



***CONCORDANCIA ENTRE UN MÉTODO CONVENCIONAL Y UN MÉTODO DIRECTO PARA LA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA EN MUESTRAS DE HEMOCULTIVOS POSITIVOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE MASAS (MALDI – TOF MS).***

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**TRABAJO DE GRADO**

**BOGOTÁ MAYO DE 2018.**

## **DEDICATORIA**

*A mi familia por su apoyo incondicional en todo este proceso a pesar de las circunstancias.*

*A mi gran empresa Keralty; en especial a Clínica Colsanitas por creer en mí en este camino de superación.*

*A mis amigos y conocidos por valorar mis esfuerzos.*

**NÉSTOR MARTÍNEZ**

## **AGRADECIMIENTOS.**

A Dios por ser mi guía, mi luz y por darme las fuerzas necesarias en cada momento difícil de mi vida.

A mi madre por sus sabios consejos entre ellos el de luchar y nunca desfallecer y a mis hermanos por creer y confiar en mí.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca quien me abrió las puertas y me dio la oportunidad de formarme como profesional.

Al Laboratorio Clínico Sanitas en especial al grupo de Microbiología en cabeza de la Doctora Claudia Sierra por su apoyo incondicional en cada proceso como Auxiliar de Laboratorio, como estudiante y ahora como futuro Bacteriólogo.

Al comité de ética y al grupo de investigación INPAC en especial a la Doctora Johana Echeverry por su apoyo y confianza depositada durante este proyecto.

Al Doctor José Arnulfo Pérez director del trabajo de grado por su asesoramiento en el mismo.

Al grupo de docentes de la universidad por sus enseñanzas y orientaciones en pro del éxito profesional.

A mis compañeros de carrera amigos y conocidos por darme una voz de aliento y por brindarme sus vivencias y experiencias de vida.

***NÉSTOR MARTÍNEZ.***

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>MARCO DE REFERENCIA.</b>	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>Espectrofotometría de masas</b>	<b>22</b>
<b>3.2</b>	<b>Analizadores (Dispositivos Biomédicos)</b>	<b>23</b>
<b>3.3</b>	<b>Maldi MS</b>	<b>24</b>
<b>3.4</b>	<b>Ionización por maldi</b>	<b>24</b>
<b>3.5</b>	<b>Analizador en tiempo de vuelo (en inglés, Time Of Flight).</b>	<b>24</b>
<b>3.6</b>	<b>Hemocultivo</b>	<b>25</b>
<b>3.6.1</b>	<b>Clasificación.</b>	<b>26</b>
<b>3.7</b>	<b>Identificación bacteriana</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>DISEÑO METODOLÓGICO</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Universo, población y muestra.</b>	<b>28</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Universo.</b>	<b>28</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Población.</b>	<b>28</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Muestra.</b>	<b>28</b>
<b>4.2</b>	<b>Hipótesis y variables.</b>	<b>30</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Hipótesis.</b>	<b>30</b>

4.2.2	Variables.	30
4.3	Análisis estadístico.	34
4.4	Técnicas y procedimientos.	35
4.4.1	Toma y remisión de muestras de hemocultivos.	35
4.4.2	Procesamiento de hemocultivos por metodología estandarizada convencional a partir de colonias en fase sólida por MALDI TOF.	35
4.4.3	Procesamiento de hemocultivos por metodología directa a partir de muestra líquida por MALDI TOF.	37
4.4.4	Proceso de recolección y sistematización de la información	38
4.5	Consideraciones éticas	38
5	RESULTADOS	41
5.1	Características demográficas de la población	41
5.1.1	Distribución de la variable edad.	41
5.1.2	Distribución de la variable sexo.	44
5.1.3	Distribución de la variable procedencia.	46
5.1.4	Distribución de variable tiempos de incubación de las muestras de hemocultivos	47

5.1.5	Distribución de variable número de botella de hemocultivo positivo.	49
5.2	Caracterización de los microorganismos hallados en los hemocultivos positivos de acuerdo a su coloración de Gram por su afinidad y morfología	50
5.2.1	Clasificación Bacteriana por Coloración de Gram.	50
5.2.2	Distribución de variable morfología bacteriana	52
5.2.3	Distribución de variable Germen identificado mediante metodo convencional Vitek MS®	54
5.2.4	Distribución de variable gérmen identificado por metodo directo	55
5.2.5	Tiempos entre la alarma de positividad y el procesamiento directo de hemocultivos positivos	57
5.3	Concordancia entre los dos métodos de análisis para la identificación bacteriana en hemocultivos positivos por MALDI-TOF.	58
6	DISCUSIÓN	59
7	CONCLUSIONES	63
8	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	64
9	ANEXOS	70

<b>9.1</b>	<b>Anexo 1. PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE MUESTRAS DE HEMOCULTIVOS.</b>	<b>70</b>
<b>9.2</b>	<b>Anexo 2. PROCEDIMIENTO PARA LA SELECCIÓN DE PACIENTES Y RECOLECCION DE MUESTRAS.</b>	<b>73</b>
<b>9.3</b>	<b>Anexo 3. INSTRUCTIVO TECNICO PARA EL PROCEDIMIENTO DE HEMOCULTIVOS.</b>	<b>74</b>
<b>9.4</b>	<b>Anexo 4. MANUAL DE USO DE EQUIPO VITEK MS® DE BIOMERIEUX®.</b>	<b>78</b>
<b>9.5</b>	<b>Anexo 5. PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACION DIRECTA DE HEMOCULTIVOS.</b>	<b>83</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Esquema de un espectrofotómetro de masas</b>	<b>22</b>
<b>Figura 2 Clasificación de hemocultivos según su finalidad</b>	<b>25</b>
<b>Figura 3 Flujograma Toma y remisión de muestras de hemocultivos</b>	<b>34</b>
<b>Figura 4 esquema de procesamiento de hemocultivos por metodología convencional a partir de colonias en fase solida por MALDI TOF</b>	<b>35</b>
<b>Figura 5. esquema de procesamiento de hemocultivos por metodología directa a partir de muestras liquidas por MALDI TOF</b>	<b>36</b>
<b>Figura 6. Distribución de la edad en la población de estudio</b>	<b>41</b>
<b>Figura 7. Distribución edad por sexo en la población de estudio.</b>	<b>43</b>
<b>Figura 8. Distribución de la variable sexo en la población de estudio.</b>	<b>43</b>
<b>Figura 9. Distribución de variable procedencia</b>	<b>46</b>
<b>Figura 10. Distribución de número de botella hemocultivo positivo empleada en el estudio</b>	<b>49</b>
<b>Figura 11. Distribución de variable clasificación bacteriana mediante coloración de Gram</b>	<b>51</b>
<b>Figura 12. Distribución de variable morfología bacteriana</b>	<b>52</b>
<b>Figura 13. Distribución de variable germen identificado mediante</b>	

<b>método convencional</b>	<b>54</b>
<b>Figura 14. Distribución de variable germen identificado por método directo.</b>	<b>55</b>
<b>Figura 15. Frascos de hemocultivos</b>	<b>69</b>
<b>Figura 16. equipo BacT/ALERT 3D®</b>	<b>73</b>
<b>Figura 17 Incubadora memmert de CO2 ICOMed con Twin DISPLAY Software Atmo CONTROL</b>	<b>74</b>
<b>Figura 18. Equipo PREVI Color Gram</b>	<b>75</b>
<b>Figura 19. Equipo Vitek MS®</b>	<b>76</b>
<b>Figura 20. Placa para inoculación de muestra Vitek MS®</b>	<b>77</b>
<b>Figura 21. Kit de reacción Vitek MS®</b>	<b>78</b>
<b>Figura 22. Puerta y rejilla de entrada Vitek MS®</b>	<b>79</b>
<b>Figura 23. Software Vitek MS®</b>	<b>81</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Espectrofotómetros existentes en el mercado</b>	<b>22</b>
<b>Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión</b>	<b>28</b>
<b>Tabla 3. Variables a estudiar</b>	<b>30</b>
<b>Tabla 4. Distribución de los datos según análisis de Shaphiro Wilk</b>	<b>40</b>
<b>Tabla 5. Análisis de variable edad.</b>	<b>41</b>
<b>Tabla 6. Análisis de Mann Whitney edad /sexo</b>	<b>42</b>
<b>Tabla 7. Distribución de la media de edad por sexo.</b>	<b>44</b>
<b>Tabla 8. Distribución de la mediana de edad por sexo.</b>	<b>45</b>
<b>Tabla 9 Distribución de la variable procedencia</b>	<b>46</b>
<b>Tabla 10. Distribución tiempo de incubación</b>	<b>47</b>
<b>Tabla 11. Mediana tiempo de incubación.</b>	<b>47</b>
<b>Tabla 12. Análisis de variable número de hemocultivo positivo.</b>	<b>48</b>
<b>Tabla13. Distribución bacteriana por coloración de Gram.</b>	<b>50</b>
<b>Tabla 14. Distribución de variable morfología bacteriana.</b>	<b>52</b>
<b>Tabla 15. Distribución de variable germen identificado mediante método convencional</b>	<b>53</b>

**Tabla16. Distribución de variable germen identificado mediante método directo 55**

**Tabla17. Tiempos entre la alarma de positividad y el procesamiento directo de hemocultivos positivos 56**



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

***CONCORDANCIA ENTRE UN MÉTODO CONVENCIONAL Y UN MÉTODO DIRECTO PARA LA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA EN MUESTRAS DE HEMOCULTIVOS POSITIVOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE MASAS (MALDI – TOF MS).***

**RESUMEN**

Introducción: Las enfermedades infecciosas con mayor índice de morbilidad y mortalidad en el mundo han sido causadas por infecciones dependientes de bacterias Gram positivas y Gram negativas, identificables en medios de cultivos sólidos a partir de hemocultivos.

Objetivo: Determinar la concordancia entre una metodología convencional y un método directo de diagnóstico *in-vitro* para identificación bacteriana, en muestras de hemocultivos positivos, provenientes de pacientes hospitalizados de la red Clínica Colsanitas de la ciudad de Bogotá mediante plataforma automatizada por espectrofotometría de masas (MALDITOF-MS),

Resultados: El índice kappa arrojó un resultado de concordancia del 68 % (0,6807) con un valor  $p=0.000$ , categorizado como K bueno.

Se estudiaron las características demográficas de la población observándose variaciones en las variables edad, sexo y procedencia, en el estudio se evidenció una media de edad de 67 años, en su mayoría sexo masculino, la mayoría de las muestras provienen de CUC con 71% y el promedio de tiempo de positividad fue 14 horas, la botella con más positividad es la # 1 con 43%, en las características de los microorganismos se encontró que las bacterias Gram negativas son las de mayor frecuencia con 71% el germen de mayor frecuencia hallado por las dos metodologías corresponde a *E. coli* con 33%.

Conclusiones: La metodología MALDI TOF MS es la más opcionada en la identificación bacteriana por método directo, sin embargo, en nuestro estudio es necesario mejorar el proceso pre analítico de las muestras antes de su identificación para lograr una mayor concordancia

**Palabras claves:** Cultivo de Sangre, Espectrometría de Masa por Láser de Matriz Asistida de Ionización Desorción.

## 1 INTRODUCCIÓN

Trascendentalmente en la ciencia de la microbiología, específicamente en la en la bacteriología, se han venido utilizando métodos fenotípicos para el diagnóstico de microorganismos asociados a patologías infecciosas en pacientes con cuadro clínico de bacteriemias. Los agentes infecciosos encontrados pueden presentar características morfológicas e histoquímicas en los diferentes medios de cultivo previamente inoculados e incubados; hoy en día su identificación final se hace mediante reacciones bioquímicas y/o ensayos moleculares específicos para cada especie; sin embargo, esto conlleva a que cada procedimiento sea dispendioso, de cuidado y de tiempo prolongado para obtener un resultado satisfactorio. Estos análisis microbiológicos pueden tomar hasta 5 días en la obtención de los resultados, lo cual impacta sobre el pronóstico y tratamiento de las infecciones(1,2).

En la rutina clínica existen casos de bacteriemias con difícil tratamiento debido al aumento en los días de estancia en la clínica, deficientes procesos de limpieza y desinfección, antibioticoterapia imprecisa, y en ocasiones tiempos prolongados en la identificación del microorganismo, debido a las características del aislamiento bacteriano (crecimiento lento, identificación imprecisa de las cepas) entre otras limitantes analíticas inherentes a los métodos de diagnóstico *in-vitro* (1,3).

La implementación de procesos técnicos más eficientes en el laboratorio de microbiología, con relación al tiempo y tecnología de identificación son de

gran impacto a nivel diagnóstico sobre en algunas dependencias de los hospitales o clínicas. Por lo anterior, con el presente trabajo se pretende establecer el grado de concordancia entre un método convencional y un método directo, con el propósito de optimizar el tiempo de procedimiento y mejorar la metodología de diagnóstico IVD para la identificación bacteriana en muestras de hemocultivos positivos mediante (MALDI –TOF MS-) obteniendo resultados más oportunos que impactaran de manera positiva el tratamiento de los pacientes (4,5).

## 2 ANTECEDENTES

Las enfermedades infecciosas con mayor índice de morbilidad y mortalidad en el mundo han sido causadas por infecciones dependientes de bacterias Gram positivas y Gram negativas, dentro de las cuales tenemos los géneros *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Enterococcus* spp, *Corynebacterium* spp, *Pseudomonas* spp, *Acinetobacter* spp, *Haemophilus* spp y Enterobacterias respectivamente, identificables en medios de cultivos provenientes de sangre total durante el procesamiento de hemocultivos. (3,6,7).

La sociedad española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica han sido los principales gestores en considerar las guías prácticas de procedimientos y protocolos básicos de estandarización y normalización de hemocultivos en los diferentes laboratorios, es por eso, que debido a importantes cambios en la incidencia y en la etiología de las bacteriemias y las fungémiás, se utiliza una muestra de sangre total envasada en una botella denominada hemocultivo la cual es procesada mediante metodologías manuales tales como: convencionales, bifásicas, lisis de filtración, lisis de centrifugación o metodologías automatizadas como: radiométricos no radiométricos o de monitorización continua.(7)

En las áreas de microbiología en los últimos años se han incluido varios sistemas comerciales que han impactado en la disminución de manipulación manual realizando una agitación continua de las botellas de hemocultivos y una monitorización permanente en la producción de CO<sub>2</sub> generado por el metabolismo bacteriano y que reacciona con un material fluorescente situado

en el fondo del frasco del hemocultivo, lo que modula la cantidad de luz que es absorbida por un sensor. Los fotosensores miden el nivel de fluorescencia, que se correlaciona con la cantidad de CO<sub>2</sub> producida por el microorganismo. Esta medida es interpretada por el sistema de acuerdo con unos parámetros programados; realizando lectura a todos los frascos cada 10 minutos con notificación inmediata de los resultados positivos mediante alarmas luminosas indicando crecimiento o presencia bacteriana (8).

Una vez se evidencia la positividad se procede a realizar un aislamiento donde inicialmente se realiza una coloración de Gram y se lleva a cabo la siembra en los diferentes medios de cultivo para posteriormente hacer la identificación basada en características bioquímicas y metabólicas; estas metodologías han evolucionado con el pasar de los años, de ser pruebas totalmente manuales a tecnologías automatizadas basadas en técnicas genómicas, moleculares y de proteómica las cuales han ayudado a obtener una identificación microbiana rápida y fiable en la industria de la microbiología.(4)

Recientemente se ha venido implementando en los diferentes campos de la microbiología y de otras áreas, una metodología mucho más rápida y de gran efectividad en la identificación bacteriana basada en el perfil de proteínas específicamente ribosomales mediante la espectrometría de masas por MALDI-TOF propuesta hace varios años. Se han realizado estudios parciales sobre la efectividad para la identificación de determinados microorganismos tales como análisis de hongos, bacterias anaerobias en distintos tipos de muestras e identificación de micobacterias en condiciones controladas, pero existen escasos trabajos publicados que han demostrado el uso efectivo de este sistema de identificación en muestras de sangre total por este método

de identificación bacteriana el cual tendría un impacto positivo sobre el tratamiento del paciente.(4,9,10)

### 3 MARCO DE REFERENCIA.

#### 3.1 Espectrofotometría de masas

La Espectrometría de masas es una técnica analítica que permite estudiar compuestos de naturaleza diversa: orgánica, inorgánica o biológica; mediante el análisis por espectrometría de masas es posible obtener información de la masa molecular del compuesto analizado, así como información estructural del mismo, o simplemente detectar su presencia y/o cuantificar su concentración. Para ello es necesario ionizar las moléculas, utilizando una separación cromatográfica (HPLC, GC) del inglés (high performance liquid chromatography and gas chromatography) previa para obtener los iones formados en fase gaseosa. Este proceso tiene lugar en la fuente de ionización.

Los iones generados son acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ) mediante la aplicación de campos eléctricos magnéticos o simplemente determinando el tiempo de llegada a un detector. Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador. El registro obtenido se denomina espectro de masas y representa las abundancias iónicas obtenidas en función de la relación masa/carga de los iones detectados. Ver figura 1.

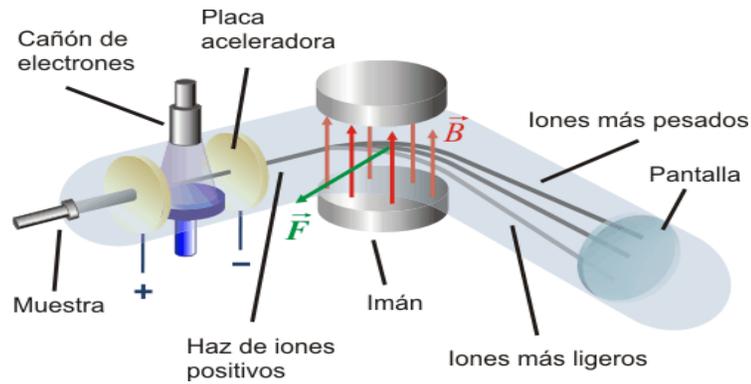


Figura 1. Esquema de un espectrofotómetro de masas. Tomado de (11).

### 3.2 Analizadores (Dispositivos Biomédicos)

Actualmente en el mercado existen diferentes equipos empleados en la espectrofotometría de masas de uso en el laboratorio clínico (1). Ver tabla 1

Tabla1. Espectrofotómetros existentes en el mercado

Equipo/método	Fundamento	Utilidad	Tamaño molecular
Cromatografía gaseosa (GC) con espectrometría de masas (MS)	Permite la separación previa de la mezcla de compuestos presentes en una misma muestra, con un posterior análisis del espectrómetro	Toxicología, medicina forense, laboratorios de alimentos y medioambientales, en general para medición de sustancias volátiles	< 1.000 Da.
Cromatografía líquida (LC) con espectrometría de masas (MS)	Permite la separación de sustancias volátiles y no volátiles Permite disminuir el tiempo de trabajo en la fase pre analítica en relación al GC/MS	Laboratorios clínicos (medición de hormonas, tamizaje neonatal de enfermedades metabólicas), Bioequivalencia, medición de pesticidas	< 3.000 Da
Cromatografía GC/MS-MS (Tandem)	Permite mejorar la sensibilidad y especificidad de los métodos anteriores	Métodos de referencia para la determinación de una gran cantidad de analitos	< 1.000 Da
Cromatografía LC/MS-MS (Tandem)	Permite mejorar la sensibilidad y especificidad de los métodos anteriores	Métodos de referencia para la determinación de una gran cantidad de analitos. Permite análisis de proteínas, aunque la etapa pre-analítica es engorrosa	< 3.000 Da
Detector de masas por tiempo de vuelo con desorción láser asistida por una matriz (MALDI-TOF matrix-assisted desorption ionization-time of flight)	Consiste en el cálculo de tiempo de vuelo de cada fragmento de una molécula a través de un trayecto predeterminado con una ionización láser previa de la molécula en una matriz determinada	Identificación de microorganismos: bacterias y hongos	< 100.000 Da (macromoléculas) 2.000 - 20.000 Da

Tomada de (1).

### **3.3 Maldi MS**

El método denominado MALDI-MS (del inglés: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry) permite detectar moléculas en un amplio rango de masas moleculares. Este tipo de ionización (junto a la ionización ESI) se conoce como "soft-ionization" ya que permite ionizar biomoléculas como péptidos y proteínas, sin ruptura durante el proceso. Existen en el mercado distintos analizadores acoplados a esta fuente de ionización pero es el TOF ("time of flight") el analizador más común.(12,13).

### **3.4 Ionización por maldi**

En este tipo de técnica la muestra se mezcla con la matriz en exceso sobre una superficie de metal de tal forma que ambas co-cristalizan cuando se evapora el solvente. Esta preparación es sometida a pulsos cortos de láser en alto vacío lo que provoca que la absorción de energía por parte de la matriz sea convertida en energía de excitación y en transferencia de hidrógenos a la muestra (ionización) dando lugar, normalmente, a especies mono cargadas. El área irradiada, de unas pocas micras, se calienta dando lugar a la desorción de los iones de fase sólida a fase gaseosa (14).

### **3.5 Analizador en tiempo de vuelo (en inglés, Time Of Flight).**

El TOF es el analizador que más comúnmente se acopla a la fuente MALDI, la determinación de la masa en una región de alto vacío se realiza mediante

una medida muy precisa del período de tiempo desde la aceleración de los iones en la fuente (source) hasta que impactan con el detector (15).

El hecho de que la ionización por MALDI permita detectar moléculas termolábiles, como son las proteínas, de forma intacta, la incluye dentro de los métodos de ionización suave (“soft-ionization”). No obstante, durante el proceso de aceleración o durante el “vuelo” a través del tubo, se da un proceso de descomposición denominado PSD (“Post Source Decay”). El análisis de los iones que se producen mediante este fenómeno proporciona una información estructural de la molécula original muy útil, para lo cual es necesario separar estos fragmentos. En un analizador de tipo linear esto no es posible ya que los iones formados por PSD tienen la misma velocidad que el ion original y viajan juntos hasta el detector; para separarlos se emplean analizadores de tipo reflector que trabajan con voltajes variables para finalmente obtener un único espectro de fragmentación-PSD compuesto de tantos espectros como voltajes empleados, que se pegan con ayuda informática (13).

### **3.6 Hemocultivo**

Se define como volumen de sangre obtenido en un recipiente, vial o frasco; por punción venosa periférica o por arrastre desde el lumen de un catéter, que es inoculado en un medio líquido enriquecido, e incubado a 35°C para detectar desarrollo de microorganismos causantes de bacteriemia o sepsis. En el caso de hemocultivos automatizados, la muestra de sangre inoculada, es incubada en un equipo que hace lecturas periódicas para detectar evidencias de metabolismo bacteriano(8,16).

### 3.6.1 Clasificación.

Según la finalidad los hemocultivos se pueden clasificar teniendo en cuenta el tipo de paciente de acuerdo a su edad y estado patológico, lugar de obtención de la muestra, microorganismo a estudiar y metodología a utilizar(8). Ver figura 2.

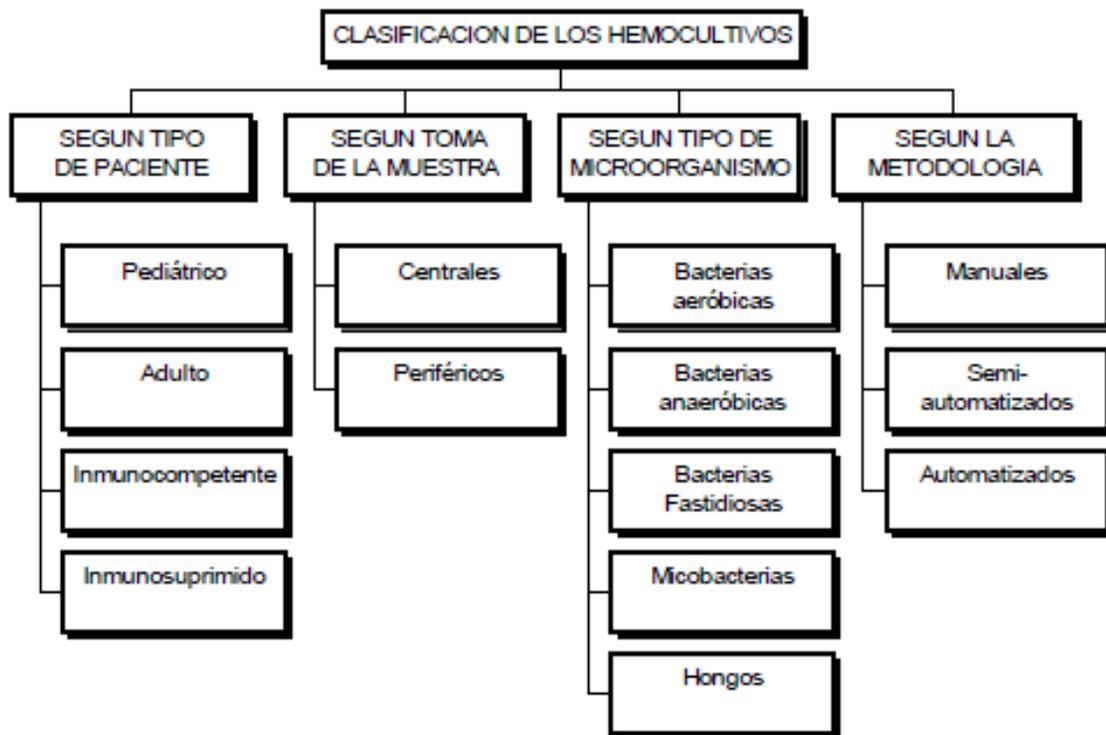


Figura 2. Clasificación de hemocultivos según su finalidad. Tomada de (12).

### **3.7 Identificación bacteriana**

Se define como el reconocimiento de un género o especie bacteriana mediante características morfológicas de agrupación, afinidad en la coloración de Gram, reacciones metabólicas, químicas y enzimáticas utilizando medios de cultivos puros, coloraciones supra vitales y reactivos específicos para determinar su identificación.(17).

## **4 DISEÑO METODOLÓGICO**

### **4.1 Universo, población y muestra.**

#### **4.1.1 Universo.**

Pacientes con solicitud medica de hemocultivo, recepcionados en el área de microbiología del laboratorio central de referencia de la Clínica Colsanitas S.A., en la ciudad de Bogotá.

#### **4.1.2 Población.**

La población objeto de donde se tomó la muestra para este estudio corresponde a 1.300 muestras de hemocultivo que en promedio son recibidas durante un mes en el área de microbiología del laboratorio central de referencia de la Clínica Colsanitas S.A., en Bogotá, de las cuales, cerca de 216 son positivas y se aísla algún germen de interés clínico.

#### **4.1.3 Muestra.**

La muestra estuvo conformada por 100 hemocultivos positivos, que cumplían con los criterios de inclusión (ver tabla 2) y que fueron procesados en el equipo BacT/ALERT 3D® en el área de microbiología del laboratorio central de referencia de la Clínica Colsanitas S.A., en Bogotá, Los hemocultivos seriados fueron tomados con intervalo de toma de muestra de 20 minutos

entre una botella y la otra; y provenían de pacientes mayores de edad hospitalizados en los diferentes servicios de las clínicas: Clínica Reina Sofía (CRS), Clínica Universitaria Colombia (CUC) y clínica calle 103 (CALLE 103) durante los meses de enero y febrero de 2018.

Se empleó un muestreo no probabilístico, consecutivo y a conveniencia, siguiendo las recomendaciones dadas por el Instituto de Estándares de Laboratorio y Clínica (en inglés, CLSI), en el documento técnico descrito para validación de pruebas para diagnóstico *IN VITRO* (en inglés, *IVD*). (18)

**Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión**

<b>CRITERIOS DE INCLUSIÓN.</b>	<b>CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pacientes con orden médica de hemocultivos seriados (3 muestras), provenientes de clínica Reina Sofía, Clínica Universitaria Colombia y clínica calle 103 de la ciudad de Bogotá.</li> <li>• Hemocultivos positivos previamente incubados por equipo BacT/ALERT 3D®</li> <li>• Hemocultivos positivos con Mono bacterias previamente observados mediante</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hemocultivos positivos provenientes de otros centros de la organización, clientes externos, unidad renal y ciudades</li> <li>• Hemocultivos positivos con más de una forma bacteriana observado en coloración de Gram.</li> <li>• Hemocultivos positivos con presencia compatible de estructuras fúngicas mediante</li> </ul>

coloración de Gram.	coloración de Gram.
---------------------	---------------------

## **4.2 Hipótesis y variables.**

### **4.2.1 Hipótesis.**

En el campo de la microbiología se pueden identificar un sin número de microorganismos empleando diferentes técnicas o metodologías; sin embargo, cada vez más se pretende realizar análisis rápidos y efectivos con el objeto de mejorar la oportunidad de respuesta en la entrega de resultados, permitiendo generar un establecimiento rápido y adecuado de la terapia antibiótica. Por tanto, se plantea como hipótesis de este trabajo:

Ho: el método directo no es concordante con el método convencional para la identificación bacteriana a partir de hemocultivos positivos por MALDI-TOF., y no presentan ventaja sobre el método convencional

Ha: el método directo para identificación bacteriana a partir de hemocultivos positivos por MALDI-TOF presenta una ventaja sobre el método convencional.

### **4.2.2 Variables.**

Para la realización de este trabajo se estudiaron variables demográficas, dentro de las cuales están; sexo, edad y lugar de procedencia de la muestras; variables relacionadas con las características del hemocultivo, dentro de las cuales se incluyeron: número de la botella positiva (botella 1, botella 2 ó botella 3); clasificación bacteriana (Gram positivo, Gram negativo) y morfología bacteriana (coco, bacilo, diplococo, coco en racimo); y metodología de identificación bacteriana (convencional -Vitek MS® ó método directo Vitek MS®. Ver tabla 3.

**Tabla 3. Variables a estudiar.**

<b>VARIABLES</b>	<b>OPERALIZACIÓN</b>	<b>TIPO</b>	<b>UNIDAD O ESCALA DE MEDICIÓN</b>
Sexo	Masculino Femenino	Cualitativa Nominal	1=masculino 2= femenino
Edad	Edad simple	Cuantitativa nominal	Años cumplidos
Procedencia	Lugar de hospitalización del paciente al que le fueron tomadas las ordenes de hemocultivo que arrojaron	Cualitativa Nominal	1= Clínica Reina Sofía 2= Clínica universitaria Colombia 3= Clínica calle 103

	posteriormente resultado positivo.		
Numero de botella de hemocultivo	Botella 1: Primera botella tomada  Botella 2: botella tomada 20 minutos después de la primera.  Botella 3: botella tomada 20 minutos después de la segunda	Cuantitativa nominal	1= hemocultivo 1 2= hemocultivo 2 3= hemocultivo 3
Clasificación bacteriana	Clasificación de los microorganismos según su reacción al colorante de Gram.	Cualitativa Nominal	1= Gram positiva 2= Gram negativa
Morfología bacteriana	Forma y tamaño que presentan los microorganismos al ser visualizados en microscopio (100X) con ayuda de la tinción de	Cualitativa Nominal	1=cocos Gram positivos 2=cocos Gram negativos 3=cocos Gram positivos en racimo 4= cocos Gram positivos

	Gram.		<p>en cadena</p> <p>5= bacilos Gram positivos</p> <p>6=bacilos Gram negativos</p>
<p>Germen Identificado por metodología convencional Vitek MS®</p>	<p>Especie y género de la identificación por el método convencional</p> <p>Se asignó numeración de acuerdo a los gérmenes que iban siendo identificados.</p>	<p>Cualitativa</p> <p>Nominal</p>	<p>1= no identificado</p> <p>2= <i>Acinetobacter lwoffii</i></p> <p>3=<i>E.coli</i></p> <p>4=<i>K. pneumoniae</i></p> <p>5=<i>P. aeruginosa</i></p> <p>6=<i>S. marcescens</i></p> <p>7=<i>S. aureus</i></p> <p>8=<i>Listeria monocytogenes</i></p> <p>9=<i>Campylobacter jejuni</i></p> <p>10=<i>Enterococcus faecalis</i></p> <p>11=<i>Propionibacterium acnes</i></p> <p>12=<i>Staphylococcus capitis</i></p> <p>13=<i>staphylococcus epidermides</i></p> <p>14=<i>Streptococcus constellatus</i></p> <p>15=<i>Enterobacter cloacae</i></p> <p>16=Doble población</p>
Germen	Especie y género	Cualitativa	1= no identificado

identificado por método directo Vitek MS®	de la identificación por el método directo.  Se asignó numeración de acuerdo a los gérmenes que iban siendo identificados.	Nominal	2= <i>Acinetobacter lwoffii</i>  3= <i>E.coli</i>  4= <i>K. pneumoniae</i>  5= <i>P. aeruginosa</i>  6= <i>S. marcescens</i>  7= <i>S.aureus</i>  8= <i>Enterobacter cloacae</i>
---	--	---------	--

### 4.3 Análisis estadístico.

Se realizó un análisis descriptivo de las variables de interés y por medio de la prueba de Shaphiro Wilk se estableció la distribución de los datos del estudio. Las variables cualitativas se reportaron como frecuencias absolutas y relativas y se resumieron en tablas de frecuencia, histogramas, gráficos de barra y gráficos de caja según el caso. Para el objetivo principal se estimó el índice Kappa ( $\kappa$ ), estableciendo un nivel mínimo aceptado del 0,85 (85%) y un nivel de desempeño esperado entre 0,95-1 (95-100%). Además, para su interpretación se tuvo en cuenta la siguiente categorización, de acuerdo a la concordancia de las metodologías analizadas: Pobre  $\kappa < 0.20$ ; débil  $\kappa: 0.21 - 0.40$ ; Moderada  $\kappa: 0.41 - 0.60$ ; Buena  $\kappa: 0.61 - 0.80$ ; y Muy buena:  $0.81 - 1.00$  (19).

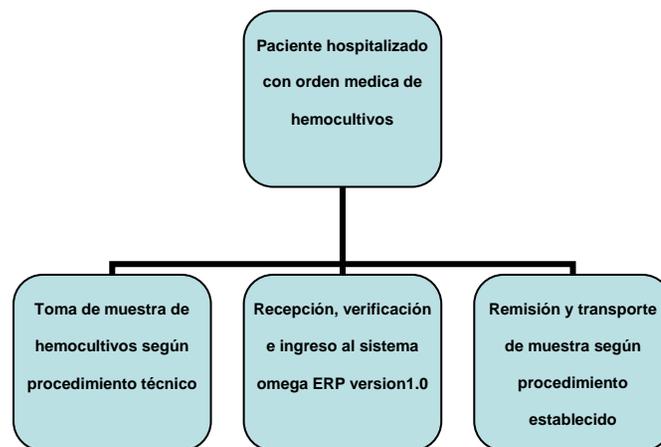
Para la realización de comparaciones entre los grupos se emplearon las pruebas de Mann Whitney y de Kruskall Wallis. Se establecieron como

diferencias estadísticamente significativas aquellas que presentaron una  $p < 0.05$ . Todos los datos fueron analizados en Stata v. 13.0.

#### 4.4 Técnicas y procedimientos.

##### 4.4.1 Toma y remisión de muestras de hemocultivos.

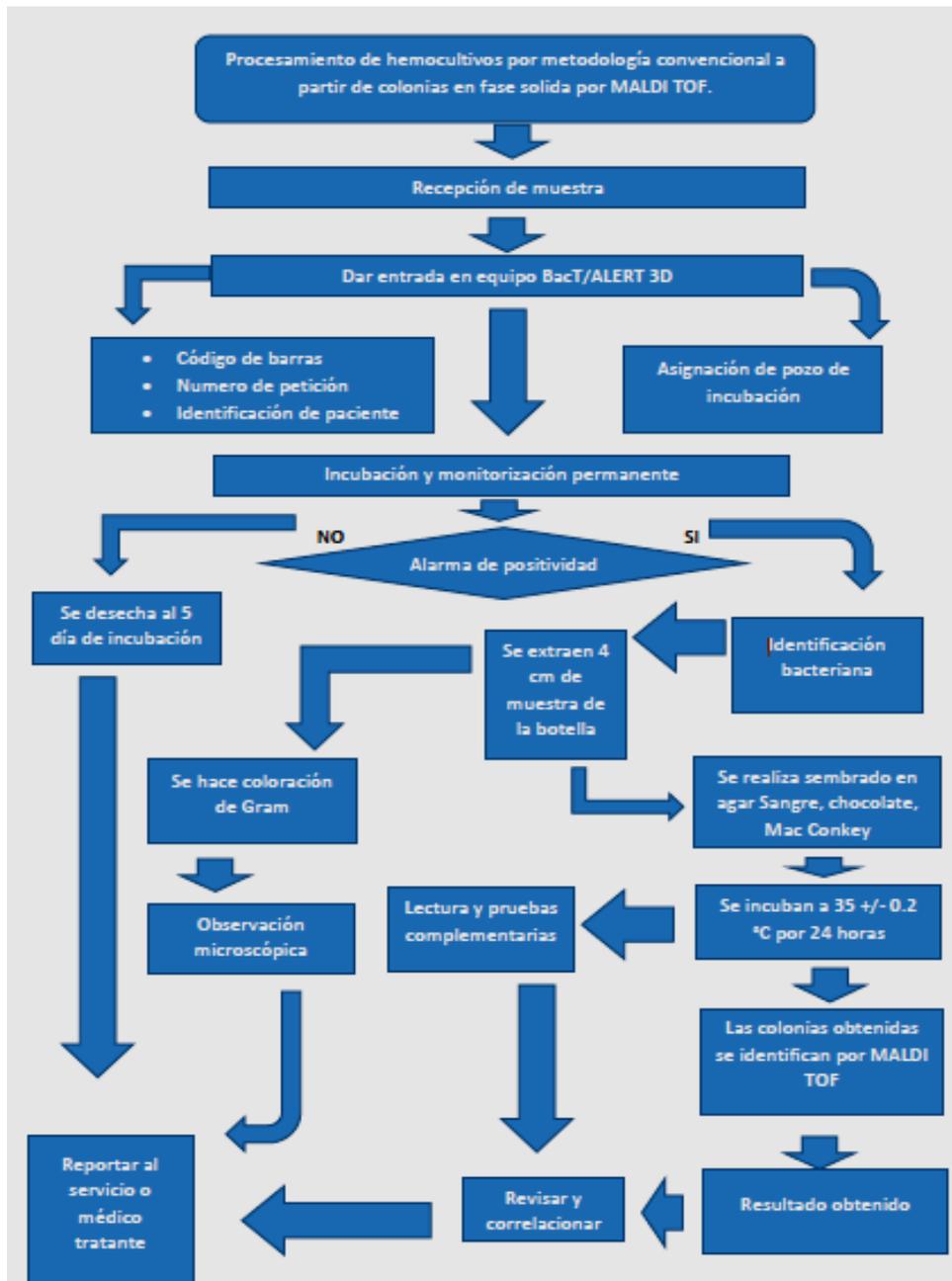
Una vez recibida la orden médica para hemocultivo, se procedió a tomar y remitir las muestras de hemocultivos de acuerdo al protocolo establecido en el manual de toma de muestras microbiológicas de la secretaria de salud de Bogotá (20) y al procedimiento de preparación y remisión de muestras de laboratorio y patología del laboratorio clínico sanitas (21). Ver figura 3, anexos 1 y 2.



**Figura 3. Flujograma de toma y remisión de muestras de hemocultivos, elaboración propia realizada el día 15 de mayo de 2018.**

##### 4.4.2 Procesamiento de hemocultivos por metodología estandarizada convencional a partir de colonias en fase sólida por MALDI TOF.

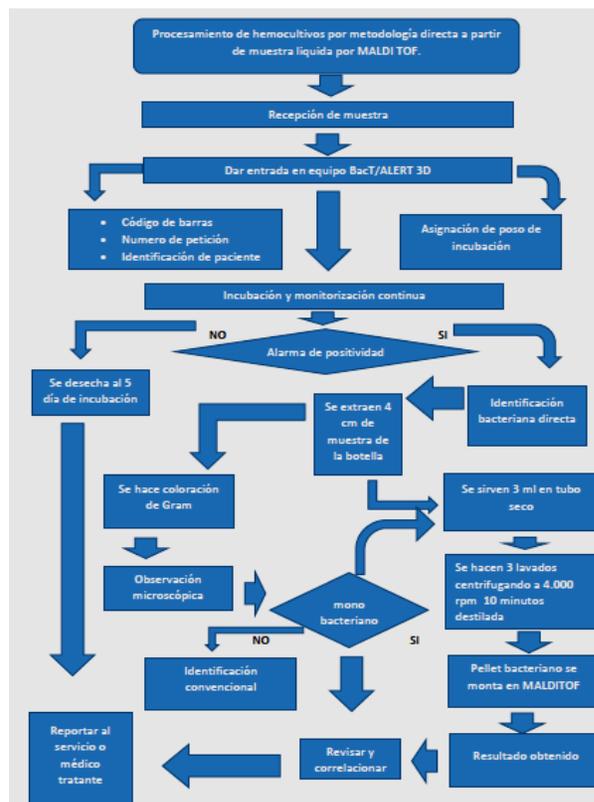
La recepción, verificación y procesamiento de los hemocultivos (incubación, positividad, aislamiento, incubación en medio sólido e identificación de colonias) se realizó de acuerdo al instructivo técnico para el procedimiento de hemocultivos del laboratorio clínico de la Clínica Colsanitas, e instructivo técnico de uso de equipos de la casa comercial Biomerieux® (22,23) Ver figura 4, anexo 3 y 4.



**Figura 4. Esquema de procesamiento de hemocultivos por metodología convencional a partir de colonias en fase sólida por MALDI TOF Fuente: elaboración propia realizada el día 15 de mayo de 2018.**

**4.4.3 Procesamiento de hemocultivos por metodología directa a partir de muestra líquida por MALDI TOF.**

Para el proceso de identificación bacteriana de hemocultivos positivos por la metodología directa se escogieron por conveniencia 100 muestras según los criterios descritos anteriormente durante los meses de enero y febrero de 2018 y se procesaron de acuerdo al procedimiento adaptado para la investigación. Ver figura 5 y anexo 5.



**Figura 5. Esquema de procesamiento de hemocultivos por metodología directa a partir de muestra líquida por MALDI TOF elaboración propia realizada el día 15 de mayo de 2018.**

#### **4.4.4 Proceso de recolección y sistematización de la información**

La información necesaria para el desarrollo del proyecto se tomó del software OMEGA ERP® versión 3.0, empleado en el laboratorio clínico de la Clínica Colsanitas para el registro de pacientes y pruebas solicitadas, una vez se obtuvieron los datos demográficos de los pacientes incluidos en el estudio se realizó una tabla en Excel que contenía tres partes fundamentales; la primera donde se registraron los datos consecutiva y cronológicamente de acuerdo a la fecha de obtención de las muestras, datos básicos del paciente, número de muestra a analizar y la procedencia, la segunda ; donde se registró la información relacionada con incubación, tiempo de incubación al momento de generar alarma de positividad y datos arrojados por la coloración de Gram, y finalmente en la tercera parte, se registró la información obtenida por el método convencional y el método directo de la identificación bacteriana por MALDI TOF MS, una vez diligenciada la información se codificaron las variables y se pasó por el programa Stata v. 13.0 para el análisis estadístico.

#### **4.5 Consideraciones éticas**

El diseño de este estudio se realizó de acuerdo con la Declaración del Helsinki, con el marco normativo vigente para Colombia, el cual corresponde a las Resoluciones N° 2378 de 2008 y N° 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y en conjunto con las pautas éticas para la investigación en salud

promulgadas por Organización Mundial de la Salud, se considera que esta investigación se encuentra categorizada como “SIN RIESGO”. Adicionalmente, de acuerdo con el artículo 11 de la resolución 8430 de 1993, se cumple con lo descrito en el numeral que describe “Investigación sin riesgo”, porque el Vitek MS® es un dispositivo biomédico con certificación IVD para muestras humanas según INVIMA y el presente estudio no tiene alcance para validar una condición adicional a lo certificado por el proveedor frente a este ente de control.

Así mismo, no se tomaron ni se modificaron las decisiones clínicas con los resultados de la prueba alterna (MALDITOF-MS / Vitek MS®) porque estos datos no fueron conocidos por el médico tratante ni el usuario y se continuo con el flujo normal de atención a través de los resultados validados en el sistema de información del laboratorio. Además, no se realizaron modificaciones de las variables biológicas o fisiológicas; solamente con los reportes de la prueba rutinaria y convencional por el método convencional, el médico tratante siguió con su conducta clínica, tal como se hace actualmente.

Otro aspecto, por lo cual se realizó de forma prospectiva el presente estudio, es para garantizar la validez interna de la prueba dado que se mantienen las condiciones habituales pre analíticas de las muestras y se evitan resultados inesperados por variables no controlables o desconocidas cuando esta prueba entre en la producción o en la rutina diaria del área de microbiología del Laboratorio Central de Referencia del Laboratorio Clínico Sanitas. Además, el presente el protocolo mantiene los parámetros habituales establecidos por los estándares internacionales para laboratorios clínicos, los cuales son dictaminados por el CLSI (18) y así mismo, han sido adoptados por la normatividad colombiana para los procesos de habilitación y acreditación, en cuanto a la validación y concordancia de nuevas

metodologías alternas para diagnóstico IVD garantizando la prestación de un atención segura y esté acorde con los desarrollos tecnológicos para este mismo campo. Por lo tanto, no requirió consentimiento informado de los participantes. Además, el protocolo de estudio fue sometido para evaluación ética al Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI).

Por último, se mantuvo la confidencialidad de la información al asignar un código consecutivo a cada registro que cumplió los criterios de elegibilidad y no se utilizó ni el nombre ni el número de identificación de las muestras incluidas en ningún momento, manteniendo la confidencialidad del paciente donde provenían las muestras. Los datos solamente se publicarán cuando concluya el estudio y de forma consolidada.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Características demográficas de la población

En el análisis del comportamiento demográfico de la población se observaron variaciones en cuanto a las variables edad, sexo y procedencia.

#### 5.1.1 Distribución de la variable edad.

La variable edad presentó una distribución no normal, (prueba de Shaphiro Wilk:  $p = 0.003$ ). Ver Tabla 4.

**Tabla 4 distribución de los datos según analisis de Shaphiro Wilk**

```
. swilk EDAD
```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
EDAD	100	0.95932	3.359	2.688	0.00360

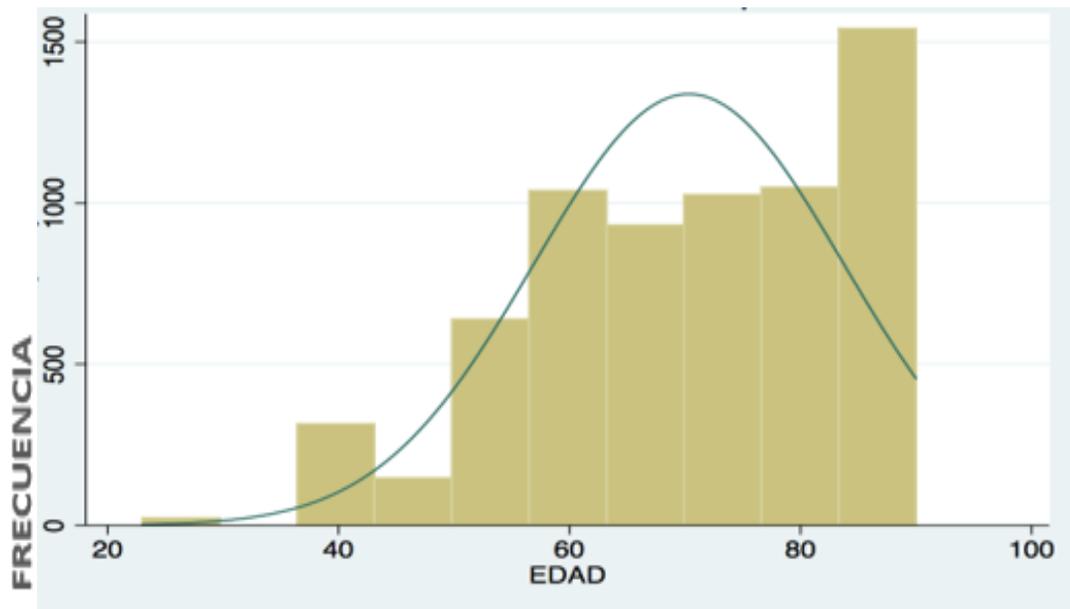
La media para la edad de la población estudiada corresponde a 67 años, con una desviación estándar de +/- 14.70 años, un índice de asimetría de 0.51 y

un índice de curtosis de 2.71, observándose una curva leptocúrtica, con distribución asimétrica negativa. Ver Tabla 5, Figura 6.

**Tabla 5. Analisis de variable edad.**

. sum EDAD,d

EDAD				
	Percentiles	Smallest		
1%	30	23		
5%	37.5	37		
10%	49	37	Obs	100
25%	58	37	Sum of Wgt.	100
50%	67		Mean	67.13
		Largest	Std. Dev.	14.70495
75%	80.5	87		
90%	85	88	Variance	216.2355
95%	86.5	89	Skewness	-.5186975
99%	89.5	90	Kurtosis	2.711504



**Figura 6. Distribución de la edad en la población de estudio.**

La edad por sexo es diferente y es estadísticamente significativa ya que la prueba no paramétrica de Mann Whitney arrojó una  $p = 0.0073$ . Ver Tabla 6, Figura 7,

**Tabla 6. Análisis de Mann Whitney edad /sexo**

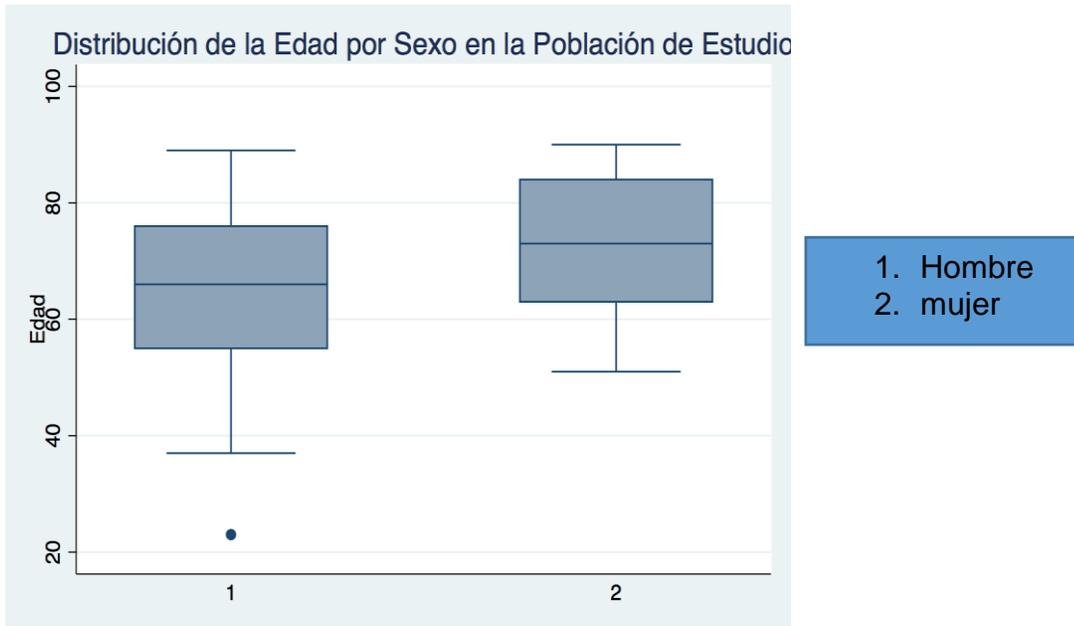
```
. ranksum EDAD,by(VARIABLESEXO)

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

VARIABLESEXO |      obs   rank sum   expected
-----|-----|-----|-----
          1 |      61    2704    3080.5
          2 |      39    2346    1969.5
-----|-----|-----
 combined |     100    5050    5050

unadjusted variance    20023.25
adjustment for ties      -40.61
-----
adjusted variance      19982.64

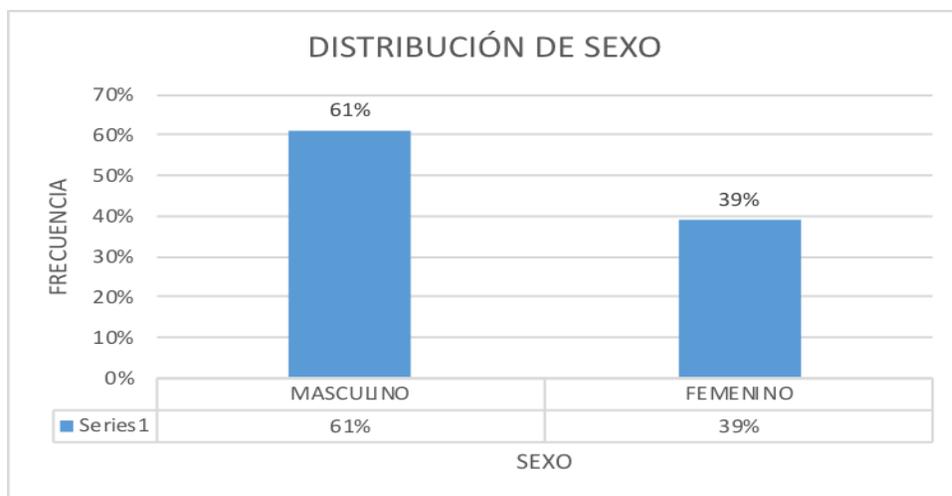
Ho: EDAD(VARIABLESEXO==1) = EDAD(VARIABLESEXO==2)
      z = -2.663
      Prob > |z| = 0.0077
```



**Figura 7. Distribución edad por sexo en la población de estudio.**

### 5.1.2 Distribución de la variable sexo.

Al realizar el análisis de la distribución de la variable sexo se determinó que la mayor parte de la población del estudio es de sexo masculino. Figura 8.



**Figura 8. Distribución de la variable sexo en la población de estudio.**

Del 61 % analizado del sexo masculino, se pudo evidenciar que existe una media de edad de 63,88 años con una desviación estándar +/- 15.60 años, y del 39% del sexo femenino la media de edad fue de 72.2 años con una desviación estándar +/- 11.65. Ver Tabla 7.

**Tabla 7. Distribución de la media de edad por sexo.**

```
. bysort VARIABLESEX0:sum EDAD,d
```

---

-> VARIABLESEX0 = 1

EDAD				
	Percentiles	Smallest		
1%	23	23		
5%	37	37		
10%	43	37	Obs	61
25%	55	37	Sum of Wgt.	61
50%	66		Mean	63.88525
			Std. Dev.	15.60032
75%	76	Largest		
		85	Variance	243.3699
90%	84	87	Skewness	-.3586424
95%	85	87	Kurtosis	2.490634
99%	89	89		

---

-> VARIABLESEX0 = 2

EDAD				
	Percentiles	Smallest		
1%	51	51		
5%	51	51		
10%	55	51	Obs	39
25%	63	55	Sum of Wgt.	39
50%	73		Mean	72.20513
			Std. Dev.	11.65102
75%	84	Largest		
		86	Variance	135.7463
90%	86	86	Skewness	-.3514343
95%	88	88	Kurtosis	1.963272
99%	90	90		

La diferencia en las medianas de edad entre hombres y mujeres son estadísticamente significativa con un valor  $p=0.007$ . Ver Tabla 8.

**Tabla 8. Distribución de la mediana de edad por sexo.**

```
. ranksum EDAD,by(VARIABLESEXO)

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
```

VARIABLESEXO	obs	rank sum	expected
1	61	2704	3080.5
2	39	2346	1969.5
combined	100	5050	5050

```

unadjusted variance    20023.25
adjustment for ties    -40.61
-----
adjusted variance      19982.64

Ho: EDAD(VARIABLESEXO==1) = EDAD(VARIABLESEXO==2)
      z = -2.663
      Prob > |z| = 0.0077

```

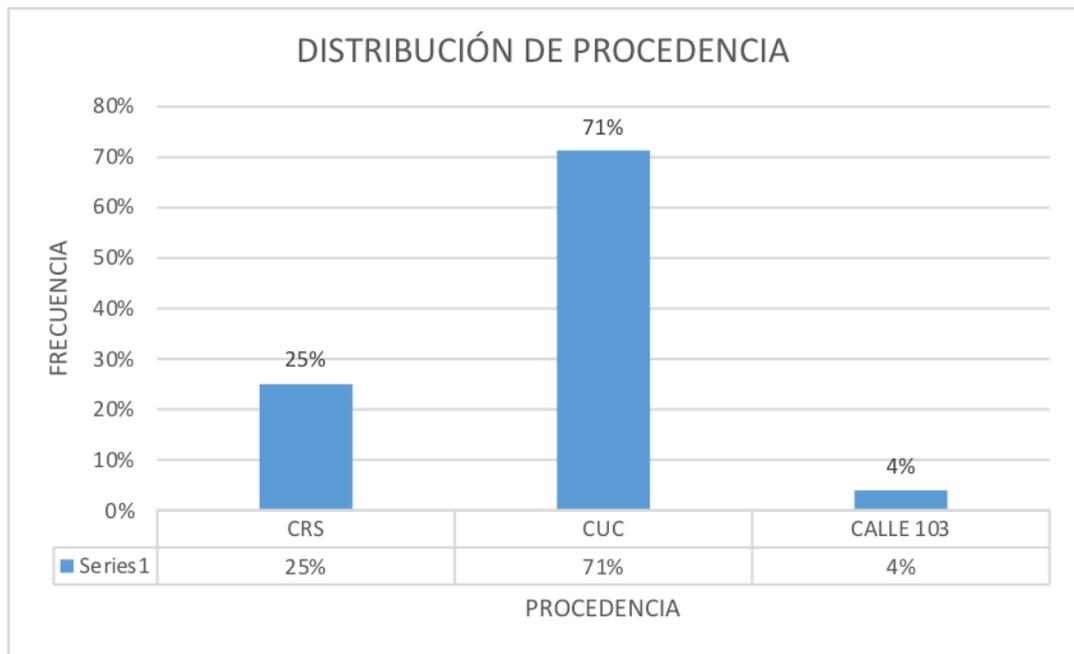
### 5.1.3 Distribución de la variable procedencia.

La distribución observada fue: Clínica Reina Sofía (CRS) con una frecuencia de 25 % de muestras estudiadas, Clínica calle 103 con 4% y finalmente la Clínica Colombia (CUC) con 71%. Ver Tabla 9, Figura 9.

**Tabla 9. Análisis de la variable procedencia**

. tab procedencia

procedencia	Freq.	Percent	Cum.
1	25	25.00	25.00
2	71	71.00	96.00
3	4	4.00	100.00
Total	100	100.00	



**Figura 9. Distribución de variable procedencia.**

#### 5.1.4 Distribución de variable tiempos de incubación de las muestras de hemocultivos

El tiempo de incubación presentó una distribución no normal, prueba de Shapiro Wilk ( $p= 0.000$ ). Ver Tabla 10.

**Tabla 10. Distribucion tiempo de incubación**

```
. swilk tincubacion
```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
tincubacion	100	0.46575	44.110	8.400	0.00000

La mediana fue 14 horas, se evidenciaron valores extremos que oscilaron entre 5 horas como mínimo y 120 horas como máximo arrojando una curtosis de 46.58 (platicúrtica). Ver Tabla 11.

**Tabla 11. mediana tiempo de incubación.**

```
. sum tinc, d
```

tinc

Percentiles		Smallest		
1%	5.5	5		
5%	8	6		
10%	10	7	Obs	100
25%	11	7	Sum of Wgt.	100
50%	14		Mean	16.43
		Largest	Std. Dev.	12.69316
75%	17	35		
90%	23	48	Variance	161.1163
95%	28	55	Skewness	5.963871
99%	87.5	120	Kurtosis	46.58923

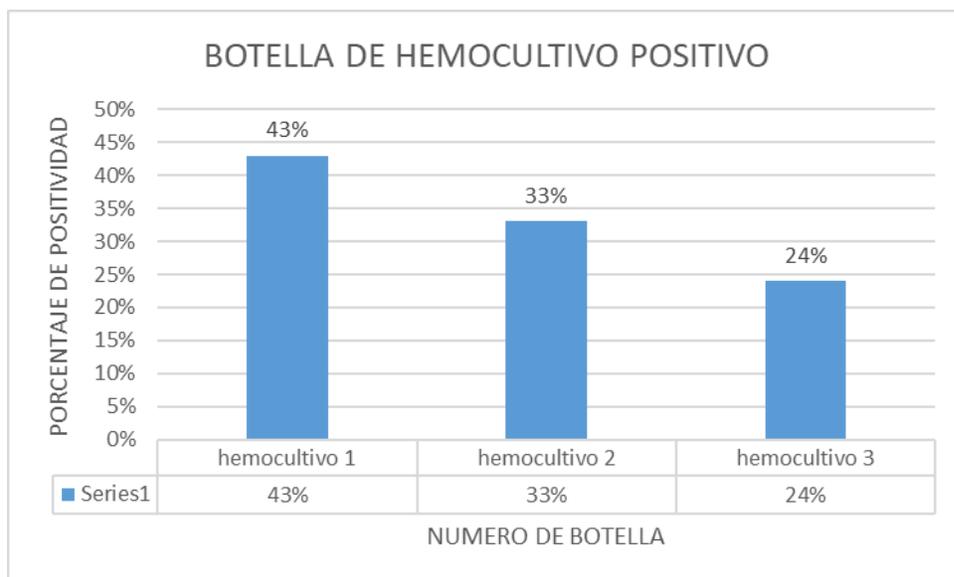
### 5.1.5 Distribución de variable número de botella de hemocultivo positivo.

Para el análisis de hemocultivos, se obtuvieron n=100 muestras positivas, recolectadas dentro de los meses de enero y febrero de 2018, se obtuvo la siguiente distribución: frecuencia de botella de hemocultivo N.1 (43%), de botella de hemocultivo N.2 (33%), y de botella de hemocultivo N.3 (24 %). Ver Tabla 12, Figura 10.

**Tabla 12. Análisis de variable numero de botella de hemocultivo positivo .**

**. tab VARIABLENUMERODEMUESTRA**

VARIABLE NUMERO DE MUESTRA	Freq.	Percent	Cum.
1	43	43.00	43.00
2	33	33.00	76.00
3	24	24.00	100.00
Total	100	100.00	



**Figura 10. Distribución de número de botella hemocultivo positivo empleada en el estudio.**

## **5.2 Caracterización de los microorganismos hallados en los hemocultivos positivos de acuerdo a su coloración de Gram por su afinidad y morfología**

De acuerdo a los hemocultivos positivos encontrados en este estudio, se realizaron ensayos microbiológicos donde se determinaron las siguientes variables: clasificación microscópica por coloración de Gram, morfología bacteriana, identificación bacteriana por método convencional e identificación bacteriana por método directo.

### **5.2.1 Clasificación Bacteriana por Coloración de Gram.**

Con la coloración de Gram se determinó que la población bacteriana con mayor frecuencia en la población de estudio fue la de bacterias Gram negativas (71%), seguida de Gram positivos (29%). Se estableció que el tiempo de incubación de acuerdo a la coloración presentó diferencias significativas (Prueba de Mann Withney:  $p=0.032$ ). Ver Tabla 13, Figura 11.

**Tabla13. Distribucion bacteriana por coloración de gram**

```
. ranksum tinc, by(clasbac)

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
```

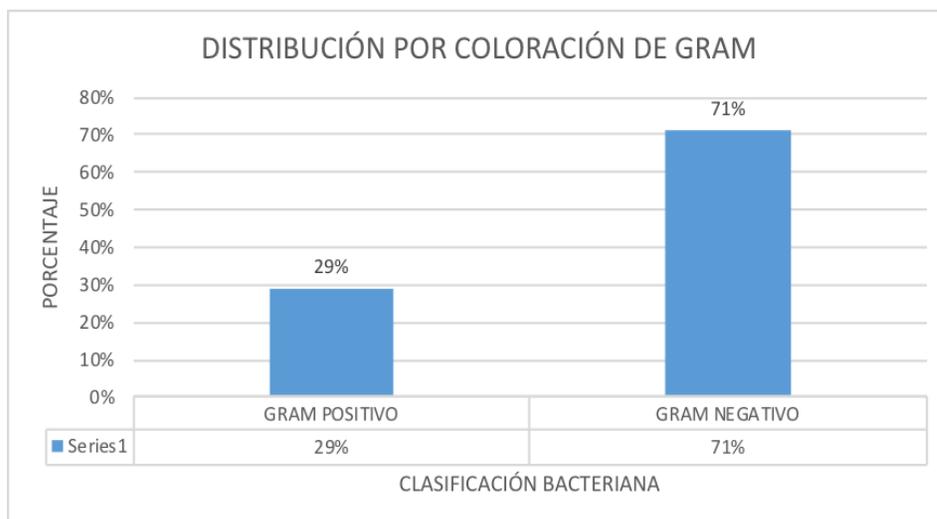
clasbac	obs	rank sum	expected
1	29	1745	1464.5
2	71	3305	3585.5
combined	100	5050	5050

```

unadjusted variance    17329.92
adjustment for ties    -154.94
-----
adjusted variance      17174.97

Ho: tinc(clasbac==1) = tinc(clasbac==2)
      z =      2.140
      Prob > |z| =    0.0323

```



**Figura 11. Distribución de variable clasificación bacteriana mediante coloración de Gram.**

### 5.2.2 Distribución de variable morfología bacteriana

Mediante la coloración de Gram se determinó que el 71% de las muestras correspondían a Bacilos Gram negativos, seguido de cocos Gram positivos en racimo con un 22% y finalmente las demás formas bacterianas Gram positivas; como: cocos sueltos, cocos dispuestos en cadena y bacilos, con porcentajes inferiores al 3%. Al analizar el tiempo de incubación por tipo de morfología bacteriana se evidencia que no hay diferencias entre los grupos, prueba de Kruskal Wallis:  $p > 0.073$ . Ver Tabla 14, Figura 12.

**Tabla 14. Distribución de variable morfología bacteriana.**

```
. kwallis tinc, by(tipobac)
```

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

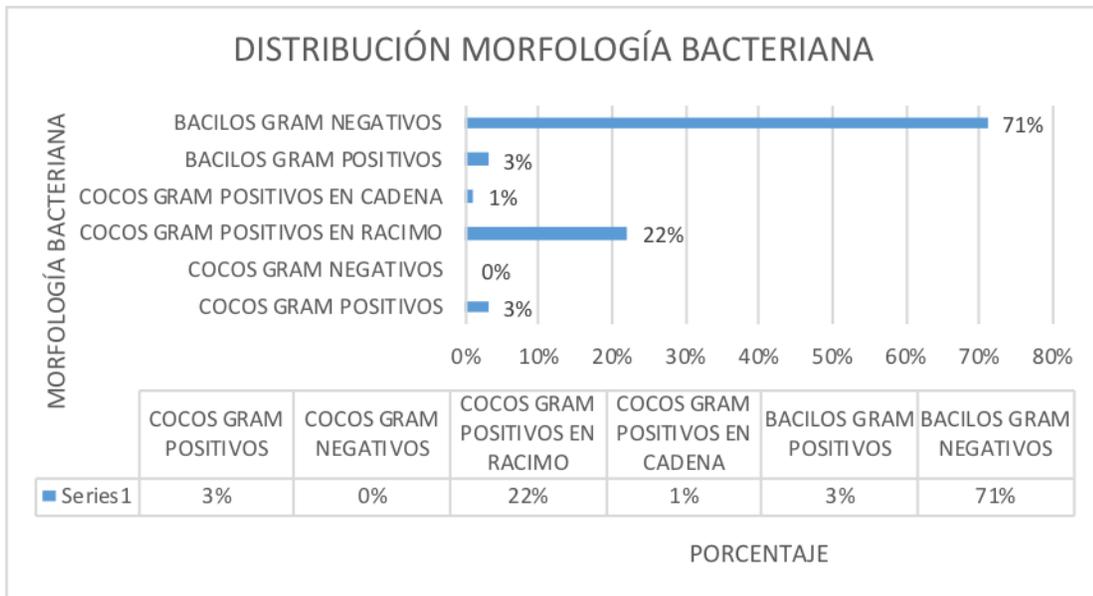
tipobac	Obs	Rank Sum
1	3	159.00
3	22	1241.50
4	1	99.00
5	3	245.50
6	71	3305.00

chi-squared = 8.553 with 4 d.f.

probability = 0.0733

chi-squared with ties = 8.630 with 4 d.f.

probability = 0.0710



**Figura 12. Distribución de variable morfología bacteriana**

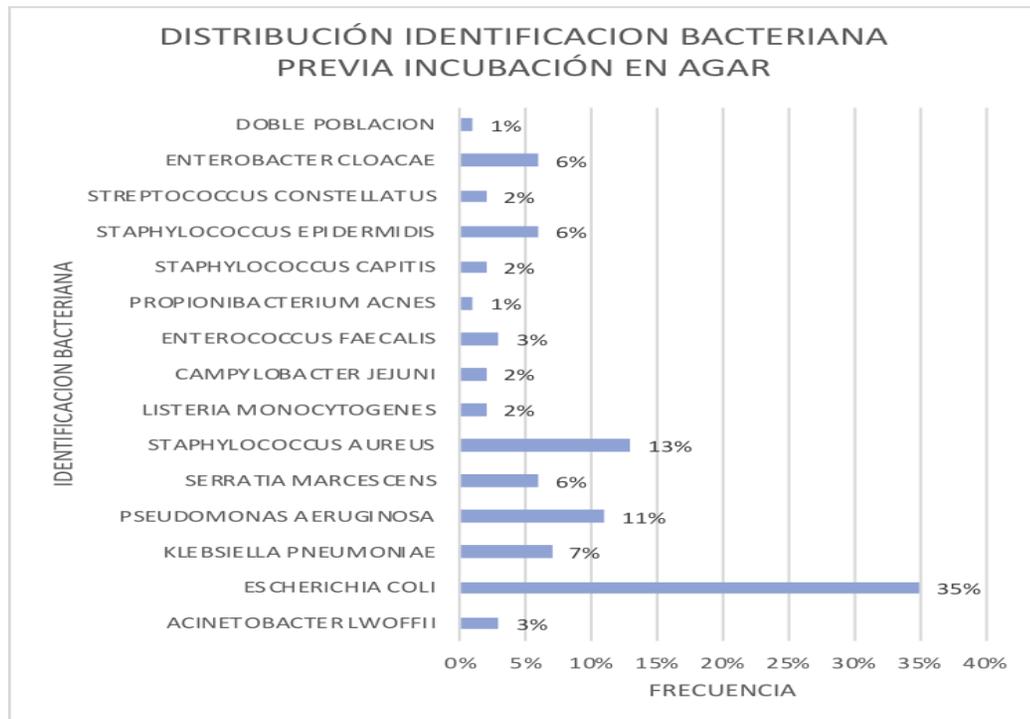
### 5.2.3 Distribución de variable Germen identificado mediante metodo convencional Vitek MS®

Luego de la incubación e identificación por el método convencional utilizando agar en fase solida se pudo encontrar que la mayor población bacteriana identificada fue *E. coli* con un 35%, seguido de *S. aureus* con un 13 %, *P. aeruginosa* con un 11%, *K. pneumoniae* con un 7%, *S. marcescens* con un 6%, y el restante de microorganismos inferior a un 3%. Ver Tabla 15, Figura 13.

**Tabla 15. Distribución de variable Germen identificado mediante metodo convencional Vitek MS®**

**. tab germenAgar**

<b>germenAgar</b>	<b>Freq.</b>	<b>Percent</b>	<b>Cum.</b>
2	3	3.00	3.00
3	35	35.00	38.00
4	7	7.00	45.00
5	11	11.00	56.00
6	6	6.00	62.00
7	13	13.00	75.00
8	2	2.00	77.00
9	2	2.00	79.00
10	3	3.00	82.00
11	1	1.00	83.00
12	2	2.00	85.00
13	6	6.00	91.00
14	2	2.00	93.00
15	6	6.00	99.00
16	1	1.00	100.00
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100.00</b>	



**Figura 13. Distribución de variable Germen identificado mediante metodo convencional Vitek MS®**

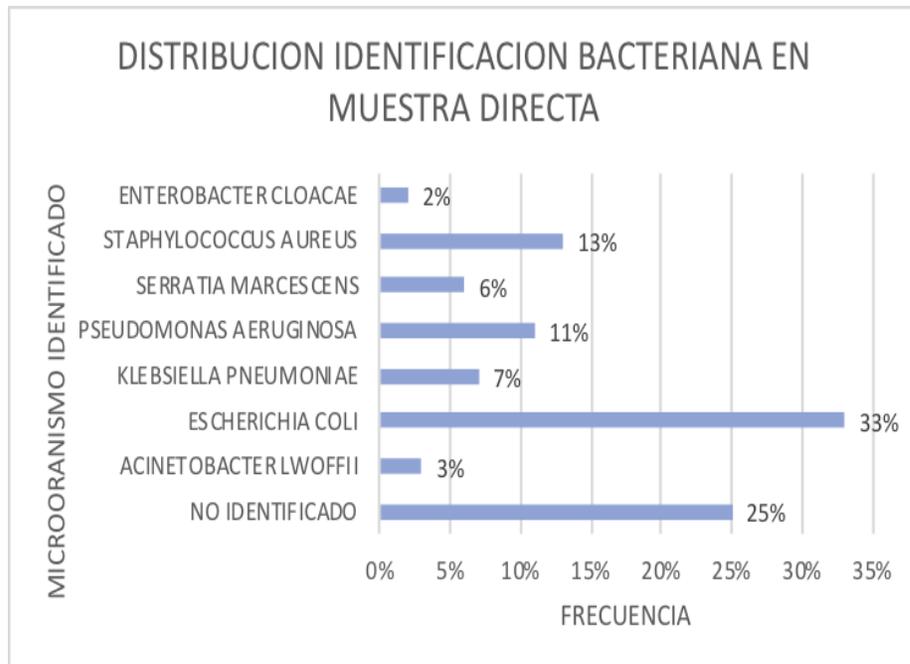
#### **5.2.4 Distribución de variable germen identificado por metodo directo**

A partir de los hemocultivos positivos analizados por el método directo se encontró que la mayor población bacteriana identificada fue *E. coli* con un 33%, seguido de microorganismos no identificados en un 25%, *S. aureus* con un 13 %, *P. aeruginosa* con un 11%, *K. pneumoniae* con un 7%, *S. marcescens* con un 6%, y el restante de microorganismos inferior a un 3%. Ver Tabla 16, Figura 14.

**Tabla16. Distribución de variable germen identificado por metodo directo.**

**. tab germendirecto**

germendirecto	Freq.	Percent	Cum.
1	25	25.00	25.00
2	3	3.00	28.00
3	33	33.00	61.00
4	7	7.00	68.00
5	11	11.00	79.00
6	6	6.00	85.00
7	13	13.00	98.00
8	2	2.00	100.00
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100.00</b>	



**Figura 14. Distribución de variable germen identificado por metodo directo**

**5.2.5 Tiempos entre la alarma de positividad y el procesamiento directo de hemocultivos positivos**

El tiempo medio transcurrido entre la alarma de positividad emitida por el equipo y el procesamiento de la muestra por el método directo es diferente al observado con el tiempo de los aislamientos obtenidos por el método contra el que está comparando, prueba de Mann Withney:  $p=0.003$ . Ver tabla 17.

**Tabla 17. Tiempos entre la alarma de positividad y el procesamiento directo de hemocultivos positivos**

```
. ranksum tiempo transcurrido, by (concor)
```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

concor	obs	rank sum	expected
1	75	3415	3787.5
2	25	1635	1262.5
combined	100	5050	5050

unadjusted variance	15781.25
adjustment for ties	-7.20
adjusted variance	15774.05

Ho: tiempo~o(concor==1) = tiempo~o(concor==2)  
z = -2.966  
Prob > |z| = 0.0030

### 5.3 Concordancia entre los dos métodos de análisis para la identificación bacteriana en hemocultivos positivos por MALDI-TOF.

Para analizar la concordancia entre los dos métodos de identificación se utilizó la prueba estadística Índice Kappa, utilizando el software Stata v. 13.0 el cual arrojo el siguiente resultado:

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
73.00%	15.43%	0.6807	0.0357	19.05	0.0000

El índice kappa arroja un resultado de concordancia del 68 % (0,6807) con un valor  $p=0.000$ , encontrándose en la categoría de bueno según el índice de concordancia de índice kappa. (19).

## 6 DISCUSIÓN

Las infecciones producidas por bacterias son una de las principales causas de muerte y de mayor impacto a nivel clínico y hospitalario. Los hemocultivos, aunque tengan baja sensibilidad, siguen siendo el examen paraclínico idóneo para confirmar bacteremias; aunque hoy en día se correlaciona en un 98% con la Procalcitonina como lo afirma Buffy G De (24) en su estudio sobre sensibilidad de la Procalcitonina y su relación con hemocultivos, dado que los resultados no son oportunos debido a la complejidad de su análisis siendo fundamental para establecer una terapia eficaz en los procesos infecciosos por bacterias, en el estudio de Cattani y Posse (25) se afirma que entre más eficiente sea el diagnóstico etiológico de la bacteriemia, la supervivencia de los pacientes se aumenta en un 8% favoreciendo la evolución e inicio de tratamiento.

En este estudio se pudo evaluar la concordancia entre dos métodos analíticos de identificación bacteriana (método convencional previa incubación en agar y un método directo a partir de botellas con hemocultivos positivos) por espectrofotometría de masas MALDI TOF. Cattani y Posse en su estudio concluyen que el MALDI TOF MS directo de hemocultivos positivos reduce de forma notoria el tiempo de identificación de especies lo cual se asocia al 11.3% de incremento en la proporción de los pacientes que recibieron terapia antibiótica antes de 24 horas de positivización del hemocultivo. Si bien en este estudio no se logró obtener la concordancia esperada (índice Kappa ( $\kappa$ ) mínimo aceptado del 0,85 (85%) y un nivel desempeño esperado entre 0,95-1 (95-100%)), se muestra que el empleo de un método directo es bueno y susceptible de mejora, por tanto se debe trabajar optimizar el proceso analítico, reduciendo el tiempo transcurrido

entre la alarma de positividad y el tiempo de procesamiento por MALDI TOF, puesto que se evidenció que el tiempo transcurrido entre un proceso y otro si pueden estar generando las diferencias observadas en el aislamiento del germen causante de la infección. Cabe aclarar que en este estudio el tiempo entre un proceso y otro fue alto, debido a las condiciones operativas internas y de recurso financiero, no permitieron ejecutar las actividades a medida que los hemocultivos iban dando alarma de positividad, sino que fue necesario hacerlo por grupos en montajes especiales semanalmente.

A partir de los resultados obtenidos en este estudio se determinó que la población estudiada estuvo en un rango de edad entre 52 y 81 años, lo que corresponde a una población adulta mayor, como afirma en el estudio de Christner, Martin (3,26) donde cita que el mayor índice de positividad se encuentra en la población que supera los 55 años siendo más relevante en personas de sexo femenino que en personas de sexo masculino, lo cual se asemeja al resultado obtenido en este estudio de los hemocultivos procedentes de las diferentes clínicas se hace notorio un comportamiento especial en La Clínica Universitaria Colombia, lugar de donde proviene el mayor número de muestras con positividad asociado a la complejidad de la clínica, a su capacidad instalada y la atención integral entre pacientes correspondientes a la EPS sanitas y pacientes de medicina prepagada Colsanitas; estos resultados se asemejan a los reportados en el estudio de Sakarikou y Ciotti (27) donde se afirma que de las instituciones regionales, universitarias y hospitales de alta complejidad es de donde proviene el mayor número de hemocultivos.

En el estudio se evidencia datos con resultados extremos en los tiempos de incubación dentro del equipo, los cuales incluyen tiempos cortos de 5 horas que según el estudio de Idelevich (17) está relacionado a una alta carga

bacteriana y al nivel de bacteriemia cursada por los pacientes; y tiempos prolongados de incubación superiores a 100 horas se dan en microorganismos exigentes, pacientes con muy poca carga bacteriana y en ocasiones por contaminaciones ambientales, tal como se observó en este estudio.

En cuanto a la distribución del número de botella de hemocultivo en el que se evidencia positividad de la serie de hemocultivos no se registraron datos con comportamientos significativos.

En Colombia existe un gran índice de hemocultivos que mediante la coloración de Gram se evidencia mayor número de bacterias Gram negativas que Gram positivas; en un estudio epidemiológico realizado en 10 hospitales de Colombia por De la rosa (28) se demostró que los microorganismos más frecuentemente hallados corresponden a Gram negativos con cifras de 74%, Gram positivos con un 20 % y otras estructuras como las fúngicas en un 6 %, concordando significativamente con los datos que obtenidos en este estudio; pero contradictorio con el estudio de Lakes (29) que en su estudio reporta mayor número de positividad en microorganismos Gram positivos (343 coloraciones) que en Gram negativo (146 coloraciones ).

En la mayoría de los estudios se registran datos en donde la mayor cantidad de gérmenes aislados corresponden a bacterias Gram negativas en especial *E. coli* seguida de cocos Gram positivos en racimo correspondiente a *S. aureus*, lo cual es similar a lo reportado en este estudio en donde la mayor forma bacteriana corresponde a bacilos Gram negativos seguido de cocos Gram positivos en racimo.(30)

Al hacer la comparación de los microorganismos aislados por los dos métodos se evidencia similitudes significativas en algunos microorganismos como *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. marcescens*. En la identificación convencional a partir de medio sólido (agar) todos los microorganismos del estudio fueron identificados correctamente a diferencia del método directo en especial los microorganismos clasificados como Gram positivos porque según la literatura son exigentes para su identificación debido a su contenido proteico, estructura y envoltura celular por su alto porcentaje de peptidoglicano lo que probablemente llevó a que el objetivo del proyecto estuviera por debajo del límite esperado según el índice kappa(19,31,32).

Desde que salió al mercado la tecnología MALDI TOF MS se han realizado múltiples estudios en el área de la microbiología con diferentes tipos de muestras obteniendo resultados satisfactorios como por ejemplo en muestras de orina, levaduras, micobacterias pero en hemocultivos se han evidenciado varios factores que interfieren con el éxito de la identificación directa como las proteínas presentes en glóbulos rojos en especial en aquellos paciente poli transfundidos, interferencias con glóbulos blancos y otros factores inherentes a la muestra, por ello es necesario hacer un pretratamiento con lavados de glóbulos rojos, precipitación de proteínas, segregación de glóbulos blancos entre otros, a toda muestra de sangre total antes de ser llevada al analizador MS. Estudios revelan información similar.(4,33)

Factores como la falta de disponibilidad del equipo, falta de recurso humano, escases en la cantidad de insumos, presupuesto deficiente y reestructuración en el área de microbiología fueron limitantes en el éxito del proyecto los cuales se deben tener en cuenta como recomendaciones para futuras investigaciones.

## 7 CONCLUSIONES

- Se observó una mayor frecuencia de positividad en los hemocultivos analizados en la población de estudio, para el sexo femenino con una media de edad de 72,2 años
- La mayoría de las muestras obtenidas provienen de la Clínica Universitaria Colombia debido a su capacidad instalada con 625 Camas y a la variabilidad de usuarios atendidos por los diferentes regímenes de atención en salud al que pertenecen.
- En el estudio se encontró que la mayoría de pacientes contraen más infecciones por microorganismos Gram negativos que por microorganismos Gram positivos.
- La metodología MALDI TOF MS es la más opcionada en la identificación bacteriana por método directo, sin embargo, en nuestro estudio es necesario mejorar el proceso pre analítico de las muestras antes de su identificación para lograr una mayor concordancia.
- En el estudio se halló que los microorganismos Gram negativos se identifican con mayor facilidad que los Gram positivos por la metodología MALDI TOF MS
- En el estudio se demostró que para tener un buen desempeño en la identificación bacteriana es necesario realizar el procedimiento en tiempo real una vez se evidencie la positividad.

## 8 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. 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 Infectología*. 2012;29(3):263–72.
2. La Scola B, Raoult D, Guo Z, Song Y, Wang J. Direct Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Bottles by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry. Bereswill S, editor. *PLoS One* [Internet]. 2009 Nov 25 [cited 2017 Apr 17];4(11):e8041. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0008041>
3. Kikuchi K, Matsuda M, Iguchi S, Mizutani T, Tega-ishii M, Sansaka K, et al. Potential Impact of Rapid Blood Culture Testing for Gram-Positive Bacteremia in Japan with the Verigene Gram-Positive Blood Culture Test. 2017;2017.
4. Buchan BW, Riebe KM, Ledebøer NA. Comparison of the MALDI biotyper system using sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol*. 2012;50(2):346–52.
5. Branda JA, Markham RP, Garner CD, Rychert JA, Ferraro J.

- Performance of the Vitek MS v2 . 0 System in Distinguishing *Streptococcus pneumoniae* from Nonpneumococcal Species of the *Streptococcus mitis* Group. 2013;51(9):3079–82.
6. Tanner H, Evans JT, Gossain S, Hussain A. Evaluation of three sample preparation methods for the direct identification of bacteria in positive blood cultures by MALDI-TOF. BMC Res Notes [Internet]. 2017;10(1):48. Available from: <http://bmcresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-016-2366-y>
  7. Christensen JJ, Dargis R, Hammer M, Justesen US, Nielsen XC, Kemp M, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis of Gram-positive, catalase-negative cocci not belonging to the *Streptococcus* or *Enterococcus* genus and benefits of database extension. J Clin Microbiol [Internet]. 2012 May [cited 2017 Apr 13];50(5):1787–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22403420>
  8. Gacia P, Perez C. Profesionales de la Sección Bacteriología General, Dra. Patricia García C.\* y Carlos Pérez C.\*.
  9. Branda JA, Markham RP, Garner CD, Rychert JA, Ferraro MJ. Performance of the vitek MS v2.0 system in distinguishing *Streptococcus pneumoniae* from nonpneumococcal species of the *Streptococcus mitis* group. J Clin Microbiol. 2013;51(9):3079–82.
  10. Rychert J, Burnham CAD, Bythrow M, Garner OB, Ginocchio CC, Jennemann R, et al. Multicenter evaluation of the vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of gram-positive aerobic bacteria. J Clin Microbiol. 2013;51(7):2225–31.
  11. Harris DC. Fundamentos de espectrofotometría. Análisis químico

cuantitativo [Internet]. 2006;407–9. Available from: [https://books.google.com.co/books?id=H-\\_8vZYdL70C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.co/books?id=H-_8vZYdL70C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

12. Legarraga P, Moraga M, Lam M, Geoffroy E, Zumarán C. Impacto de la espectrometría de masas por MALDI-TOF MS en la identificación rápida de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia clínica. *Rev Chil Infectología*. 2013;30(2):140–6.
13. Gonzalez I. “Espectrómetros de masa basados en tiempo de vuelo”, manual de proteomica. 2014;203–88.
14. Aranda MC, Gomez martinez j, Salvado costa m. Estudio de coste-efectividad de la aplicación de la técnica MALDI-TOF MS en la identificación de micobacterias atípicas Mireia. 2014;15:417–31.
15. Wang YFW, Fu J. Rapid laboratory diagnosis for respiratory infectious diseases by using MALDI-TOF mass spectrometry. *J Thorac Dis* [Internet]. 2014;6(5):507–11. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4015007&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
16. Lafourcade laura, Herve B. Recommendations for the microbiological diagnosis of bloodstream infections associated to hemodialysis catheter. :87–90.
17. Idelevich EA, Schüle I, Grünastel B, Wüllenweber J, Peters G, Becker K. Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(10):1001–6.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. User Protocol for Evaluation of Qualitative , test performance, approved Gudeline-second

edition. 2008;(January):EP12-A2.

19. Lopez de ullibarrí GL PF s. medidas de concordancia; índice kappa. 1999.
20. Rojas SM, Bogotá AM De. Manual para la toma de muestras para análisis microbiológico.
21. Martínez O, Sanitas laboratorio clínico. PREPARACIÓN Y REMISIÓN DE MUESTRAS PARA LABORATORIO CLÍNICO Y DE PATOLOGÍA. Bogotá, Colombia; 2010. p. 1,4.
22. Hospital MS, Printed UW, Copy M, Sinai M, Microbiology H, Procedures SO, et al. vitek MS use manual. 2018;1,18.
23. Vargas J, Sierra C, Martínez A. INSTRUCTIVO TECNICO PARA EL PROCEDIMIENTO DE HEMOCULTIVOS. Bogotá, Colombia: isolucion,central de procesos, Clinica Colsanitas; 2015. p. 4.
24. Buffy G De, Sepsis T De. Artículo Original Original Article Sensibilidad y Especificidad de la Procalcitonina y Tinción de Gram de. 2011;34(1):20–4.
25. Cattani ME, Posse T, Hermes RL, Kaufman SC. Identificación rápida de microorganismos de frascos de hemocultivos por espectrometría de masas. Comparación de 2 procedimientos diagnósticos. Rev Argent Microbiol [Internet]. 2015 [cited 2017 Apr 12];47(3):190–5. Available from:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754115000838>
26. Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K, Aepfelbacher M. Rapid Identification of Bacteria from Positive Blood Culture Bottles by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption – Ionization Time of Flight Mass Spectrometry Fingerprinting □ †. 2010;48(5):1584–91.

27. Sakarikou C, Ciotti M, Dolfa C, Angeletti S, Favalli C. Rapid detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains derived from blood cultures by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *BMC Microbiol* [Internet]. 2017;17(1):54. Available from: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-017-0952-3>
28. Rosa GD La. Epidemiología y pronóstico de pacientes con infección del torrente sanguíneo en 10 hospitales de Colombia. 2008;141–9.
29. Lakes F. Rapid Identification of Bacteria Directly from Positive Blood Cultures by Use of a Serum Separator Tube , Smudge Plate Preparation , and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass. 2015;53(10):3349–52.
30. Pacheco R, Osorio L, Correa AM, Villegas MV. Prevalencia de bacterias Gram negativas portadoras del gen bla KPC en hospitales de Colombia. 2014;34:81–90.
31. Jeong S, Hong JS, Kim JO, Kim KH, Lee W, Bae IK, et al. Identification of *Acinetobacter* Species Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Ann Lab Med* [Internet]. 2016;36(4):325–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27139605><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4855052>
32. Loonen AJM, Jansz AR, Stalpers J, Wolffs PFG, Van Den Brule AJC. An evaluation of three processing methods and the effect of reduced culture times for faster direct identification of pathogens from BacT/ALERT blood cultures by MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(7):1575–83.
33. Relloso MS, Nievas J, Fares S, Farquharson V, Mujica MT, Romano V,

et al. Evaluación de la espectrometría de masas : MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de levaduras. Rev Argent Microbiol [Internet]. 2015;47(2):103–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2015.02.004>

## 9 ANEXOS

### 9.1 Anexo 1. PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE MUESTRAS DE HEMOCULTIVOS.

1. Antes de acercarse al entorno del paciente para tomar este tipo de muestra debe realizar higiene de manos.
2. Revisar la orden médica para la toma de hemocultivo. Toda orden médica para la toma de hemocultivo debe incluir la siguiente información:

Nombre del paciente

Número de identificación

Edad del paciente

Servicio donde se encuentra el paciente.

Ubicación donde se encuentra el paciente.

Número de juegos de hemocultivo que el médico quiere que se cultiven.

Nombre del médico que ordena el procedimiento

Otra información que el médico y el laboratorio requiera.

3. Identificar con nombre y apellido al paciente y verificar que esta información corresponda al indicado en la orden médica.
4. Explicar al paciente o familiares el procedimiento a realizar.
5. Revisar por medio de una lista de chequeo que todo el material que será utilizado se encuentra disponible y listo para realizar el procedimiento. Dejar sobre una mesa o bandeja a la cual se le haya

realizado un proceso previo de limpieza y desinfección todos los materiales a utilizar garantizando el fácil acceso a ellos durante el procedimiento. Los códigos de colores de las botellas de hemocultivos se utilizarán de acuerdo a la solicitud de orden médica. Ver figura 15.

**BOTELLA AMARILLA:** utilizado para paciente pediátrico.

**BOTELLA NARANJA:** utilizado para determinación de gérmenes anaerobios.

**BOTELLA VERDE:** utilizado para gérmenes comunes en paciente adulto.

**BOTELLA ROJA:** utilizada para determinación de hongos

**BOTELLA BLANCA.** Utilizada para determinación de micobacterias



**Figura 15. Frascos de hemocultivos**

Tomado de pagina web Biomerieux® citado el 14 marzo de 2018 disponible en <http://www.ganbaro.com.ve/productos/clinica/microbiologia-clinica/Biomerieux®>

6. Desinfectar la tapa de caucho de la botella de hemocultivo utilizando una gasa estéril humedecida con alcohol isopropílico al 70% y dejar secar.
7. Ubicar al paciente en posición apropiada, poner el torniquete, seleccionar y localizar la vena adecuada. Para ello, palpar y hacer seguimiento del trayecto de la vena en el brazo con el dedo. Verificar que el sitio de la venopunción se encuentra completamente normal. En el caso de pacientes con antecedente de mastectomía o fístulas siempre consultar con el médico tratante (CLSI H3 2005).
8. Colocar gorro, tapabocas, gafas de seguridad o mascarilla visual y bata.
9. Realizar higiene de manos. Inmediatamente colocar guantes estériles
10. Realizar asepsia y antisepsia del sitio de venopunción con gasas estériles impregnadas de Gluconato de Clorhexidina al 2% en asociación con alcohol isopropílico al 70%, frotando el área. Dejar 30 segundos permitiendo que la piel se seque para la primera toma y 60 a 120 segundos en la segunda. En situaciones de hipersensibilidad se recomienda el uso de soluciones con bases yodadas. NOTA: En pacientes menores de dos meses, se recomienda utilizar alcohol isopropílico al 70% (Halm, 2011) o Gluconato de Clorhexidina al 0,5%.
11. Mantener firme el brazo del paciente y con el dedo pulgar tensar la piel, haciendo presión 2,5 a 5,0 cm por debajo de la zona de punción.
12. Con el bisel de la aguja hacía arriba, realizar la venopunción utilizando un ángulo de inserción menor a los 30 grados.
13. Mantener la aguja tan estable como sea posible, mientras extrae lentamente el volumen requerido.
14. Retirar el torniquete.

15. Sacar la aguja, hacer presión con una gasa sobre el área de venopunción y colocar un vendaje adhesivo sobre la zona de venopunción.
16. Mezclar por inmersión las botellas.
17. Descartar la aguja en el contenedor para residuos corto punzantes.
18. Repetir el mismo procedimiento para la toma del segundo juego de hemocultivo en un sitio diferente. NOTA: En caso de contar con un sistema cerrado de colección, una vez se realice la punción, la sangre deberá ser inoculada directamente en cada una de las botellas. Se debe asegurar siempre que éstas y el sistema de colección se debe mantener por debajo del nivel del sitio de la venopunción, en ese caso la primera botella a inocular será la botella aeróbica seguida de la botella anaeróbica. Una vez terminado el proceso, descartar la aguja en el contenedor para residuos corto punzantes.
19. Una vez terminado el proceso de venopunción retirar los guantes y realizar higiene de manos.
20. Marcar las botellas incluyendo el sitio de toma y la hora de realización del procedimiento. Tenga en cuenta no tachar, ni rayar o colocar rótulos sobre la zona del código de barras de las botellas.
21. Enviar al laboratorio de microbiología siguiendo las recomendaciones de transporte

## **9.2 Anexo 2. PROCEDIMIENTO PARA LA SELECCIÓN DE PACIENTES Y RECOLECCION DE MUESTRAS.**

1. Se seleccionarán a todos los pacientes con síndrome febril, bacteriemias y septicemias de las diferentes clínicas de Clínica Colsanitas S.A. en la ciudad de Bogotá con previa orden médica para análisis de hemocultivos.
2. Las personas idóneas del laboratorio clínico o el personal médico encargado del paciente realizarán la toma de muestras de hemocultivos según indicación médica cumpliendo con los protocolos y guías convencionales para el procedimiento.
3. Las muestras de hemocultivos serán enviadas junto con la orden medica al laboratorio clínico donde serán revisadas y posteriormente ingresadas al sistema de información del laboratorio (OMEGA ERP® Version1.0) donde se generará un código de barras único de identificación y posterior rotulación de la muestra.
4. Las muestras de hemocultivos fueron embaladas y remitidas junto con la remisión al área de microbiología del laboratorio central de referencia como lo indica el manual de procedimiento de remisión, embalaje y transporte de muestras.
5. En el área de microbiología del laboratorio central de referencia se recibieron y se verificaron las muestras de hemocultivos por la bacterióloga encargada del procesamiento de urgencias quien procederá a procesar las muestras de acuerdo al instructivo de procesamiento de hemocultivos.

### **9.3 Anexo 3. INSTRUCTIVO TECNICO PARA EL PROCEDIMIENTO DE HEMOCULTIVOS.**

1. Revisadas las muestras se les dió entrada en el equipo automatizado de hemocultivos BacT/ALERT 3D®. ver figura 16,

colocando los datos que el equipo pide para la identificación de las muestras como son: código de barras de cada botella, consecutivo de petición incluyendo ( año, mes, día, numero asignado por sistema)apellidos y nombres completos, una vez digitados estos datos el equipo genera la posición de depósito de la botella donde se incubara; este código es anotado en la relación de petición enviada por la clínica remitente.



**Figura 16. Equipo BacT/ALERT3D**

Tomado de pagina web Biomerieux® citado el 14 marzo de 2018 disponible en <http://www.ganbaro.com.ve/productos/clinica/microbiologia-clinica/Biomerieux®>

2. Las botellas de hemocultivos ya en proceso de incubación dentro del equipo son agitadas y monitoreadas constantemente detectando cambios específicos donde grafica una curva de lectura generando una alarma cuando llegue a su tiempo máximo de incubación indicando que es positivo.
3. Una vez se identificó el hemocultivo positivo fue extraído del equipo BacT/ALERT 3D® y mediante técnicas de asepsia y bioseguridad para la manipulación manual se extraerá una alícuota

de aproximadamente 4 cm con una jeringa, se hace un extendido en dos laminas porta objetos para la coloración de Gram y la muestra restante es depositada en un tubo standard previo etiquetado con el código de asignación de la muestra.

4. El tubo con la muestra de hemocultivo es introducido en el equipo previsola. de la casa comercial Biomerieux® el cual se programa para que siembre y estríe la muestra en los agares necesarios para el crecimiento bacteriano (agar sangre, chocolate y MacConkey) se introdujeron en la incubadora memmert modelo 260. Ver figura 17, a una temperatura de  $35 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas para su posterior lectura.



**Figura 17. Incubadora memmert de CO2 ICOMed con Twin DISPLAY  
Software AtmoCONTROL**

Tomado de pagina web memmert experts in thermostatics citado el 14 marzo  
de 2018 disponible en

[https://www.memmert.com/fileadmin/products/documents/categories/BR-  
Incubadores-espagnol-D10025.pdf](https://www.memmert.com/fileadmin/products/documents/categories/BR-Incubadores-espagnol-D10025.pdf)

5. Se realiza la coloración de Gram de una de las láminas en el equipo automatizado previcolor Gram Ver figura 18 y se observa al microscopio, se registra en la hoja de trabajo el microorganismo observado y se reporta al servicio donde se encuentra el paciente.



**Figura 18. Equipo PREVI Color Gram**

Tomado de pagina web Biomerieux® citado el 14 marzo de 2018 disponible en <http://www.ganbaro.com.ve/productos/clinica/microbiologia-clinica/Biomerieux®>

6. Una vez las cajas cumplan el tiempo de incubación y se evidencie crecimiento bacteriano en los agares, se procederá a realizar identificación por la técnica MALDI TOF en el equipo MS de Biomerieux®. Ver anexo 4, y el antibiograma por la tecnología vitek 2 de Biomerieux® y de acuerdo a la información obtenida realizar pruebas complementarias para la generación de un resultado final.
7. La grafica expresada por el equipo MS de Biomerieux® serán comparada con la base de datos reposados en la biblioteca del equipo, el cual arroja el dato con el microorganismo detectado y el porcentaje de concordancia el cual es verificado y validado por la bacterióloga operadora del equipo.

8. Ya verificados los resultados emitidos por el equipo MS, la bacterióloga los emitirá mediante una interface al sistema OMEGA ERP® versión 1.0 para su respectivo análisis con antibiograma emitido por el equipo vitek 2 de Biomerieux® para ser validados y reportados al servicio de procedencia.

#### **9.4 Anexo 4. MANUAL DE USO DE EQUIPO VITEK MS® DE BIOMERIEUX®.**

El equipo Vitek MS® ver figura 19, cuenta con tres estaciones de servicio especiales y necesarias para la identificación microbiana.



**Figura 19. Equipo Vitek MS®**

Tomado de pagina web Biomerieux® citado el 14 marzo de 2018 disponible en <http://www.ganbaro.com.ve/productos/clinica/microbiologia-clinica/Biomerieux®>

1. ESTACION DE PREPARACIÓN: es la parte inicial del procedimiento donde se prepara la muestra para su lectura de acuerdo a los siguientes pasos.
  - Se inicia con el equipo encendido oprimiendo la tecla scroll (esta tecla se oprime dos veces seguidas), luego se coloca el número 2 y enseguida se digita la clave “micro” y la contraseña “microbio2018”
  - Aparece la pantalla principal de este módulo, con la pistola escaneamos la placa porta objeto la cual tiene tres adquisiciones y nos indica la posición en donde debemos depositar la muestra Ingresar la petición del paciente en el espacio designado y oprimir la tecla enter.
  - El equipo indica en qué posición de la lámina porta objeto debe depositar la muestra. Ver figura 20.



**Figura 20. Placa para inoculación de muestra Vitek MS®**

Tomado de página web Biomerieux® citado el 14 marzo de 2018 disponible en <http://www.ganbaro.com.ve/productos/clinica/microbiologia-clinica/Biomerieux®>

- Tomar con asa destinada para inocular la muestra una parte de la colonia del medio solido (agar) e inocularla en los dos pozos destinados para esta muestra.
- Una vez inoculadas las muestras oprimir la ventana validar para pasar al siguiente paciente.
- Este procedimiento se realiza de la misma manera con 8 muestras hasta completar la primera adquisición.
- Una vez terminadas las 8 muestras se procede a inocular el pozo destinado para el control el cual se realiza con una cepa ATCC de *E. coli*
- Colocar en cada pozo inoculado con una punta convencional la cantidad de 1 micro litro de matriz HCCA. Ver figura 21



**Figura 21 . Kit de reacción Vitek MS®**

Tomado de pagina web Biomerieux® citado el 14 marzo de 2018 disponible en <http://www.ganbaro.com.ve/productos/clinica/microbiologia-clinica/Biomerieux®>.

- Este procedimiento se realiza de la misma manera hasta completar las tres adquisiciones con sus respectivos controles.

- Enviar los datos a la estación adquisición en la ventana “porta”
2. ESTACION DE ADQUISICIÓN: en esta parte del proceso la muestra es intervenida para su lectura de acuerdo con los siguientes pasos:
- Se inicia oprimiendo la tecla scroll (esta tecla se oprime dos veces seguidas), luego se coloca el número 4 y enseguida se digita la clave “micro” y la contraseña “microbio2018”
  - Se oprime la ventana OPEN para que el equipo abra la puerta.
  - Una vez abierta la puerta se escanea la lámina preparada y se oprime la tecla enter.
  - Colocamos la lámina en el estuche de metal propio del equipo y la depositamos en la ranura de entrada que está en la puerta del equipo y oprimimos la ventana start. Ver figura 22

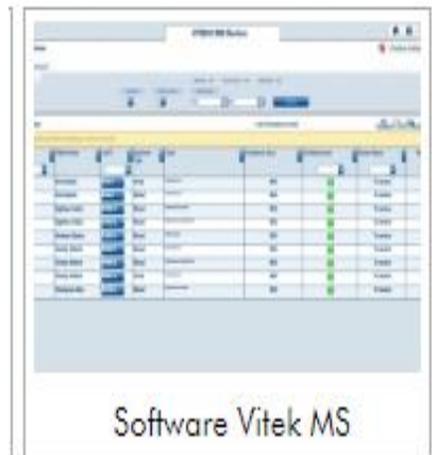


**Figura 22. Puerta y rejilla de entrada Vitek MS®**

Tomado de pagina web Biomerieux® citado el 14 marzo de 2018 disponible en <http://www.ganbaro.com.ve/productos/clinica/microbiologia-clinica/Biomerieux®>

- El equipo empieza su funcionamiento una vez alcance su presión y el vacío necesario.
  - Inicia con leer el control y una vez sea aceptado inicia con la lectura de los primeros 8 pacientes que están en la primera parte de adquisición, cuando hay buen desempeño en la lectura se evidencia con un halo verde dentro del pozo leído y cuando no hay un buen desempeño de lectura se evidencia un halo rojo dentro del pozo leído; al terminar con este grupo de adquisición vuelve a leer el control y valida la lectura del grupo de adquisición; así sucesivamente hasta completar la totalidad de la lámina.
  - Una vez terminada el primer grupo de adquisición el equipo envía la información a la estación de mayla, así sucesivamente con las dos adquisiciones siguientes.
3. ESTACION MAYLA: en esta parte del proceso se analizan los resultados obtenidos y se valida de acuerdo al nivel de concordancia, de acuerdo con los siguientes pasos:
- En la estación de ADQUISICIÓN buscamos el link de MAYLA se ingresa digitando la clave “micro” y la contraseña “microbio2018”
  - Se verifica los resultados de acuerdo al código de colores de la siguiente manera: Ver figura 23
    - CUADRO VERDE: lectura y concordancia perfecta
    - TRIANGULO NARANJA: lectura y concordancia por definir

- HALO ROJO: lectura y concordancia deficiente



The image shows a screenshot of the Vitek MS software interface. It features a data table with multiple columns, likely representing patient information, test results, and concordance status. The table is titled 'Software Vitek MS' at the bottom. The interface includes a header with navigation options and a main area with a grid of data. The data rows are color-coded, with green indicating high concordance and red indicating low concordance (HALO ROJO).

**Figura 23. software Vitek MS®**

Tomado de pagina web Biomerieux® citado el 14 marzo de 2018 disponible en <http://www.ganbaro.com.ve/productos/clinica/microbiologia-clinica/Biomerieux®>

- Se validan y se exportan a la interface los de concordancia superior al 99 % que por lo general son los CUADRO VERDE.
- Se revisa y se validan los TRIANGULO NARANJA de acuerdo al criterio de germen y porcentaje de concordancia.
- Se rechazan por ser discordantes los de HALO ROJO y se procede a procesar nuevamente.

## **9.5 Anexo 5. PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACION DIRECTA DE HEMOCULTIVOS.**

- De las botellas con hemocultivos positivos emitidos por el BacT/ALERT 3D® se tomaron las 100 muestras aleatoriamente que cumplieron los criterios de aceptación de muestras descritas anteriormente en este trabajo, se organizaron cronológicamente de acuerdo al número de petición con las que fueron ingresadas en el sistema del laboratorio clínico sanitas y se registraron en la base de datos designada para la recolección de los datos del proyecto.
- Se tomaron 100 tubos secos vacutainer BD no additive® con referencia 366408 con número de lote 7208934 con fecha de vencimiento 2018-09-30, cada uno fue marcado consecutivamente con el número de muestra, número de petición y número de hemocultivo.
- En la cabina de seguridad biológica de tipo C4 calificada y recalificada por la empresa CYM COLOMBIA S.A.S. modelo CSB 85 serial 130817 ubicada en el área de microbiología del laboratorio central de referencia se desinfectaron las botellas seleccionadas con alcohol antiséptico al 95%.
- Por sistema cerrado usando camisa y aguja vacutainer se extrajeron 5 ml de muestra de las botellas seleccionadas en cada tubo previamente identificado
- Las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos para obtener pellet o sedimento bacteriano, el sobrenadante fue descartado en recipiente destinado para desechos líquidos de riesgo biológico.
- los sedimentos o pellet bacterianos fueron agitados en el Agitador Vortex Marca Grant Instruments® - UK, modelo PV1 durante 2 minutos
- a cada tubo se le realizó lavado con agua estéril marca Baxter® viafler apirógena lote 5B17KLO referencia ARB0303 con fecha de

vencimiento noviembre de 2019 mediante centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos, este proceso se realizó tres veces con el propósito de limpiar el pellet bacteriano de restos celulares como glóbulos rojos y leucocitos ya que las proteínas de estas células interfieren con la de las bacterias. (1)(25)

- El proceso se continuo como esta descrito en el manual de uso de equipo VITEK MS® de Biomerieux®, utilizando laminas para Vitek MS® referencia 410893 lote 11111204MB con fecha de vencimiento 2018-12-15 y matriz ácido cinámico CHCA referencia 411071 lote 1005998530 con fecha de vencimiento 2018-10-03.(22)
- Los datos obtenidos fueron registrados en la matriz diseñada para la recolección de los datos descritos en el numeral: **3.3.4** Proceso de recolección y sistematización de la información.