



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTANDARIZACIÓN DE UNA TÉCNICA PARA AISLAMIENTO  
MICROBIANO A PARTIR DE HEMOCULTIVOS POSITIVOS  
DIRECTOS E IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS  
(TECNOLOGÍA MALDI-TOF)**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**GABRIELA CARMONA SÁNCHEZ**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**Q.F.B. LILIA PICHARDO VILLALÓN**



**Ciudad Universitaria, CD.MX.**

**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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: HÉRNANDEZ GÓMEZ LUCIANO  
**VOCAL:** Profesor: CASTELLANOS CHÁVEZ NORMA ANGÉLICA  
**SECRETARIO:** Profesor: PICHARDO VILLALÓN LILIA  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: LÓPEZ HERRERA GABRIELA  
**2° SUPLENTE:** Profesor: JIMÉNEZ REYES GENARO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO CLÍNICO CENTRAL DEL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO “FEDERICO GÓMEZ”**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**Q.F.B. LILIA PICHARDO VILLALÓN**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

**Q.F.B. LAURA GRICELDA MARTÍNEZ MÉNDEZ**

**SUSTENTANTE:**

---

**GABRIELA CARMONA SÁNCHEZ**

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	III
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	V
<b>ABREVIATURAS</b> .....	VI
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	2
2.1 Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS).....	2
2.2 Sepsis.....	2
2.3 Sepsis severa .....	3
2.4 Choque séptico.....	3
2.5 Sepsis en pacientes pediátricos.....	3
2.6 Historia Clínica .....	5
2.7 Bacteriemias y Fungemias.....	5
2.8 Hemocultivos .....	6
2.8.1 Hemocultivos positivos .....	10
2.8.2 Medios de cultivo .....	10
2.8.3 Tinción de Gram .....	11
2.9 Identificación de los microorganismos .....	14
2.9.1 Espectrómetro de masas VITEK MS .....	14
2.10 Procalcitonina .....	19
2.10.1 Historia de la PCT .....	19
2.10.2 Biología de la PCT.....	19
2.10.3 PCT en la sepsis .....	20
2.10.4 Prueba de la PCT .....	22
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	25
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	29
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	31
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	31
6.1 OBJETIVO GENERAL.....	31
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	31
<b>7. DISEÑO</b> .....	32
<b>8. CRITERIOS DE SELECCIÓN</b> .....	32
8.1 Criterios de inclusión .....	32
8.2 Criterios de exclusión .....	32
<b>9. MATERIAL</b> .....	33

9.1	AISLAMIENTO BACTERIANO EN SANGRE .....	33
9.2	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN SÉRICA DE PCT .....	34
<b>10.</b>	<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>35</b>
10.1	Método por inoculación en placa. ....	35
10.2	Experimentos previos a estandarizar técnicas .....	35
10.2.1	Control de funcionalidad y esterilidad .....	35
10.3	Técnica de lisis con detergente.....	36
10.3.1	Preparación de N-acetil-L-cisteína.....	36
10.3.2	Procedimiento.....	36
10.4	Técnica de lisis con cloruro de amonio .....	37
10.4.1	Preparación de solución de cloruro de amonio (NH <sub>4</sub> Cl) al 0.8% .....	37
10.4.2	Procedimiento.....	37
10.5	Estandarización de técnicas de lisis .....	37
10.5.1	Técnica de lisis con detergente .....	37
10.5.2	Técnica de lisis con cloruro de amonio y gel separador.....	38
10.6	Identificación en equipo VITEK MS (MALDI-TOF) .....	38
10.6.1	Técnica por inoculación en placa.....	38
10.6.2	Técnica de lisis con cloruro de amonio .....	39
10.6.3	Técnica de lisis con detergente .....	39
10.7	Determinación de niveles séricos de Procalcitonina (PCT).....	40
<b>11.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
<b>12.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>53</b>
<b>13.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>58</b>
<b>14.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>59</b>
<b>15.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>60</b>
<b>ANEXO I</b>	.....	<b>63</b>
	Comprobación de la presencia de microorganismos de acuerdo a la técnica.....	63
<b>ANEXO II</b>	.....	<b>64</b>
	Experimentos previos.....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Componentes del instrumento BacT/ALERT 3D®BioMérieux.....	8
<b>Figura 2.</b> Frascos de hemocultivos BacT/ALERT®PF Plus inoculados con sangre.....	9
<b>Figura 3.</b> Esquema de las diferencias estructurales entre bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas.....	12
<b>Figura 4.</b> Bacterias y estructuras micóticas observadas por tinción de Gram en un microscopio óptico a 100x.....	13
<b>Figura 5.</b> Proceso de trabajo dentro del MALDI-TOF MS de acuerdo a VITEK-MS de la casa comercial BioMérieux.....	17
<b>Figura 6.</b> Flujo de trabajo para la identificación del microorganismo a partir de una colonia aislada en medio de cultivo hasta la emisión del resultado del género y especie.....	18
<b>Figura 7.</b> Estructura molecular de la Procalcitonina.....	20
<b>Figura 8.</b> Comportamiento de los niveles séricos de la PCT en sangre ante un estímulo infeccioso sistémico.....	21
<b>Figura 9.</b> Equipo MINIVIDAS®B·R·A·H·M·S PCT™ y componentes.....	24
<b>Figura 10.</b> Total de muestras recibidas por mes en el año 2017.....	25
<b>Figura 11.</b> Segregación de muestras positivas y negativas a los cinco días de incubación.....	26
<b>Figura 12.</b> Distribución de las muestras positivas de acuerdo a su origen.....	26
<b>Figura 13.</b> Total de hemocultivos positivos en 2017.....	27
<b>Figura 14.</b> Comparación en porcentaje de los hemocultivos monomicrobianos y con más de dos microorganismos.....	27
<b>Figura 15.</b> Hemocultivos positivos de acuerdo a la sala.....	28
<b>Figura 16.</b> Diagrama de estandarización de la técnica de lisis con detergente comercial.....	38
<b>Figura 17.</b> Diagrama de estandarización de la técnica de lisis con NH <sub>4</sub> Cl al 0.8%.....	38
<b>Figura 18.</b> Procedimiento para el informe de resultados de las identificaciones de los microorganismos.....	39
<b>Figura 19.</b> Determinación de niveles séricos de PCT.....	40
<b>Figura 20.</b> Frecuencia de pacientes por género de la edad de los pacientes.....	41

<b>Figura 21.</b> Frecuencia de la edad de los pacientes .....	42
<b>Figura 22.</b> Pacientes de acuerdo al servicio del HIMFG.....	42
<b>Figura 23.</b> Tiempos de procesamiento para los tres métodos.....	50
<b>Figura 24.</b> Ejemplo de la formación del espectro en la metodología del detergente utilizando el buffer con N-acetil-L cisteína.....	54
<b>Figura 25.</b> Inóculo del último lavado de la técnica con detergente.....	63
<b>Figura 26.</b> Inóculo de la superficie del gel separador de acuerdo a la técnica con solución de cloruro de amonio al 0.8%.....	63

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Puntos de corte de PCT para el diagnóstico de sepsis.....	22
<b>Tabla 2.</b> Resultados de los diferentes métodos para identificación de microorganismos aislados en hemocultivos.....	43
<b>Tabla 3.</b> Promedio de tiempo de procesamiento de técnicas.....	49
<b>Tabla 4.</b> Resultados estadísticos de análisis de varianza de una vía (ANOVA) de los tiempos de los 102 hemocultivos positivos por los tres tratamientos.....	49
<b>Tabla 5.</b> Porcentaje de identificación de microorganismos de acuerdo a la técnica empleada.....	51
<b>Tabla 6.</b> Nivel de confianza de los resultados de las identificaciones microbianas por técnica.....	51
<b>Tabla 7.</b> Niveles de PCT y resultados de la identificación de los hemocultivos.....	52
<b>Tabla 8.</b> Resultados con las técnicas lisis con de detergente y con NH <sub>4</sub> Cl al 0.8%.....	64

## ABREVIATURAS

<b>Microorganismo abreviado</b>	<b>Nombre completo del microorganismo</b>
<b><i>A.baumannii complex</i></b>	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>
<b><i>A.xylosoxidans</i></b>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
<b><i>B.cereus</i></b>	<i>Bacillus cereus</i>
<b><i>B.clausii</i></b>	<i>Bacillus clausii</i>
<b><i>B.subtilis</i></b>	<i>Bacillus subtilis</i>
<b><i>C.albicans</i></b>	<i>Candida albicans</i>
<b><i>C.tropicalis</i></b>	<i>Candida tropicalis</i>
<b><i>E.coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b><i>E.cloacae</i></b>	<i>Enterococcus cloacae</i>
<b><i>E.faecalis</i></b>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<b><i>E.kobei</i></b>	<i>Enterobacter kobei</i>
<b><i>H.influenzae</i></b>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<b><i>K.pneumoniae</i></b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b><i>P.aeruginosa</i></b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b><i>P.mirabilis</i></b>	<i>Proteus mirabilis</i>
<b><i>S.aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b><i>S.capitis</i></b>	<i>Staphylococcus capitis</i>
<b><i>S.cohnii</i></b>	<i>Staphylococcus cohnii</i>
<b><i>S.epidermidis</i></b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<b><i>S.haemolyticus</i></b>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<b><i>S.hominis</i></b>	<i>Staphylococcus hominis</i>
<b><i>S.maltophilia</i></b>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<b><i>S.mitis/oralis</i></b>	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>
<b><i>S.pasteuri</i></b>	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
<b><i>S.salivarius</i></b>	<i>Streptococcus salivarius</i>

<b>Ac. Fórmico</b>	ácido fórmico
<b>g</b>	gramo
<b>HC</b>	Hemocultivo central
<b>HP</b>	Hemocultivo periférico
<b>kDa</b>	kiloDalton
<b>NI</b>	No identificado
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Cloruro de amonio
<b>min</b>	minuto
<b>mL</b>	mililitro
<b>ng/mL</b>	nanogramos por mililitro
<b>PCT</b>	Procalcitonina
<b>r.p.m</b>	revoluciones por minuto
<b>µL</b>	microlitro

## **1. INTRODUCCIÓN**

El término de bacteriemia se define como la presencia de una bacteria viable en el torrente sanguíneo<sup>1</sup> y la entidad de sepsis se genera por el proceso infeccioso que causan las bacteriemias o fungemias ya que liberan exotoxinas o componentes en el hospedero, desarrollando una respuesta sistémica en contra de ella. Esto constituye un importante problema de salud para pacientes hospitalizados debido a que complica el estado de ellos aunado a las enfermedades base (síndromes, cualquier tipo de cáncer, inmunocompromiso, entre otros), la malnutrición, la pobreza, la falta de acceso a vacunas y un tratamiento oportuno pueden desencadenar al desenlace de la vida del paciente, además de los gastos generados al sistema de salud.

Es necesario proponer técnicas que faciliten la identificación microbiana presentes en los cultivos de sangre u orina positivos para agilizar y disminuir su tiempo de proceso, ya que anteriormente se han utilizado pruebas bioquímicas básicas o métodos automatizados, pero actualmente, el uso de un espectrómetro de masas ha innovado a los laboratorios de microbiología y bacteriología diagnóstica.

En el presente trabajo se estandarizaron dos técnicas para identificación directa de hemocultivos positivos utilizando el espectrómetro de masas VITEK MS (MALDI-TOF), las cuales disminuyen el tiempo de identificación en comparación con la técnica por inoculación en placa.

## **2. MARCO TEÓRICO**

La palabra sepsis proviene del griego clásico σήψις (sipsis) que significa putrefacción<sup>2</sup>; en 1991, después del consenso de distintas sociedades científicas y como resultado de más de una década para unificación de criterios, se logró una definición para el término de “sepsis”; aunque fue actualizada en el año 2001 con las aportaciones de sociedades europeas y se incorpora el término “síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) y definiéndose los términos “sepsis”, “sepsis grave” y “choque séptico”. Para el año 2005, como resultado de la Conferencia Internacional de Consenso en Sepsis Pediátrica, se establecieron las definiciones siguientes:

### **2.1 Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS)**

Es una entidad clínica secundaria que para considerarse como tal, debe presentar al menos dos de los siguientes criterios, siendo que uno de ellos debe ser temperatura o recuento leucocitario anormal:

- Temperatura central mayor a 38.5°C o menor a 36°C.
- Taquicardia mayor a dos desviaciones estándar sobre el valor de referencia o bradicardia.
- Frecuencia respiratoria mayor a dos desviaciones estándar sobre el valor de referencia o ventilación mecánica en un proceso agudo.
- Leucocitosis o leucopenia según edad o mayor al 10% de formas inmaduras.<sup>2, 3, 4</sup>

### **2.2 Sepsis**

Es una respuesta del hospedero a un patógeno o síndrome clínico asociado con una alta probabilidad de infección que desencadena una SRIS. La evidencia de infección incluye hallazgos positivos al examen físico, de laboratorio o de imágenes.<sup>3</sup>

### **2.3 Sepsis severa**

Cuando la presencia de sepsis causa un mal funcionamiento de los órganos, principalmente corazón y/o pulmones.<sup>3, 5</sup>

### **2.4 Choque séptico**

El choque séptico se debe a una sepsis con hipotensión que persiste a pesar de la administración de líquidos, acompañada de alteraciones de órganos. Se produce cuando las toxinas del agente infeccioso y/o la liberación en la circulación de los mediadores de la inflamación producen una disfunción cardiovascular que culmina en la muerte.<sup>3, 5</sup>

A nivel mundial, se estima que entre 20 y 30 millones de pacientes son afectados por esta grave entidad. Cada hora, aproximadamente 1 000 personas y cada día alrededor de 24 000 pacientes mueren a causa de la sepsis en todo el mundo. A pesar de que representa más de 8 millones de vidas perdidas cada año, la sepsis es una de las enfermedades menos conocidas.<sup>4</sup>

### **2.5 Sepsis en pacientes pediátricos**

La población infantil es vulnerable debido a que su sistema inmunológico no se encuentra completamente desarrollado, así que la sepsis es una causa importante de morbilidad y mortalidad en ellos, además que por su rápida progresión hacia estados de inestabilidad hemodinámica y respiratoria requieren estancias prolongadas con costo elevado para el sistema de salud.

La sepsis neonatal es un síndrome clínico caracterizado por signos y síntomas de infección sistémica que se confirma al aislarse bacterias, hongos o virus en hemocultivos o cultivo de líquido cefalorraquídeo (LCR) y se manifiesta dentro de los primeros 28 días de vida.<sup>6</sup> Se puede clasificar según el tiempo de inicio de la enfermedad: sepsis temprana o EOS por sus siglas en inglés (early onset) y sepsis tardía, LOS por Late onset. La diferencia es debida principalmente a las

bacterias adquiridas antes y durante el parto para el caso de la EOS y para LOS son las bacterias adquiridas después del parto haciendo referencia a las del tipo nosocomial o fuentes de la comunidad. <sup>7</sup>

La etiología de esta enfermedad se debe a diferentes patógenos, pero difieren de acuerdo a los países ya que en los países del tercer mundo es causada principalmente por microorganismos Gram negativos como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella*, seguido de Gram positivos: *Streptococcus* del grupo B como *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* o estafilococos coagulasa negativos (ECN), *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*.<sup>7, 8</sup>

Dentro de las salas de los hospitales la presencia de objetos inanimados ya sean envases de jabones líquidos, antisépticos y medicamentos, la poca limpieza de las áreas y/o las manos de los trabajadores juegan un papel importante debido a que pueden fungir como una fuente de contaminación para los neonatos.

Cerca del 50% de los casos de sepsis neonatal tardía son debido a *Staphylococcus coagulasa negativa*<sup>8</sup>, los cuales son microorganismos comensales de la piel y su alta incidencia se debe a dispositivos invasivos como catéteres, prematurez y una estancia hospitalaria prolongada, por mencionar algunos.

En el mundo de medianos y bajos ingresos, la sepsis representa 60 a 80% de pérdida de vidas en la infancia, con más de 6 millones de recién nacidos y niños afectados por esta entidad anualmente. Es responsable de más de 100 000 casos de muertes maternas cada año y, en algunos países, es ahora la mayor amenaza durante el embarazo.<sup>6</sup>

Para el diagnóstico de sepsis son necesarios los siguientes elementos: historia clínica detallada del paciente, cultivos, estudios de gabinete e imagen y actualmente se ha propuesto el uso de biomarcadores entre ellos la Procalcitonina; el conjunto de ellos ayudará a los trabajadores de la salud a tener diagnósticos más certeros, ya que no se puede tratar por individual el resultado de

un estudio, además de un tratamiento oportuno con los medicamentos adecuados para estabilizar la salud del paciente.

## **2.6 Historia Clínica**

Es uno de los puntos más importantes debido a que ella permite organizar en forma racional y secuencial la información que se obtiene de un paciente para determinar un diagnóstico y registrar la evolución clínica.

Se compone de un interrogatorio donde se toman los datos generales, el registro del motivo de consulta y los síntomas que el paciente describe; un examen físico inicial que está constituido por la percepción sensorial del médico y sus elementos constitutivos siguen siendo la inspección (apreciación visual), la palpación, la percusión y la auscultación.<sup>9</sup>

Para el caso de los pacientes neonatos, el interrogatorio va dirigido a las madres o tutores, es crucial obtener toda la información sobre antecedentes heredofamiliares, los no patológicos (de donde son originarios, alimentación, desarrollo psicomotor, inmunizaciones), los antecedentes perinatales y patológicos que se refiere a información del desarrollo del embarazo y nacimiento.

## **2.7 Bacteriemias y Fungemias**

Se define como bacteriemia a la presencia de bacterias en la sangre, por otra parte, la fungemia se designa cuando el torrente sanguíneo se encuentra colonizado por hongos; y ambos se ponen de manifiesto por el aislamiento en los hemocultivos. Esto es debido a que se multiplican a un ritmo que supera la capacidad del sistema retículo endotelial para eliminarlos.<sup>10</sup>

Hay que recordar que la expresión de sepsis se emplea para denominar el síndrome clínico con el que habitualmente se manifiestan las bacteriemias o fungemias, independientemente del resultado de los hemocultivos.

Las bacteriemias pueden ser: <sup>11</sup>

-Transitorias: Son aquellas que tiene lugar tras la manipulación de tejidos infectados (cirugía, absceso) o la instrumentación de superficies mucosas (endoscopias, cistoscopias), cuya duración va de minutos a horas.

-Continuas: Es una característica de las infecciones endovasculares como la endocarditis.

-Intermitentes: Son típicas en infecciones cerradas como los abscesos intraabdominales; se resuelve y vuelve a recurrir.

## **2.8 Hemocultivos**

El hemocultivo es un análisis microbiológico que consiste en la inoculación de sangre de una venopunción única en un frasco con medio de cultivo especial. La obtención de dos a tres hemocultivos es necesaria tanto para mejorar la sensibilidad del diagnóstico, como para facilitar la interpretación de su significado clínico en caso de crecimiento positivo.<sup>12</sup>

La Norma Oficial Mexicana NOM-045-SSA2-2005, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones, apartado 6.9, nos refiere que para el diagnóstico de una bacteriemia en pacientes con menos de 48 horas de estancia hospitalaria sometidos a procedimientos diagnósticos invasivos o que reciben terapia intravascular, se debe considerar la presencia de fiebre, hipotermia o distermia con hemocultivo positivo. El desarrollo de bacterias Gram negativas, *Staphylococcus aureus* u hongos en un solo hemocultivo, es suficiente para considerar que se trata de una bacteriemia o fungemia, en el caso del aislamiento de un bacilo Gram positivo o estafilococo coagulasa negativa, se requerirán dos hemocultivos con desarrollo tomados en dos momentos y/o sitios diferentes para considerarlo una bacteriemia.<sup>13</sup>

Para la obtención de la muestra es necesario una previa asepsia de la piel para evitar la contaminación de los hemocultivos con microbiota saprófita de la piel. Se realiza con antisépticos cutáneos como compuestos yodados (tintura de yodo al 1-2% o povidona yodada al 10%) o con clorhexidina.<sup>10, 12</sup>

Los microorganismos que se consideran contaminantes son: *Staphylococcus* coagulasa negativa, *Corynebacterium spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Bacillus spp.*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus viridans* y otros que forman parte de la microbiota habitual de la piel, siempre que crezcan en una sola muestra de hemocultivos extraídos.<sup>12</sup>

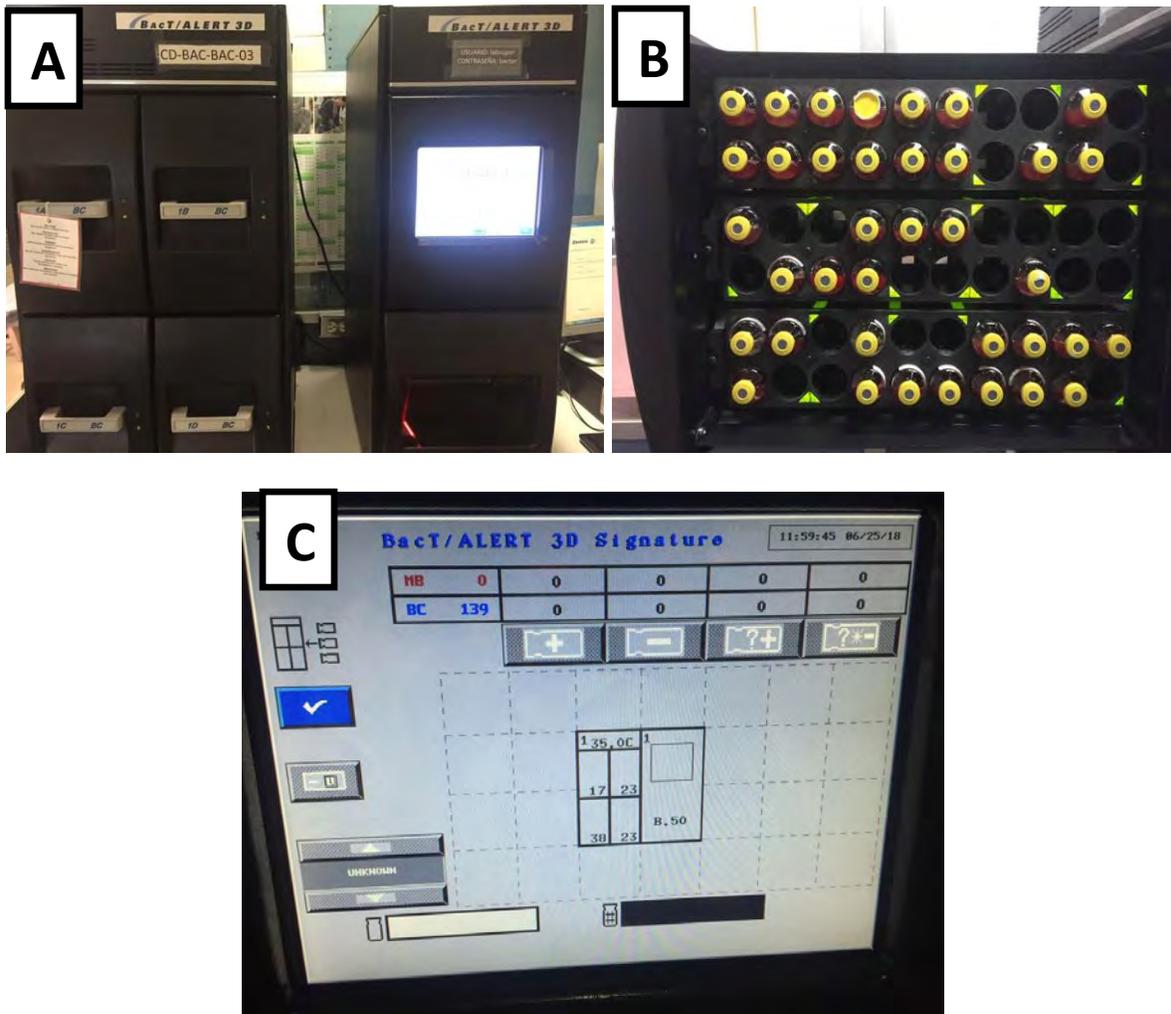
Además, es importante que al extraer las muestras sanguíneas se realice con guantes y antes de inocularlas en los frascos se saniticen los tapones de ellos.

Con respecto al volumen que debe inocularse depende de la persona, si es un adulto 10-20mL, para el caso de neonatos y niños se recomienda un volumen de 0.5 a 1.5mL por cada frasco; la literatura describe que a mayor volumen de sangre cultivada mayor porcentaje de bacteriemias/fungemias detectadas.<sup>12</sup>

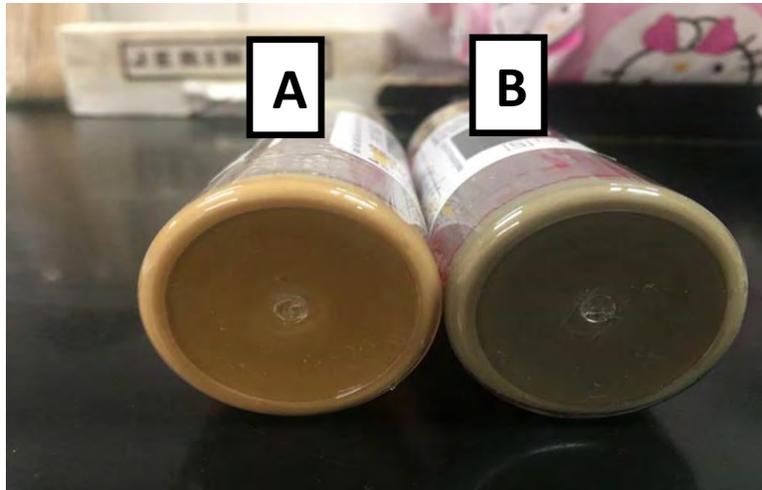
Actualmente existen frascos de hemocultivos que utilizan equipos automatizados de monitoreo continuo para la detección de crecimiento, pero anteriormente en los años 40's, en 1947, de acuerdo con la aportación del doctor Ruíz Castañeda, se introdujo un frasco con medio bifásico compuesto por una fase sólida y otra líquida.<sup>10</sup> Al inclinar el frasco, el medio líquido cubría totalmente el medio sólido, realizando un subcultivo en el mismo sin necesidad de abrir la botella. Este medio representó un avance significativo en el rendimiento de los aislamientos de *Brucella spp.*<sup>10</sup>

En la actualidad, en el Hospital Infantil de México se trabaja con el equipo automatizado de monitorización continua BacT/ALERT 3D®BioMérieux y el frasco de cultivo BacT/ALERT® PF Plus para la detección microbiana, el cual se basa en un sensor colorimétrico por sus siglas en inglés LES (Liquid Emulsion Sensor) de alta sensibilidad y la reflexión de la luz reflejada monitorea la presencia y producción de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) disuelto en el medio de cultivo, esto quiere decir que si hay microorganismos en la muestra se producirá CO<sub>2</sub> a medida que metabolizan los sustratos presentes en el medio de cultivo por lo que el color del sensor ubicado en el fondo del frasco es permeable al gas y el cambio que ocurre es del color verde a amarillo.<sup>14</sup>

El instrumento BacT/ALERT 3D®BioMérieux consiste de un módulo controlador y un módulo incubador con capacidad de simultáneamente incubar y detectar la presencia de los microorganismos en 240 muestras individuales. Una vez que la botella se introduce en él, los sensores colorimétricos son escaneados cada 10 minutos y una vez que el crecimiento es detectado, el sistema emite una alarma sonora y visual. <sup>14</sup>



**Figura 1.** Componentes del instrumento BacT/ALERT 3D®BioMérieux. **(A)** El instrumento BacT/ALERT 3D®bioMérieux. **(B)** Módulo incubador con frascos de hemocultivos. **(C)** Módulo controlador, pantalla de inicio del instrumento.



**Figura 2.** Frascos de hemocultivos BacT/ALERT®PF Plus inoculados con sangre

**(A)** hemocultivo positivo con fondo virado a color amarillo mostaza y

**(B)** hemocultivo negativo cuyo fondo es de color verde.

Es importante mencionar que, como cualquier prueba, se tienen ciertas limitaciones que a continuación se mencionan: <sup>14</sup>

- Es posible que determinados microorganismos exigentes raros no crezcan o crezcan lentamente en el medio de crecimiento del frasco, pero sin que produzcan suficiente dióxido de carbono para dar un resultado positivo.

- Determinadas cepas de *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae* pueden ser sensibles al anticoagulante polimetosulfonato sódico (SPS), lo cual puede causar la ausencia de crecimiento o una baja producción de CO<sub>2</sub> por estas cepas si se inocula una cantidad insuficiente de muestra en los frascos de cultivo.

- En raras ocasiones, si existe un número muy alto de leucocitos en la muestra el instrumento BacT/ALERT puede señalar un frasco de cultivo como positivo.

- Se debe extraer sin demora los frascos positivos cuando así sean clasificados por el instrumento BacT/ALERT para evitar la posibilidad de cultivos no viables debido a autólisis u otras razones, como es el caso de ciertas cepas de *Streptococcus pneumoniae*.

- Antes de la administración de antibióticos, lo ideal es hacer la toma de muestra pero en muchas ocasiones no es posible y es aquí cuando encontramos la limitación de que no se logra la neutralización de los antimicrobianos ceftazidima o cefepima.

### **2.8.1 Hemocultivos positivos**

En un laboratorio de microbiología o bacteriología clínica diagnóstica cuando un hemocultivo sea positivo se siembra en medios de cultivo para aislar el microorganismo, tinción de Gram y posteriormente se hace la identificación.

### **2.8.2 Medios de cultivo**

Son mezclas de agua y sustancias orgánicas y/o inorgánicas que contienen nutrientes necesarios para cultivar microorganismos.<sup>15, 16</sup>

Por su composición:<sup>16</sup>

- Sintéticos son aquellos que tienen una composición químicamente definida.
- Naturales o complejos, son medios cuya composición es químicamente desconocida ya que son elaborados como ingredientes de naturaleza compleja como extractos de tejidos animales, por mencionar.

Por su estado físico:<sup>16</sup>

- Líquidos: Conocidos como caldos, son útiles para hacer diluciones, homogenizar mezclas de microorganismos, enriquecer cultivos o para rehidratar cepas liofilizadas.
- Semisólidos son aquellos medios líquidos a los que se adiciona agar en concentraciones de 0.4 a 0.8% y son útiles para observar la movilidad de los microorganismos.
- Sólidos son medios que favorecen el crecimiento de colonias aisladas en las que es posible observar las características morfológicas diferenciando entre

microorganismos, también son usadas para pruebas de sensibilidad. La concentración del agente solidificante es de 1.5 a 2.0%.

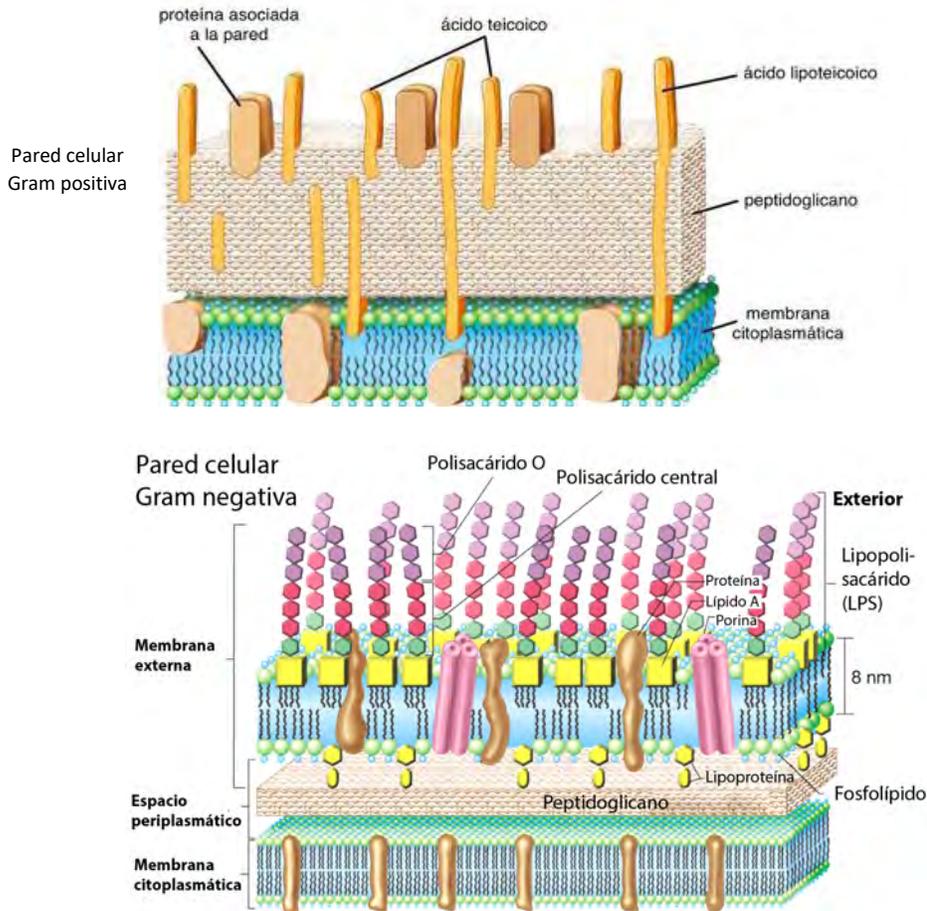
Por su aplicación: <sup>16</sup>

- Selectivos son medios que favorecen el desarrollo de un microorganismo específico e inhibe el crecimiento de otros. Como el agar Sabouraud cicloheximida.
- Enriquecimiento contienen componentes y condiciones que favorecen la multiplicación y crecimiento celular de un grupo de microorganismos, a su vez disminuye la velocidad de crecimiento de la biota acompañante, tal es el caso del caldo tetrionato bilis verde brillante que permite el desarrollo de bacterias entéricas, pero inhibe el desarrollo de la biota que lo acompaña.
- Enriquecidos son medios químicamente complejos que permiten el crecimiento de microorganismos heterótrofos exigentes como en agar sangre o agar nutritivo.
- Diferenciales, contienen sustancias nutritivas o indicadoras que permiten poner de manifiesto alguna actividad metabólica del microorganismo que es diferente a los demás. Ejemplo: Agar cromogénico para *Candida*.

### **2.8.3 Tinción de Gram**

Esta tinción fue desarrollada por el científico danés Hans Christian Gram en 1884<sup>15</sup>, es una tinción compuesta que utiliza dos colorantes (cristal violeta y safranina), clasificando a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas.

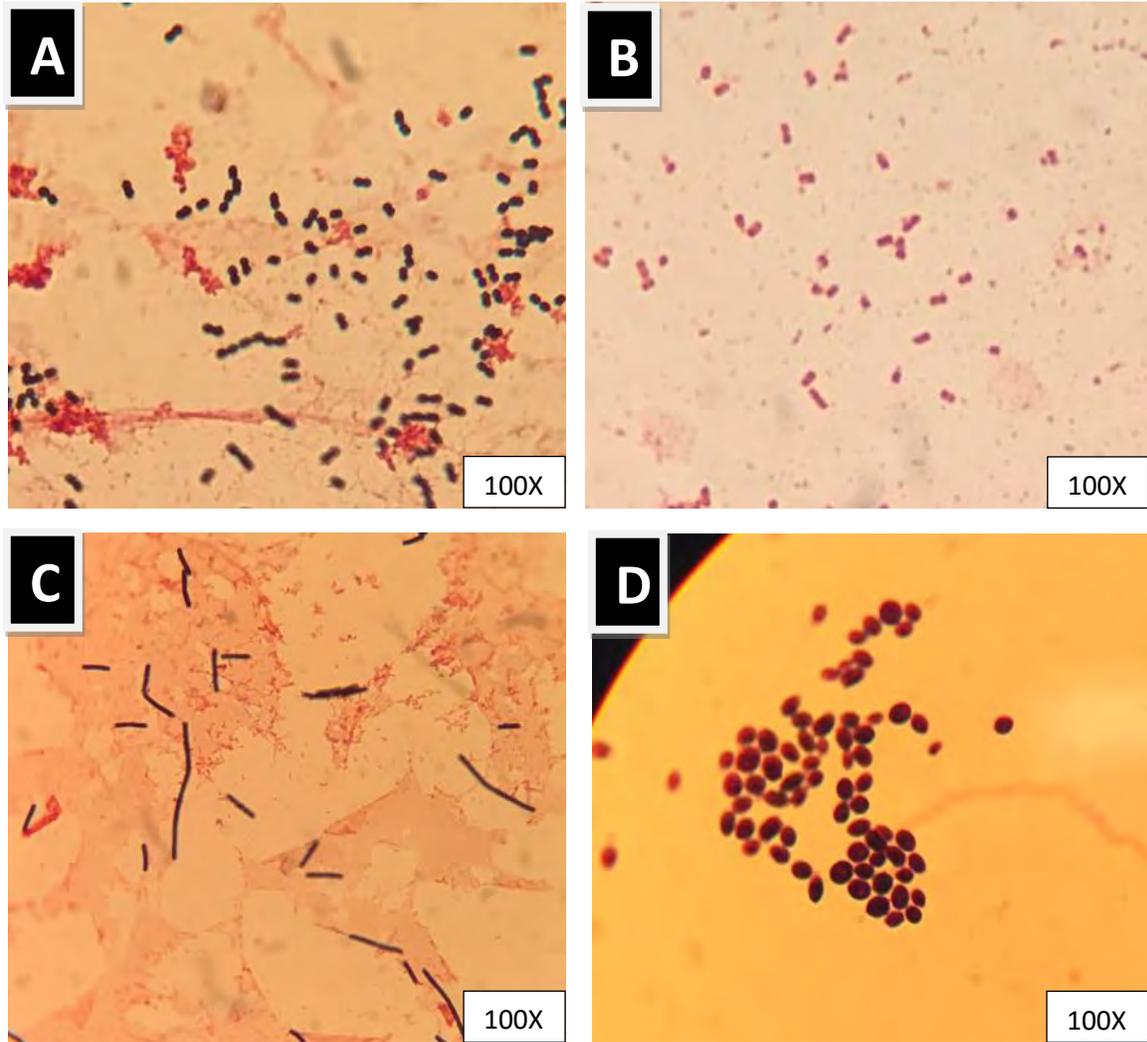
Su fundamento está basado en las características de la pared celular de las bacterias, ya que la pared celular de las bacterias Gram negativas está constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa, mientras que las bacterias Gram positivas poseen una pared gruesa constituida por peptidoglicano.<sup>15, 17</sup>



**Figura 3.** Pared celular de bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas.

Madigan MT, et. al., 2009<sup>17</sup>

La tinción de Gram utiliza como colorante primario el cristal violeta que tiene afinidad con el peptidoglicano de la pared bacteriana; posteriormente se coloca lugol que sirve como mordente e impide la salida del cristal violeta por la formación de un complejo cristal violeta-yodo que satura los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana. Se coloca una mezcla de alcohol-acetona que su función es deshidratar la pared bacteriana y cerrar los poros de la misma, también destruye la membrana externa de las bacterias Gram negativas debido a que ésta es soluble a la acción de solventes orgánicos. Por lo anterior, se agrega un colorante de contraste que puede ser safranina.<sup>15, 17</sup>



**Figura 4.** Bacterias y estructuras micóticas observadas por tinción de Gram en un microscopio óptico a 100x. **(A)** Se observan cocos Gram positivos. **(B)** Bacilos Gram negativos. **(C)** Bacilos largos Gram positivos. **(D)** Estructuras micóticas. Las anteriores imágenes fueron tomadas de los frotis de hemocultivos positivos en Laboratorio de Bacteriología del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

## **2.9 Identificación de los microorganismos**

Tradicionalmente la identificación bacteriana se ha basado en la utilización de características morfológicas y tintoriales que presentan los microorganismos en distintos medios de cultivo, así como en las reacciones bioquímicas, pero conlleva a una carga laboral que consume tiempo, impactando directamente en el estado de salud del paciente ya que se ha demostrado que existe un incremento de mortalidad del 7% por hora cuando existe un retraso en el inicio de antimicrobianos para aquellas personas que se encuentren en un estado séptico.<sup>18</sup>

Aunado a lo anterior, los métodos de identificación han evolucionado a partir de lo manual con tubos de medios de cultivo con pruebas bioquímicas básicas al uso de galerías de pruebas bioquímicas miniaturizadas, a esto, siguieron los métodos automatizados con el uso de tarjetas que disminuían notablemente el tiempo de identificación; sin embargo, actualmente se ha aplicado una nueva técnica para minimizar este tiempo: la espectrometría de masas.

### **2.9.1 Espectrómetro de masas VITEK MS**

La espectrometría de masas ha tomado importancia dentro del campo de diagnóstico clínico debido a la facilidad que tienen estos equipos en el manejo, la disminución de tiempo para la identificación de microorganismos y el uso de reactivos.

Es un método que determina la dimensión de una molécula mediante la medición de su masa con relación a su carga (relación masa/carga), así como la de los fragmentos generados a partir de ella. En 1912, fue desarrollado el primer espectrómetro de masas por J. J. Thomson que fue utilizado para el análisis de espectros de elementos como O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> y CO.<sup>18</sup> A partir de esto, la evolución de la espectrometría de masas ha sido importante hasta el punto de que, en 1975, Anhalt y Fenselau propusieran el uso de la espectrometría de masas para identificar bacterias a través de la detección de biomarcadores.<sup>19, 20</sup> Fue a finales de los 80's cuando que los ganadores del Premio Nobel de Química en el 2002:

John B. Fenn y el Ingeniero químico Koichi Tanaka<sup>19</sup> marcaron un punto de partida para el análisis de macromoléculas biológicas.

Con lo anterior, a finales de los años 90, se encontró que la aplicación de la espectrometría de masas en células bacterianas enteras producía un espectro de proteínas característicos y reproducibles que podían utilizarse para la identificación bacteriana a nivel de género y especie; lo que llevo al desarrollo de bibliotecas de espectros con cepas de referencia, integradas a programas informáticos con algoritmos de decisión, permitió la aplicación de la espectrometría de masas en el análisis de la composición proteínica de los microorganismos de manera rutinaria en los laboratorios de microbiología con alto grado de precisión, ya que estas proteínas, en su mayoría de origen ribosómico en el rango de masas de 2-20 kDa, así como sus variaciones, generan espectros de masas que son específicos de género y especie.<sup>18, 20</sup>

Así que llegamos a la era del MALDI-TOF que en inglés es matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry, en español: desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo <sup>19, 20, 21</sup>.

El fundamento del MALDI-TOF MS tiene tres elementos principales: la fuente de ionización para transferir iones a las moléculas de la muestra en una fase gaseosa, el analizador de masas que separa los iones de acuerdo con su relación m/z y el detector para monitorizar los iones separados.<sup>21, 22</sup>

La fuente de ionización es un láser ultravioleta con longitud de onda de 337nm, que produce la desorción-ionización de la muestra con ayuda de una matriz orgánica, la cual es el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-trans-cinámico (HCCA). Para ello, la muestra a analizar se mezcla con la matriz orgánica fotosensible, se deposita sobre una placa metálica y se deja secar al aire unos minutos.<sup>20, 21</sup> La finalidad de la matriz es absorber y después transmitir la energía del láser a la muestra, facilitando su ionización, es decir, que primero expone las proteínas intracelulares mediante la ruptura de la membrana celular y segundo, facilita la vaporización y la ionización de las proteínas mediante un haz de laser pulsante.<sup>19, 22</sup>

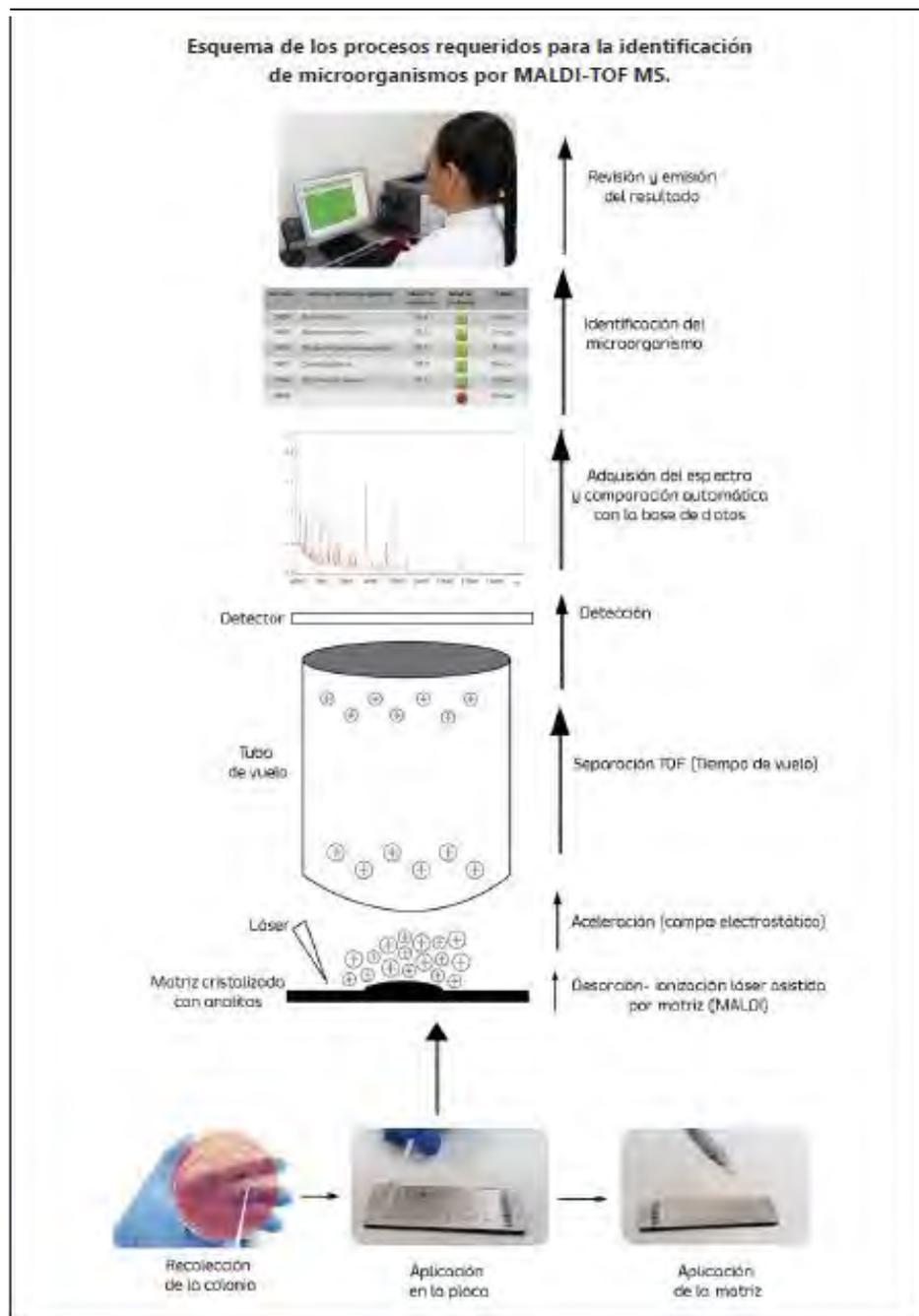
La interacción entre los fotones de las moléculas de láser y de la matriz, causado por la absorción de la energía del haz, desencadena una sublimación de la matriz en una fase gaseosa y enseguida la ionización de la muestra del microorganismo con mínima fragmentación, lo que se conoce como ionización suave.<sup>20</sup> Tras la ionización, los iones generados se aceleran mediante la aplicación de un campo eléctrico y pasan por un analizador. El analizador tipo TOF separa los iones procedentes de la muestra en relación con su razón masa/carga ( $m/z$ ). Esto determina el tiempo que tarda un ión en alcanzar el detector (tiempo vuelo)<sup>22</sup>, así que los iones más pequeños vuelan más rápido y alcanzan el detector antes en comparación con los iones de mayor masa; finalmente, cuando los iones impacten contra el detector, que su función es recoger toda la información necesaria para generar un espectro de masas de cada compuesto analizado, esto también se le conoce como huella digital de la masa de los péptidos (peptide mass fingerprinting).<sup>21, 22</sup>

El MALDI-TOF MS utiliza el cálculo de tiempo de migración (tiempo de vuelo) de cada fragmento de una molécula a través de un trayecto predeterminado previa desorción/ionización láser de la molécula en una matriz determinada. Este espectrómetro tiene la capacidad de medir macromoléculas de hasta 100.000 Dalton, dentro de las cuales están los péptidos y proteínas que forman parte de hongos y bacterias. Dado que un microorganismo analizado en el MALDI-TOF MS entregará siempre el mismo espectro de masas, los fabricantes de los sistemas MALDI-TOF MS han diseñado archivos con los espectros de masas de la fragmentación de péptidos y proteínas que presentan los distintos microorganismos para una misma emisión del láser y una misma distancia de migración.<sup>19, 20, 21, 22</sup>

La identificación se realiza a través de la comparación (correlación) del resultado de una bacteria con todos los espectros de masas que contiene el archivo comercial proporcionado por el fabricante.<sup>21, 22</sup>



**Figura 5.** Proceso de trabajo dentro del MALDI-TOF MS de acuerdo a VITEK-MS de la casa comercial BioMérieux.<sup>23</sup>



**Figura 6.** Flujo de trabajo para la identificación del microorganismo a partir de una colonia aislada en medio de cultivo hasta la emisión del resultado del género y especie. N. Maldonado, et al<sup>19</sup>.

## **2.10 Procalcitonina**

Como se ha mencionado, el uso de biomarcadores para complementar el diagnóstico de sepsis ha tenido un auge muy importante en los últimos años, dándose a conocer la Procalcitonina (PCT).

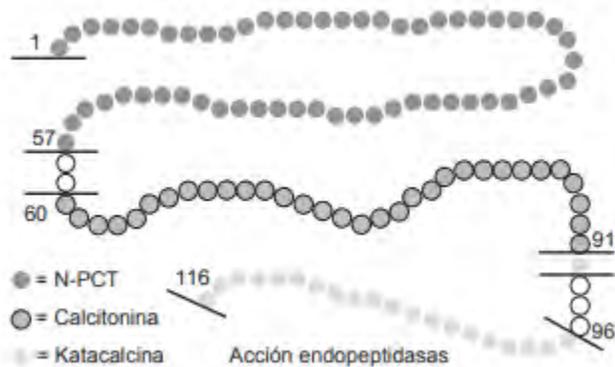
### **2.10.1 Historia de la PCT**

En 1975, Moya, F y colaboradores sugirieron la existencia de un precursor de la calcitonina, basándose en experimentos realizados en pollo y deciden nombrar a la molécula como procalcitonina<sup>24</sup>; posteriormente, gracias al grupo de investigación de Assicot en 1993, se describe el papel de la PCT en condiciones inflamatorias ya que observaron una elevación de la misma de 3 a 4 horas después de una inyección de endotoxina, alcanzando un máximo 24 horas después.<sup>24</sup>

### **2.10.2 Biología de la PCT**

La PCT corresponde a un grupo de proteínas relacionadas con el gen de la calcitonina (CGRP) I y II, que son catalogados como precursores de calcitonina; es una proteína de 116 aminoácidos, con peso molecular de 13 kDa. Después de la transcripción del gen CALC-1, el RNA mensajero codifica una proteína de 16 kDa y 141 aminoácidos llamada preprocalcitonina, la cual comprende una secuencia de señalización que al ser separada de la molécula en el retículo endoplásmico da origen a la PCT. La PCT es precursor de tres moléculas distintas: calcitonina (32 aminoácidos), katalcina (segmento carboxi-terminal de PCT, 21 aminoácidos), y aminoprocalcitonina (aminoterminal, 57 aminoácidos). Estas moléculas son resultado de un proceso proteolítico intracelular, llevado a cabo por la enzima prohormona convertasa en las células C de la tiroides en condiciones metabólicas normales. Además, estas moléculas se encuentran en las células neuroendocrinas de pulmón y páncreas. En individuos sanos los niveles de procalcitonina son indetectables. La PCT se degrada por proteasas específicas y tiene una vida

media de 25 a 30 horas. No se ha establecido una vía específica de eliminación de PCT.<sup>26, 27</sup>



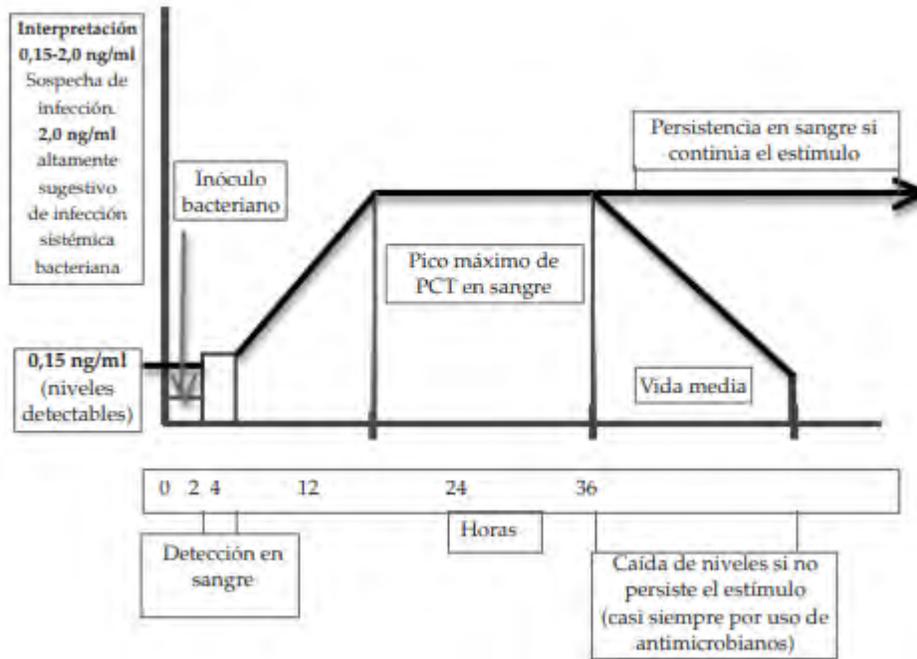
**Figura 7.** Estructura molecular de la Procalcitonina. Morales-Muñoz, et. al, 2006.<sup>28</sup>

### 2.10.3 PCT en la sepsis

La síntesis de PCT puede ser inducida por una gran variedad de estímulos como las endotoxinas bacterianas, citocinas proinflamatorias, situaciones clínicas no infecciosas como eventos quirúrgicos mayores, pacientes con quemaduras, pancreatitis, cirrosis, trauma múltiple e infarto agudo del miocardio, pero son las endotoxinas bacterianas, principalmente los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gramnegativas, el mayor estímulo para su producción.<sup>3, 25</sup>

Lo anterior se debe al proceso de inflamación resultado de la respuesta a las endotoxinas o a los mediadores inducidos principalmente por las infecciones bacterianas como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 inducen procesos de fosforilación, inhibiendo la proteólisis de la procalcitonina por lo que no se elevan los niveles de calcitonina. Después de este estímulo aparece en la sangre tres a seis horas después con un máximo de ocho horas y una meseta de 24 a 30 horas, que se mantiene hasta por 72 horas. Tiene una vida media de 20 a 24 horas y una alta estabilidad en suero o plasma con una disminución de aproximadamente 12% a

temperatura ambiente y 6% a 4°C en las primeras 24 horas después de recolectada la muestra.<sup>29, 30</sup>



**Figura 8.** Comportamiento de los niveles séricos de la PCT en sangre ante un estímulo infeccioso sistémico. Reyna-Figueroa, J. et.al. (2015).<sup>29</sup>

Durante la sepsis, hay un aumento en la expresión del gen CALC-1 que causa un aumento de PCT y sus niveles persisten durante periodos de tiempo relativamente largos que se correlacionan con la severidad de ella y la mortalidad.<sup>31</sup>

Con el paso del tiempo se han establecido valores de referencia de la concentración de procalcitonina. A continuación, se muestran:

**Tabla 1.** Puntos de corte de PCT para el diagnóstico de sepsis. Carrillo-Esper, 2013.<sup>25</sup>

<b>Niveles de PCT</b>	<b>Interpretación</b>
<b>&lt;0.5ng/mL</b>	Individuos sanos, procesos inflamatorios crónicos, infecciones víricas e infecciones bacterianas localizadas. La presencia de sepsis, sepsis grave o choque séptico son improbables.
<b>0.5-2 ng/mL</b>	Infecciones víricas e infecciones bacterianas localizadas. El riesgo de sepsis grave o choque séptico son bajos.
<b>2-10 ng/mL</b>	Infección bacteriana sistémica (sepsis) muy probable. Se aconseja iniciar tratamiento con antibióticos.
<b>&gt;10 ng/mL</b>	Sepsis grave o choque séptico muy probables, existe riesgo de desarrollar fallo multiorgánico. Es necesario iniciar tratamiento específico.

Existen varias técnicas para su medición en plasma o suero, la mayoría ensayos inmunoluminométricos semicuantitativos, que detectan valores desde 0.06 ng/ml y pruebas de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), con resultados disponibles entre 1 y 2 horas. Es una molécula estable, cualidad importante en un biomarcador, ya que permanece estable durante las preparaciones de medición y se mantiene por largos periodos de almacenamiento.<sup>29</sup>

La PCT es medida mediante un ensayo inmunoluminométrico, el cual utiliza dos anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes epítopes de la molécula: uno dirigido contra los residuos 96-106 de PCT (el anticuerpo de captura) y otro dirigido contra los residuos 70-76 de PCT (anticuerpo trazador), el cual fue registrado por BRAHMS (Berlín) desde 1996.<sup>26</sup>

#### **2.10.4 Prueba de la PCT**

El Hospital Infantil de México cuenta con un equipo llamado MINIVIDAS®B·R·A·H·M·S PCT™ de la casa comercial BioMérieux SA (Figura 9 A), es una prueba automatizada para la valoración de la procalcitonina humana en

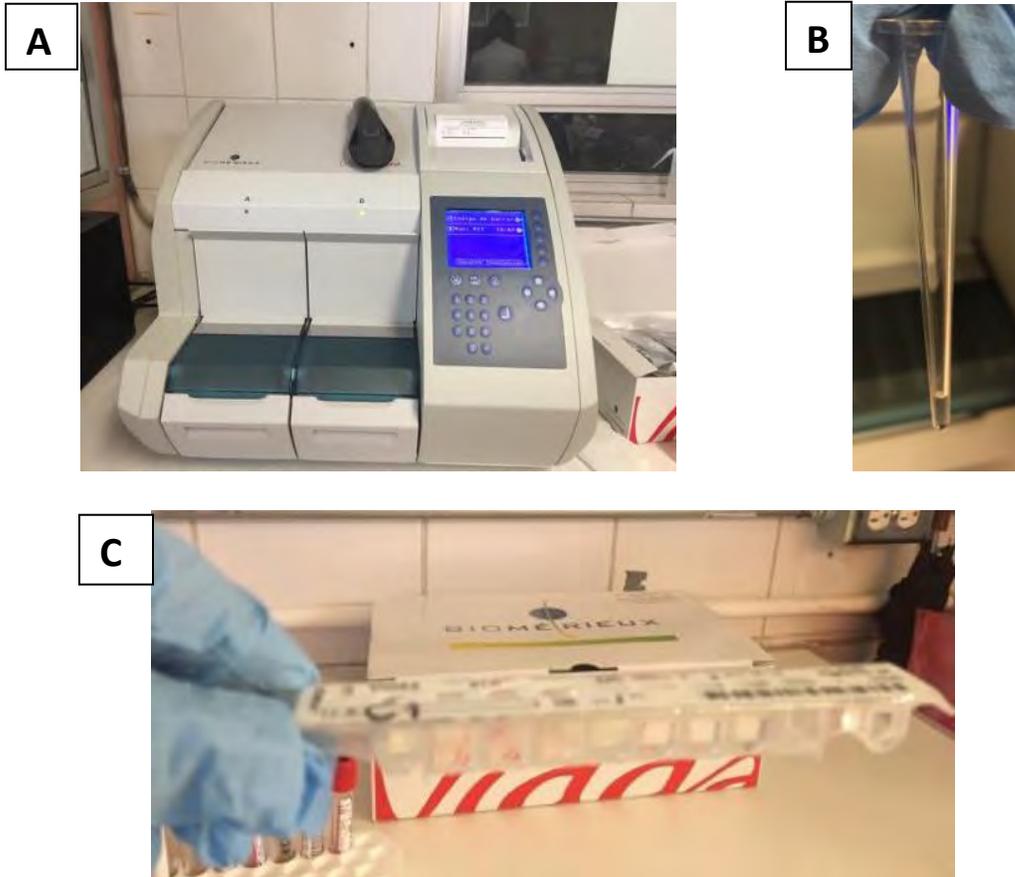
suero humano o plasma (heparina de litio) mediante el uso de la técnica Enzyme-Linked Fluorescent Assay (ELFA).<sup>32</sup>

Como ya se mencionó anteriormente, el ensayo combina el método de un enzimoimmunoensayo tipo sándwich en un solo paso con una detección final por fluorescencia (ELFA).<sup>32</sup>

Se compone por un cono (SPR®: Solid Phase Receptable) que sirve a la vez de fase sólida y de sistema de pipeteo; este cono está sensibilizado y recubierto en su interior con inmunoglobulina monoclonal de ratón anti-procalcitonina.<sup>32</sup> (Figura 9 B)

Al utilizar un equipo automatizado nos referimos a que realiza todas las etapas del ensayo; así que la muestra de suero se transfiere a los pocillos que contienen anticuerpos anti-procalcitonina marcados con fosfatasa alcalina (conjugado) (Figura 9 C). Se procesa la mezcla de la muestra/conjugado por una sucesión de ciclos de aspiración/expulsión en el cono varias veces, esto permite que se fije el antígeno a la inmunoglobulina adherida en la pared interior del cono y el conjugado hasta formar un “sándwich”. Durante cada etapa, el sustrato (4-Metil-umbeliferilfosfato) es aspirado y expulsado del cono; después, la enzima del conjugado cataliza la hidrólisis del sustrato en un producto fluorescente (4-Metil-umbeliferona). La intensidad de fluorescencia se mide a 450nm.<sup>32</sup>

Las limitaciones de la prueba es la existencia de interferencias con determinadas muestras que contengan anticuerpos dirigidos contra los componentes del reactivo y por tal, se debe interpretar los resultados de la determinación teniendo en cuenta la historia clínica del paciente, así como los resultados de otras pruebas que se hayan realizado.<sup>32</sup>



**Figura 9.** Equipo MINIVIDAS@B·R·A·H·M·S PCT™ y componentes.

**(A)** Equipo MINIVIDAS@B·R·A·H·M·S PCT™ de la casa comercial BioMérieux SA.

**(B)** Cono SPR®: Solid Phase Receptable. **(C)** Tira con pocillos.

### 3. ANTECEDENTES

El Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) es un hospital de tercer nivel que debido al gran desarrollo que ha tenido a través de los años es ubicado como líder y el primer centro de referencia nacional para el diagnóstico, atención y tratamiento de enfermedades, es por ello que recibe a niños de diferentes entidades destacándose las zonas conurbadas de la Ciudad de México, estados como de México, Hidalgo, Veracruz, Guerrero y Oaxaca con un promedio anual cercano a los 153 mil<sup>33</sup>.

En el HIMFG durante el año 2017 se recibieron en el Laboratorio de Bacteriología del Laboratorio Clínico un total de 10140 hemocultivos y mielocultivos (Figura 10) de los cuales 1242 fueron positivos y 8898 fueron negativos a los 5 días de incubación (Figura 11). Respecto al grupo de los positivos: 797 (64.17%) fueron hemocultivos Periféricos, 401 (32.29%) hemocultivos Centrales, 37 (2.98%) hemocultivos sin origen y 7 (0.56%) mielocultivos (Figura 12); estos datos fueron recabados del Registro diario de cultivos de sangre, médula ósea y células progenitoras hematopoyéticas HIM-LC-BAC-PR.08-IT.01-RE-02.

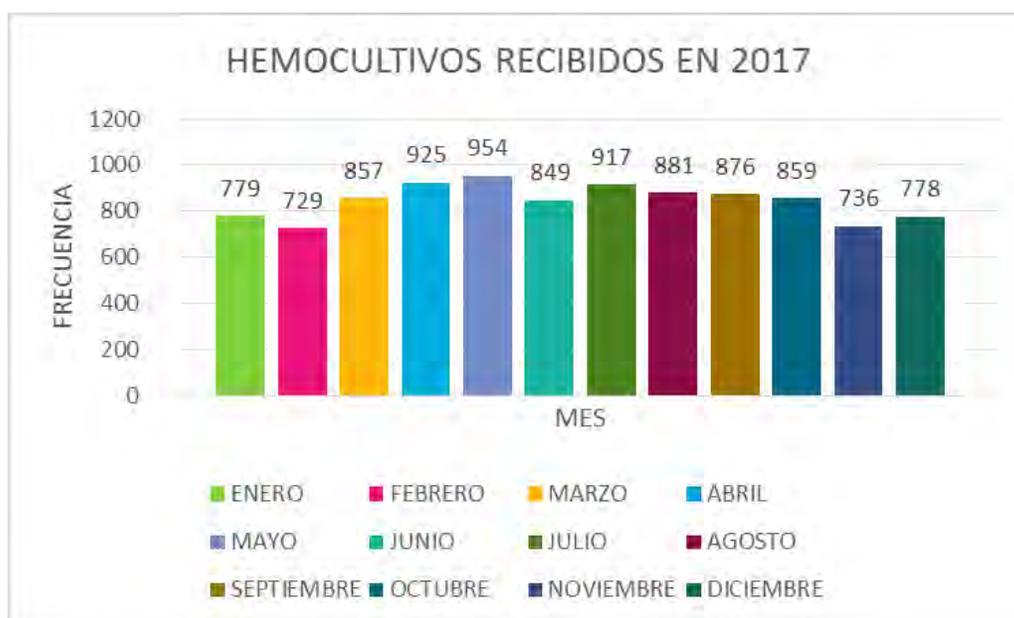
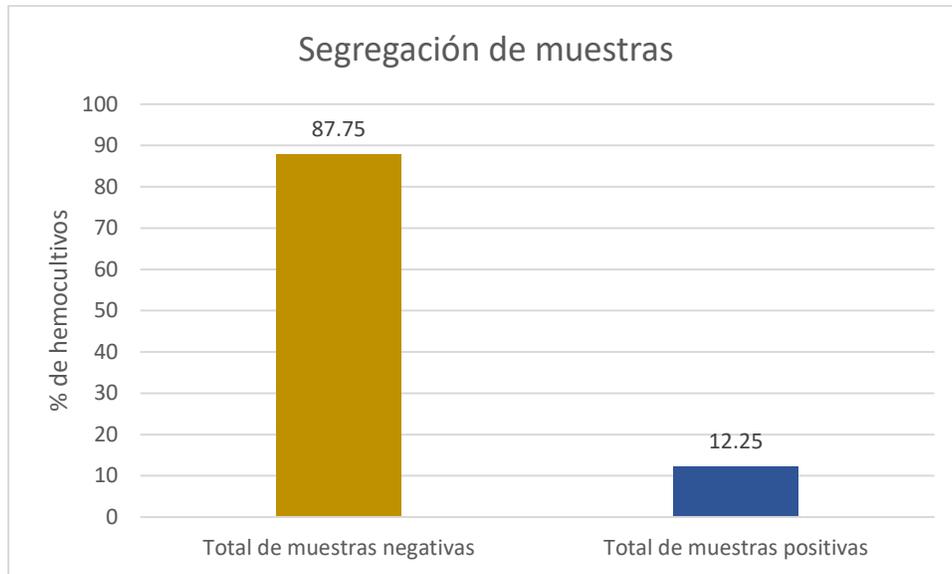
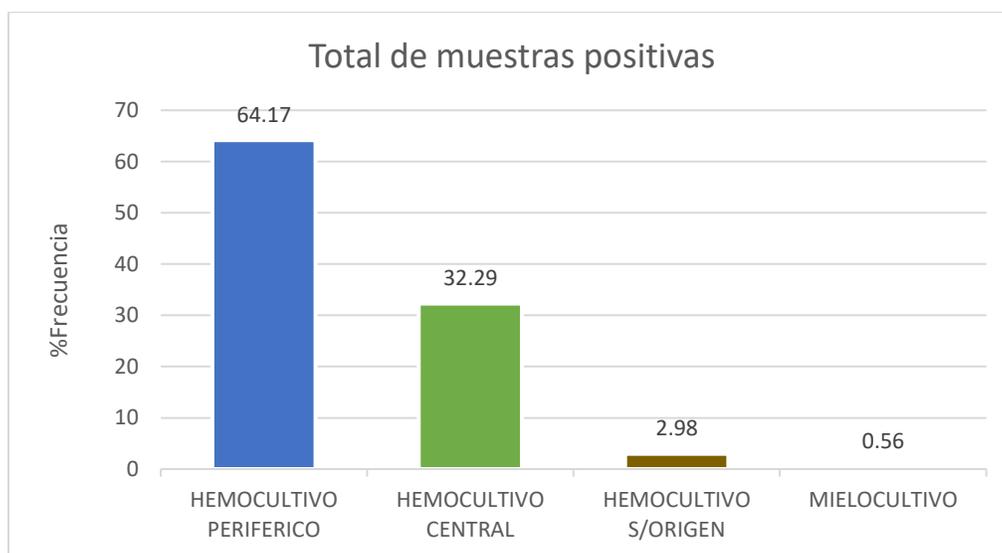


Figura 10. Total de muestras recibidas por mes en el año 2017.

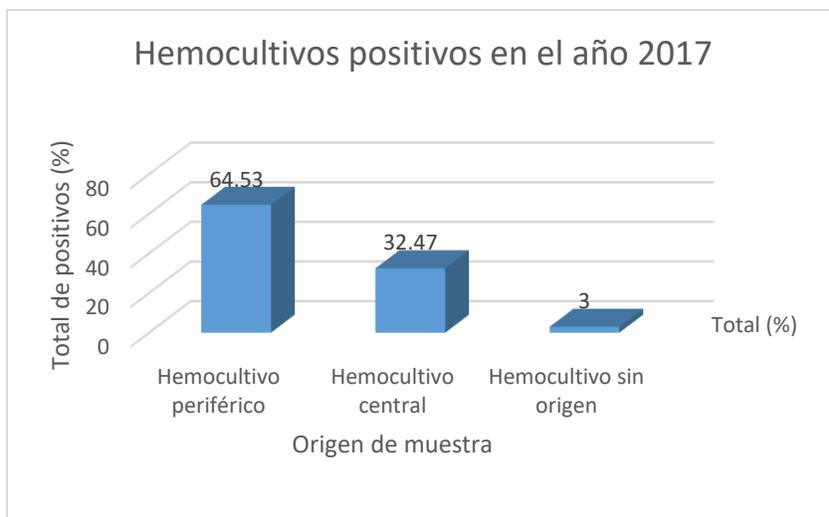


**Figura 11.** Segregación de muestras positivas y negativas a los cinco días de incubación.



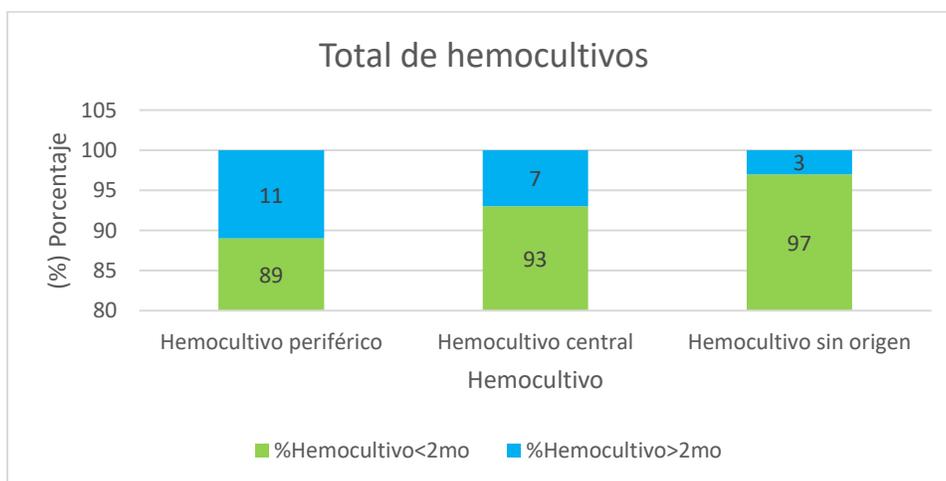
**Figura 12.** Distribución de las muestras positivas de acuerdo a su origen. Año 2017.

Así que, en el año 2017, 1235 hemocultivos fueron positivos (Figura 13): 64.53% pertenece a los periféricos, 32.47% a los centrales y 3% al grupo de hemocultivos sin datos de origen indicado.



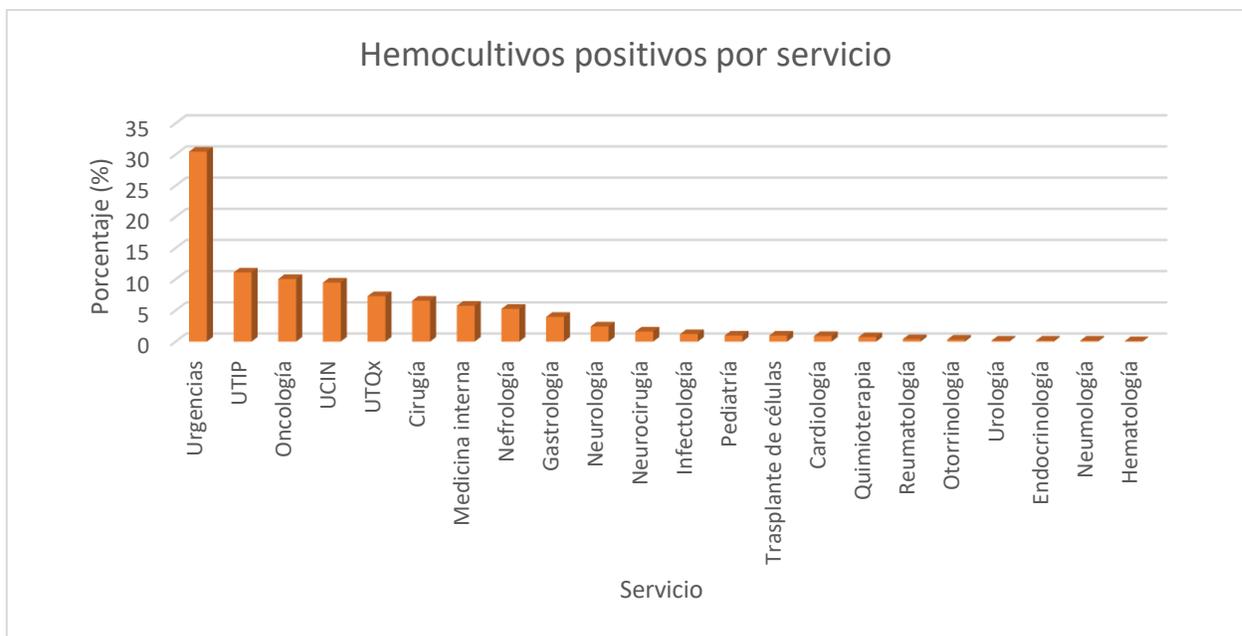
**Figura 13.** Total de hemocultivos positivos en 2017.

Se revisó si se identificaron uno o más microorganismos, en el caso de los Hemocultivos Periféricos el 89% fueron del tipo monomicrobiano mientras que el restante pertenece a una identificación polimicrobiana; para el caso de hemocultivos centrales en el 93% se identificó un solo tipo de microorganismo y el 7% restante resultó con identificación de 2 o más tipos de microorganismos. También, en los hemocultivos sin datos de origen el 97% son monomicrobianos y el resto tuvo 2 o más microorganismos (Figura 14).



**Figura 14.** Comparación en porcentaje de los hemocultivos monomicrobianos y con más de dos microorganismos. (<2mo)= menos de dos microorganismos, (>2mo)= más de dos microorganismos.

En el recuento de hemocultivos positivos por servicio se obtuvieron los siguientes datos: Urgencias 30.45%, Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP) 11.09%, Oncología 10.04%, Unidad de cuidados intensivos (UCIN) 9.47%, Unidad de Terapia Quirúrgica (UTQx) 7.29%, Cirugía 6.40%, Medicina interna 5.75%, Nefrología 5.26%, Gastroenterología 3.97%, Neurología 2.43%, Neurocirugía 1.62%, Infectología 1.21%, Pediatría 0.97%, Unidad de Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas 0.97%, Cardiología 0.89%, Quimioterapia 0.73%, Otorrinolaringología 0.32%, Urología 0.16%, Endocrinología 0.16%, Neumología 0.16% y Hematología 0.08% (Figura 15).



**Figura 15.** Hemocultivos positivos de acuerdo al servicio.

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En México, ha aumentado la incidencia de pacientes con sepsis en los últimos años y se calcula que ocurren más de 40,000 casos por año, con un índice de mortalidad del 30%.<sup>33</sup>

En la población infantil, donde se incluyen los lactantes y adolescentes, en el mundo cada año se presentan cuatro millones de muertes neonatales y 35% son debidas a procesos infecciosos<sup>34</sup>.

La sepsis puede ser causada por bacterias Gram negativas, Gram positivas y hongos. En nuestro país, la sepsis bacteriana es la segunda causa de muerte (12.3%) en neonatos.<sup>34</sup> Su diagnóstico tradicional incluye técnicas de cultivo y la clasificación de los síntomas, pero con frecuencia puede suceder que se presente la sintomatología en ausencia de un cultivo positivo, además el diagnóstico de bacteriemia se basa en el subcultivo en medios para una incubación de 18 a 24 horas, esto seguido por pruebas bioquímicas convencionales o ensayos automatizados. Si no hay una acción rápida y eficiente pone en riesgo la vida del paciente.

La tecnología MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry), ha innovado a los laboratorios de diagnóstico clínico debido a la eficiencia y rapidez con la que arroja un resultado (género y especie) además de su confiabilidad; cualidades que se pueden aprovechar, implementando procesos que disminuyan el tiempo de identificación por lo que han surgido inquietudes y métodos de cómo hacerlo, el procedimiento que se ha propuesto es la identificación microbiana directa de botellas de hemocultivos positivos.

Así mismo, para la complementación de los estudios de identificación microbiana rutinarios se sugiere incluir los biomarcadores como la procalcitonina, con el objetivo de enriquecer un diagnóstico oportuno que reduzca la mortalidad de los pacientes, así como los costos de salud mediante disminución de días de estancia hospitalaria y la administración de tratamientos farmacéuticos adecuados.

Con toda la información obtenida del análisis previo y considerando que existe un incremento de mortalidad del 7% por hora cuando hay un retraso en el inicio de antimicrobianos<sup>18</sup>, se justifica implementar un método que pueda hacer una mejora en la identificación rápida de los microorganismos causantes de bacteriemias en un tiempo de alrededor de 2 horas después de la detección de un hemocultivo positivo, aprovechando la tecnología tan innovadora como lo es la espectrometría de masas, lo que favorecería la atención del paciente, ya que el laboratorio le daría herramientas inmediatas al médico quien valoraría rápidamente si el resultado es compatible con los signos, síntomas y otros estudios, incrementando la asertividad del diagnóstico con los resultados de la determinación de procalcitonina en suero y con ello se podría implementar el uso racional específico y dirigido de antimicrobianos y otros medicamentos.

## **5. HIPÓTESIS**

Si se logra estandarizar una metodología sencilla, eficiente y de bajo costo para hacer identificaciones microbianas rápidas a partir de hemocultivos positivos directos entonces se contará con una herramienta que será útil para disminuir el tiempo de diagnóstico y terapia oportuna, así como un adecuado monitoreo de la sepsis.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 OBJETIVO GENERAL**

Estandarizar una metodología a partir de hemocultivos positivos directos para el diagnóstico rápido de sepsis en pacientes pediátricos, que permita disminuir el tiempo para la identificación de microorganismos mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).

### **6.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Comparar dos técnicas de lisis para seleccionar la de mayor utilidad, en la identificación microbiana, a partir de hemocultivos positivos directos.
- Analizar el tiempo que tarda la identificación utilizando esta metodología en comparación con la metodología por inoculación en placa.
- Determinar los niveles de PCT sérica en sueros de pacientes con hemocultivo positivo.

## **7. DISEÑO**

Se trata de un diseño observacional, descriptivo y analítico

## **8. CRITERIOS DE SELECCIÓN**

### **8.1 Criterios de inclusión**

-Todos los Hemocultivos que resultaron positivos durante el turno matutino del laboratorio de Bacteriología del HIMFG. (8:00-14:00 horas).

-Hemocultivos positivos sembrados en los agares durante la madrugada, sin un crecimiento durante la lectura de placas en el turno matutino.

-Todos los sueros de pacientes con hemocultivo positivo incluidos en el estudio, y que la toma de muestra sanguínea corresponda al mismo día del hemocultivo.

### **8.2 Criterios de exclusión**

-Hemocultivos cuya positividad se presente en la madrugada y sus resiembras en las placas con medios de cultivo se observe crecimiento.

-Falsos positivos.

**Población del estudio:** Se incluyeron pacientes recién nacidos (R/N) hasta adolescentes, es decir, de 0-18 años de edad, de todos los servicios del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), con sospecha de sepsis.

## 9. MATERIAL

### 9.1 AISLAMIENTO BACTERIANO EN SANGRE

- Frascos de hemocultivo BacT/ALERT®PF Plus contiene 30mL de medio complejo y 1.6g de perlas poliméricas adsorbentes. Dicho medio está compuesto por peptona de caseína (1.0%p/v), extracto de levadura (0.45% p/v), peptona de soya (0.3% p/v), peptona de carne (0.1% p/v), polimetolsulfonato sódico (SPS) (0.083% p/v), menadiona (0.00005% p/v), L-cisteína (0.003% p/v), ácido pirúvico (0.1% p/v), clorhidrato de piridoxina (0.001% p/v), ácido nicotínico (0.0002% p/v), ácido pantoténico (0.0002% p/v), clorhidrato de tiamina (0.0001% p/v) y otros sustratos de carbohidratos y aminoácidos complejos en agua purificada; inoculados con sangre de paciente con sospecha de sepsis
- Equipo Automático de Monitorización continua BacT/ALERT 3D®BioMérieux
- Medios de cultivo: Agar Sangre, Chocolate y MacConckey
- Estufa de incubación de aerobiosis 35°C±2°C.
- Estufa de incubación al 10% de CO<sub>2</sub> / 90% aire.
- Espectrómetro de masas Vitek MS® BioMérieux con aditamentos: VITEK®MS-CHA (matriz), VITEK®MS-FA (ácido fórmico), cepa control para pocillo control: LyfoCults Plus *Escherichia coli* ATCC 8739, palillos de madera estériles, VITEK®MS-DS: portaobjetos y Lámpara de luz visible.
- Microscopio óptico
- Colorantes para tinción de Gram y aceite de inmersión
- Portaobjetos
- Mechero
- Tubos falcon de 15mL con tapón, estériles
- Tubos con gel separador 5mL BD Vacutainer SST™ REF368159
- Jeringas de 1mL y 10mL
- Adaptador para frasco de hemocultivo y agujas
- Centrífuga

- Pipetas Pasteur estériles
- Micropipetas de 0.5  $\mu$ L y 1 $\mu$ L y puntas estériles
- Vórtex
- Detergente AXION®Colgate-Palmolive: agua, alquil sulfonato de sodio<10%, C12-14alcoholEO<10%, alquil sulfonato de magnesio<10%, óxidos de amina<10%, alquil sulfonato de trietanolamina<10%, etanol, perfume, EDTA tetrasódico, colorantes, preservante.
- Agua estéril
- Cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) al 0.8%
- N-acetil-L-cisteína (sal)

## **9.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN SÉRICA DE PCT**

- Tiras y conos PCT®BioMérieux
- Equipo MINI-VIDAS®BioMérieux
- Centrífuga
- Sangre por venopunción
- Micropipeta 200  $\mu$ L y puntas estériles
- Guantes de nitrilo

## **10. METODOLOGÍA**

### **10.1 Método por inoculación en placa.**

- ❖ El equipo BacT/ALERT3D emitió una señal auditiva y visual en el momento en que se detectó un vire al fondo del frasco que contiene la muestra de sangre, dicho frasco se retiró del equipo y se obtuvo el dato del tiempo de detección que es el tiempo transcurrido a partir del momento en que se introdujo el frasco al equipo hasta que suene la alarma al detectar el vire del indicador del frasco.
- ❖ La muestra del frasco se inoculó en tres medios de cultivo: agar sangre, agar MacConkey y agar Chocolate.
- ❖ Se incubó a  $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  de 24-48 horas. Como condición adicional para el agar Chocolate una incubación al 10%  $\text{CO}_2$ ; además, se hizo un frotis para teñir por tinción de Gram.
- ❖ Una vez terminado el tiempo de incubación, se observaron las placas para determinar si el crecimiento es monomicrobiano o polimicrobiano, en el último caso se debió realizar una resiembra para poder separar los morfotipos coloniales.
- ❖ Se hizo la identificación microbiana por espectrometría de masas VITEK-MS (MALDI-TOF).

### **10.2 Experimentos previos a estandarizar técnicas**

#### **10.2.1 Control de funcionalidad y esterilidad**

Para la funcionalidad de los frascos BacT/ALERT PF se procedió de acuerdo a la “Instrucción de trabajo para el control de calidad de frascos para cultivo de líquidos corporales” conforme a la información documental referente a la Gestión de Calidad del laboratorio de bacteriología del HIMFG.

Previamente y durante el desarrollo del experimento (cada semana), fue sembrado en Agar sangre por estría el detergente AXION, para comprobar su esterilidad, al igual que las soluciones de agua estéril, Buffer 3 (agua estéril + 0.1 g de N-acetil-

L-cisteína), la solución de NH<sub>4</sub>Cl incubándose a 35°C±2°C por 24 horas. Además, tanto la solución que contiene cisteína como el cloruro de amonio fueron inoculadas en frascos BacT/ALERT PF PLUS con el lote 3049399 que ya había sido sometido a control de calidad.

### **10.3 Técnica de lisis con detergente**

Con base a lo referido en la literatura de Arnold Foster<sup>35</sup> se realizaron los siguientes experimentos:

#### **10.3.1 Preparación de N-acetil-L-cisteína**

- ❖ Se pesaron 0.5 g de N-acetil-L-cisteína (sal)
- ❖ La cantidad pesada, se disolvió en 500 mL de agua estéril.

#### **10.3.2 Procedimiento**

- ❖ Del caldo de hemocultivo positivo se extrajeron 7mL y se adicionó el Buffer 1 (2.5 mL agua estéril + 0.5 mL detergente AXION Colgate-Palmolive).
- ❖ Se centrifugó a 50 rpm x 3min; se desechó sobrenadante y resuspendió el sedimento.
- ❖ Se lavó con Buffer 2 (9.5 mL agua estéril + 0.5mL detergente AXION) y centrifugó a 50 rpm x 3 min. Se desechó el sobrenadante y resuspendió.
- ❖ Un último lavado se realizó con Buffer 3 (10 mL de agua estéril + 0.1 g de N-acetil-L-cisteína). Se centrifugó nuevamente a 50 rpm x 3min y desechó sobrenadante, con el mínimo volumen se resuspendió el sedimento.

En los experimentos pilotos, del botón resuspendido se realizó un frotis para teñir con tinción de Gram y se observó al microscopio; además se sembró en Agar sangre, incubando a 35°C±2°C por 24 horas.

## 10.4 Técnica de lisis con cloruro de amonio

### 10.4.1 Preparación de solución de cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) al 0.8%

- ❖ Se pesó 4g de NH<sub>4</sub>Cl (sal).
- ❖ En 500mL de agua estéril se disolvió y homogenizó.

### 10.4.2 Procedimiento

- ❖ De tubos con gel separador se obtuvieron 5 mL del medio del hemocultivo positivo.
- ❖ Se centrifugó a 50 rpm x 3 min, se quitó sobrenadante y homogenizó el volumen de la superficie del gel separador para poner en un tubo falcón con 3.5mL de la solución de NH<sub>4</sub>Cl.
- ❖ Se incubó a 35°C±2°C por 10 minutos.
- ❖ Se centrifugó a 50 rpm x 3min y desechó el sobrenadante.
- ❖ El botón se resuspendió con 3.5 mL de agua estéril.
- ❖ Se incubó a 35°C±2°C por 10 minutos.
- ❖ Se centrifugó a 50 rpm x 3 min, se desechó sobrenadante y resuspendió el sedimento.

Por otro lado, en los experimentos pilotos de la superficie del gel separador, se tomó con un hisopo, para comprobar la presencia de los microorganismos y se sembró en Agar Sangre incubando a 35°C±2°C por 24 horas además de realizarse su tinción de Gram.

## 10.5 Estandarización de técnicas de lisis

### 10.5.1 Técnica de lisis con detergente

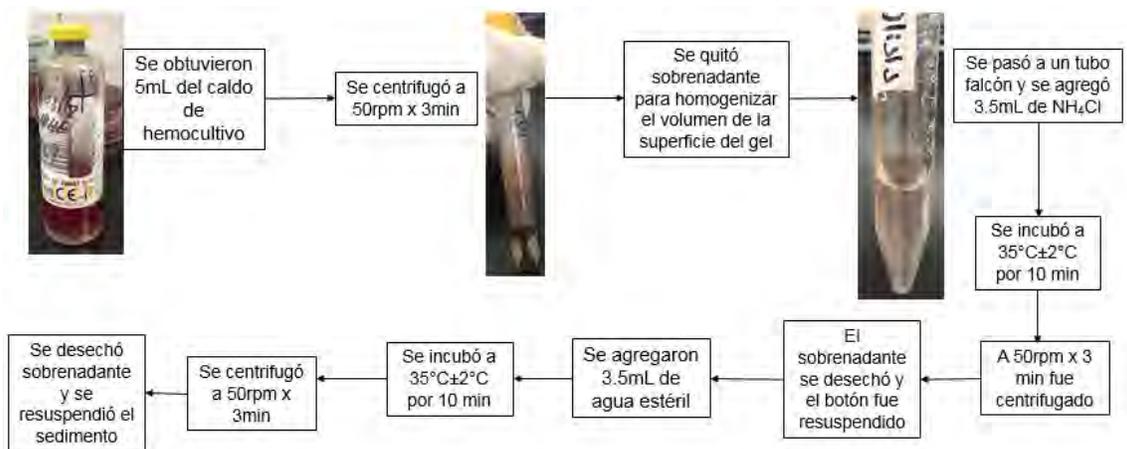
- ❖ De acuerdo al apartado 10.3 **Técnica de lisis con detergente**; se hizo una modificación en el último lavado (Buffer 3), se usaron 10 mL de agua estéril.
- ❖ Se centrifugó a 50 rpm x 3min.
- ❖ El sobrenadante se desechó y el botón se resuspendió.



**Figura 16.** Diagrama de estandarización de la técnica de lisis con detergente comercial.

### 10.5.2 Técnica de lisis con cloruro de amonio y gel separador

- ❖ Se determinó utilizar un volumen de 3.5 mL  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y de agua estéril en los lavados, de acuerdo con el apartado 2.3



**Figura 17.** Diagrama de estandarización de la técnica de lisis con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 0.8%.

## 10.6 Identificación en equipo VITEK MS (MALDI-TOF)

### 10.6.1 Técnica por inoculación en placa.

- ❖ Se eligieron las placas con el mejor aislamiento de colonias (de preferencia las de Agar sangre).

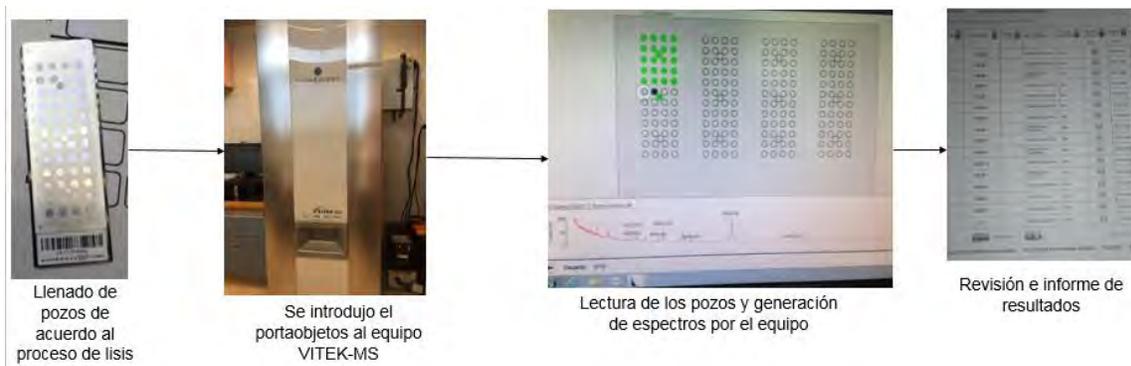
- ❖ Con el aplicador, se depositaron en el pozo del portaobjetos.
- ❖ Se agregó 1.0 µL de la matriz.

### 10.6.2 Técnica de lisis con cloruro de amonio

- ❖ Se tomaron 1.0 µL del pellet resuspendido
- ❖ Se depositaron en el pozo para su posterior adición de 1.0 µL de matriz.
- ❖ En otro pozo se depositó la misma cantidad de muestra, más 0.5 µL de ácido fórmico.
- ❖ Se dejó secar para agregar el 1.0 µL de matriz en ambos pozos.

### 10.6.3 Técnica de lisis con detergente

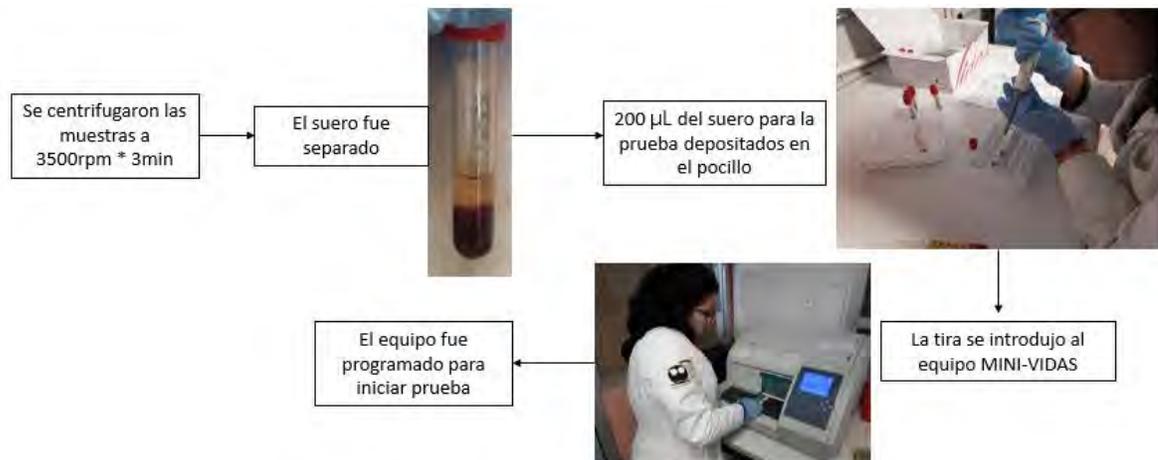
- ❖ Se agregó 0.5 µL del pellet resuspendido más 1.0 µL de matriz.
- ❖ En otro pozo se depositó la misma cantidad de muestra más 0.5 µL de ácido fórmico.
- ❖ Se dejó secar para agregar el 1.0 µL de matriz.
- ❖ Se introdujo el portaobjetos al equipo MALDI-TOF MS para la identificación microbiana.



**Figura 18.** Procedimiento para el informe de resultados de las identificaciones de los microorganismos.

## 10.7 Determinación de niveles séricos de Procalcitonina (PCT)

- ❖ Las muestras de sangre completa fueron centrifugadas a 3500 rpm x 3 min para la obtención de suero.
- ❖ Se procesaron las muestras de suero de acuerdo con las instrucciones del inserto para determinación de PCT del equipo MINI-VIDAS.

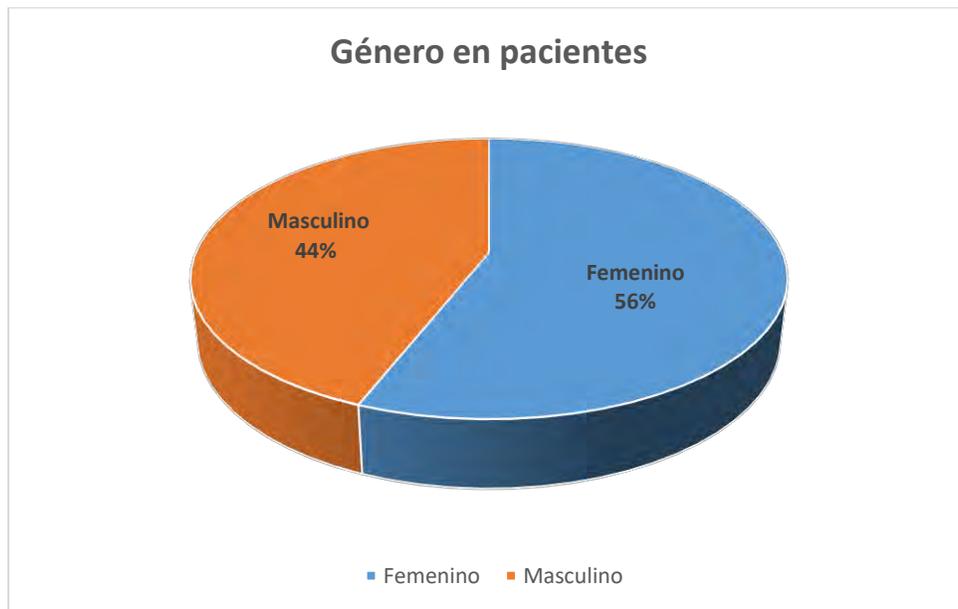


**Figura 19.** Determinación de niveles séricos de PCT

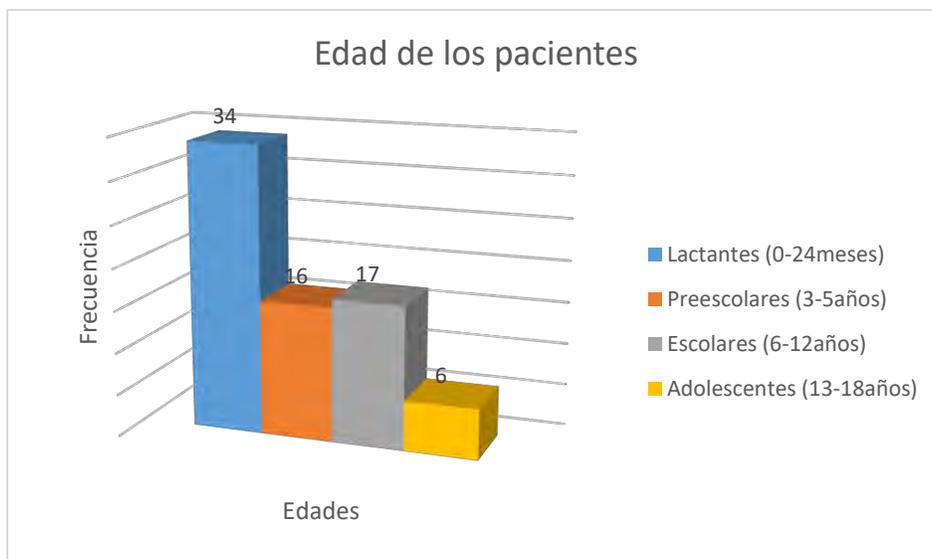
## 11. RESULTADOS

Se incluyeron 102 hemocultivos positivos de 72 pacientes con edades entre 5 días a 17 años, recibidos en el periodo del 5 de febrero hasta el 31 de mayo del 2018; el 56% correspondió al género femenino y los 44% al género masculino (Figura 20) ingresados en el Hospital Infantil de México.

Referido a las edades de los pacientes la edad promedio fue de 6 años, el grupo con mayor población son los lactantes con 34 pacientes, el grupo de preescolares con 16 pacientes, en el grupo de los escolares con 17 pacientes y, por último, el menor grupo es el de adolescentes con 6 pacientes. (Figura 21).

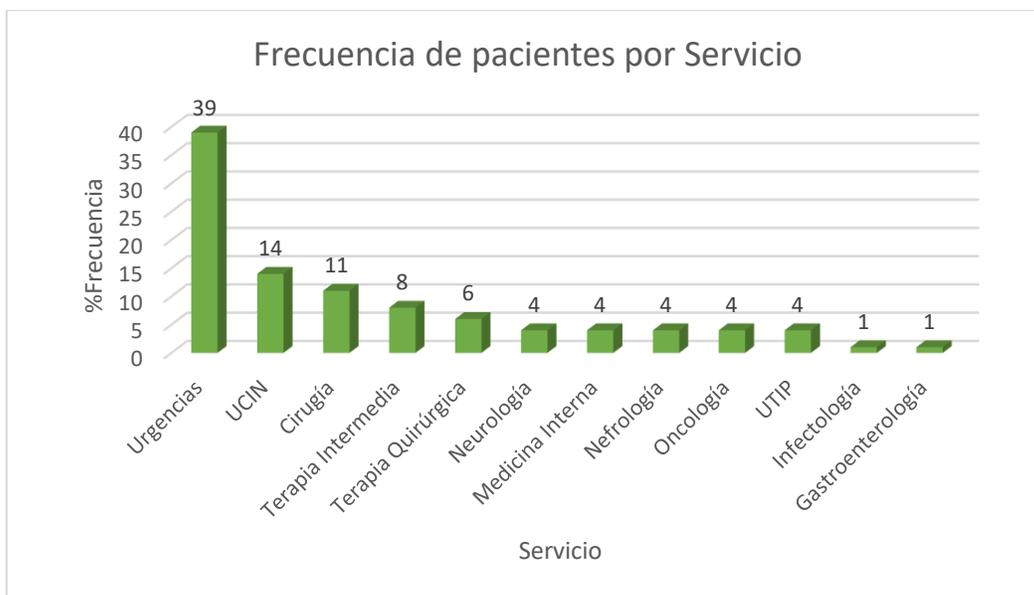


**Figura 20.** Frecuencia de pacientes por género.



**Figura 21.** Frecuencia de la edad de los pacientes. El grupo con mayor población son los lactantes (0-24 meses) con 34 pacientes y el de menor pertenece a los adolescentes (13-18 años) con 6.

Además, la frecuencia por servicio del HIMFG es Urgencias 39%, Unidad de cuidados intensivos (UCIN) 14%, Cirugía 11%, Terapia Intermedia 8%, Unidad de Terapia Quirúrgica (UTQx) 6%, los siguientes servicios tienen 4%: Neurología, Medicina interna, Nefrología, Oncología y Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP); por último, 1% para Infectología y Gastroenterología. (Figura 22)



**Figura 22.** Pacientes de acuerdo con el servicio del HIMFG.

En la siguiente tabla, se observan los resultados respecto a las identificaciones de los hemocultivos comparando las técnicas con la inoculación en placa.

**Tabla 2.** Resultados de los diferentes métodos para identificación de microorganismos aislados en hemocultivos.

Origen	Técnica de lisis con detergente AXION			Técnica lisis con NH <sub>4</sub> Cl 0.8%			Técnica por inoculación en placa	
	Tiempo (min)	Pozo 1 / %confianza	Pozo 2 / %confianza	Tiempo (min)	Pozo 1 / %confianza	Pozo 2 / %confianza	Tiempo (min)	Microorganismo / %confianza
HC	41	NI	<i>S.hominis</i> / 99.8	75	NI	<i>S.hominis</i> / 99.9	1260	<i>S.hominis</i> / 99.9
HP	41	<i>S.aureus</i> / 99.9	<i>S.aureus</i> / 99.9	75	<i>S.aureus</i> / 99.9	<i>S.aureus</i> /96.0	1260	<i>S.aureus</i> / 99.9
HP	37	NI	NI	61	<i>S.haemolyticus</i> / 93.9	NI	1620	<i>S.haemolyticus</i> / 99.9
HP2	45	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	70	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	1250	<i>K. pneumoniae</i> / 99.9
HP	52	NI	NI	76	NI	NI	1590	<i>S. cohnii</i> / 99.9
HP2	52	NI	NI	76	<i>S.maltophilia</i> / 82.1	NI	1590	<i>S. maltophilia</i> / 99.9
HC1	53	<i>E.coli</i> / 99.9	<i>E.coli</i> / 99.9	76	<i>E.coli</i> / 99.9	<i>E.coli</i> / 99.9	1410	<i>E.coli</i> / 99.9
HC2 L.rojo	48	NI	NI	69	<i>E.coli</i> / 99.9	<i>E.coli</i> / 99.9	1460	<i>E.coli</i> / 99.9
HP	46	<i>S.pasteuri</i> /99.9	<i>S.pasteuri</i> / 99.9	67	NI	<i>S.pasteuri</i> / 99.9	1580	<i>S.pasteuri</i> / 99.9
HP1	36	<i>E.coli</i> / 99.9	<i>E.coli</i> / 99.9	70	<i>E.coli</i> / 99.9	<i>E.coli</i> / 99.9	1675	<i>E.coli</i> / 99.9
HC	36	<i>E.coli</i> / 99.9	<i>E.coli</i> / 99.9	70	<i>E.coli</i> / 99.9	<i>E.coli</i> / 99.9	1595	<i>E.coli</i> / 99.9
HC	45	NI	NI	65	NI	<i>S.maltophilia</i> / 99.9	1390	<i>S. maltophilia</i> / 99.9
HP	53	NI	NI	78	NI	<i>S.epidermidis</i> / 99.9	1080	<i>S.epidermidis</i> / 99.9
HP1	53	NI	NI	71	<i>S.maltophilia</i> / 99.8	<i>S.maltophilia</i> / 99.9	1440	<i>S. maltophilia</i> / 99.9
HP1	53	NI	NI	73	<i>S.maltophilia</i> / 60.6	<i>S.maltophilia</i> / 99.4	1680	2 morfotipos de <i>S. maltophilia</i> / 99.9
HP2	53	NI	NI	73	<i>S.maltophilia</i> / 99.8	<i>S.maltophilia</i> / 99.9	1680	2 morfotipos de <i>S. maltophilia</i> / 99.9

Origen	Técnica de lisis con detergente AXION			Técnica lisis con NH <sub>4</sub> Cl 0.8%			Técnica por inoculación en placa	
	Tiempo (min)	Pozo 1 / %confianza	Pozo 2 / %confianza	Tiempo (min)	Pozo 1 / %confianza	Pozo 2 / %confianza	Tiempo (min)	Microorganismo / %confianza
HP	48	NI	NI	74	<i>S.epidermidis</i> / 99.9	<i>S.epidermidis</i> / 99.9	1320	<i>S.epidermidis</i> / 99.9
HP2	49	NI	NI	74	<i>A.xylosoxidans</i> / 99.9	<i>A.xylosoxidans</i> / 99.9	1295	<i>A. xylosoxidans</i> / 99.9
HP2	42	<i>E. kobei</i> / 99.9	NI	76	<i>E.cloacae</i> / 60.0	NI	1675	<i>E. cloacae</i> / 99.9
HP1	44	NI	<i>E.hormaechei</i> / 79.8	76	<i>E. kobei</i> / 99.9	<i>E.kobei</i> / 99.9	1680	<i>E. cloacae</i> /99.9
HP	44	<i>P.propionicum</i> / 99.9	NI	71	NI	NI	1285	<i>S.epidermidis</i> / 99.9
HP2	44	NI	NI	75	NI	<i>S. mitis/oralis</i> / 99.9	2490	<i>S. mitis/oralis</i> y <i>E. faecium</i> / 99.9
HP	53	<i>S.aureus</i> / 99.9	<i>S.aureus</i> / 99.9	78	NI	<i>S.aureus</i> / 99.9	1480	<i>S.aureus</i> / 99.9
HP1	54	<i>P.aeruginosa</i> / 99.9	<i>P.aeruginosa</i> / 99.9	80	<i>P.aeruginosa</i> / 99.9	<i>P.aeruginosa</i> / 99.10	1740	<i>P.aeruginosa</i> / 99.9
HC L.Café	54	NI	NI	80	NI	NI	1380	<i>C. albicans</i> / 99.9
HP	54	<i>E.coli</i> / 99.9	<i>E.coli</i> / 99.9	80	<i>E.coli</i> /99.9	<i>E.coli</i> /99.9	1345	<i>E.coli</i> / 99.9
HP2	54	NI	NI	80	<i>S.epidermidis</i> / 99.9	<i>S.epidermidis</i> / 99.10	1230	<i>S.epidermidis</i> / 99.9
HP1	54	NI	NI	80	NI	NI	1230	<i>S.epidermidis</i> / 99.9
HC L.blanc	54	NI	<i>A.baumannii</i> complex / 99.9	80	<i>A. baumannii</i> complex / 99.9	<i>A. baumannii</i> complex / 99.9	1230	<i>A. baumannii</i> complex/ 99.9
HP2	55	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	85	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> /99.9	1200	<i>K. pneumoniae</i> / 99.9
HP	47	NI	NI	79	NI	NI	1440	<i>S.epidermidis</i> / 99.9
HP2	43	NI	NI	74	<i>S.maltophilia</i> / 99.9	<i>S.maltophilia</i> / 99.9	1245	<i>S. maltophilia</i> / 99.9
HC	46	NI	NI	79	<i>S.epidermidis</i> / 99.9	<i>S.epidermidis</i> / 99.8	1275	<i>S.epidermidis</i> / 99.9
HP	46	NI	NI	79	<i>S.aureus</i> / 99.9	<i>S.aureus</i> / 99.9	1250	<i>S.aureus</i> / 99.9

Origen	Técnica de lisis con detergente AXION			Técnica lisis con NH <sub>4</sub> Cl 0.8%			Técnica por inoculación en placa	
	Tiempo (min)	Pozo 1 / %confianza	Pozo 2 / %confianza	Tiempo (min)	Pozo 1 / %confianza	Pozo 2 / %confianza	Tiempo (min)	Microorganismo / %confianza
HC	38	<i>S.aureus</i> /99.9	<i>S.aureus</i> / 49.2	73	<i>S.aureus</i> / 99.2	<i>S.aureus</i> / 99.9	1250	<i>S.aureus</i> / 99.9
HP	38	NI	<i>E.faecalis</i> / 99.9	73	<i>E.faecalis</i> / 99.9	<i>E.faecalis</i> / 99.9	1270	<i>E.faecalis</i> / 99.9
HC L.azul	51	NI	NI	78	NI	<i>S.mitis/oralis</i> / 72	1620	<i>S. mitis/oralis</i> / 99.9
HP	51	<i>S. mitis/oralis</i> / 99.9	<i>S. mitis/oralis</i> / 99.9	78	<i>S.mitis/oralis</i> / 85.5	NI	1620	<i>S. mitis/oralis</i> / 99.9
HP1	53	NI	NI	71	NI	<i>S.epidermidis</i> / 99.9	1550	<i>S.epidermidis</i> / 99.9
HP1	39	NI	NI	69	<i>S.schleiferi</i> / 99.9	NI	1570	<i>S.epidermidis</i> / 99.9
HP	48	NI	NI	70	NI	NI	1085	<i>S.epidermidis</i> / 99.9
HC L.café	51	<i>P.aeruginosa</i> / 99.9	<i>P.aeruginosa</i> / 99.9	76	<i>P.aeruginosa</i> / 99.9	<i>P.aeruginosa</i> / 99.9	1510	<i>P.aeruginosa</i> / 99.9
H	51	NI	NI	76	<i>P.mirabilis</i> / 99.9	<i>P.mirabilis</i> / 99.9	1510	<i>P. mirabilis</i> / 99.9
HC	49	<i>P.aeruginosa</i> / 99.9	<i>P.aeruginosa</i> / 99.9	74	<i>P.aeruginosa</i> / 99.9	<i>P.aeruginosa</i> / 99.9	1230	<i>P.aeruginosa</i> / 99.9
HP	49	NI	NI	74	NI	<i>S.epidermidis</i> / 99.9	1220	<i>S.epidermidis</i> / 99.9
HC	46	NI	NI	71	NI	<i>S.epidermidis</i> / 99.9	1430	<i>S.epidermidis</i> / 99.9
HC	45	NI	<i>E.cloacae</i> / 50	73	NI	NI	1095	<i>E. cloacae</i> / 99.9
H1	42	<i>B. clausii</i> / 99.9	NI	76	<i>B.clausii</i> / 99.9	<i>B.clausii</i> / 99.9	1520	<i>B.clausii</i> / 99.9
HC L.Blanc o	42	NI	NI	76	<i>S.epidermidis</i> / 95.4	<i>S.epidermidis</i> / 99.9	1520	<i>S.epidermidis</i> / 99.9
HP	48	NI	NI	79	<i>B.clausii</i> / 99.9	<i>B.clausii</i> / 99.9	1230	<i>B. clausii</i> / 99.9
HP	48	NI	NI	79	NI	NI	1100	<i>S.epidermidis</i> / 99.9
HP	38	NI	NI	72	<i>B.clausii</i> / 99.9	<i>B.clausii</i> /99.9	1420	<i>B. clausii</i> / 99.9
HC1 L.Blanc o	40	NI	NI	71	<i>K.pneumoniae</i> / 97.3	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	1640	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9
HC1 L.café	45	NI	NI	80	<i>S.epidermidis</i> / 99.9	<i>S.epidermidis</i> / 99.9	1245	<i>S.epidermidis</i> / 99.9

Origen	Técnica de lisis con detergente AXION			Técnica lisis con NH <sub>4</sub> Cl 0.8%			Técnica por inoculación en placa	
	Tiempo (min)	Pozo 1 / %confianza	Pozo 2 / %confianza	Tiempo (min)	Pozo 1 / %confianza	Pozo 2 / %confianza	Tiempo (min)	Microorganismo / %confianza
HC L.blanc o	45	NI	NI	80	<i>S.epidermidis</i> / 99.9	<i>S.epidermidis</i> / 99.9	1245	<i>S.epidermidis</i> / 99.9
HP1	42	<i>K.pneumoniae</i> /99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	79	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	1540	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9
HP2	42	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	79	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	1540	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9
HP	39	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	75	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	1260	<i>K. pneumoniae</i> / 99.9
HC	48	NI	NI	77	<i>S.maltophilia</i> /99.9	<i>S.maltophilia</i> / 98.3	1670	<i>S. maltophilia</i> / 99.9
HP1	48	NI	NI	77	<i>S.epidermidis</i> / 99.9	<i>S.epidermidis</i> / 98.1	1485	2 morfotipos <i>S.epidermidis</i> / 99.9
HP	52	NI	NI	80	<i>S.maltophilia</i> / 99.9	<i>S.maltophilia</i> / 99.1	1620	<i>S. maltophilia</i> / 99.9
HP	52	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	80	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	1500	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9
HP	52	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	81	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	1330	<i>K. pneumoniae</i> / 99.9
HP1	47	NI	NI	78	<i>S.hominis</i> /99.9	<i>S.hominis</i> / 99.9	1560	<i>S. hominis</i> / 99.9
HP	47	<i>E.coli</i> / 99.9	<i>E.coli</i> / 99.9	78	<i>E.coli</i> / 99.9	<i>E.coli</i> / 99.9	1260	<i>E.coli</i> / 99.9
HP	46	<i>E.coli</i> / 99.9	<i>E.coli</i> / 99.9	72	<i>E.coli</i> / 99.9	<i>E.coli</i> / 99.9	1445	<i>E.coli</i> / 99.9
HP2	46	<i>S.capitis</i> / 99.9	<i>S.capitis</i> / 99.9	72	<i>S.capitis</i> / 77.2%	<i>S.capitis</i> / 98.1	1545	<i>S. capitis</i> / 99.9
HP	40	NI	NI	76	NI	NI	1620	<i>S.maltophilia</i> / 99.9
HP1	40	NI	NI	76	<i>S.aureus</i> / 99.6	<i>S.aureus</i> /99.9	1465	<i>S.aureus</i> / 99.9
HP1	51	NI	NI	69	<i>S.epidermidis</i> / 99.7	<i>S.epidermidis</i> / 95.9	1100	<i>S.epidermidis</i> / 99.9
HP1	51	NI	NI	70	NI	<i>S.cohnii</i> / 99.9	1110	<i>S. cohnii</i> / 99.9
HP	37	NI	NI	68	<i>S.maltophilia</i> / 99.9	<i>S.maltophilia</i> / 99.9	1650	<i>S.maltophilia</i> / 99.9
HP1	48	<i>P.aeruginosa</i> / 99.9	<i>P.aeruginosa</i> / 99.9	79	<i>P.aeruginosa</i> / 99.9	<i>P.aeruginosa</i> / 99.9	1125	<i>P. aeruginosa</i> / 99.9

Origen	Técnica de lisis con detergente AXION			Técnica lisis con NH <sub>4</sub> Cl 0.8%			Técnica por inoculación en placa	
	Tiempo (min)	Pozo 1 / %confianza	Pozo 2 / %confianza	Tiempo (min)	Pozo 1 / %confianza	Pozo 2 / %confianza	Tiempo (min)	Microorganismo / %confianza
HP1	54	NI	NI	79	<i>B.clausii</i> / 99.9	<i>B.clausii</i> / 99.9	1735	<i>B.clausii</i> / 99.9
HP1	54	<i>E.coli</i> / 99.9	<i>E.coli</i> / 99.9	73	<i>E.coli</i> / 99.9	<i>E.coli</i> / 99.9	1590	<i>E.coli</i> / 99.9
HC L.blanco	54	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	73	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	1380	<i>K. pneumoniae</i> / 99.9
HC L.rojo	42	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	75	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	1445	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9
HC L.azul	46	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	78	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	1255	<i>K. pneumoniae</i> / 99.9
HC2	46	NI	NI	78	NI	NI	1090	<i>S.epidermidis</i> / 99.9
HP	41	NI	NI	77	NI	<i>S.epidermidis</i> / 99.9	1135	<i>S.epidermidis</i> / 99.9
HP	49	<i>S.hominis</i> / 99.9	<i>S.hominis</i> / 99.9	79	<i>S.hominis</i> / 99.9	<i>S.hominis</i> / 99.9	1265	<i>S.hominis</i> / 99.9
HC	49	NI	NI	79	NI	NI	1150	<i>S.maltophilia</i> / 99.9
HP1	40	NI	NI	74	NI	<i>C.tropicalis</i> / 99.9	1735	<i>C. tropicalis</i> / 99.9
HC	39	NI	NI	76	NI	NI	1145	<i>S.salivarius</i> , <i>S.haemolyticus</i> y <i>S.mitis/oralis</i> / 99.9
HP	43	NI	NI	73	<i>S.maltophilia</i> / 99.9	<i>S.maltophilia</i> / 99.9	1550	<i>S.maltophilia</i> / 99.9
HP2	45	NI	NI	72	NI	<i>S.epidermidis</i> /99.9	1070	<i>S.epidermidis</i> / 99.9
HP1	50	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	76	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	3360	<i>E. faecalis</i> , <i>K.pneumoniae</i> y <i>S. maltophilia</i> / 99.9
HP	50	NI	NI	76	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	1590	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9
HP	50	NI	NI	77	<i>B.cereus</i> / 92.1	<i>B.cereus</i> / 95.1	3360	<i>B.cereus</i> y <i>K. pneumoniae</i> / 99.9
HP	46	NI	NI	71	<i>S.epidermidis</i> / 99.9	<i>S.epidermidis</i> / 99.9	1415	2 morfotipos de <i>S.epidermidis</i> / 99.9
HP	49	NI	NI	71	NI	NI	1170	<i>S.epidermidis</i> / 99.9

Origen	Técnica de lisis con detergente AXION			Técnica lisis con NH <sub>4</sub> Cl 0.8%			Técnica por inoculación en placa	
	Tiempo (min)	Pozo 1 / %confianza	Pozo 2 / %confianza	Tiempo (min)	Pozo 1 / %confianza	Pozo 2 / %confianza	Tiempo (min)	Microorganismo / %confianza
HC	47	NI	NI	74	NI	NI	1425	<i>S.epidermidis</i> / 99.9
HP 2	39	NI	NI	76	NI	<i>B.subtilis</i> / 75.6%	1090	<i>B. subtilis</i> / 99.9
HP1	42	NI	NI	76	<i>S.maltophilia</i> / 99.9	<i>S.maltophilia</i> / 99.9	1410	<i>S. maltophilia</i> / 99.9
HP1	42	NI	NI	77	<i>S.hominis</i> / 99.9	<i>S.hominis</i> / 99.9	1370	<i>S.hominis</i> / 99.9
HC	42	NI	NI	77	NI	NI	1360	<i>S.epidermidis</i> / 99.9
HP	47	NI	<i>S.hominis</i> / 99.9	78	<i>S.hominis</i> / 99.9	<i>S.hominis</i> / 99.9	1540	<i>S.hominis</i> / 99.9
HP2	47	<i>S.haemolyticus</i> / 99.9	<i>S.haemolyticus</i> / 99.9	78	<i>S.haemolyticus</i> / 99.9	<i>S.haemolyticus</i> / 99.9	1560	<i>S.haemolyticus</i> / 99.9
HP1	47	<i>S.haemolyticus</i> / 99.9	<i>S.haemolyticus</i> / 99.9	78	<i>S.haemolyticus</i> / 99.9	<i>S.haemolyticus</i> / 99.9	1560	<i>S.haemolyticus</i> / 99.9
HP1	47	NI	<i>S.hominis</i> / 99.9	78	NI	<i>S.hominis</i> / 99.9	2760	<i>S.hominis</i> y <i>S.epidermidis</i> / 99.9
HP1	37	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 54	67	<i>K.pneumoniae</i> / 45.7	<i>K.pneumoniae</i> / 79.5	3120	<i>K.pneumoniae</i> y <i>S.epidermidis</i> / 99.9
HP2	37	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	67	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9	1560	<i>K.pneumoniae</i> / 99.9
Promedio =	46.421 5686		Promedio=	75.1274 51		Promedio=	1482.84 314	

**HC** Hemocultivo central  
**HC 1** Hemocultivo central 1  
**HC 2** Hemocultivo central 2  
**HP** Hemocultivo periférico  
**HP 1** Hemocultivo periférico 1

**HP 2** Hemocultivo Periférico 2  
**L. azul** Lumen azul  
**L. blanco** Lumen blanco  
**L. café** Lumen café  
**L. rojo** Lumen rojo

Con los resultados de la Tabla 2, se obtiene lo siguiente: el procesamiento de las muestras por la técnica de lisis con detergente es en promedio de 46 minutos, mientras que por la técnica de lisis con cloruro de amonio el promedio es de 75 minutos (1 hora con 15 minutos) y para el caso de la técnica por inoculación en placa 1483 minutos (24 horas con 43 minutos).

**Tabla 3.** Promedio de tiempo de procesamiento de técnicas.

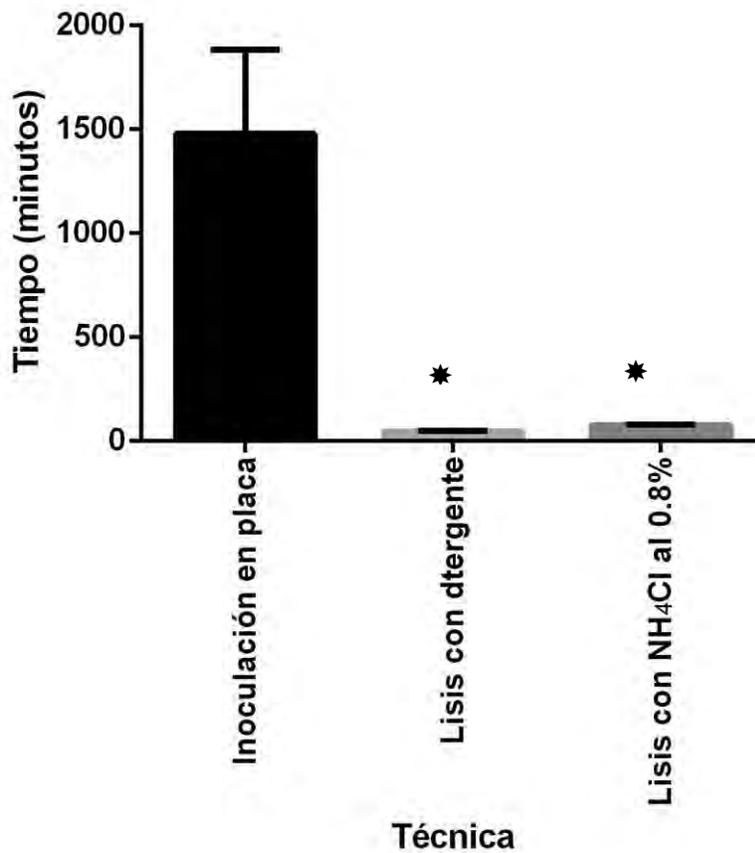
<b>Técnica</b>	<b>Lisis con Detergente AXION</b>	<b>Técnica lisis con NH<sub>4</sub>Cl 0.8%</b>	<b>Inoculación en placa</b>
<b>Tiempo</b>	46 minutos	75 minutos (1 hora 15 minutos)	1483 minutos (24 horas 43 minutos)

Realizando el análisis estadístico se observó una diferencia significativa de los tiempos entre las técnicas implementadas comparada a la técnica inoculada en placa.

**Tabla 4.** Resultados estadísticos de análisis de varianza de una vía (ANOVA) de los tiempos de los 102 hemocultivos positivos por los tres tratamientos.

<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F</b>
<b>Factor</b>	137557009.7	2	68778504.85	1267.25103
<b>Error</b>	16444955.7	303	54273.78119	
<b>Total</b>	154001965.4	305		

Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para un valor de  $p < 0.0001$ .



**Figura 23.** Tiempos de procesamiento para las tres técnicas.  
 Los resultados de la gráfica representan la media  $\pm$  SEM.  $p < 0.0001$

De los 102 hemocultivos, para el caso de la técnica por inoculación en placa se logró la identificación de al menos un microorganismo en 100% de los frascos, de los cuales 92 (90.2%) son aislamientos monomicrobianos, 10 son bibacterianos que corresponde al 7.8% y 2 (2.0%) son polimicrobianos.

Las identificaciones realizadas mediante la técnica de lisis con detergente, (muestra y matriz), fue de 36 (35%). Para el caso de muestra, ácido fórmico y matriz, fueron 40 (39%).

En la técnica de lisis con cloruro de amonio al 0.8% y con tubo gel separador las identificaciones llevadas a cabo mediante la utilización de la matriz, fueron 72 (71%) y al agregar el ácido fórmico, 82 (80%). (Tabla 5).

**Tabla 5.** Porcentaje de identificación de microorganismos de acuerdo con la técnica empleada.

Identificación	Técnica de lisis detergente		Técnica lisis con NH <sub>4</sub> Cl 0.8%		Técnica en placa
	Matriz (%)	Matriz + Ac. fórmico (%)	Matriz (%)	Matriz + Ac. fórmico (%)	%
Sí	35	39	71	80	100
No	65	61	29	20	0
Total	100	100	100	100	100

Igualmente, se cotejó el nivel de confianza que nos refieren las identificaciones por el equipo VITEK-MS (MALDI-TOF), cuyo software se rige por tres estatus: alta donde se da la identificación del microorganismo, media es cuando se elige entre diferentes opciones de microorganismos y baja se refiere a que es necesario repetir el análisis. (Tabla 6).

**Tabla 6.** Nivel de confianza de los resultados de las identificaciones microbianas por técnica.

Proceso	Técnica de lisis con detergente		Técnica de lisis con NH <sub>4</sub> Cl 0.8%		Técnica en placa
	Matriz	Matriz + Ac. fórmico	Matriz	Matriz + Ac. fórmico	%
Nivel de confianza (%)	99.9	95.7	94.5	98.8	99.9

Respecto al porcentaje de recuperación de microorganismos en los cultivos monomicrobianos con la técnica en placa (inoculación en placa) es 52.2% (48) para Gram positivos, 45.7% (42) por Gram negativos y 2.1% (2) estructuras micóticas. En el caso de la técnica de lisis con detergente AXION al sólo utilizar el reactivo de la matriz, 34 identificaciones que incluyen 12% (11) y 25% (23) para Gram positivos y negativos respectivamente mientras que la utilización del ácido fórmico más la matriz 38 identificaciones con 13% (12) y 28.3% (26) para Gram positivos y Gram negativos. Por otro lado, la técnica de lisis con cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) 0.8%, al utilizar sólo la matriz 65 microorganismos identificó con 27.2% (25) para bacterias Gram positivas y 42.4% (39) Gram negativas; el uso adicional del ácido fórmico

permitió 73 identificaciones de las cuales 37% (34) fueron Gram positivos, 41.3% (38) bacterias Gram negativas y 1% (1) para estructura micótica.

Cuando son cultivos bimicrobianos o polimicrobianos, solamente la técnica en placa fue capaz de diferenciar e identificar con certeza, se obtuvieron 10 (7.8%) y 2 (2.0%) respectivamente; sin embargo, en las técnicas de lisis con detergente AXION o lisis con NH<sub>4</sub>Cl 0.8%, para estos casos sólo fue posible identificar un microorganismo.

Referente a los niveles séricos de procalcitonina, los resultados se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Niveles de PCT y resultados de la identificación de los hemocultivos.

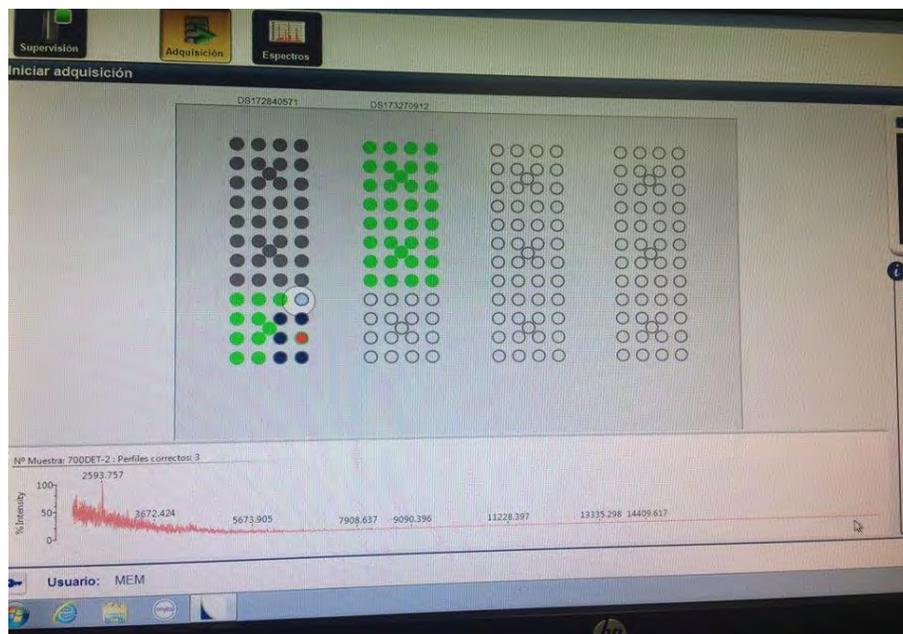
<b>Paciente</b>	<b>Microorganismo identificado</b>	<b>PCT [ng/mL]</b>
1	<i>K.pneumoniae</i>	68.50
2	<i>S.maltophilia</i>	<0.05
3	<i>S.pasteuri</i>	25.24
4	<i>S.epidermidis</i>	0.37
5	<i>S.epidermidis</i>	<0.05
6	<i>S.epidermidis</i>	9.27
7	<i>A.baumannii complex</i>	0.08
8	<i>S.epidermidis</i>	0.42
9	<i>S.epidermidis</i>	0.43
10	<i>P.mirabilis</i>	0.52
11	<i>K.pneumoniae</i>	>200
12	<i>S.maltophilia</i>	7.16
13	<i>S.epidermidis</i>	4.18
14	<i>S.maltophilia</i>	0.48
15	<i>S.aureus</i>	1.29
16	<i>S.epidermidis</i>	0.44
17	<i>S.epidermidis</i>	0.35
18	<i>S.epidermidis</i>	0.71
19	<i>S.epidermidis</i>	3.05
20	<i>B.subtilis</i>	0.12
21	<i>E.faecalis, K.pneumoniae y S.maltophilia</i>	<0.05
22	<i>S.hominis</i>	0.21
23	<i>S.hominis</i>	0.32
24	<i>K.pneumoniae</i>	1.30
25	<i>S.epidermidis</i>	3.71

## 12. DISCUSIÓN

El tiempo de una identificación microbiana por medio de las pruebas bioquímicas se lleva a cabo de 24-48 horas<sup>36</sup>, pero con la implementación de la tecnología de espectrometría de masas MALDI-TOF este tiempo se ha reducido a 24 horas 43 minutos. Sin embargo, la necesidad de disminuir aún más el tiempo ha llevado a probar técnicas por lo que en el presente trabajo se estandarizaron dos técnicas de lisis para la identificación directa de hemocultivos positivos por la tecnología MALDI-TOF y se obtuvo lo siguiente: El tiempo de procesamiento en la técnica de lisis con detergente fue de 46 minutos y para el caso de la técnica de lisis con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.8% fue de 72 minutos (1 hora 12 minutos).

Al comparar los tiempos de procesos de ambas técnicas con la inoculación en placa que es alrededor de 18-24 horas utilizando el VITEK-MS (Tabla 3), hay una disminución significativa ( $p < 0.0001$ ) ya que la estimación es de aproximadamente 2 horas lo que beneficia que el médico prescriba el tratamiento antimicrobiano oportuno y certero en caso de ser necesario, sin embargo, la ventaja que tiene la técnica por inoculación sobre las implementadas en el trabajo, es que al sembrar en medios de cultivo los hemocultivos positivos, se puede realizar una diferenciación morfológica de las colonias si la muestra no es monomicrobiana y por consecuencia, se obtienen identificaciones certeras de dos o más microorganismos. Por lo tanto, en hemocultivos con una mezcla de microorganismos no es factible apoyarnos en la técnica de hemocultivos positivos directos; sin embargo, este tipo de casos aplicaría para ambas técnicas. Observamos dos situaciones: puede llevarse a cabo la identificación del microorganismo que se encuentre en mayor proporción en la muestra o puede ser que no sea identificado por no crear un espectro congruente, ya que se generan demasiados picos. Esta situación, no puede ser detectada en primera instancia cuando se realiza el frotis y la tinción de Gram de la muestra porque hay hemocultivos que contienen microorganismos morfológica y microscópicamente iguales, a menos que se vea una diferencia tintorial de Gram negativos o positivos, o en su defecto, se observen bacilos y cocos.

Se hicieron algunos ajustes a la metodología de lisis con detergente comercial AXION®Colgate-Palmolive planteada por Arnold Foster<sup>35</sup>, ya que agrega un buffer con N-acetil-L-cisteína, sin embargo, al llevar a cabo la identificación microbiana del sedimento así tratado, el espectro de masas que nos presentó el VITEK-MS, era inconsistente para una buena comparación de los picos, esto se puede deber a los componentes del N-acetil-L-cisteína ya que está constituida en su base con un aminoácido. Recordando que el VITEK-MS genera la información de la composición del microorganismo mediante el espectro que relaciona la masa/carga conocida como huella digital de la masa de los péptidos<sup>19</sup>, la N-acetil-L-cisteína estaba causando interferencia y como consecuencia, el software nos alertaba que no existían suficientes picos para comparar en su base de datos, no quiere decir que no habían iones que se estaban detectando, si no que había una saturación de ellos y por ende no podía formar un espectro coherente para ser comparado. (Figura 24)



**Figura 24.** Ejemplo de la formación del espectro en la metodología del detergente utilizando el buffer con N-acetil-L cisteína.

Por lo anterior, se preparó nuevamente el buffer de lisis sin el reactivo N-acetil-L-cisteína con lo que se obtuvieron mejores resultados; hay que recordar que en esta técnica con detergente comercial AXION ®Colgate-Palmolive, se manejan compuestos orgánicos que confieren un ambiente de saponificación para la muestra

que está constituida en su mayoría por eritrocitos, aunado a ello, el choque osmótico que se produce en el medio debido al agua agregada funciona para lisar los eritrocitos. Cabe destacar que es importante al montar la muestra en los pozos del portaobjetos, dejar secar debido a que, si enseguida se agrega la matriz y ácido fórmico, puede ocasionarse la formación de una capa gruesa que la luz UV será incapaz de penetrar para ionizar la muestra.

El tiempo de procesamiento en la estandarización de esta técnica fue de 46 minutos mientras que en el artículo de referencia ya mencionado<sup>35</sup> fue de aproximadamente 30 minutos, no son datos alejados entre sí, sin embargo las discrepancias radican en el total de identificaciones correctas, ya que centrándonos en las bacterias positivas, especialmente del género *Staphylococcus*, refiere un 99.2% de identificaciones mientras que en nuestros resultados no fue así porque para *Staphylococcus epidermidis*, (el cual es un microorganismo que se aísla frecuentemente en los hemocultivos positivos del HIMFG), no siempre fue posible lograr su identificación, indicándonos que posiblemente el proceso no lisa por completo al microorganismo exponiéndolo para que interactúe con la matriz.

Se observó mayor porcentaje de recuperación de los microorganismos Gram negativos, sin embargo, un caso especial sucedió con uno de ellos, ya que se tuvo dificultad en la identificación de *Stenotrophomonas maltophilia*, lo que coincide con el artículo de Arnold Foster<sup>35</sup>, en donde tampoco fue identificado, esto es una desventaja porque es un patógeno nosocomial<sup>37</sup> importante en el HIM "Federico Gómez", debido al número de casos en que fue aislado de los hemocultivos positivos. Tiene la propiedad de unirse ávidamente a la superficie de implementos médicos, como lo son ventiladores mecánicos y catéteres endovasculares<sup>38</sup>, este microorganismo es resistente a múltiples antibióticos intrínsecamente. Cabe la posibilidad de que la composición de su estructura celular le confiera ciertas características de tal modo que al estar en contacto con las sustancias agregadas no se lise con facilidad, teniendo como consecuencia que no se identifique.

En la técnica de lisis centrifugación con cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), se combinan métodos de separación de suero y lisis centrifugación usando el tubo con gel

separador de suero, el cual nos permite tener una muestra libre de contaminación por células e hilos de fibrina<sup>39</sup>. Siendo las células la principal fuente de interferencia para el equipo VITEK MS (MALDI-TOF), es importante eliminar aquellos vestigios eritrocitarios que puedan estar aún en la muestra, y para ello se utilizó la solución de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) que es conocida por ser un agente hemolizante.

El mecanismo se debe a la difusión de amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) libre a través de la membrana y una vez dentro de la célula, se establece un equilibrio entre  $\text{NH}_3$  y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), mientras que el hidróxido ( $\text{OH}^-$ ) intracelular se intercambia con el cloro ( $\text{Cl}^-$ ) extracelular, lo que resulta en una afluencia neta de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) dentro de los glóbulos rojos, provocando la inflamación celular y finalmente, la ruptura de la membrana celular.<sup>40</sup>

El lavado con agua nos sirve para eliminar restos de la solución anterior. Ésta técnica tiene como ventaja el identificar estructuras micóticas.

Se debe destacar que el uso del ácido fórmico coadyuva a la matriz debido a que como observamos en la Tabla 5 y 6, se obtienen más identificaciones al usar ambos reactivos, lo anterior es debido que a veces es necesario aplicar un tratamiento previo adicional con un ácido orgánico fuerte<sup>18</sup>, en este caso el ácido fórmico, para aquellos microorganismos cuya lisis es más difícil como el caso de ciertas bacterias Gram positivas, micobacterias, levaduras, estructuras micóticas en general.

Referente a los 72 pacientes que se incluyeron en el estudio, la mayor población son los lactantes que van de los 0 a 24 meses de edad con una frecuencia de 34 niños (Figura 23), por lo que al implementar técnicas que identifiquen microorganismos directamente de los hemocultivos positivos sería una ventaja porque este grupo en particular presenta inmadurez inmunológica y por ello la presencia de un patógeno en el torrente sanguíneo puede ser devastador para el paciente. Aunado a lo anterior, referente a la frecuencia por servicio dentro del HIM "Federico Gómez" (Figura 24), aunque Urgencias ocupa el primer lugar, el segundo puesto es para Unidad de cuidados intensivos (UCIN) con 14 pacientes los cuales son neonatos y se relaciona con la mayor población del estudio; por lo que al disminuir el tiempo de identificación microbiana se presenta como una herramienta clave para determinar si

es conveniente iniciar una terapia antimicrobiana, cambiar los antibióticos administrados cuando se trate de bacterias patógenas o retirarlos en caso de microorganismos contaminantes. También es importante mencionar que en caso de los pacientes sometidos a cirugías es indispensable tener un pronto resultado debido a la situación en la que se encuentra porque compromete su estado de salud.

El valor de referencia en el HIM “Federico Gómez” para la determinación de procalcitonina en suero es de 2.0 ng/mL, como se observa en la Tabla 7 en 32% de los pacientes los niveles de PCT fueron mayores a 2 ng/mL, se considera que a partir de este valor existe la posibilidad de que el paciente se encuentre cursando un proceso de sepsis. No fue posible contar con la información de todos los niños, debido a que en los pacientes críticos se inicia terapia antimicrobiana de manera empírica, o bien no siempre el médico tratante solicita la determinación de biomarcadores como PCT o proteína C reactiva (PCR) para complementar su diagnóstico.

Lo anterior puede explicar el hecho de identificar en algunos pacientes (24%) microorganismos como *Staphylococcus coagulasa* negativa, que se ha reportado como contaminante de piel y valores elevados de PCT, pues podría tratarse de una bacteriemia en tratamiento o de un proceso de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica sin aislamiento microbiano. También cabe considerar que en pacientes críticos no se debe soslayar la presencia de microorganismos considerados como parte de la microbiota, pues su condición de inmunocompromiso los hace vulnerables a este tipo de agentes.

En el 8% de los pacientes con determinación de PCT, se encontraron elevados por arriba de 2 ng/ml y se logró identificar un microorganismo patógeno, lo cual apoya que se trata de un proceso de sepsis.

En 52% de los pacientes los niveles de PCT fueron menores a 2 ng/ml y solo se identificó a un microorganismo considerado parte de la microbiota de piel, lo anterior puede apoyar la idea de que existió una ineficiente asepsia de la zona de punción al momento de la toma de muestra, mientras que en el 8% de los pacientes los niveles de PCT fueron menores a 2 ng/ml y se logró identificar un microorganismo patógeno,

es probable que estos pacientes se encontraran en tratamiento y que la solicitud de PCT tuviera la finalidad de dar seguimiento a la administración de los antimicrobianos.

### **13. CONCLUSIONES**

Se logró estandarizar una metodología a partir de hemocultivos positivos directos implementando dos técnicas de lisis en el desarrollo de este trabajo disminuyendo el tiempo de identificación de los microorganismos mediante el uso de la espectrometría de masas (MALDI-TOF) en comparación a la técnica en placa.

Se logró disminuir el tiempo de identificación en 1 hora 10 minutos (75 minutos) para la técnica de gel separador y en 46 minutos para la técnica de lisis con detergente, en comparación a la metodología por inoculación en placa que se procesan en 24 horas 43 minutos (1473 minutos).

Con los resultados obtenidos, podemos concluir que la técnica de lisis con cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) tiene mayores ventajas ya que el porcentaje de identificación es de 71-80% y el nivel de confianza que va de 94.5-98.8%, recordando que el uso del ácido fórmico mejora el proceso de identificación. Por lo que, puede ser una técnica de elección para tratar hemocultivos positivos directos tanto por su bajo costo, rapidez, facilidad de ejecución y porcentaje de resultados correctos obtenidos, siempre y cuando el laboratorio cuente con el equipo e insumos indispensables.

La técnica de lisis con detergente es accesible al usar un producto comercial sin embargo no es la más útil por la baja capacidad de identificación (35-39%).

Estas técnicas no dan resultados fiables cuando se tiene más de un microorganismo en el hemocultivo, pero son una alternativa para obtener un resultado rápido. Además, se obtienen mejores resultados cuando se trata de identificar hemocultivos con bacilos Gram negativos que con microorganismos Gram positivos.

El uso de biomarcadores complementa el diagnóstico, pero para PCT es necesario que la indicación de la prueba sea oportuna y se acompañe del hemocultivo.

## **14. PERSPECTIVAS**

Para estudios futuros se propone:

- Aumentar la concentración de las soluciones de lisis, así como el tiempo de lisis o centrifugación con el detergente comercial.
- Probar otros detergentes comerciales cuya composición sea similar al utilizado en este trabajo.
- Relacionar los resultados de los hemocultivos con otros biomarcadores como la Proteína C Reactiva (PCR) además del ya mencionado en este trabajo (PCT) para ampliar la información que oriente a los profesionales de la salud y tener un conjunto de herramientas que mejoren la atención del paciente.

## 15. REFERENCIAS

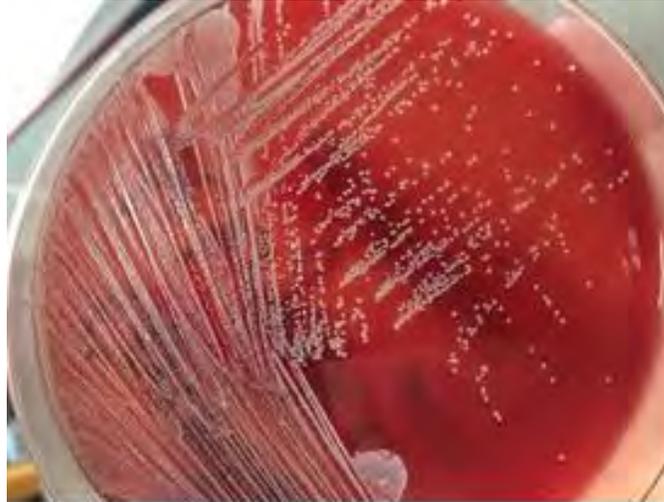
1. Christaki E & Giamarellos-Bourboulis EJ. *The complex pathogenesis of bacteremia from antimicrobial clearance mechanisms to the genetic background of the host*. Virulence. 2014; 5(1): 57-65.
2. Donoso A, Arriagada D, Cruces P & Díaz F. *Shock séptico en pediatría I. Enfoque actual en el diagnóstico y tratamiento*. Rev Chil Pediatr. 2013; 84(5): 484-498.
3. Sánchez-Garduño, J. *Procalcitonina y sepsis neonatal: aspectos clínicos y del laboratorio*. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab. 2016; 63(3):148-154.
4. Reinhart K, Daniels R & Ribeiro F. *The burden of sepsis: a call to action in support of World Sepsis Day 2013*. Rev Bras Ter Intensiva. 2013; 25 (1): 3-5.
5. Carrillo-Esper R, Peña-Pérez CA & Sosa-García JO. *Sepsis de las bases moleculares a la campaña para incrementar la supervivencia*. Documento de postura. Academia Nacional de Medicina. 2015
6. Vergnano S, Sharland M, Kazembe P, Mwansambo C & Heath PT. *Neonatal sepsis: an international perspective*. Arch Dis Child Fetan Neonatal. 2005; 90: F220-F224.
7. Arriagada SD, Díaz RF, Donoso FA, Cruces RP. *Clasificación PIRO en sepsis grave y shock séptico pediátrico: Nuevo modelo de estratificación y su utilidad en pronóstico*. Rev Chil Infectol. 2010; 27(1):17-23.
8. Coronell W, Pérez C, Guerrero C & Bustamante H. *Sepsis neonatal*. Rev Enfer Infec Ped. 2009; 90.
9. Guzmán F & Arias CA. *La historia clínica: elemento fundamental del acto médico*. Rev Colomb Cir. 2012; 27:15-24.
10. Loza Fernández de Bobadilla E, Planes-Reig A & Rodríguez-Creixems M. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2003
11. Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. *Update on detection of bacteremia and fungemia*. Clin Microbiol Rev. 1997; 10(3): 444-65
12. Sánchez-Carrillo C, Rodríguez-Creixems M & Muñoz P. *Indicaciones y valoración clínica del hemocultivo*. Medicine. 2010; 10(49):3313-3316
13. Norma Oficial Mexicana NOM-045-SSA2-2005, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones.
14. Inserto de BacT/ALERT®PF Plus. REF 410853 de BioMérieux, Inc.
15. López-Jácome LE, Hernández-Durán M, Colín-Castro C, Ortega-Peña S, Cerón-González R & Franco-Cendejas R. *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología*. Investigación en discapacidad. 2014; 3(1):10-18.
16. Ramírez-Gama RM, Luna-Millán B, Velázquez-Madrado O, Vierna-García L, Mejía-Chávez A, Tsuzuki-Reyes G, Hernández-Gómez L, Camacho-Cruz A & Urzúa-Hernández M del C. *Manual de Prácticas de Microbiología General*. Facultad de Química, UNAM. México. 6ª edición. 201. Pp, 66-68.
17. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV & Clark DP. *Brock, Biología de los microorganismos*. 12ª edición. PEARSON. 2009. Pp, 86-87,92.

18. García P, Allende F, Legarraga P, Huilcaman M & Solari S. *Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI*. Rev Chil Infectol. 2012; 29(3):263-272.
19. Maldonado N, Robledo C & Robledo J. *La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica*. Infecto 2018; 22(1):35-45.
20. Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti J-L, Ferroni A, Gutmann L & Nassif X. *MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory*. Clinical Biochemistry. 2011; 44: 104-109.
21. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK & Viridi JS. *MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis*. Front Microbiol. 2015, 6:791.
22. Zboromyrska, Y. *Aplicaciones del MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología*. Ed Cont Lab Clín. 2015; 20:87-98.
23. Literatura complementaria de la casa comercial BioMérieux
24. Barba JR. *PROCALCITONINA. Su papel como biomarcador de sepsis*. Rev Mex Patol Clin. 2008; 55(3): 157-167.
25. Carrillo-Esper R & Pérez-Calatayud AA. *Procalcitonina como marcador de procesos infecciosos en cirugía. Conceptos actuales*. Cirujano General. 2013; 35(1): 49-55.
26. Vijayan A, Vanimaya, Ravindran S, Saikant R, Lakshmi S, Kartik R & Manoj G. *Procalcitonin: a promising diagnostic marker for sepsis and antibiotic therapy*. Journal of Intensive Care. 2017; 5:51
27. Meza-Cano ME, Treviño-Frutos R & Hernández-Portales J. *Procalcitonina como biomarcador diagnóstico de sepsis en adultos*. Med Int Mex 2012; 28(4):329-335.
28. Morales-Muñoz G, Ruíz-Álvarez M, Aguirre-Sánchez J, Elizalde-González JJ, Poblano-Morales M & Martínez-Sánchez J. *Procalcitonina en el diagnóstico temprano de sepsis de origen bacteriano*. Rev Asoc Mex Med Crit y Ter Int 2006; 20(2):57-64 M)
29. Reyna-Figueroa J, Lagunas-Martínez A, Martínez-Matsumoto P & Madrid-Marina V. *Procalcitonina como biomarcador diagnóstico de sepsis en el niño con cáncer, neutropenia y fiebre: revisión de la literatura*. Arch Argent Pediatr 2015; 113(1):46-52
30. Córdova-Ortega JA, Asz-Sigall J, Medina-Vega FA. *Procalcitonina sérica como factor pronóstico de apendicitis perforada en niños*. Acta Pediatr Mex 2011; 32(6):337- 343
31. Shiferaw B, Bekele E, Kumar K, Boutin A, Frieri M. *The Role of Procalcitonin as a Biomarker in Sepsis*. J Infect Dis Epidemiol. 2016; 2:006
32. Inserto VIDAS®B·R·A·H·M·S PCT™ (PCT). REF 30 450 de BioMérieux, Inc
33. Hospital Infantil de México Federico Gómez. Historia del instituto. Consultado el 08 de agosto 2018, de [himfg.com.mx](http://himfg.com.mx)

34. Pérez RO, Lona JC, Quiles M, Verdugo MA, Ascencia EP & Benítez EA. *Sepsis neonatal temprana, incidencia y factores de riesgo asociados en un hospital público del occidente de México*. Rev Chil Infectol. 2015; 32(4).
35. Foster A. *Rapid identification of microbes in positive blood cultures by use of the Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry System*. Journal of Clinical Microbiology. 2013; 51(11): 3717-3719.
36. Hervé B. *Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico: automatización y algunas aplicaciones en identificación microbiana y estudios de susceptibilidad*. Rev. Med. Clin. Condes. 2015; 26(6):753-763.
37. Corzo-Delgado JE & Gómez-Mateos JM. *Stenotrophomonas maltophilia, un patógeno nosocomial de importancia creciente*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2016; 24:1-3.
38. Gutiérrez-Martínez CA, Reyes-García E & Corona-Jiménez F. *Stenotrophomonas maltophilia, una bacteria multirresistente*. Rev Asoc Mex Med Crit y Ter Int. 2007; 21(2): 91-94.
39. BD-México-Vacutainer. Tubos BD Vacutainer® para extracción de sangre por sistema de vacío. Consultado el 31 de agosto 2018, de <https://www.bd.com/es-es/our-products/blood-and-urine-collection/vacutainer-blood-collection-tubes>
40. Cheryshev AV, Tarasov PA, Semianov KA, Nekrasov V, Hoekstra A & Maltsev V. *Erythrocyte lysis in isotonic solution of ammonium chloride: Theoretical modeling and experimental verification*. Journal of Theoretical Biology. 2008; 93-107.

## ANEXO I

Comprobación de la presencia de microorganismos de acuerdo a la técnica.



**Figura 25.** Inóculo del último lavado de la técnica con detergente. Crecimiento de colonias blancas y pequeñas, perteneciente a Gram positivos en Agar sangre, aparentemente monomicrobiano.



**Figura 26.** Inóculo de la superficie del gel separador de acuerdo con la técnica con solución de cloruro de amonio al 0.8%. Observación de crecimiento de bacteriano en Agar sangre, colonias blanquecinas y pequeñas.

## ANEXO II

### Experimentos previos

Para los experimentos pilotos, se tomaron 15 hemocultivos positivos, obteniendo los siguientes resultados para cada técnica.

**Tabla 8.** Resultados con las técnicas con detergente, lisis-centrifugación con NH<sub>4</sub>Cl al 0.8% y por inoculación en placa.

No.	Origen	Técnica con detergente			Técnica con NH <sub>4</sub> Cl 0.8%			Técnica en placa
		Tiempo (min)	Pozo 1 / %confianza	Pozo 2 / %confianza	Tiempo (min)	Pozo 1 / %confianza	Pozo 2 / %confianza	
1	HC	54	<i>E.coli</i> /99.9	<i>E.coli</i> / 99.9	80	<i>E.coli</i> / 99.9	<i>E.coli</i> / 99.9	<i>E.coli</i>
2	HP1	40	NI	NI	71	NI	NI	<i>P.aeruginosa</i>
3	HC	52	NI	NI	74	NI	NI	<i>S.aureus</i> y <i>A.xylooxidans</i>
4	HP	59	NI	NI	66	NI	<i>S.aureus</i> /99.9	<i>S.aureus</i> y <i>A.xylooxidans</i>
5	HC	39	NI	NI	65	NI	<i>S.haemolyticus</i> /99.9	<i>S.haemolyticus</i> y <i>S.epidermidis</i>
6	HC L.Rojo	59	NI	NI	78	<i>H.parainfluenzae</i> /99.7	<i>H.parainfluenzae</i> /99.9	<i>H.parainfluenzae</i>
7	HC	50	NI	NI	81	NI	NI	<i>S.epidermidis</i>
8	HP2	49	NI	NI	75	NI	<i>S.hominis</i> /99.9	<i>S.hominis</i>
9	HP	40	NI	NI	76	NI	<i>S.hominis</i> /99.9	<i>S.hominis</i>
10	HP1	47	NI	NI	79	<i>S.maltophilia</i> /99.9	<i>S.maltophilia</i> /99.8	<i>S.maltophilia</i>
11	HP2	36	<i>S.maltophilia</i> /99.9	<i>S.maltophilia</i> /99.9	79	<i>S.maltophilia</i> /99.9	<i>S.maltophilia</i> /67.3	<i>S.maltophilia</i>
12	HP	44	NI	NI	72	NI	NI	<i>S.epidermidis</i>
13	HC L.Café	38	<i>P.aeruginosa</i> /99.9	<i>P.aeruginosa</i> /99.9	68	NI	<i>P.aeruginosa</i> /99.9	<i>P.aeruginosa</i>
14	HP1	57	NI	NI	74	<i>S.haemolyticus</i> /99.9	<i>S.haemolyticus</i> /99.9	<i>S.hominis</i> y <i>S.haemolyticus</i>
15	HC	46	<i>S.aureus</i> /99.9	NI	69	NI	NI	2 morfotipos de <i>S.aureus</i>
Promedio		47.33		Promedio	73.8			

El procesamiento de la técnica del detergente tuvo una duración promedio de 47 minutos, mientras que con la técnica de lisis-centrifugación fue aproximadamente de 74 minutos. En la técnica de detergente se observó que la utilización de N-cisteína (de acuerdo con el artículo base de Arnold G.W. Foster <sup>35</sup>), afectaba los resultados, por lo que a partir del experimento piloto número 11 se retiró, obteniendo una mejora en la identificación del microorganismo y se aplicó en los experimentos siguientes.