bacteriana es variable pero consistentemente mejor para la identificación de bacterias Gram negativas comparado con Gram positivos. Para Gram negativos la identificación a nivel de especie, comparado con el método tradicional, es correcto en 88-94% de los casos mientras que para Gram positivos este valor oscila entre 67 y 73%. Estos porcentajes son más altos para la identificación a nivel de género, alcanzando el 100 y 93% para Gram negativos y Gram positivos respectivamente (19,21,22,23,24). El porcentaje de no identificaciones es de aproximadamente 20% y de mala identificación 1%. Las no identificaciones fueron habitualmente por un número de bacterias inadecuados o por mala calidad de la muestra. Las identificaciones incorrectas se presentan habitualmente para microorganismos encapsulados como *S. pneumoniae* y *H. influenzae* entre otras. El error más común es la identificación de *S. pneumoniae* por *S. mitis* y este debe ser considerado como una limitante de esta técnica (22,23,24). En el 2016, la base de datos de los espectros de masas de las bacterias Gram positivos fue ampliado para mejorar la identificación de bacterias grampositivos (25).

Las pruebas de sensibilidad utilizando estas técnicas han sido satisfactorios. Una vez identificado la bacteria la AST es correcta en aproximadamente 95% de las veces (22,23,24).

Otras técnicas han sido propuestas para la identificación por MALDI TOF incluso antes de la positividad de la botella de hemocultivo o con periodos cortos, 2-4 horas, de cultivo en un medio sólido (23,26,27).

Se ha admitido que los métodos para la identificación de las bacterias a través de las botellas de hemocultivo positivos necesitan perfeccionarse, sobre todo la obtención de bacterias Gram positivos.

### **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es la concordancia en la identificación bacteriana con el método MALDI TOF MS utilizando bacterias de hemocultivos sembrados en un medio sólido (método tradicional) y bacterias obtenidas directamente de las botellas de hemocultivos (método directo) en pacientes hospitalizados del Centro Médico ABC Campus Observatorio?

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Uno de los pilares en el manejo de las BSI es la identificación rápida de las bacterias, así como su susceptibilidad antimicrobiana lo cual permite la iniciación temprana del antibiótico correcto. Cada hora de retraso en el inicio del antibiótico correcto disminuye la probabilidad de sobrevivencia en 7.6%. Los métodos actuales de identificación bacteriana han mejorado sustancialmente en su especificidad y en el tiempo de espera para obtener resultados, sin embargo, una vez que resulta positivo el hemocultivo, el tiempo de espera para identificar a la bacteria causal y conocer sus susceptibilidades antimicrobianas siguen siendo inaceptables.

Las técnicas de identificación, basados en el método de espectrometría de masas ha permitido identificar a las bacterias en escasos minutos. Uno de los puntos principales de retraso es entre la positividad del hemocultivo y la identificación bacteriana; ya que habitualmente se requiere de por lo menos 24 horas de crecimiento en un medio sólido antes de proceder a su identificación. Actualmente, se invierte en disminuir este periodo de retraso. Se han desarrollado múltiples técnicas para crear un pellet de bacterias directamente de la botella de hemocultivos, sin necesidad de la siembra en un medio sólido, que permita la identificación bacteriana inmediatamente después de ser positivo el hemocultivo, con buenos resultados. Las técnicas para la identificación bacteriana directamente de la botella de hemocultivo son múltiples y dependen de las prácticas e insumos de los distintos centros. En el centro médico ABC la identificación bacteriana se realiza usando MS tras un periodo de por lo menos 24 horas de siembra en un medio sólido lo cual implica retrasos significativos en la iniciación del antimicrobiano correcto, con el consecuente aumento en la morbimortalidad. Es por esto que la realización de un protocolo diseñado para evaluar la sensibilidad y especificidad de la identificación bacteriana directamente de la botella de hemocultivo, mediante una técnica de obtención de pellet diseñado en el laboratorio de microbiología resulta imperativo.

## **JUSTIFICACIÓN**

Las BSI son fuente importante de mortalidad hospitalaria, y aumenta dramáticamente los costos de la atención médica, especialmente en las unidades de cuidados intensivos. La iniciación temprana de antimicrobianos específicos para el agente infectante es uno de pilares en el tratamiento de las BSI y se ha documentado que cada hora de retraso en la iniciación de antimicrobianos específicos aumenta la mortalidad. Es por esto que, en diversos centros de todo el mundo, se realizan esfuerzos por encontrar métodos de identificación bacteriana y de AST que reducen los tiempos de espera para el clínico. Este esfuerzo ha culminado en la identificación bacteriana directamente de la botella de hemocultivo sin la necesidad de la siembra en un medio sólido, paso que suele prolongar los tiempos de espera.

El centro Médico ABC se ha caracterizado por ser un centro con los más altos estándares de calidad, siempre a la vanguardia de la medicina. En nuestro centro se realiza la identificación bacteriana con el método tradicional por lo que se identifica este como un área de oportunidad para acortar los tiempos de entrega de los resultados de hemocultivo. Es por esto que es importante evaluar un procedimiento, desarrollado en nuestro centro, para la identificación bacteriana directamente de la botella de hemocultivo. Los resultados de este estudio, en caso de ser favorables, permitirán implementar esta estrategia en los laboratorios de este hospital y así acortar los tiempos de entrega de resultados de hemocultivo y sensibilidad antimicrobiano. Este paso es vital para la mejor atención de los pacientes con infecciones del torrente sanguíneo.



### **OBJETIVO GENERAL:**

Determinar cuál es la concordancia entre la identificación bacteriana con el método MALDI TOF MS utilizando bacterias de hemocultivos sembrados en un medio sólido y bacterias obtenidas directamente de las botellas de hemocultivos

### **OBJETIVO ESPECIFICO:**

- Identificar las bacterias presentes en botellas de hemocultivos con alerta de positivo, utilizando bacterias obtenidas directamente de la botella de hemocultivo.
- Identificar las bacterias presentes en botellas de hemocultivos con alerta positiva, utilizando bacterias del medio sólido donde fueron sembrados.
- Comparar la concordancia entre las bacterias identificados por el método directo y el método tradicional
- Evaluar la concordancia entre las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana utilizando las bacterias identificados con ambos métodos.

### **HIPÓTESIS:**

La concordancia en la identificación bacteriana con el método MALDI TOF MS utilizando bacterias de hemocultivos sembrados en un medio sólido (método tradicional) y bacterias obtenidas directamente de las botellas de hemocultivos es casi exacta.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

*Tipo de estudio:* Experimental, transversal, Prospectivo, analítico.

*Universo de trabajo:* Botellas de hemocultivos positivos

*Población blanco:* Botellas de hemocultivo positivo en el laboratorio clínico del centro médico ABC Campus Observatorio.

*Población de estudio:* Botellas de hemocultivo positivo en el laboratorio clínico del centro médico ABC Campus Observatorio que cumplan con los criterios de inclusión.

### **CRITERIO DE INCLUSIÓN:**

- Botellas de hemocultivos señalizados como positivos por el sistema Bact/Alert

### **CRITERIO DE EXCLUSIÓN:**

- Botellas de hemocultivos con más de 48 horas de ser señalado como positivo

### **CRITERIO DE ELIMINACIÓN:**

- Botella de hemocultivo con más de una morfología bacteriana en la tinción de gram.

## **MATERIALES:**

1. Botella de hemocultivo:
  - a. BacT/ ALERT FN PLUS. Marca BIOMERIEUX 40 ML. (Naranja).
  - b. BacT/ ALERT FP PLUS. Marca BIOMERIEUX 30 ML. (Amarilla).
  - c. BacT/ ALERT FA PLUS. Marca BIOMERIEUX 30 ML. (Verde).
2. Equipo BacT/ ALERT 3D Versión B. 25.
3. Centrifuga Allegra X-22 MARCA BECKMAN COULTER.
4. Porta objetos para microscopio esmerilado Marca MADESA.
5. Colorantes para la tinción de Gram.
6. Guantes de nitrilo desechables ECOME.
7. Tubos cónicos para centrifuga de polipropileno de alta calidad de 15 ml. Marco CORNING.
8. Toallitas de alcohol isopropílico al 70 % por volumen. Marca BD.
9. Pipetas de Pasteur estériles.
10. Aplicadores con algodón de plástico de 15 cm. Marca PROTEC.
11. Jeringas de plástico de 20 ml. BD Plastipak.
12. Tarjetas slides DS VITEK MS. Marca BIOMERIEUX.
13. Ácido cinámico (VITEK MS-CHCA) 5 X 0.5 ML.
14. Ácido fórmico (VITEK MS- FA) 5 X 0.5 ML.
15. Espectrómetro de masas (VITEK MS) MALDI TOF. Serie 50247
16. Tubos de ensayo de 5ml. Marca SARSTEDT.
17. Solución salina 0.45% 500 ml. BIOMERIEUX.
18. Vortex Genie 2. Modelo G560. Scientific industries.
19. Densi check plus. Marca BIOMERIEUX.
20. Tarjetas de sensibilidad AST N285. VITEK 2. BIOMERIEUX
21. Tarjetas de sensibilidad AST GP67. VITEK 2. BIOMERIEUX.
22. Equipo VITEK 2. BIOMERIEUX.

**VARIABLES:**

Variable	Tipo	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición
Morfología bacteriana	Cualitativo Dicotómico, nominal	Clasificación bacteriana según su morfología al microscopio de luz	Clasificación bacteriana según su morfología, tras la tinción de gram	Bacilo o coco
Tiempo entre positividad de la botella y la identificación	Cualitativo Dicotómico, ordinal	No aplica	Tiempo entre la positividad de la botella de hemocultivo y el proceso para la identificación	≤24 horas y >24 horas
Nivel de confianza de la identificación	Cualitativo Dicotómico ordinal	Concordancia del espectro de masas de la muestra con el de la referencia	Nivel de confianza reportado por el sistema Vitek MS	≤79=no confiable ≥=confiable
Concordancia a nivel de género con método tradicional	Cualitativo Nominal	No aplica	Concordancia entre el género bacteriano identificado por el método directo y el método tradicional	Concordante No concordante No identificado
Concordancia a nivel de especie con método tradicional	Cualitativo Nominal	No aplica	Concordancia entre la especie de la bacteria identificado por el método directo y el método tradicional	Concordante No concordante No identificado

## **DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO:**

Posterior al tratamiento usual de las botellas de hemocultivo para la identificación bacteriana por el método tradicional que involucra tinción de gram, identificación de la morfología bacteriana y siembra en agar; se seleccionaron las botellas con una solo morfología bacteriana para su identificación por el método directo.

Para la identificación por el método directo y para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana se realizarán los siguientes procedimientos dependiendo de si se trató de bacilos o cocos:

1. Procedimiento para bacilos.
  - a. Se homogenizó la botella rodando suavemente entre las palmas de la mano en posición horizontal por aproximadamente 15 segundos.
  - b. Se esterilizará el capuchón de la botella del hemocultivo con alcohol isopropilico al 70 % y llama.
  - c. Con una jeringa estéril de 20ml se tomó 10 ml del hemocultivo y se colocó en un tubo cónico para centrifuga.
  - d. Se centrifugó la muestra a 1500 gravedades por 3 minutos a temperatura ambiente.
  - e. Se extrajo el sobrenadante con una pipeta de Pasteur de 5 ml y se depositó en un nuevo tubo cónico para centrífuga y se centrifugó a 1500 gravedades por tres minutos.
  - f. Se decantó el sobrenadante y con un hisopo se retiró el exceso del sobrenadante del borde del tubo.

- g. Con una pipeta de Pasteur estéril se extrajo y coloco el sedimento en un portaobjeto
- h. Se montó la muestra en el slide con un palillo, se colocó 1.0  $\mu$  de Matriz (ACIDO CINAMICO) y se dejo secar.
- i. Se dio de alta e introdujo el slides al equipo VITEK MS para identificación del microorganismo según las especificaciones del fabricante
- j. Del sedimento restante del tubo para centrifuga se preparó una suspensión de 0.50 a 0.63 Mcfarland para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana, según las especificaciones de fabricante.
- k. Se coloco la tarjeta de sensibilidad AST- N285.
- l. Se dio de alta en el equipo VITEK 2.

## 2. Procedimiento para Cocos.

- a. Se homogenizo la botella rodando suavemente entre las palmas de la mano en posición horizontal por aproximadamente 15 segundos.
- b. Se esterilizó el capuchón de la botella del hemocultivo con alcohol isopropilico al 70 % y llama.
- c. Con una jeringa estéril de 20ml se tomaron 10 ml del hemocultivo y se coloco en un tubo cónico para centrifuga.
- d. Se centrifugo la muestra a 1500 gravedades por 3 minutos a temperatura ambiente.
- e. Se decanto el sobrenadante.
- f. Se realizo lavados al sedimento con solución salina en dos ocasiones y se descanto de nueva cuenta el sobrenadante.

- g. Con una pipeta de Pasteur se tomo una gota del sedimento y se coloco en un portaobjeto
  - h. Se monto la muestra en el slide con un palillo y se colocaro 1.0  $\mu$  de ácido fórmico y se dejará secar.
  - i. Se coloco 1.0 $\mu$ l de matriz, con una micropipeta y se deajo secar.
  - j. Se dio de alta e introdujo el slide al equipo VITEK MS para identificación del microorganismo según las especificaciones del fabricante.
  - k. Del sedimento restante del tubo para centrifuga se preparo una suspensión de 0.50 a 0.63 Mcfarland para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana según las especificaciones del fabricante.
  - l. Se coloco la tarjeta de sensibilidad AST- GP67.
  - m. Se dio de alta en el equipo VITEK 2.
3. Se realizaron pruebas de identificación hasta completar el tamaño de la muestra requerida.

### **ANALISIS ESTADISTICO:**

Como estadística descriptiva se utilizarán frecuencias y porcentajes. La concordancia entre los dos métodos de identificación será evaluada por medio del índice Kappa. Se estatificará el desempeño según el tiempo entre la positividad de la prueba y el tiempo de identificación y se comparan por medio de la prueba de Chi-cuadrada. Todas las pruebas estadísticas serán realizadas con el programa estadístico SPSS versión 21, IBM.

### **CALCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA:**

En el centro médico ABC, campus observatorio, se realizan aproximadamente 50 hemocultivos por mes. Buscando una concordancia de  $90 \pm 5$ , con un nivel de confianza del 95%, se utilizó la fórmula para proporciones con un tamaño de muestra de 58 muestras (23).

### **FACTIBILIDAD:**

El laboratorio clínico del centro médico ABC campus Observatorio recibió un número de botellas de hemocultivo importante de los cuales se pudo obtener el número de botellas positivas lo cual permitió completar este estudio.

Se contó con la infraestructura y los recursos humanos necesarios para la realización de la identificación bacteriana y pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

### **ASPECTOS ÉTICOS:**

El trabajo es de categoría riesgo menor al mínimo ya que no se realizará ningún procedimiento a pacientes; y no se utilizarán los datos personales de los pacientes de quienes se obtuvieron las muestras de hemocultivo.



**CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES:**

Actividad	Enero 2017	Febrero 2017	Marzo 2017	Abril 2017	Mayo 2017	Junio 2017	Julio 2017
Revisión de bibliografía							
Redacción y sometimiento del protocolo							
Realización de pruebas y recolección de datos							
Redacción de resultados y reporte final							

## **RESULTADOS:**

Se analizaron 90 frascos de hemocultivo: 43 aerobios, 38 anaerobios, 4 pediátricos y 5 no especificados. Se aislaron 27 Gram positivos, 59 Gram negativos y 3 levaduras y no se obtuvo resultado en la tinción de Gram de un frasco. No hubo diferencia en los resultados de la tinción de Gram según el tipo de botella ( $p=0.23$ ). Por el método tradicional se identificaron ocho especies de bacterias en 77 frascos y una especie de levadura en 3 frascos mientras que con el método directo se identificaron 12 especies de bacterias en 85 frascos y una de levadura en 3 frascos siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p<0.001$ ). Los géneros y especies identificados por ambos métodos se muestran en la tabla 1. No se identificó ningún microorganismo en 10 frascos con el método tradicional y en 2 frascos con el método directo.

Entre los 80 microorganismos identificados por el método estándar, 78 fueron identificados correctamente por el método directo y todos los microorganismos fueron identificados a nivel especie. Un microorganismo fue identificado erróneamente (*S. entérica* identificada como *C. koseri*) y uno no fue identificado (*K. pneumoniae*).

De los 10 microorganismos no identificados por el método tradicional, 7 fueron identificados por el método directo (6 *E. fecalis* y 1 *K. varianz*). La identidad de la bacteria fue confirmada por medio del sistema de identificación con tarjetas Vitek 2 por lo cual el método directo identificó correctamente al 95.5% (85/89) de los microorganismos.

**Tabla 1: Género y especie de bacterias y hongos identificados por el método estándar y el método directo.**

<b>Microorganismo</b>	<b>Método Tradicional</b>	<b>Método Directo</b>	<b>Identificación correcta</b>
<i>E. coli</i>	51	51	51
<i>S. aureus</i>	11	11	11
<i>B. thetaiotaomicron</i>	1	1	1
<i>S. enterica</i>	2	1	1
<i>S. epidermidis</i>	7	7	7
<i>C. fetus</i>	1	1	1
<i>K. varianz</i>	0	1	0
<i>C. koseri</i>	0	1	0
<i>K. pneumoniae</i>	4	3	3
<i>P. saprophiticus</i>	0	1	0
<i>S. ovis</i>	0	1	0
<i>E. fecalis</i>	0	6	0
<i>C. parapsilosis</i>	3	3	3
<i>no identificados</i>	10	2	0
<b>Total</b>	<b>90</b>	<b>90</b>	<b>78</b>

Un microorganismo no fue identificado por ningún método y 2 fueron identificados por el método directo sin poderse confirmar la identidad del microorganismo por algún otro método. La concordancia entre ambos métodos se muestra en la tabla 2.

Considerando la suma de microorganismos identificados por el método tradicional y el método de tarjetas (verdaderos positivos), la sensibilidad fue del 97.8%, la especificidad de 66.7%, el valor predictivo positivo 97.8% y el valor predictivo negativo del método directo fue 66.7%.

**Tabla 2: Concordancia del método directo con el método tradicional en la identificación bacteriana**

	% de Identificaciones correctas	# Coeficiente de Fleiss-Kappa	Intervalo de confianza 95%	p
Gram negativo* (n=59)	96.6	0.863	0.70-1.00	<0.0001
Gram positivo* (n=27)	92.6	0.845	0.69-99.39	<0.0001
Total (n=86)	95.3	0.91	0.83-0.98	<0.0001

\*: Diferencia entre porcentaje de Gram positivos y Gram negativos identificados correctamente por el método directo no significativo ( $p=0.412$ )

#: concordancia entre los métodos ajustado por el azar

La levadura identificada fue *Candida parapsilosis* y la concordancia fue perfecta.

La mediana de la confianza de las identificaciones con ambos métodos fue de 99.9% y esto fue similar para Gram negativos, Gram-positivos y levaduras. Para evaluar la reproducibilidad, se realizó montaje doble con el método directo de 78 de los 98 frascos con concordancia del 100%.

El análisis de los AST fue realizado con 79 frascos en las que estas pruebas fueron realizadas por ambos métodos de los cuales 55 fueron Gram negativos y 24 Gram positivos. Las concordancias de las ASTs se muestran en Tabla 3. Los antimicrobianos para los cuales hubo discordancia, según los microorganismos, se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 3: Interpretación de la concordancia de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana con el método directo comparado con el estándar.**

Numero de botellas	# AMB analizados	Concordancia n (%)	Error Menor n (%)	Error Mayor n (%)	Error Muy Mayor n (%)
<b>Gram Positivo (n=24)</b>	456	453 (99.44)	2(0.44)	1(0.22)	0
<b>Gram Negativo (n=55)</b>	935	916 (97.97)	16 (1.71)	2(0.21)	1(0.11)

p valor de tendencia =0.054

AMB=antimicrobiano, Concordancia: resultados similares por ambos métodos, Error menor: resistencia intermedia versus susceptibilidad o resistencia, Error mayor: Falsa resistencia, Error muy mayor: Falsa susceptibilidad

**Tabla 4: Combinaciones antimicrobianos-microorganismo que fueron discordantes con el método estándar en AST.**

Microorganismo	Error menor	Error mayor	Error muy mayor
<b><i>E. coli</i></b>	Trimetoprim, Cefazolina, Amoxicilina/Acido clavulanico, Piperacilina/Tazobactam, cefoxitina, cefazolina, nitrofurantoina		Cefoxitina, Piperacilina/Tazobactam
<b><i>S. aureus</i></b>		Tetraciclina	
<b><i>S. epidermidis</i></b>	Clindamicina		
<b><i>K. pneumoniae</i></b>	Nitrofurantoina	Ciprofloxacino	
<b><i>E. fecalis</i></b>	eritromicina		

Error menor: resistencia intermedia versus susceptibilidad o resistencia, Error mayor: Falsa resistencia, Error muy mayor: Falsa susceptibilidad

## **DISCUSIÓN:**

En este estudio evaluamos un método de lavado-centrifugación, desarrollado en nuestro laboratorio, combinado con VITEK MS y VITEK 2 para la identificación directa y prueba de sensibilidad antimicrobiana directa de frascos de hemocultivo positivos. A diferencia de otros procedimientos laboriosos, el nuestro involucro únicamente dos episodios de lavado centrifugación. La proporción de microorganismos correctamente identificados fue de 95% tanto a nivel género como a nivel especie. Similar a lo reportado por Machen et al<sup>12</sup>, Jo et al<sup>13</sup>, Wattal et al<sup>22</sup> y Fothegil et al<sup>23</sup> entre otros; la proporción de Gram negativos identificados correctamente fue más alta que los Gram positivos sin alcanzar significancia estadística. La correcta identificación de Gram negativos es reportada entre el 84% y el 99%<sup>13, 16, 20, 23</sup> y la nuestra fue de 97.9%. A diferencia de otros autores como que identificaron aproximadamente el 64- y 86% % de Gram positivos, con nuestra técnica logramos la identificación de 92.6 %<sup>16, 22, 23</sup>. Una tasa similar de identificación de Gram positivos ha sido reportada únicamente por Machen et al<sup>12</sup>. El índice Kappa para evaluar concordancia más allá del azar fue de 0.91 para el total de identificaciones, 0.86 para Gram negativos y 0.84 para Gram positivos. El método directo logró identificar más microorganismos que el método estándar de tal forma que siete microorganismos no identificados por el método estándar (seis *E. fecalis* y un *K. varianz*) fueron identificados con el método directo, aunque en el caso de la *K. varianz*, fue con baja confiabilidad. La identidad de estos microorganismos fue verificada utilizando el VITEK 2 para identificación bacteriana con tarjetas. También se identificaron 3 levaduras, todas *C. parapsilosis*. En cuanto a la sensibilidad y especificidad del método directo, esto no ha sido reportado

previamente por otros autores. La baja especificidad y valor predictivo negativo reflejan mas bien los casos en donde el método directo pudo identificar un microorganismo sin embargo no se pudo corroborar dicho resultado con otros métodos dejando abierto la posibilidad de que el método directo sea superior al método estándar y de tarjetas.

En cuando a AST, de un total de 1391 antibióticos, hubo concordancia en 1369 (98.4%), cifra similar a lo reportado por Machen et al<sup>12</sup>, Jo et al<sup>13</sup> y Wattal et al<sup>22</sup>. La mayoría de los errores fueron menores y se presentaron con *E. Coli*. El antibiótico que más comúnmente reporto error fue Trimetroprim-Sulfometoxazol; dato que ya ha sido reportado por Machen et al<sup>12</sup> y Jo et al<sup>13</sup>.

La piperacilina-Tazobactam fue motivo de 3 errores menores y uno mayor y la cefoxitina también fue motivo de error mayor, todos estos en *E. coli*. No hubo diferencia en el número de errores entre Gram positivos y Gram negativos.

Entre las limitantes de nuestro trabajo está el número reducido de especies identificadas durante el periodo de estudio y que sólo se presentaron 3 levaduras, todas ellas de la misma especie. Otra limitante es que no se incluyeron infecciones polimicrobianas, las cuales han sido evaluadas en escasas ocasiones y en donde se ha reconocido que el rendimiento de este método de identificación es bajo<sup>18,23</sup>.

## **CONCLUSIONES:**

En este estudio demostramos que, utilizando una técnica de lavado-centrifugación, se puede formar un pellet de bacterias directo de los frascos de hemocultivo, de una calidad adecuada para la identificación y AST directas por medio de VITEK MS y VITEK 2 en el contexto clínico diario. Este trabajo también demuestra que los resultados obtenidos con esta estrategia son confiables para su utilización en la toma de decisión sobre el tratamiento de las BSI.



## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med* 2013; 39(2): 165-228.  
DOI:10.1007/s00134-012-2769-8
2. Marquet K, Liesenborgs A, Bergs J, Vleugels A, Claes N. Incidence and outcome of inappropriate in-hospital empiric antibiotics for severe infection: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2015;19(1):63. DOI: 10.1186/s13054-015-0795-y
3. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, 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(6):1589-96.  
DOI: 10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9
4. Lamy B, Dargère S, Arendrup MC, Parienti JJ, Tattévin P. How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the-Art. *Front Microbiol* 2016; 7: 697. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00697
5. Flayhart D, Borek AP, Wakefield T, Dick J, Carroll KC. Comparison of BACTEC PLUS blood culture media to BacT/Alert FA blood culture media for detection of bacterial pathogens in samples containing therapeutic levels of antibiotics. *J Clin Microbiol* 2007; 45(3): 816-21. DOI: 10.1128/JCM.02064-06
6. Campos-Braga PA, Tata A, Goncalves dos Santos V, Barreiro JR, Vilczaki-Schwab N, Veiga dos Santos M et al. Bacterial identification: from the agar plate to the mass spectrometer. *RSC Adv* 2013; 3: 994–1008. DOI: 10.1039/c2ra22063f
7. DeMarco ML, Ford BA. Beyond identification: emerging and future uses for MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *Clin Lab Med* 2013; 33(3): 611-28. DOI: 10.1016/j.cll.2013.03.013

8. Sauget M, Valot B, Bertrand X, Hocquet D. Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type Bacteria? *Trends Microbiol* 2017; 25(6): 447-55. DOI: 10.1016/j.tim.2016.12.006
9. Croxatto A, Prod'hom G, Durussel C, Greub G. Preparation of a blood culture pellet for rapid bacterial identification and antibiotic susceptibility testing. *J Vis Exp* 2014; 15(92): e51985. DOI: 10.3791/51985
10. Loonen AJ, Jansz AR, Stalpers J, Wolffs PF, van den Brule AJ. An evaluation of three processing methods and the effect of reduced culture times for faster direct identification of pathogens from BacT/ALERT blood cultures by MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31(7):1575-83. DOI: 10.1007/s10096-011-1480-y
11. Hoyos-Mallecot Y, Miranda-Casas C, Cabrera Alvargonzález JJ, Gómez-Camarasa C, Perez-Ramirez MD, Navarro-Marí JM. Identificación bacteriana directamente del hemocultivo mediante una técnica rápida de espectrometría de masas Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time-of-Flight. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013;31(3):152–5. DOI: 10.1016/j.eimc.2012.09.003
12. Machen A, Drake T, Wang YF. Same day identification and full panel antimicrobial susceptibility testing of bacteria from positive blood culture bottles made possible by a combined lysis-filtration method with MALDI-TOF VITEK mass spectrometry and the VITEK2 system. *PLoS One* 2014; 14;9(2): e87870. DOI: 10.1371/journal.pone.0087870
13. Jo SJ, Park KG, Han K, Park DJ, Park YJ. Direct Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria From Positive Blood Culture Bottles by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry and the Vitek 2 System. *Ann Lab Med* 2016; 36(2): 117-23. DOI: 10.3343/alm.2016.36.2.117

14. Veloo AC, de Vries ED, Jean-Pierre H, Justesen US, Morris T, Urban E, et al. The optimization and validation of the Biotyper MALDI-TOF MS database for the identification of Gram-positive anaerobic cocci. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22(9): 793-798. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.06.016
15. Martiny D, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of an in-house method and the commercial Sepsityper™ kit for bacterial identification directly from positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31(9):2269-81. DOI: 10.1007/s10096-012-1566-1
16. Kok J, Thomas LC, Olma T, Chen SCA, Iredell JR. Identification of bacteria in blood cultures broths using Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Sepsityper™ and Time of Flight Mass Spectrometry. *PLoS One* 6(8): e23285. DOI: 10.1371/journal.pone.0023285
17. Dixon P, Davies P, Hollingworth W, Stoddart M, MacGowan A. A systematic review of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry compared to routine microbiological methods for the time taken to identify microbial organisms from positive blood cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34(5):863-76. DOI: 10.1007/s10096-015-2322-0.
18. Mestas J, Felsenstein S, Bard JD. Direct identification of bacteria from positive BacT/ALERT blood culture bottles using matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 80:193-6. DOI:
19. Lagacé-Wiens PRS, Adam HJ, Karlowsky JA, Nichol KA, Pang PF, Guenther J, et al. Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry

- and a commercial extraction system: analysis of performance, cost, and turnaround time. *J Clin Microbiol* 2012; 50(10): 3324-3328.
20. Rodriguez-Sanchez B, Sanchez-Carrillo C, Ruiz A, Marin M, Cercendo E, Rodriguez-Créixems M, et al. Direct identification of pathogens from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: O421-O427.
21. Maelegheer K, Nulens E. Same-day identification and antibiotic susceptibility testing on positive blood cultures: a simple and inexpensive procedure. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017; 36(4): 681-687.
22. Wattal C, Oberoi JK. Microbial identification and automated antibiotic susceptibility testing directly from positive blood cultures using MALDI-TOF MS and VITEK 2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016; 35: 75-82.
23. Fothergill A, Kasinathan V, Hyman J, Walsh J, Drake T, Wang YF. Rapid identification of bacteria and yeasts from positive-blood-culture bottles by using a lysis-filtration method and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum analysis with the SARAMIS database. *J Clin Microbiol* 2013; 51(3): 805-809.