

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**IDENTIFICACION RAPIDA DE MICROORGANISMOS  
EN LIQUIDOS ESTERILES CON MALDI-TOF MS**

**Por**

**DR. ISAI MEDINA PIÑON**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
ESPECIALISTA EN INFECTOLOGIA**

**FEBRERO 2018**

**IDENTIFICACION RAPIDA DE MICROORGANISMOS**

**EN LIQUIDOS ESTERILES CON MALDI-TOF MS**

**Aprobación de la tesis:**



---

**Dr. Michel Fernando Martínez Reséndez**  
**Director de la tesis**



---

**Dr. Pedro Alberto Hernández Rodríguez**  
**Coordinador de Enseñanza**



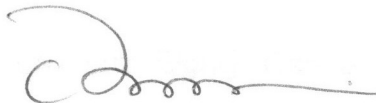
---

**Dr. med. Adrián Camacho Ortiz**  
**Coordinador de Investigación**



---

**Dr. med. Javier Ramos Jiménez**  
**Jefe de Servicio o Departamento**



---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**  
**Subdirector de Estudios de Posgrado**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a todas las personas que apoyaron para la realización de la presente Tesis. No existen palabras ni suficiente espacio para expresar mi gratitud.

Principalmente, doy gracias a Dios por la vida, por la oportunidad de disfrutar un paso más en mi formación profesional y personal, y por el privilegio de poder vivir mi pasión: Medicina.

Agradezco atentamente a mis padres, QBP. Arturo Medina Martínez y Lic. Beatriz Piñón López, por creer en mí, por su apoyo incondicional, y ser un gran ejemplo de amor y fortaleza.

A mis profesores, Dr. Michel Fernando Martínez Reséndez, Dr. med. Adrián Camacho Ortiz, Dr. Pedro Hernández Rodríguez, y Dr. med. Javier Ramos Jiménez, por compartir conmigo su conocimiento y gusto por la Infectología, así como sus valiosos consejos, orientación y experiencia.

Al Dr. med. Héctor Jesús Maldonado Garza, Dra. Elvira Garza González, QCB. Leslie Giovanna Galván Irigoyen, y todo el amable personal del Laboratorio y Servicio de Gastroenterología por abrirme las puertas de sus servicios y recursos, y ser parte fundamental de la presente tesis.

A mi compañera de vida, LN. Luz Eighty García Prieto, por su constante motivación, inagotable cariño, y enorme paciencia.

Con admiración y respeto, gracias a todos.

Dr. Isaí Medina Piñón

## TABLA DE CONTENIDO

| <b><u>CAPITULO</u></b>   | <b><u>PAGINA</u></b> |
|--|----------------------|
| <b>Capítulo 1</b>  |                      |
| RESÚMEN. ....  | 9                    |
| <b>Capítulo 2</b>  |                      |
| MARCO TEORICO .....  | 10                   |
| 2.1 Introducción. ....   | 10                   |
| 2.2 Diagnóstico microbiológico clásico. ....                               | 10                   |
| 2.3 Métodos automatizados. ....  | 11                   |
| 2.4 Otros métodos de identificación microbiológica. ....                   | 13                   |
| 2.5 Espectrometría de masas / MALDI-TOF. ....                              | 13                   |
| 2.6 MALDI-TOF MS en el laboratorio de microbiología. ....                  | 14                   |
| 2.7 Aplicación de MALDI-TOF en infectología y microbiología clínica. ...   | 17                   |
| 2.8 Uso de frascos de hemocultivos y su impacto clínico. ....              | 19                   |
| 2.9 Aplicación de MALDI-TOF para identificación en líquidos estériles. ... | 20                   |
| 2.10 Beneficios del MALDI-TOF y futuras aplicaciones .....                 | 21                   |
| <b>Capítulo 3</b>  |                      |
| INVESTIGACION CLINICA .....  | 23                   |
| 3.1 Justificación del estudio. ....  | 23                   |
| 3.2 Hipótesis. ....  | 23                   |
| 3.3 Objetivos .....  | 24                   |
| 3.3.1 Objetivo principal. ....   | 24                   |
| 3.3.2 Objetivos secundarios. ....  | 24                   |
| 3.4 Material y Métodos. ....   | 24                   |
| 3.4.1 Tipo y diseño de estudio. ....                                       | 24                   |
| 3.4.2 Población de estudio. ....   | 24                   |
| 3.4.3 Criterios de inclusión. ....   | 25                   |
| 3.4.4 Criterios de exclusión. ....   | 25                   |
| 3.4.5 Criterios de eliminación. ....                                       | 25                   |

|   |    |
|---|----|
| 3.4.6 Datos clínicos. . . . .                 | 26 |
| 3.4.7 Datos de laboratorio. . . . .           | 26 |
| 3.4.8 Obtención y manejo de muestras. . . . . | 26 |
| 3.4.9 Análisis estadístico. . . . .           | 30 |
| <b>Capítulo 4</b>                             |    |
| RESULTADOS . . . . .                          | 31 |
| <b>Capítulo 5</b>                             |    |
| DISCUSIÓN Y CONCLUSION . . . . .              | 40 |
| <b>Capítulo 6</b>                             |    |
| BIBLIOGRAFIA . . . . .                        | 43 |
| <b>Capítulo 7</b>                             |    |
| RESUMEN AUTOBIOGRAFICO. . . . .               | 52 |

## INDICE DE TABLAS

| <b>Tabla</b>   | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| 1. Métodos actuales de identificación microbiológica.....          | 12            |
| 2. Ventajas y limitaciones del MALDI TOF MS .....                  | 16            |
| 3. Rangos de confiabilidad de MALDI-TOF MS .....                   | 28            |
| 4. Información general de pacientes incluidos .....                | 32            |
| 5. Diagnóstico de ingreso por Líquido Estéril .....                | 33            |
| 6. Correlación de estudio citoquímico de Líquidos pleurales .....  | 34            |
| 7. Correlación de estudio citoquímico de LCR .....                 | 34            |
| 8. Muestras identificadas por MALDI-TOF MS .....                   | 35            |
| 9. Porcentaje de identificación de muestras por MALDI-TOF MS ..... | 35            |
| 10. Identificación microbiológica por MALDI-TOF MS .....           | 37            |
| 11. Tiempo de identificación de muestras por MALDI-TOF MS .....    | 38            |
| 12. Capacidad diagnóstica de MALDI-TOF MS .....                    | 39            |
| 13. Potencial modificación al tratamiento con MALDI-TOF MS .....   | 39            |

## INDICE DE FIGURAS

| <b>Figura</b>   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| 1. Algoritmo de procedimientos de Microbiología Clásica ..... | 11            |
| 2. Esquema general de la espectrometría de masas .....        | 15            |
| 3. Resumen de procedimientos .....                            | 28            |
| 4. Ejemplo de resultado en equipo MALDI-TOF MS.....           | 29            |

## LISTA DE ABREVIATURAS

**MALDI:** Matrix-assisted laser desorption ionization  
(Desorción/ionización láser asistida por matriz).

**TOF:** Time of flight  
(Tiempo de vuelo)

**MS:** Mass espectrometry  
(Espectrometría de masas).

**LCR:** Líquido cefalorraquídeo.

**ELISA:** Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay  
(Enzimo-inmuno ensayo).

**FISH:** Fluorescence *in situ* hybridization  
(Hibridación fluorescente in situ).

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ADNr:** Ácido desoxirribonucleico ribosomal.

**LAMP:** Loop-mediated isothermal amplification  
(Amplificación isotérmica mediada por bucle)

**SARM:** *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

**SASM:** *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina.

**BLEE:** Beta-lactamasas de espectro extendido.

**IACDP:** Infección asociada a catéter de diálisis peritoneal.

**IC 95%:** Intervalos de confianza de 95%.

**m/z** = Masa sobre carga.

**mmHg:** Milímetros de mercurio.

**mg/dL:** Miligramos/decilitro.



## CAPITULO I

### RESUMEN

#### IDENTIFICACION RAPIDA DE MICROORGANISMOS EN LIQUIDOS ESTERILES CON MALDI-TOF MS

**Objetivos:** Las nuevas tecnologías para diagnóstico microbiológico rápido y eficaz incluyen a la espectrometría de masas, la cual ha demostrado identificación rápida de microorganismos de colonias aisladas y frascos de hemocultivo. El objetivo del presente estudio es evaluar la capacidad y rapidez de la espectrometría de masas para el diagnóstico microbiológico de líquidos estériles.

**Material y Métodos:** Estudio prospectivo realizado en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, en el cual se obtuvieron muestras de líquidos corporales estériles (pleural, sinovial, peritoneal y cefalorraquídeo) de pacientes ingresados con infección afectando regiones anatómicas relacionadas. Se cultivaron en el laboratorio por métodos convencionales y frascos de hemocultivo, y se analizaron con espectrometría de masas. Se documentó el tiempo, y la capacidad de identificación en los métodos que dieran resultado positivo más rápido.

**Resultados:** Se obtuvieron 36 muestras de líquidos estériles: Líquido pleural 44.4% (16/36), cefalorraquídeo 38.8% (14/36), sinovial 8.3% (3/36), y peritoneal 8.3% (3/36). Se reportaron con identificación 44.4% (16/36) por MALDI-TOF MS adaptado de los siguientes métodos: cultivo convencional 18.75% (3/16), estudio directo de extracto de frascos positivos 31.25% (5/16), y cultivo de resiembra de extracto de frascos positivos 50% (8/16). La media de tiempo por método fue 24h 10min, 44h 51min, y 171h 43min, respectivamente. Todos los microorganismos fueron identificados con puntuación confiable (>1.7). La capacidad diagnóstica entre métodos convencionales y frascos de hemocultivo ( $P=0.0011$ ), y el potencial para modificar tratamiento ( $P=0.0001$ ) resultaron significativos, aun en un escenario de 86.1% (31/36) de pacientes con antibioticoterapia al tiempo de toma de muestras.

**Conclusión:** La espectrometría de masas es útil para la identificación de microorganismos desarrollados de líquidos estériles, adaptando métodos convencionales con frascos de hemocultivo. Su aplicación en la reducción de tiempo de identificación es prometedora, y está encaminada a la toma oportuna de decisiones terapéuticas.

## **CAPITULO II**

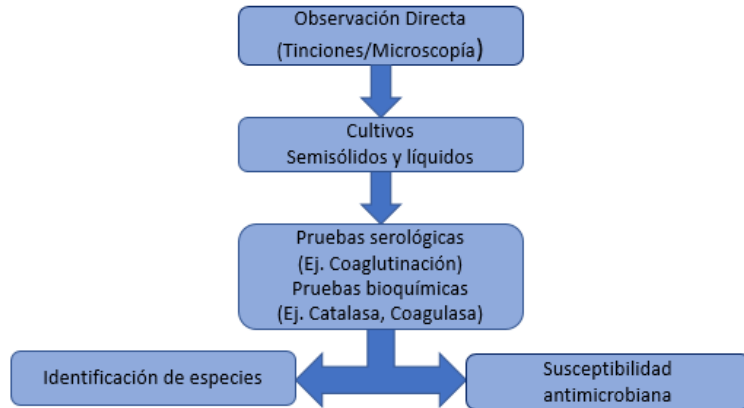
### **MARCO TEORICO**

#### **2.1 Introducción**

Las enfermedades infecciosas se encuentran en las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel global. En el curso natural de las infecciones bacterianas, el diagnóstico temprano y tratamiento oportuno, son elementos clave para que se desarrolle mejor rehabilitación y pronóstico. Actualmente, los métodos de diagnóstico microbiológico convencionales proveen información para modificar los tratamientos empíricos y elegir tratamiento específico (des-escalar) con precisión, sin embargo, requieren de 2 a 4 días para la obtención de resultados.<sup>1,2</sup>

#### **2.2 Diagnóstico microbiológico clásico**

El diagnóstico microbiológico clásico incluye metodologías basadas en tinciones para clasificación morfológica, cultivo en medios semi-sólidos o líquidos, y la posterior realización de pruebas bioquímicas, serológicas y/o antigénicas para la identificación del microorganismo. Además, se realizan a la par estudios de susceptibilidad antimicrobiana para definir las opciones terapéuticas. (Figura 1).<sup>2,3</sup>



**Figura 1. Algoritmo de procedimientos de Microbiología Clásica.**

En la mayoría de los laboratorios de microbiología se requiere el crecimiento en los cultivos, la realización de pruebas bioquímicas de identificación y pruebas de susceptibilidad, lo cual prolongan el tiempo de obtención de los resultados a días, y en algunos casos hasta semanas.<sup>1,3-5</sup>

### **2.3 Métodos automatizados**

Actualmente se disponen herramientas automatizadas para la identificación microbiológica y la realización de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en los laboratorios de microbiología, entre las cuales destacan: Vitek 2® (bioMérieux), MicroScan® (Siemens), y Phoenix® (Becton Dickinson). Aun con los equipos automatizados, se requiere esperar días de crecimiento microbiano en cultivos convencionales, para su procesamiento en estos equipos.<sup>1,6</sup>

Tabla 1.

**Métodos actuales de identificación microbiológica.**

| <b>Método de detección</b>   | <b>Ventajas</b>   | <b>Desventajas</b>   |
|--|---|--|
| <b>Convencional:</b><br>Cultivos e identificación con pruebas bioquímicas          | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bajo costo</li> <li>- Sensibilidad alta en escenarios sin uso previo de antibióticos.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Requiere más de 24h para resultados.</li> </ul>   |
| <b>Métodos inmunológicos</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pueden detectar presencia de microorganismos y toxinas</li> <li>- Mayor rapidez que métodos convencionales</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- No son tan sensibles o específicos como las pruebas moleculares.</li> <li>- Requieren grandes cantidades de reactivos</li> <li>- Está limitado a una cantidad discreta de microorganismos.</li> </ul> |
| <b>Hibridación fluorescente in situ (FISH)</b>                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Rápida detección e identificación</li> <li>- Método fácil de aplicar con tinciones convencionales</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Limitado por la baja disponibilidad de antígenos para identificación</li> </ul>   |
| <b>Estudios moleculares:</b><br>- Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real. | <ul style="list-style-type: none"> <li>- No requiere cultivos</li> <li>- Alta sensibilidad y especificidad</li> <li>- Bajo riesgo de contaminación</li> <li>- Puede identificar varios patógenos simultáneamente</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Requiere un termociclador</li> <li>- Se requiere personal con entrenamiento</li> <li>- Costos elevados.</li> </ul>  |
| <b>Secuenciación genética</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Puede detectar patógenos fastidiosos y difíciles de cultivar</li> <li>- Secuenciación 16s ADNr y 18S ADNr son estándar de oro</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Es necesario personal con entrenamiento y software especializado para su interpretación</li> <li>- Alto costo</li> <li>- No es aplicable para uso clínico común</li> </ul>                            |
| <b>Microarreglos</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Búsqueda simultánea de microorganismos a gran escala, y detección de múltiples patógenos.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alto costo</li> <li>- Requiere personal con entrenamiento</li> </ul>  |
| <b>Amplificación Isotérmica mediada por asas (LAMP)</b>                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Puede generar grandes cantidades de ADN en menos de 1h</li> <li>- Fácil de usar, sin necesidad de equipos sofisticados</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Está limitado a una cantidad discreta de microorganismos</li> </ul>   |
| <b>MALDI-TOF MS</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Rápido y preciso</li> <li>- Menor costo que pruebas inmunológicas y moleculares</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alto costo del equipo</li> </ul>  |

## 2.4 Otros métodos de identificación microbiológica

En los últimos 20 años, han surgido nuevas tecnologías para la identificación microbiológica, como resultado de la búsqueda de estándares para mayor rapidez, precisión, y sensibilidad, que permiten optimizar la atención y terapéutica de los pacientes.<sup>2,3,5</sup> Entre ellos están los métodos de medición de la reacción inmunológica como la detección de los niveles anticuerpos por ELISA.<sup>4,7,8</sup> Además, se han agregado métodos novedosos que han demostrado potencial uso en investigación y en la práctica clínica, y que son alternativas diagnósticas al cultivo tradicional. Por ejemplo: secuenciación genética,<sup>9,10</sup> hibridación fluorescente *in situ* (FISH),<sup>11</sup> reacción en cadena de polimerasa en tiempo real,<sup>12</sup> las "ómicas" (transcriptómica, genómica, proteómica, etc.),<sup>13</sup> y el MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry).<sup>14</sup>

El abordaje diagnóstico con este tipo de herramientas provee oportunidades para predecir, prevenir, e individualizar la evaluación microbiológica y el tratamiento de las enfermedades infecciosas (Tabla 1).<sup>1,15,16</sup>

## 2.5 Espectrometría de masas / MALDI-TOF MS

La espectrometría de masas es una técnica en la cual, las moléculas de una muestra son ionizadas, y el rango de su relación masa/carga ( $m/z$ ) se analiza como patrón que distingue a dichos compuestos. Aunque la espectrometría de masas fue descubierta a inicios del siglo XX, su campo fue básicamente a nivel de las ciencias químicas.<sup>2</sup>

En 1975, se propuso por Anhalt y Fenselau, el uso de espectrometría de masas para identificación bacteriana.<sup>17</sup> Lamentablemente, en ese tiempo no se disponía de la tecnología para analizar macromoléculas intactas, hasta la década de los 80s. En 1985, Koichi Tanaka describió la técnica de "ionización suave" (soft-ionization), en la cual se ioniza de manera gentil a muestras de moléculas para que generaran un espectro de sus componentes.<sup>2,18</sup> En 1987, se presentó por

primera vez el método de MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization), utilizando una matriz orgánica.<sup>19</sup> Estudios subsecuentes complementaron y fortalecieron este método, en conjunto con avances computacionales para el desarrollo de bases de datos comprensibles y confiables para su uso clínico.<sup>20,21</sup> En consecuencia a dichos avances tecnológicos, en el 2002, se le otorgó el Premio Nobel de Química a Koichi Tanaka.<sup>22</sup>

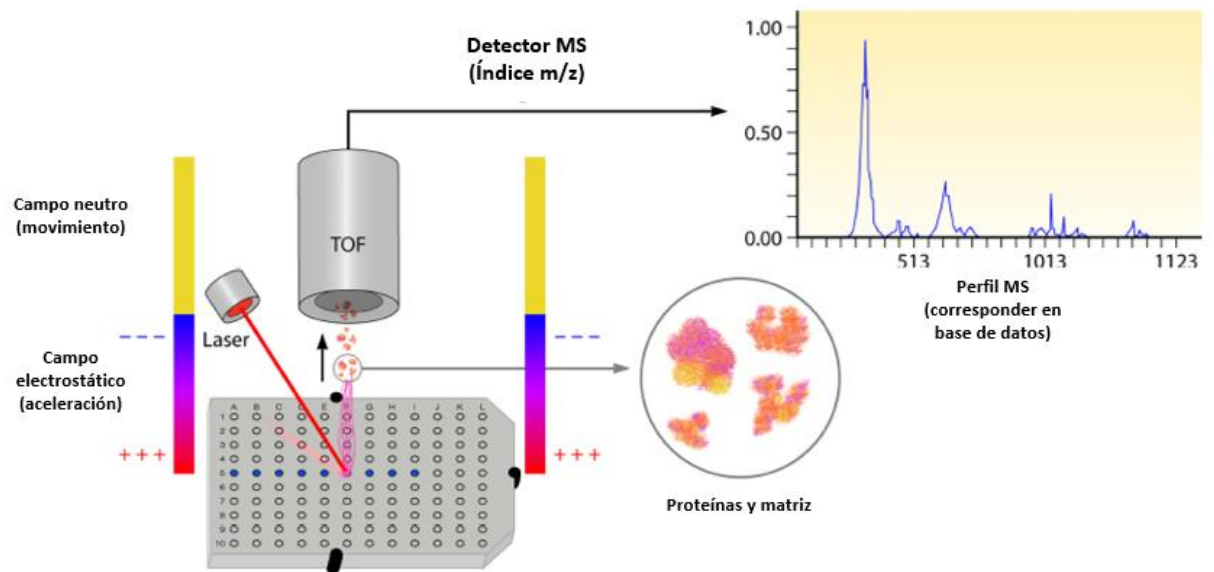
La espectrometría de masas también ha sido utilizada en el campo clínico, por su alto nivel de sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de algunas enfermedades hereditarias (ej. fenilcetonuria),<sup>23</sup> neoplasias,<sup>24</sup> y biomarcadores diagnósticos de enfermedad.<sup>25</sup> En microbiología e infectología clínica tiene aplicación amplia. <sup>1,2</sup>

## **2.6 MALDI-TOF MS en el laboratorio de microbiología**

MALDI-TOF MS tiene aplicación en el laboratorio de microbiología para la identificación, a partir de una colonia de bacterias, micobacterias, y hongos. Cuando ya se cuenta con una colonia, ésta se coloca sobre una placa de acero y se adiciona la matriz o reactivo para ionización. Una vez colocada la placa en el equipo, las muestras son ionizadas por pulsos de láser (ionización-suave), seguida de aceleración de partículas a través de un tubo con campo eléctrico. La cantidad de tiempo que cada partícula tarde en llegar al detector depende de su masa y carga ( $m/z$ ). Este tiempo es el denominado "time-of-flight" (TOF). Después de que las macromoléculas (proteínas) ionizadas han sido detectadas por el espectrómetro de masas, se produce una huella digital o patrón de picos, la cual es única en cada especie dependiendo de su composición de proteínas. Las principales proteínas detectadas por el MALDI-TOF MS, son proteínas ribosomales.<sup>26</sup> El patrón de picos se analiza y compara en el software del equipo con las bases de datos, para la identificación del microorganismo.<sup>27</sup>

Algunos microorganismos son más difíciles de lisar e identificar (hongos filamentosos, levaduras, micobacterias, etc.), y se utilizan pretratamientos con ácidos orgánicos más potentes.<sup>28,29</sup>

Una descripción breve de cómo funciona el MALDI-TOF MS, se resume en la Figura 2.<sup>29,30</sup> En la Tabla 2, se mencionan ventajas y desventajas del MALDI-TOF MS.<sup>2</sup>



**Figura 2.** Esquema general de la espectrometría de masas (MS). Una vez que se procesaron las muestras adecuadamente, se colocan en la placa del MALDI-TOF, donde son bombardeadas por el láser. Como resultados, se subliman y ionizan la muestra y la matriz. Estos iones se separan a través del tubo de “time of flight” (TOF), de acuerdo con su índice m/z (masa sobre carga), generando una representación espectral (Perfil MS) que posteriormente es analizada y comparada con la base de datos. (Adaptado de: Clark AE, *et al.* Clin. Microbiol. Rev. 2013;26(3): 547-603)

**Tabla 2.**

**Ventajas y limitaciones del MALDI TOF MS.**

| <b>Ventajas</b>   | <b>Limitaciones</b>   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Proceso y resultados rápidos.</li></ul>   | <ul style="list-style-type: none"><li>• Incapacidad de diferenciar microorganismos altamente relacionados.</li></ul>            |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Bajo costo por prueba.</li></ul>  | <ul style="list-style-type: none"><li>• Alto costo del equipo.</li></ul>  |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Verificable y reproducible.</li></ul>   | <ul style="list-style-type: none"><li>• Es necesario mantener actualizadas las bases de datos.</li></ul>                        |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Mínimo aislamiento de colonias.</li></ul>   | <ul style="list-style-type: none"><li>• Algunos microorganismos requieren extracción de proteínas antes de la prueba.</li></ul> |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Capacidad de identificar un gran número de microorganismos en una misma plataforma.</li></ul>   | <ul style="list-style-type: none"><li>• Incapacidad de realizar cuantificación.</li></ul>                                       |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Fácil de usar (preparación de la muestra, ejecución del proceso, y análisis de información).</li></ul>  | <ul style="list-style-type: none"><li>• Baja habilidad de identificar susceptibilidades antimicrobianas.</li></ul>              |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Error en la tinción de Gram inicial, no afecta los resultados de MALDI TOF MS.</li></ul>  |   |
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Potencial de identificación de microorganismos difíciles de identificar por métodos convencionales o que requieren métodos moleculares.</li></ul> |   |



## 2.7 Aplicación de MALDI-TOF en infectología y microbiología clínica

MALDI-TOF MS es una herramienta que complementa ampliamente el laboratorio de microbiología y la práctica médica en el campo clínico de las enfermedades infecciosas. Uno de los objetivos principales del apoyo con herramientas diagnósticas, es la identificación rápida y oportuna de los microorganismos causales de enfermedad, y dirigir el tratamiento adecuado para favorecer a una resolución y recuperación con menos secuelas posibles en la integridad del individuo.<sup>18</sup>

Múltiples estudios se han realizado para identificación de bacterias aerobias con MALDI-TOF MS, en comparación métodos convencionales (cultivos semisólidos y pruebas bioquímicas) u otros métodos de identificación (automatizadas). Un estudio para identificar bacilos Gram negativos comunes y no usuales, en 440 muestras, reveló que MALDI-TOF MS identificó correctamente 92% y 82%, respectivamente. Los métodos convencionales identificaron 83% y 75%, respectivamente, a nivel especie y género. Además, en otro estudio involucrando 217 muestras de Gram positivos, MALDI-TOF MS identificó correctamente 98%.<sup>31,32</sup>

Se ha estudiado el desempeño del MALDI-TOF MS con especies difíciles de identificar. En uno de ellos, se evaluaron 67 muestras de estas bacterias y se identificaron correctamente el 75% de las especies en comparación de 45% por métodos convencionales.<sup>33</sup> En otro estudio, se analizaron 190 bacilos Gram positivos, y el 72% se identificaron correctamente en colonias directas y el 85% con tratamiento con ácido fórmico.<sup>34</sup> Lasch et al., unieron esfuerzos de distintos centros europeos, para estudiar especies de manejo en nivel de bioseguridad 3 entre las cuales se incluyeron *Bacillus anthracis*, *Brucella canis*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, y *Yersinia pestis*; y se obtuvo identificación del 77% con bases de datos no estandarizadas, y hasta 93% con bases de datos optimizadas.<sup>35</sup> En un estudio con 253 muestras de anaerobios, se estudiaron directamente en placa con ácido fórmico, e identificaron correctamente el 92% de

las cepas.<sup>36</sup> Barreau et al., en un estudio más amplio donde analizaron 1,325 anaerobios, lograron identificación de 93%.<sup>37</sup>

En los últimos años, MALDI-TOF ha sido la preferencia para la aplicación en este tipo de bacterias, incrementando el espectro de diagnóstico de clínicos y microbiólogos que adquieren experiencia en el uso de la espectrometría de masas.<sup>18</sup>

Recientemente, MALDI-TOF MS ha demostrado ser una herramienta útil, rápida, accesible, y de bajo costo para la identificación de micobacterias. Se necesita una preparación especial para remover su envoltura y lisar las bacterias previo al estudio directo en placa. Sin embargo, este proceso lleva máximo 2 horas, no se puede hacer con la mayoría de los métodos de identificación de micobacterias, y no distingue entre los diferentes miembros del *Mycobacterium tuberculosis* complex.<sup>38</sup> Balada-Llasat et al., analizaron 178 crecimientos en medio sólido y/o líquido, preparando la muestra con inactivación con calor, tratamiento con etanol, y separación mecánica e identificaron el 98% y 94%, de género y especie, respectivamente.<sup>39</sup>

Una más de las grandes aplicaciones del MALDI-TOF MS, es la identificación de levaduras, con la misma técnica directa en placa que con bacterias.<sup>40</sup> Dhiman et al., analizaron 138 muestras de levaduras comunes, y 103 de no usuales, con un porcentaje de identificación correcta de 96% y 85%, respectivamente.<sup>41</sup> Mancini et al., encontraron porcentajes similares, aun comparando MALDI-TOF MS de distinto fabricante.<sup>42</sup>

Distintas variedades hongos filamentosos también han sido estudiados en los últimos años en MALDI-TOF MS.<sup>43</sup> Diversas técnicas se han propuesto para perfeccionar la eficacia de identificación, incluyendo tratamiento previo de muestras para extracción de proteínas, así como enriquecer las bases de datos con muestras de hongos previamente identificadas para mejorar el desempeño de identificación a nivel género y especie.<sup>44</sup> Schulthess et al., analizaron 83 muestras de hongos filamentosos, con una identificación de 78% y 54%,

respectivamente.<sup>45</sup> Lau et al., con sus técnicas de pretratamiento y estudio perfeccionadas, logró 94% y 90% de identificación de 421 muestras.<sup>44</sup> De Respini et al., evaluaron 141 muestras de dermatofitos, identificando correctamente 96%.<sup>46</sup>

El estudio de colonias tomadas directo de los medios sólidos o líquidos, es el método más utilizado en MALDI-TOF MS, para la identificación de microorganismos.<sup>2</sup> Estos procedimientos llevan días de espera entre siembra y crecimiento de microorganismos, por lo que es necesario tener paciencia y esperar los resultados para la toma de decisiones clave en el tratamiento de los pacientes.<sup>4,5</sup> Sin embargo, se han estudiado métodos para identificación más rápida, de muestras clínicas directas para reducir los tiempos de identificación y optimizar el tratamiento a los pacientes afectados. Entre ellos se encuentra la aplicación directa de extracto de frascos de hemocultivos positivos en la placa del MALDI-TOF MS, con resultados sorprendentes en identificación efectiva y en la reducción de tiempos para decisiones terapéuticas.<sup>2,18</sup>

## **2.8 Uso de frascos de hemocultivos y su impacto clínico**

El procedimiento requiere preparaciones de la muestra, previas a la aplicación en placa del MALDI-TOF.<sup>47</sup> Se lleva a cabo una centrifugación diferencial, lavados, lisis de células sanguíneas, y filtración. Uno de estos métodos estandarizados es el Sepsityper BD®. Estudios en 2 diferentes marcas de MALDI-TOF MS (Bruker® and VITEK MS®), demostraron identificación de microorganismos en género-especie de 98-82% y 93-81%, respectivamente.<sup>48</sup> Una limitante puede ser que no se provee el resultado con susceptibilidades antimicrobianas, pero Manchen et al., demostraron que se puede reducir esa desventaja al someter la muestra tanto al MALDI-TOF MS como a un método automatizado como el Vitek 2® (Biomeriux) o Phoenix® (Becton Dickinson).<sup>49</sup>

Diversas publicaciones han documentado que se reduce el tiempo de identificación y publicación del resultado de 1-2 días, para optimizar el tratamiento del paciente a una terapéutica dirigida y eficaz. Martiny et al., publicaron como el MALDI-TOF MS, aportó un cambio en la terapéutica dirigida de 13.3% (21/157) pacientes con bacteriemias estudiadas, así mismo fue considerada por el especialista en enfermedades infecciosas como útil en la confirmación de sospecha diagnóstica, de las decisiones terapéuticas tomadas, y solicitud estudios complementarios con mayor anticipación.<sup>50</sup> Clerc et al., también contribuyeron con publicar como en 35.1% de bacteriemias por Gram negativos identificadas por MALDI-TOF MS, tuvieron un impacto en su terapéutica, mayor que al recibir sólo el resultado de tinción de Gram de frascos de hemocultivo positivos.<sup>51</sup> De Almeida-Junior et al., abordó los casos de fungemia con identificación de la muestra por MALDI-TOF MS de frascos de hemocultivo positivos, confirmando el impacto favorable al dirigir el tratamiento de pacientes en estado crítico.<sup>52</sup>

Barberino et al., evaluaron la extracción de 538 frascos de hemocultivo positivos monomicrobianos, de los cuales lograron identificación con el extracto procesado directo en placa, en 460 (83.94%); así mismo, logrando identificación del 93.4% de las bacterias Gram negativas, y 78.85% de las Gram positivas.<sup>53</sup> Otros estudios enfocaron la siembra del extracto de frascos positivos por periodos cortos para mejorar la sensibilidad al identificar de las colonias aisladas. Gonzalez et al., publicaron como la siembra del extracto de frascos positivos por un corto plazo en medios sólidos, ayudó a la identificación por MALDI-TOF MS, y logró reducir el tiempo de reporte de resultados de 28.3 a 21.2 horas.<sup>54</sup>

## **2.9 Aplicación de MALDI-TOF MS para identificación en líquidos estériles.**

Los estudios microbiológicos de líquidos estériles son cruciales para la identificación de microorganismos causales de infección en regiones anatómicas relacionadas. Los cultivos eran tradicionalmente aplicados en medios de cultivo sólido y con bajo porcentaje de efectividad. Con la aplicación en frascos de

hemocultivo, mejoró la efectividad e identificación de microorganismos.<sup>55</sup> Cetin et al., analizaron 412 muestras de líquidos estériles en frascos de hemocultivo, demostrando la disminución del tiempo de identificación, así como mayor aislamiento de bacterias fastidiosas que en métodos convencionales.<sup>56</sup> Akcam et al., estudiaron 906 especímenes: 344 de líquido peritoneal (38.0%), 290 de LCR (32.0%), 163 de líquido pleural (18.0%), 66 de líquido sinovial (7.3%), 33 de médula ósea (3.6%), y 10 de líquido pericárdico (1.1%); de las cuales 80 (8.8%), fueron detectados positivos en el sistema Bactec®, y reveló ventajas contra los métodos convencionales para aislamiento de bacterias fastidiosas.<sup>57</sup>

Existe información en cuanto a la aplicación directa de fluidos corporales al MALDI-TOF MS, por ejemplo, orina.<sup>58</sup> En el caso de líquidos estériles (Líquido cefalorraquídeo, pleural, sinovial, y peritoneal, pericárdico, etc.), la información es limitada. Algunos casos reportados de aplicación en LCR han sido publicados. Segawa et al., reportaron el caso de un hombre de 43 años con meningitis aguda, en el cual una muestra de LCR (procesada previamente para eliminación de excedente de proteínas y leucocitos), fue aplicada directamente en placa de MALDI-TOF MS, logrando identificación de *Klebsiella pneumoniae*.<sup>59</sup> Nyvang-Hartmeyer et al., reportaron otro caso de un hombre de 46 años con meningitis aguda, aplicando la identificación directa de LCR, identificando *Streptococcus pneumoniae* en menos de media hora de tomada la muestra.<sup>60</sup>

## **2.10 Beneficios del MALDI-TOF y futuras aplicaciones**

La información previa es evidencia de que el MALDI-TOF MS es un método orientado a identificación microbiológica rápida, con alta efectividad y certeza.<sup>2,18</sup> Sin embargo, los alcances de este método no se limitan a identificación de género y especie.

Recientemente, se han propuesto y estudiado técnicas que van orientadas a determinar identificación de resistencias antimicrobianas, ampliando los horizontes de la investigación con MALDI-TOF MS, y enriqueciendo la crucial información oportuna que provee al clínico y especialista en enfermedades

infecciosas.<sup>61,62</sup> En un estudio de Edwards-Jones et al., 14 picos específicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM), fueron identificados y comparados con otros 9 picos específicos de *S. aureus* sensibles a meticilina (SASM).<sup>63</sup> Así mismo Du et al., analizaron 76 aislamientos de *S. aureus*, logrando identificar patrones para distinguir SARM de SASM.<sup>64</sup> Shah et al., publicaron como identificaron correctamente entre 47 SAMR y 50 SAMS, siguiendo la diferencia en sus patrones de picos (específicamente por 7 iones).<sup>65</sup> En otro estudio Griffin et al., analizaron 67 muestras de *Enterococcus faecium*, vanB positivos, con sensibilidad y especificidad de 96.7% y 98.1%, respectivamente.<sup>66</sup> Li et al., estudiaron 69 bacterias Gram negativas con BLEE (Beta-lactamasas de espectro extendido), posterior a incubarlas en una solución con cefotaxima e identificar su hidrólisis.<sup>67</sup> Ghebremedhin et al., compartieron que identificaron correctamente 98% de *Pseudomonas* spp. y *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas.<sup>62</sup>

El impacto clínico de identificación microbiológica rápida ha sido mencionado como relevante con el uso de MALDI-TOF MS en los centros clínicos que lo tienen disponible.<sup>50</sup> En pacientes críticos es crucial la identificación rápida de los agentes causales de bacteriemias y sepsis, para tomar decisiones terapéuticas que sean trascendentales en el pronóstico.<sup>50-51</sup> French et al., publicaron sobre el impacto clínico que tiene la identificación en las primeras 24 horas en los pacientes con bacteriemias, aplicando el extracto directo de frascos de hemocultivo positivos en MALDI-TOF MS; de 115 casos de hemocultivos positivos, lograron identificar 73 (63.5%) en las primeras 24 horas, y en 11 (9.6%) pacientes lograron modificación del esquema de antibióticos.<sup>68</sup>

En el futuro de MALDI-TOF MS, se estima que la emergencia de bases de datos y aplicaciones complementarias, también serán clave para la identificación de muestras polimicrobianas, y con resultados cuantitativos.<sup>69-72</sup>

## CAPITULO III

### INVESTIGACIÓN CLINICA

#### **3.1 Justificación del estudio**

El diagnóstico microbiológico rápido es crucial para el inicio temprano de tratamiento específico. La aplicación del MALDI-TOF MS para el diagnóstico microbiológico en pacientes con infección y compromiso de regiones anatómicas con líquidos estériles, permitirá contribuir a elegir el tratamiento específico en un tiempo más corto que con los métodos convencionales, y, por lo tanto, se reflejará en una mejor calidad de atención de cuidados de salud.

Las contribuciones más significativas son encaminadas a reducir la morbimortalidad de este tipo de infecciones, e incluyen menos interacciones medicamentosas y efectos adversos, reducción del tiempo de estancia hospitalaria y rehabilitación, menor gasto en servicios de salud, y mayor calidad en los servicios de diagnóstico microbiológico que lo tengan disponible.

#### **3.2 Hipótesis**

##### **Hipótesis de investigación**

La espectrometría de masas es una herramienta efectiva para la identificación microbiológica rápida y complemento para la práctica clínica en pacientes con infección por microorganismos que comprometen áreas anatómicas con líquidos estériles.

##### **Hipótesis nula**

La espectrometría de masas no es una herramienta efectiva en la identificación microbiológica rápida y/o complemento en las pruebas diagnósticas de líquidos estériles.

### **3.3 Objetivos**

#### **3.3.1 Objetivo principal**

Evaluar la capacidad y rapidez de la espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) para el diagnóstico microbiológico en pacientes con infecciones que comprometen líquidos corporales estériles.

#### **3.3.2 Objetivos secundarios**

1. Identificar pacientes con infecciones de probable etiología bacteriana y compromiso de regiones anatómicas con líquidos estériles.
2. Realizar análisis microbiológico de líquidos estériles empleando recursos de microbiología clásica y frascos de hemocultivo para incubar líquidos estériles.
3. Documentar y comparar los tiempos de resultados de los métodos de cultivo, adaptados para diagnóstico microbiológico por MALDI-TOF MS.

### **3.4 MATERIAL Y METODOS**

#### **3.4.1 Tipo y diseño de estudio**

Estudio longitudinal, prospectivo, unicéntrico.

#### **3.4.2 Población de estudio**

El estudio fue realizado con pacientes del departamento de Urgencias y Salas de hospitalización del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, hospital de enseñanza de tercer nivel y 500 camas censables, durante el periodo de junio del 2017 a enero del 2018.

La población estimada a incluir con infección que comprometiera regiones anatómicas con líquidos estériles fue de 40 individuos (10 por cada líquido corporal comprometido).



El tamaño de la muestra se eligió por conveniencia, ya que en la literatura no se encuentra ningún otro estudio que demuestre la hipótesis propuesta.

#### **3.4.3 Criterios de Inclusión**

- Pacientes mayores de 18 años, hospitalizados en Urgencias o Salas del Hospital Universitario “Dr. José E. González”, con sospecha de infección, a criterio diagnóstico inicial de médicos tratantes y servicio de infectología, y que tengan compromiso de regiones anatómicas con los siguientes líquidos estériles y probables diagnósticos:
  - Líquido cefalorraquídeo: meningitis comunitaria y postquirúrgica.
  - Líquido pleural: Derrame pleural en estudio, paraneumónico, empiema.
  - Líquido sinovial: Artritis séptica.
  - Líquido peritoneal: Peritonitis bacteriana espontánea, peritonitis asociada a catéter de diálisis peritoneal.

#### **3.4.4 Criterios de Exclusión**

- Pacientes menores de 18 años.
- Pacientes con contraindicación para procedimiento de punción en región anatómica con presencia del líquido a estudiar.
- Pacientes que se nieguen a contribuir al estudio.

#### **3.4.5 Criterios de eliminación:**

- Pacientes sin ingreso o registro en el Hospital Universitario.
- Pacientes participantes en protocolo de investigación experimental y que pueda afectar en los resultados.
- Pacientes en los que no se logró obtener una muestra del líquido estéril deseado
- Pacientes que en cualquier momento deseen dejar de participar en el estudio.

### **3.4.6 Datos clínicos**

La evaluación clínica de los pacientes incluyó lo siguiente:

- Evaluación de datos clínicos relevantes: edad, género, factores de riesgo, comorbilidades, signos vitales, diagnóstico de ingreso, tratamiento previo (antibióticos).
- Evaluación de indicación de procedimiento para obtener líquido de región anatómica afectada.

### **3.4.7 Datos de laboratorio**

Se documentarán los siguientes datos de laboratorio, y se analizarán los resultados relevantes:

- Resultados del Laboratorio Central de patología clínica del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” (Leucocitos, PCR, Creatinina, Citoquímico de líquidos corporales).
- Resultados de laboratorio del servicio de gastroenterología:
  - Resultados de estudios directos: Tinciones y MALDI-TOF MS.
  - Resultados de frascos de cultivo (BACTEC BD®): Tinciones y MALDI-TOF MS.
  - Resultados de cultivos y pruebas de microbiología clásica.
  - Tiempo identificación y reporte (toma de muestra a reporte final).

### **3.4.8 Obtención y manejo de muestras y resultados**

El procedimiento de obtención de muestra se realizó lo más pronto posible al sospechar el diagnóstico por el residente de la especialidad a cargo del paciente, con la previa evaluación de por el servicio de Infectología, para atención integral del mismo e inclusión al protocolo. Se realizó obtención de muestras por los residentes de Medicina Interna o subespecialidad de guardia, siguiendo el envío a estudios convencionales de laboratorio indicados para su evaluación adecuada.

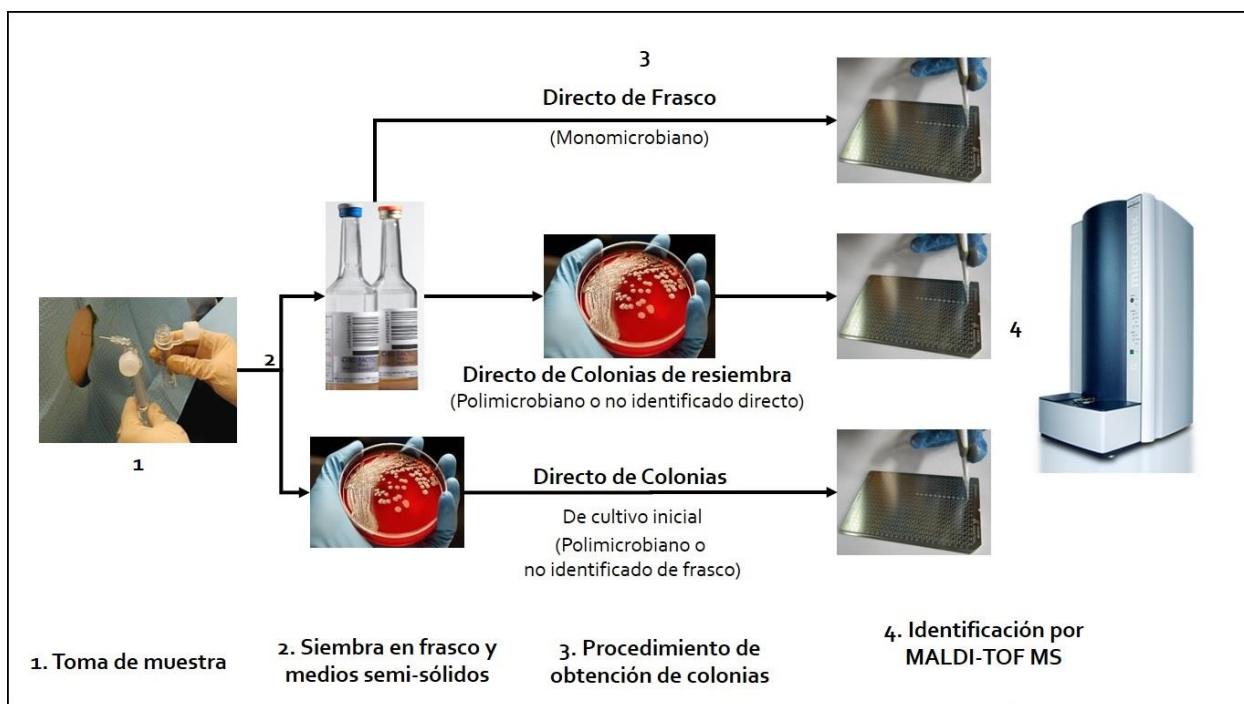
Se solicitó que compartieran muestra de líquido obtenido (3 a 10ml), sin comprometer o limitar los estudios que necesitaba el paciente.

El residente encargado de realizar el procedimiento fue el responsable de dirigir y compartir el consentimiento informado oficial del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, incluyendo la orientación verbal al paciente y/o familiares de las posibles complicaciones del procedimiento, sin reprimir el enfoque y énfasis en las indicaciones y beneficios de este.

Las muestras de líquido cefalorraquídeo se obtuvieron directamente por punción lumbar o por ventriculostomía; líquido sinovial por artrocentesis; líquido pleural por toracocentesis; líquido peritoneal por paracentesis o catéter de diálisis peritoneal.

Las muestras incluidas al protocolo fueron debidamente identificadas (etiqueta estándar con datos del paciente), y transportadas con los estándares de seguridad e higiene al Laboratorio del Servicio de Gastroenterología.

El procesamiento inicial de la muestra fue realizar tinción de Gram, agregar a incubación en frasco de hemocultivo aerobio en Bactec BD®, y simultáneamente en medios de cultivo convencionales (placas de agar Sangre, Chocolate, Azida, y EMB). Con alerta de crecimiento de microorganismos o término de periodo de incubación del equipo BACTEC BD®, se realizó frotis y tinción de Gram del extracto del frasco positivo, y subsecuente estudio directo en MALDI-TOF MS. Si los resultados de procesamiento directo son inconclusos, o hay evidencia de que sea polimicrobiano, se realizó resiembra del extracto de frasco (en placas de agar Sangre, Chocolate, Azida, y EMB) para posterior identificación por MALDI-TOF MS de las colonias desarrolladas (Figura 3).



**Figura 3. Resumen de procedimientos.** Proceso de toma de muestra, métodos de desarrollo de microorganismos, e identificación por MALDI-TOF MS.

Se registraron resultados de identificación, y se clasificaron de acuerdo con los rangos de confiabilidad del equipo de MALDI-TOF MS: Microflex LT ® (Bruker Daltonics) y software MALDI Biotyper ® RTC (versión 3.1). Rangos de confiabilidad descritos en la Tabla 3.

**Tabla 3.**  
**Rangos de confiabilidad de MALDI-TOF MS\***

| Rango       | Descripción   | Símbolo | Color    |
|-------------|---|---------|----------|
| 2.300-3.000 | Identificación de especie altamente probable          | (+++)   | Verde    |
| 2.000-2.299 | Identificación segura de género, probable de especie. | (++)    | Verde    |
| 1.700-1.999 | Identificación probable de género                     | (+)     | Amarillo |
| 0.000-1.699 | Identificación no confiable                           | (-)     | Rojo     |

\*Equipo Microflex LT ®, MALDI Biotyper ® versión 3.1 (Bruker Daltonics).

Los resultados de los estudios se registraron en el documento fuente del protocolo y en la base de datos electrónica (ejemplo de resultado en Figura 4). Además, se identificaron y guardaron adecuadamente las laminillas de las tinciones directas (porta laminillas identificadas). En caso de sobrante de

muestras, se congelaron en el departamento de Gastroenterología a -20°C, para posibles solicitudes emergentes de estudios especiales. Además, serán almacenadas indefinidamente en el laboratorio de Gastroenterología para futuras referencias y evidencia del estudio. Podrán ser desechadas a criterio del investigador al término del protocolo, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, “Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo”.

| Analyte Name:               |   | B23  |                 |
|-----------------------------|---|--|-----------------|
| Analyte description:        |   |  |                 |
| Analyte ID:                 |   | <i>Staphylococcus aureus</i> isolate No. 5 |                 |
| Analyte creation Date/Time: |   | 2016-03T12:43:41.395                       |                 |
| Applied MSP Library(ies):   |   |  |                 |
| Applied taxonomy tree:      |   | Bruker taxonomy                            |                 |
| Rank (Quality)              | Matched pattern   | Score value                                | NCBI Identifier |
| 1<br>(++)                   | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862 THL+ <i>Bacithus flexus</i> DSM 1320T DSM | 2.24                                       | 1280            |
| 2<br>(++)                   | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 THL+ <i>Bacithus flexus</i> DSM 1320T DSM | 2.224                                      | 1280            |
| 3<br>(+)                    | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 THL                                       | 1.911                                      | 1280            |
| 4<br>(+)                    | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862 THL                                       | 1.879                                      | 1280            |
| 5<br>(+)                    | <i>Staphylococcus aureus</i> ssp., <i>aureus</i> DSM 3463 DSM                     | 1.776                                      | 46170           |
| 6<br>(+)                    | <i>Staphylococcus aureus</i> ssp., <i>aureus</i> DSM 4910 DSM                     | 1.72                                       | 46170           |
| 7<br>(-)                    | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 THL                                       | 1.69                                       | 1280            |

**Figura 4. Ejemplo de resultado en equipo MALDI-TOF MS.**

Los resultados del MALDI-TOF MS tendrán respaldo de almacenamiento en el sistema del dispositivo. Los resultados de rutina de laboratorio quedaron respaldados en su respectiva bitácora de laboratorio, así como en la base de datos electrónica del presente estudio.

Se analizarán y discutirán los beneficios, ventajas, y desventajas del MALDI-TOF MS, que se observen en el transcurso del protocolo, así como para experiencia que contribuya a para mejorar su aplicación y desarrollar futuros proyectos de investigación.

### **3.4.9 Análisis estadístico**

Se analizaron los resultados para obtener estadística descriptiva e inferencial, con medidas de tendencia central, e intervalos de confianza del 95%. Para las variables de datos continuas se realizó T de Student, y con las variables dicotómicas o tablas de contingencia se utilizó test de Fisher (valores menores de 5), o  $\chi^2$  (valores mayores de 5). Los valores de  $P < 0.05$  son considerados estadísticamente significativos.

Todos los procedimientos estadísticos se realizaron con orientación de los asesores, tutores, y Departamento de Estadística de la Incubadora INVEST de la Facultad de Medicina de la UANL, y en software de bases de datos y análisis estadísticos (Microsoft Office Excel ® 2016, y GraphPad QuickCalcs ® 2018).

## CAPITULO 4

### RESULTADOS

Durante el periodo de junio 2017 a enero de 2018, se evaluaron 37 pacientes hospitalizados con sospecha de infección que comprometieran regiones anatómicas con líquidos estériles y fueran relevantes para obtener diagnóstico microbiológico. Se recibieron 37 muestras, de las cuales se analizaron 36, eliminando 1 por no contar con registro o expediente en el Hospital Universitario.

La edad media fue de 42.1 años (18-85), 55.6% hombres (20/36) y 44.4% mujeres (16/36). 69.4% (25/36) de los pacientes presentaron comorbilidades y factores de riesgo: Infección por VIH 16.6%, Diabetes Mellitus 8.33%, enfermedad renal crónica 8.33%, inmunoscenecencia 8.33%, cirrosis hepática 8.33%, neoplasias 5.56%, embarazo 2.78%, y enfermedad autoinmune 2.78%. Cabe destacar, que al 86.1% (31/36) de los pacientes incluidos se les había indicado y administrado antibióticos al momento de la toma de muestra. (Tabla 4).

Se registraron los signos vitales de los pacientes incluidos, presentando un promedio de tensión arterial sistólica de 110.3 mmHg (máxima 138, mínima 80) y tensión arterial diastólica de 68.5 mmHg (máxima 80, mínima 50); frecuencia cardiaca promedio de 85.1 latidos/minuto (máxima 120, mínima 60); frecuencia respiratoria promedio de 17.9 respiraciones/minuto (máxima 30, mínima 12); temperatura promedio de 37.4°C (máxima de 40.3, mínima de 36).

**Tabla 4. Información general de pacientes incluidos (n=36).**

| Paciente No. | Edad | Sexo | Diagnóstico                          | Muestra    | Procedimiento    | Antibiótico Previos |
|--------------|------|------|--------------------------------------|------------|------------------|---------------------|
| 1            | 19   | F    | Neuroinfección comunitaria           | LCR        | Punción lumbar   | SI                  |
| 2            | 37   | F    | IACDP                                | Peritoneal | Paracentesis     | SI                  |
| 3            | 41   | F    | Derrame pleural                      | Pleural    | Toracocentesis   | SI                  |
| 4            | 21   | M    | Derrame pleural                      | Pleural    | Toracocentesis   | SI                  |
| 5            | 62   | F    | Derrame pleural                      | Pleural    | Toracocentesis   | SI                  |
| 6            | 21   | F    | IACDP                                | Peritoneal | Paracentesis     | SI                  |
| 7            | 61   | F    | Neuroinfección comunitaria           | LCR        | Punción lumbar   | SI                  |
| 8            | 69   | M    | Derrame pleural<br>paraneumónico     | Pleural    | Toracocentesis   | SI                  |
| 9            | 34   | M    | Artritis séptica                     | Sinovial   | Artrocentesis    | NO                  |
| 10           | 29   | F    | Neuroinfección comunitaria           | LCR        | Punción Lumbar   | SI                  |
| 11           | 43   | M    | Neuroinfección comunitaria           | LCR        | Punción Lumbar   | SI                  |
| 12           | 85   | F    | Artritis séptica                     | Sinovial   | Artrocentesis    | NO                  |
| 13           | 85   | M    | Empiema                              | Pleural    | Toracocentesis   | SI                  |
| 14           | 54   | F    | Neuroinfección comunitaria           | LCR        | Ventriculostomía | SI                  |
| 15           | 18   | F    | Neuroinfección comunitaria           | LCR        | Punción lumbar   | SI                  |
| 16           | 57   | M    | Empiema                              | Pleural    | Toracocentesis   | SI                  |
| 17           | 32   | M    | Neuroinfección comunitaria           | LCR        | Punción lumbar   | NO                  |
| 18           | 51   | F    | Derrame pleural<br>paraneumónico     | Pleural    | Toracocentesis   | SI                  |
| 19           | 23   | M    | Neuroinfección postquirúrgica        | LCR        | Punción lumbar   | SI                  |
| 20           | 56   | M    | Neuroinfección postquirúrgica        | LCR        | Punción lumbar   | SI                  |
| 21           | 34   | M    | Derrame pleural<br>paraneumónico     | Pleural    | Toracocentesis   | SI                  |
| 22           | 27   | M    | Derrame pleural                      | Pleural    | Toracocentesis   | SI                  |
| 23           | 27   | M    | Neuroinfección comunitaria           | LCR        | Punción lumbar   | SI                  |
| 24           | 36   | M    | Artritis séptica                     | Sinovial   | Artrocentesis    | NO                  |
| 25           | 48   | M    | Derrame pleural                      | Pleural    | Toracocentesis   | SI                  |
| 26           | 63   | M    | Peritonitis bacteriana<br>espontánea | Peritoneal | Paracentesis     | SI                  |
| 27           | 33   | M    | Neuroinfección postquirúrgica        | LCR        | Punción lumbar   | SI                  |
| 28           | 27   | F    | Derrame pleural                      | Pleural    | Toracocentesis   | SI                  |
| 29           | 28   | M    | Neuroinfección postquirúrgica        | LCR        | Ventriculostomía | SI                  |
| 30           | 19   | F    | Neuroinfección                       | LCR        | Punción lumbar   | NO                  |
| 31           | 57   | F    | Empiema                              | Pleural    | Toracocentesis   | SI                  |
| 32           | 40   | M    | Derrame pleural<br>paraneumónico     | Pleural    | Toracocentesis   | SI                  |
| 33           | 80   | F    | Derrame pleural<br>paraneumónico     | Pleural    | Toracocentesis   | SI                  |
| 34           | 19   | M    | Neuroinfección postquirúrgica        | LCR        | Punción lumbar   | SI                  |
| 35           | 54   | M    | Empiema                              | Pleural    | Toracocentesis   | SI                  |
| 36           | 28   | F    | Derrame pleural<br>paraneumónico     | Pleural    | Toracocentesis   | SI                  |

M: Masculino. F: Femenino. LCR: Líquido cefalorraquídeo. IACDP: Infección asociada a catéter de diálisis peritoneal.



Los estudios de laboratorio relevantes registrado para análisis, incluyeron los leucocitos totales de sangre periférica, PCR (proteína C reactiva) como marcador de inflamación, y creatinina. Los valores de leucocitos totales al tiempo de la toma de muestra variaron de 399/mm<sup>3</sup> a 32,000/mm<sup>3</sup>, con una media que corresponde a 11,747.6, con desviación estándar de 7,516, y mediana de 10,650. Los valores de PCR variaron de 0.5 a 45.1 mg/dL, con media de 14.1 mg/dL, mediana de 13.4, y desviación estándar de 13. Los valores de creatinina variaron de 0.4 a 5.8 mg/dL, con una media de 1.49, mediana 0.7, y desviación estándar de 1.55.

Las 36 muestras de líquidos estériles procesadas en el protocolo incluyeron: líquido pleural 16 (44.4%), líquido cefalorraquídeo 14 (38.9%), líquido sinovial 3 (8.3%), y líquido peritoneal 3 (8.3%). Los diagnósticos de ingreso fueron: derrame pleural 16.67%, derrame pleural paraneumónico 11.1%, empiema 16.67%, neuroinfección comunitaria 25%, neuroinfección postquirúrgica 13.89%, peritonitis bacteriana espontánea 2.77%, infección asociada a catéter de diálisis peritoneal 5.55%, y artritis séptica 8.33%. Información disponible en la Tabla 5.

**Tabla 5. Diagnóstico de ingreso por Líquido Estéril (n=36)**

| Pleural (44.4%) |                       |         | Cefalorraquídeo (38.9%)       |                            | Peritoneal (8.3%)                 |       | Sinovial (8.3%)  |
|-----------------|-----------------------|---------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|-------|------------------|
| Derrame pleural | Derrame paraneumónico | Empiema | Neuroinfección Postquirúrgica | Neuroinfección comunitaria | Peritonitis bacteriana espontanea | IACDP | Artritis séptica |
| 6               | 4                     | 6       | 5                             | 9                          | 1                                 | 2     | 3                |
| 16.67%          | 11.11%                | 16.67%  | 13.89%                        | 25%                        | 2.77%                             | 5.55% | 8.33%            |

IACDP: Infección asociada a catéter de diálisis peritoneal.

Los servicios que donaron muestras de sus pacientes fueron las siguientes: Cirugía 4 (11.1%), Medicina Interna 15 (41.7%), Urgencias 11 (30.6%), Obstetricia 1 (2.8%), y UCI 5 (13.9%).

Los valores de estudios citoquímicos se documentaron de 77.7% de las muestras, principalmente los de líquido pleural y cefalorraquídeo. En los resultados de citoquímicos de líquido pleural (Tabla 6), se documentó una media de glucosa de 56.1 mg/dL, proteínas 3,121.1 mg/dL, y LDH de 3,047.3 mg/dL. La

diferencia de valores entre los citoquímicos positivos y negativos se analizó con distribución de T de Student, obteniendo diferencia de medias de LDH de 6086.51 (IC 95%: 2252.2-9920.82;  $P=0.0054$ ); la diferencia de medias de glucosa 59.2 (IC 95%: 30.95-87.56;  $P=0.0009$ ); la diferencia de media de proteínas 610.9 (IC 95%: 1513-2735;  $P=0.536$ ).

**Tabla 6 Correlación estudio citoquímico de Líquidos pleurales (n=16)**

|                        | Media Total            | Media Positivos        | Media Negativos        | <i>P</i> * |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------|
| <b>Glucosa mg/dL</b>   | 56.17<br>(3-110)       | 21.6<br>(3-57)         | 80.85<br>(54-110)      | 0.0009     |
| <b>Proteínas mg/dL</b> | 3121.17<br>(1482-6336) | 2764.8<br>(1944-4400)  | 3061.74<br>(1482-6336) | 0.536      |
| <b>LDH mg/dL</b>       | 3047.33<br>(83-14181)  | 6597.8<br>(1887-14181) | 511.28<br>(83-1289)    | 0.0054     |

LDH: Lactato deshidrogenasa.

\*T de Student

En los resultados de líquidos ceforraquídeos (Tabla 7), se documentó una media de glucosa de 34.46 mg/dL, proteínas 197.09 mg/dL, y leucocitos 43.92/mm<sup>3</sup>. La diferencia de valores entre los citoquímicos positivos y negativos se analizó con T de Student, obteniendo diferencia de medias de glucosa 5.3 (IC 95%: 26.48-37.08;  $P=0.7205$ ); la diferencia de media de proteínas 17.08 (IC 95%: 326.5-360.68;  $P=0.9129$ ). Los citoquímicos de líquido sinovial y peritoneal no se les realizó análisis estadístico por la baja cantidad de muestras a relacionar.

**Tabla 7  
Correlación de estudio citoquímico de LCR (n=14)**

|                                  | Media Total        | Media Positivos    | Media Negativos    | <i>P</i> * |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------|
| <b>Glucosa mg/dL</b>             | 34.46<br>(3-75)    | 27.14<br>(3-75)    | 43.00<br>(4-75)    | 0.72       |
| <b>Proteínas mg/dL</b>           | 197.09<br>(22-703) | 227.00<br>(39-425) | 113.00<br>(22-703) | 0.91       |
| <b>Leucocitos/mm<sup>3</sup></b> | 43.92<br>(0-257)   | 67.57<br>(0-102)   | 59.16<br>(0-257)   | 0.54       |

\*T de Student

Del total de muestras analizadas en el laboratorio, 44.4% (16/36) se lograron identificar por MALDI-TOF MS. Por medio de 3 métodos se lograron identificar: cultivo convencional, estudio directo de extracto de frascos positivos, y cultivo de resiembra de extracto de frascos positivos; 18.75% (3/16), 31.25% (5/16), y 50% (8/16) de las muestras, respectivamente (Tabla 8).

**Tabla 8. Muestras identificadas por MALDI-TOF MS (n=16)**

| Cultivo convencional | Frasco de Hemocultivo |                      | Total |
|----------------------|-----------------------|----------------------|-------|
|                      | Directo del frasco    | Cultivo de resiembra |       |
| 3                    | 5                     | 8                    | 16    |
| 18.75%               | 31.25%                | 50%                  | 100%  |

El porcentaje de diagnóstico por líquido fue variado. En 50% (8/16) de los líquidos pleurales se logró identificar microorganismos; en LCR 35.7%, líquido peritoneal 66.6%, y sinovial 33.3% (Tabla 9).

**Tabla 9. Porcentaje de identificación de muestras por MALDI-TOF MS (n).**

| Pleural (16) |          | Cefalorraquídeo (14) |          | Peritoneal (3) |          | Sinovial (3) |          |
|--------------|----------|----------------------|----------|----------------|----------|--------------|----------|
| Positivo     | Negativo | Positivo             | Negativo | Positivo       | Negativo | Positivo     | Negativo |
| 8            | 8        | 5                    | 9        | 2              | 1        | 1            | 2        |
| 50.00%       | 50.00%   | 35.71%               | 64.29%   | 66.67%         | 33.33%   | 33.33%       | 66.67%   |

Las muestras en general desarrollaron crecimiento monomicrobiano y polimicrobiano, 75% (12/16) y 25% (4/16), respectivamente. Las muestras monomicrobianas fueron identificadas por MALDI-TOF MS por cultivo convencional (2/16; 12.5%), directo del extracto de frascos positivos (5/16; 31.2%), y de cultivos de resiembra (5/16; 31.2%). Las muestras polimicrobianas fueron identificadas de colonias desarrolladas en los cultivos convencionales 25% (1/4) y cultivo de resiembra 75% (3/4).

Por medio de MALDI-TOF MS, se identificaron 21 microorganismos de 16 pacientes, con una puntuación promedio de 2.124 (Tabla 10). El rango fue de

1.701 a 2.443. Los microorganismos identificados correspondieron 17 a bacterias y 4 a hongos (levaduras). Las bacterias identificadas fueron Gram positivos 58.9% (10/17), y Gram negativos 41.1% (7/17). Bacterias anaerobias identificadas correspondieron a 17.6% (3/17). La lista de microorganismos identificados por paciente y los rangos de confiabilidad se presentan en la Tabla 10.

Los tiempos de identificación en MALDI-TOF MS por método de cultivo y desarrollo de microorganismos, fueron documentados (Tabla 11). En el grupo de muestras identificadas de las colonias de cultivo convencional, el promedio de tiempo desde la toma de muestra a diagnóstico microbiológico fue de 1450 minutos (24 horas con 10 minutos). En el grupo de muestras identificadas directo del extracto de frascos de cultivo, el promedio de tiempo fue de 2691 minutos (44 horas con 51 minutos). En el grupo de muestras identificadas de las colonias de resiembra de frascos, el promedio de tiempo fue de 10303.13 minutos (171 horas con 43 minutos). La diferencia de medias entre el grupo de cultivos convencionales y el grupo general de frascos de cultivo (directo y resiembra) fue 5924.72 (IC 95%: 2736.94-14586.38;  $P=0.1645$ ). Ajustando a sólo a bacterias aerobias (omitiendo muestras de anaerobios y levaduras), entre los grupos de cultivo convencional y cultivo de resiembra, la diferencia de medias fue 3897.67 (95% IC 413-7381.71;  $P=0.036$ ). Entre cultivo convencional y directo de frascos, la diferencia de medias fue de 1240.33 (95% IC 1562.45-4043;  $P=0.3205$ ). Los tiempos de diagnóstico microbiológico por muestra y método de desarrollo se resumen en la Tabla 11.

**Tabla 10**  
**Identificación microbiológica por MALDI-TOF MS**

| <b>Paciente</b> | <b>Resultados MALDI-TOF MS</b>                                 |                    |
|-----------------|--|--------------------|
| <b>No.</b>      | <b>Microorganismos identificados</b>                           | <b>Puntuación*</b> |
| 5               | <i>Staphylococcus haemolyticus</i>                             | 2.048              |
| 6               | <i>Candida tropicalis</i>                                      | 2.221              |
| 7               | <i>Acinetobacter baumannii</i><br><i>Staphylococcus caprae</i> | 2.388<br>2.042     |
| 8               | <i>Streptococcus constellatus</i>                              | 2.305              |
| 11              | <i>Bacillus firmus</i>   | 1.751              |
| 13              | <i>Staphylococcus epidermidis</i>                              | 2.012              |
| 16              | <i>Enterococcus faecalis</i><br><i>Fusobacterium nucleatum</i> | 2.311<br>1.847     |
| 17              | <i>Cryptococcus neoformans</i>                                 | 2.134              |
| 22              | <i>Eggerthia cateniformis</i><br><i>Parvimonas micra</i>       | 1.701<br>2.443     |
| 24              | <i>Aeromonas hydrophila</i>                                    | 1.809              |
| 26              | <i>Escherichia coli</i>  | 2.370              |
| 27              | <i>Kocuria palustris</i><br><i>Pseudomonas aeruginosa</i>      | 2.138<br>2.231     |
| 28              | <i>Escherichia coli</i><br><i>Candida krusei</i>               | 2.337<br>2.144     |
| 29              | <i>Acinetobacter baumannii</i>                                 | 2.227              |
| 32              | <i>Cryptococcus neoformans</i>                                 | 1.937              |
| 35              | <i>Streptococcus pneumoniae</i>                                | 2.202              |

\*MALDI Biotyper 3.1. Puntuación confiable: >1.7.

**Tabla 11. Tiempo de Identificación de muestras por MALDI-TOF MS**

| <b>Identificación de cultivo convencional</b>                   | <b>Horas (días aprox.)</b>    | <b>Minutos totales</b> |
|---|-------------------------------|------------------------|
| <b>Polimicrobiano:</b>  |                               |                        |
| <i>Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Candida Krusei</i> | 23h 10 min (1 día)            | 1390                   |
| <b>Monomicrobiano:</b>  |                               |                        |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>                                 | 25h (1 día)                   | 1500                   |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>                                  | 24h 22 min (1 día)            | 1462                   |
| <b>PROMEDIO</b>   | <b>24h 10min (1 día)</b>      | <b>1450.67</b>         |
| <b>Identificación de frasco de hemocultivo</b>                  |                               |                        |
| <b>Monomicrobiano:</b>  |                               |                        |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i>                              | 50h 36min (2 días)            | 3036                   |
| <i>Streptococcus constellatus</i>                               | 24h 49min (1 día)             | 1489                   |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>                                     | 24h 26min (1 día)             | 1466                   |
| <i>Escherichia coli</i>   | 25h 50 min (1 día)            | 1550                   |
| <i>Kocuria palustris</i>  | 98h 34min (4 días)            | 5914                   |
| <b>PROMEDIO</b>   | <b>44h 51min (&lt;2 días)</b> | <b>2691</b>            |
| <b>Identificación de resiembra</b>                              |                               |                        |
| <b>Polimicrobiano:</b>  |                               |                        |
| <i>Eggerthia catenaformi, Parvimonas micra</i>                  | 340h 40min (14 días)          | 20440                  |
| <i>Acinetobacter baumannii, Staphylococcus caprae</i>           | 49h 56min (2 días)            | 2996                   |
| <i>Enterococcus faecali, Fusobacterium nucleaum</i>             | 254h 45 min (11 días)         | 15285                  |
| <b>Monomicrobiano:</b>  |                               |                        |
| <i>Bacillus firmus</i>  | 121h 20 min (5 días)          | 7280                   |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>                               | 96h 9 min (4 días)            | 5769                   |
| <i>Candida tropicalis</i>                                       | 51h 55min (2 días)            | 3115                   |
| <i>Cryptococcus neoformans</i>                                  | 126h (5 días)                 | 7560                   |
| <i>Cryptococcus neoformans</i>                                  | 333h (14 días)                | 19980                  |
| <b>PROMEDIO</b>   | <b>171h 43min (7 días)</b>    | <b>10303.13</b>        |

De los resultados a analizar, se incluyó el de valorar la capacidad diagnóstica entre medios de cultivo convencionales y resultados de frascos de cultivos (directo de frasco y cultivos de resiembra). Se tomaron en cuenta como prioridad los resultados de diagnóstico microbiológico que dieron primero la identificación (más rápido). En general, los cultivos convencionales identificaron 3 muestras positivas más rápido que los frascos. Los frascos dieron resultado positivo en 13 muestras. Por medio de test de Fisher, se obtuvo la diferencia para valorar la capacidad diagnóstica en tablas de contingencia encontrando diferencia significativa con  $P=0.0011$  (Tabla 12).

**Tabla 12**  
**Capacidad diagnóstica de MALDI-TOF MS**

| Procedimiento           | Positivo | Negativo | $P^*$  |
|-------------------------|----------|----------|--------|
| Cultivos convencionales | 3        | 13       | 0.0011 |
| Frasco de hemocultivo   | 13       | 3        |        |

\*Fisher

Durante el estudio se documentó la posibilidad de modificación en la terapéutica del paciente al momento de recibir el resultado de identificación microbiológica por MALDI-TOF MS. De los resultados positivos, 68.7% (11/16) tenían potencial para indicar modificaciones en el tratamiento (suspender o agregar antibióticos con orientación microbiológica). De los resultados por método de desarrollo de microorganismos podrían aportar modificaciones: 100% (3/3) de los cultivos convencionales, 80% (4/5) de los directos de frasco, y 50% (4/8) de los cultivos de resiembra. Esto con relación a que los tiempos de identificación fueron en promedio de 1450.67, 2691, y 10303.13 minutos, respectivamente. De los resultados negativos, sólo 5.2% (1/19) aportarían cambios. La diferencia entre aportación para modificaciones en el tratamiento se relacionó con test de Fisher en tablas de contingencia, con  $P=0.0001$  (Tabla 13).

**Tabla 13**  
**Potencial modificación al tratamiento con resultados por MALDI-TOF MS**

| Cambio en tratamiento | Positivos (n=16)     |                   |              | Negativos (n=20) | $P^*$  |
|-----------------------|----------------------|-------------------|--------------|------------------|--------|
|                       | Cultivo convencional | Directo de frasco | De resiembra |                  |        |
| SI                    | 3                    | 4                 | 4            | 1                | 0.0001 |
| NO                    | 0                    | 1                 | 4            | 19               |        |

\*Test de Fisher

## CAPITULO 5

### **DISCUSION Y CONCLUSION**

El presente protocolo de estudio ha sido un ejemplo de la aplicación y contribución en investigación de MALDI-TOF MS. En el análisis de la población, se observó ligero predominio de hombres a mujeres, y el 63.9% se encontraban con comorbilidades y factores de riesgo para infección. Entre esos factores de riesgo, se observaron principalmente infección por VIH y enfermedades crónicas. Además, la mayoría de los pacientes se encontraban con tratamiento antimicrobiano al momento de toma de muestra, lo cual pudo haber afectado en el desarrollo de microorganismos en las muestras negativas. Esto es ejemplo del escenario en la vida real, donde un gran porcentaje de los pacientes con infección ya han estado expuestos a antimicrobianos, y los resultados de los estudios microbiológicos pueden afectarse. Agregar la incubación en frascos de hemocultivo, logró rescatar resultados de más del 80% de las muestras positivas, y se les dio prioridad para su identificación directa y en resiembra. En este escenario que era aparentemente desfavorable para el desarrollo bacteriano, se lograron resultados prometedores. La pequeña desventaja de la resiembra es que incrementa ligeramente el tiempo de identificación, pero favorece la identificación de muestras polimicrobianas e incrementa la capacidad de diagnóstico de las monomicrobianas que no se lograron identificar directamente de los frascos. Además, las bacterias anaerobias identificadas fueron de crecimiento lento, lo cual podría modificarse agregando el uso a la par de frascos de cultivo aerobio y anaerobio, favoreciendo el análisis de resultados a comparar entre tipos de microorganismos.

En 83.3% de los pacientes destacaron diagnósticos que comprometieron líquido pleural y líquido cefalorraquídeo (Tabla 4), con resultados citoquímicos relevantes



en los pleurales (Tabla 6). Los pacientes que dieron resultado de identificación microbiológica correspondían a que presentaban glucosa baja y LDH alta. Los presentes hallazgos son estadísticamente significativos, y se considerarán como referencia para criterios de selección en futuros estudios de líquidos pleurales y en la práctica clínica. Los resultados citoquímicos de líquidos cefalorraquídeos no dieron diferencias significativas (Tabla 7). Una posible razón es que sea etiología distinta que no desarrolla en los medios utilizados en el estudio, y que incrementa proteínas y presencia de leucocitos. Ejemplo de esto, es el hallazgo en el seguimiento de dos pacientes con resultados de MALDI-TOF MS negativos, de los cuales se documentaron resultados positivos con otros métodos (*Coccidioides immitis* por ácidos nucleicos, y *Mycobacterium tuberculosis* por cultivo para micobacterias). En este tipo de líquidos corporales estériles, estudios de reacción en cadena de polimerasa (GeneXpert MTB®, Biofire FilmArray®) pueden ser más útiles en la identificación rápida de microorganismos sin necesidad de gran inóculo por ser basado en detección de ácidos nucleicos.

Alrededor de la mitad de las muestras recolectadas dieron identificación por MALDI-TOF MS (Tabla 8). Se identificaron 21 microorganismos, de los cuales el 81% fueron bacterias (Tabla 10), y cerca del 80% de estas dieron un rango alto de confiabilidad (MALDI Biotyper Puntuación >2.0). Es importante mencionar que 4 microorganismos identificados fueron levaduras, aun con medio de cultivo que no son los ideales para hongos. Dos correspondieron a *Cryptococcus neoformans*, relacionado a alta mortalidad y necesidad de indicación de combinación de antifúngicos sistémicos (anfotericina B más fluconazol) en pacientes con VIH. Además, se identificó *Candida krusei* en una paciente con fluconazol (al cual es resistente), y el reporte favoreció a potencial cambio de tratamiento por anidulafungina. En el futuro de MALDI-TOF MS, se estima que la emergencia de bases de datos y aplicaciones complementarias tendrán mayor impacto clínico, ya que será clave para la identificación de muestras polimicrobianas, tendrá resultados cuantitativos, e identificación de resistencias.

El análisis de los resultados de tiempo de identificación se encontró estadísticamente relevante la diferencia de tiempo entre cultivo convencional y cultivo de resiembra con ajuste a bacterias aerobias. Dichos datos están limitados porque el desarrollo de microorganismos fue heterogéneo, y lo ideal es comparar los tiempos entre el mismo tipo de bacterias (aerobios, anaerobios, fermentadoras, no fermentadoras, etc.), y levaduras (*Candida spp*, *Cryptococcus sp.*, etc.). En estudios futuros, se sugiere realizar dicho análisis de resultados, y con un mayor número de muestra.

Entre otras limitantes del estudio, está la cantidad de líquido obtenido de algunas muestras, sobre todo de líquidos cefalorraquídeos. La escasa cantidad en ocasiones era limitada para realizar todo el proceso y en algunas muestras se le dio prioridad para inocular en frascos de hemocultivo. Entre otros detalles que pudieron afectar el estudio, está el horario operacional del laboratorio, el cual se encuentra limitado (lunes a viernes, 8 horas diarias). Un horario más amplio y que incluya todos los días de la semana, podrían ayudar a mejorar los tiempos de identificación y reporte.

En conclusión, el presente estudio se hace evidente la trascendencia de MALDI-TOF MS en la práctica diaria y en laboratorio de microbiología, demostrado en su capacidad diagnóstica al rescatar los resultados de muestras de líquidos estériles, que por métodos convencionales hubiera sido deficiente. Además, se deja base para su aplicación a futuro en estudios de líquido pleural y cefalorraquídeo, enfocados en reducir de tiempo de inicio o modificación de los antimicrobianos a un esquema dirigido y eficaz. En consecuencia, podrá observarse y documentarse impacto clínico con mejor pronóstico, reducción de morbimortalidad, optimización de antibióticos, y reducción de costos de atención en salud.

## CAPITULO 6

### BIBLIOGRAFÍA

1. Belkum AV, et al. Rapid Clinical Bacteriology and Its Future Impact. *Ann Lab Med* 2013;33:14-27
2. Clark AE, et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013;26:547-603
3. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Chapter 16: Laboratory Diagnosis of Bacterial Diseases. In: *Medical Microbiology*, 2016. 8th ed. Elsevier Inc. p153-161.
4. Murray PR. Chapter 16, The Clinician and the Microbiology Laboratory. In: *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 2015. 8th ed. Elsevier Saunders. p191-223
5. Hall GS, Woods GL. Chapter 58, Medical Bacteriology. In: *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 2017. 23rd Ed. Elsevier Inc. p1114-1152
6. Jin WY, Jang SJ, Lee MJ, Park G, Kim MJ, Kook JK, et al. Evaluation of VITEK2, MicroScan, and Phoenix for identification of clinical isolates and reference strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:442-7.
7. Steingart KR, Henry M, Laal S, Hopewell PC, Ramsay A, Menzies D, et al. Commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *PLoS Med* 2007;4:e202.
8. Wattiau P, Boland C, Bertrand S. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:7877-85.
9. Petti CA, Polage CR, Schreckenberger P. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43:6123–6125.

10. Petti CA. Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. *Clin Infect Dis*. 2007;44(8):1108-1114.
11. Stone NRH, Gorton RL, Barker K, Ramnarain P, Kibbler CC. Evaluation of PNA-FISH Yeast Traffic Light for rapid identification of yeast directly from positive blood cultures and assessment of clinical impact. *J. Clin. Microbiol*. 2013;51:1301–1302.
12. Gaydos CA, Van Der Pol B, Jett-Goheen M, et al. Performance of the Cepheid CT/NG Xpert Rapid PCR Test for the detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol*. 2013;51:1666–1672.
13. Zhang W, Li F, Nie L. Integrating multiple ‘omics’ analysis for microbial biology: application and methodologies. *Microbiology* 2010;156:287-301.
14. Emonet S, Shah HN, Cherkaoui A, Schrenzel J. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Infect*. 2010;16:1604–1613.
15. Kerremans JJ, Verbrugh HA, Vos MC. Frequency of microbiologically correct antibiotic therapy increased by infectious disease consultations and microbiological results. *J Clin Microbiol* 2012;50:2066-8.
16. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK and Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol*. 2015;6:791
17. Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem* 1975;47:219–25.
18. Patel R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Clinical Chemistry* 2015;61(1):100–111
19. Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process*. 1987;78:53–68.
20. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 Daltons. *Anal Chem* 1988;60:2299–301.

21. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, Matsuo T. Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1988;2:151–153.
22. Tanaka K. The origin of macromolecule ionization by laser irradiation [Lecture]. In: Frängsmyr T, ed. *The Nobel Prizes 2002*. Stockholm, Sweden: Nobel Foundation;2003.
23. Chace DH, Millington DS, Terada N, Kahler SG, Roe CR, Hofman LF. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* 1993;39:66–71.
24. Diamandis EP. Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool. *Mol. Cell. Proteomics* 2004;3:367–378.
25. Ackermann BL, Hale JE, Duffin KL. The role of mass spectrometry in biomarker discovery and measurement. *Curr. Drug Metab.* 2006;7:525–539.
26. Sun L, Teramoto K, Sato H, et al. Characterization of ribosomal proteins as biomarkers for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectral identification of *Lactobacillus plantarum*. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006;20:3789–98.
27. Bizzini A, Durussel C, Bille J, et al. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2010;48:1549–54.
28. van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 2010;48:900–7.
29. Emonet S, Shah HN, Cherkaoui A, et al. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:1604–13.
30. Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2001;20:157–71.

31. Saffert RT, Cunningham SA, Ihde SM, Jobe KE, Mandrekar J, Patel R. Comparison of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometer to BD Phoenix automated microbiology system for identification of gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 2011;49:887–92.
32. Alatoon AA, Cunningham SA, Ihde SM, Mandrekar J, Patel R. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011;49:2868–73.
33. Lau SK, Tang BS, Teng JL, et al. Matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry for identification of clinically significant bacteria that are difficult to identify in clinical laboratories. *J Clin Pathol* 2014;67:361–6.
34. Schulthess B, Bloemberg GV, Zbinden R, Bottger EC, Hombach M. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2014;52:1089–97.
35. Lasch P, Wahab T, Weil S, Pályi B, Tomaso H, Zange S, Kiland Granerud B, Drevinek M, Kokotovic B, Wittwer M, Pflüger V, Di Caro A, Stämmeler M, Grunow R, Jacob D. Identification of highly pathogenic microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: results of an interlaboratory ring trial. *J Clin Microbiol* 2015;53:2632–2640.
36. Schmitt BH, Cunningham SA, Dailey AL, Gustafson DR, Patel R. Identification of anaerobic bacteria by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with on-plate formic acid preparation. *J Clin Microbiol* 2013;51:782–6.
37. Barreau M, Pagnier I, La Scola B. Improving the identification of anaerobes in the clinical microbiology laboratory through MALDI-TOF mass spectrometry. *Anaerobe* 2013;22:123–5.
38. Ceysens P-J, Soetaert K, Timke M, Van den Bossche A, Sparbier K, De Cremer K, Kostrzewa M, Hendrickx M, Mathys V. Matrix-assisted laser

- desorption ionization–time of flight mass spectrometry for combined species identification and drug sensitivity testing in mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2017;55:624 –634
39. Balada-Llasat JM, Kamboj K, Pancholi P. Identification of mycobacteria from solid and liquid media by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2013;51:2875–9.
  40. Theel ES, Schmitt BH, Hall L, Cunningham SA, Walchak RC, Patel R, Wengenack NL. Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012;50:3093–5.
  41. Dhiman N, Hall L, Wohlfiel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL. Performance and cost analysis of matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *J Clin Microbiol* 2011;49:1614 – 6.
  42. Mancini N, De Carolis E, Infurnari L, Vella A, Clementi N, Vaccaro L, et al. Comparative evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry systems for identification of yeasts of medical importance. *J Clin Microbiol* 2013;51:2453–7.
  43. Cassagne C, Normand AC, L'Ollivier C, Ranque S, Piarroux R. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. *Mycoses*. 2016;59(11):678-90.
  44. Lau AF, Drake SK, Calhoun LB, Henderson CM, Zelazny AM. Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013;51:828 –34.
  45. Schulthess B, Ledermann R, Mouttet F, Zbinden A, Bloemberg GV, Bottger EC, Hombach M. Use of the Bruker MALDI Biotyper for the identification of molds in the clinical mycology laboratory. *J Clin Microbiol* 2014;52: 2797– 803.

46. de Respinis S, Tonolla M, Pranghofer S, Petrini L, Petrini O, Bosshard PP. Identification of dermatophytes by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Med Mycology* 2013;51:514–21.
47. Rodriguez-Sanchez B, Sanchez-Carrillo C, Ruiz A, Marin M, Cercenado E, Rodriguez-Creixems M, Bouza E. Direct identification of pathogens from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microb Infect* 2014;20:421–7.
48. Chen JH, Ho PL, Kwan GS, She KK, Siu GK, Cheng VC, et al. Direct bacterial identification in positive blood cultures by use of two commercial matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems. *J Clin Microbiol* 2013;51:1733-9.
49. Machen A, Drake T, Wang YF. Same day identification and full panel antimicrobial susceptibility testing of bacteria from positive blood culture bottles made possible by a combined lysis-filtration method with MALDITOF VITEK mass spectrometry and the VITEK2 system. *PloS One* 2014;9:e87870.
50. Martiny D, Debaugnies F, Gateff D, Gerard M, Aoun M, Martin D, et al. Impact of rapid microbial identification directly from positive blood cultures using matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry on patient management. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:E568 – 81.
51. Clerc O, Prod'hom G, Vogne C, Bizzini A, Calandra T, Greub G. Impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with Gram-negative bacteremia: a prospective observational study. *Clin Infect Dis* 2013;56:1101–7.
52. De Almeida Junior JN, Sztajn bok J, da Silva Junior AR, et al. Rapid identification of moulds and arthroconidial yeasts from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry. *Medical Mycology* 2016;0:1–5.
53. Barberino MG, Silva MO, Arraes ACP, et al. Direct identification from positive blood broth culture by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Braz J Infect Dis* 2017;21(3):339–342.
54. Gonzalez MD, Weber CJ, Burnham CA. Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by testing early growth on solid media using



- matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;85(2):133-5.
55. Altun O, Almuhayawi M, Ullberg M, Ozenci V. Rapid identification of microorganisms from sterile body fluids by use of FilmArray. *J Clin Microbiol* 2015;53:710 –712.
  56. Cetin ES, Kaya S, Demirci M, Aridogan BC. Comparison of the BACTEC Blood Culture System Versus Conventional Methods for Culture of Normally Sterile Body Fluids. *Adv Ther*. 2007;24(6):1271-7.
  57. Akcam FZ, Yayli G, Uskun E, Kaya O, Demir C. Evaluation of the Bactec microbial detection system for culturing miscellaneous sterile body fluids. *Res Microbiol*. 2006;157(5):433-6.
  58. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Gonazalez-Avila M, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption/ionizationtime of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010;48:2110–5.
  59. Segawa S, Sawai S, Murata S, Nishimura M, Beppu M, Sogawa K, et al. Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis. *Clin Chim Acta* 2014;435:59 – 61.
  60. Nyvang Hartmeyer G, Kvistholm Jensen A, Bocher S, Damkjaer Bartels M, Pedersen M, Engell Clausen M, et al. Mass spectrometry: pneumococcal meningitis verified and *Brucella* species identified in less than half an hour. *Scand J Infect Dis* 2010;42:716-8.
  61. Hrabak J, Chudackova E, Walkova R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:103–14.
  62. Ghebremedhin B, Halstenbach A, Smiljanic M, Kaase M, Ahmad-Nejad P. MALDI-TOF MS based carbapenemase detection from culture isolates and from positive blood culture vials. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016;15:5

63. Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, Gordon DB. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J. Med. Microbiol.* 2000;49:295–300.
64. Du Z, Yang R, Guo Z, Song Y, Wang J. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2002;74:5487-5491.
65. Shah HN, Rajakaruna L, Ball G, Misra R, Al-Shahib A, Fang M, Gharbia SE. Tracing the transition of methicillin resistance in sub-populations of *Staphylococcus aureus*, using SELDI-TOF mass spectrometry and artificial neural network analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* 2011;34:81– 86
66. Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Tilse MH, Urbanski T, Hamilton B, Venter D. Use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50:2918 – 2931.
67. Li B, Tongsheng Guo, Fen Qu, Boan Li, Haibin Wang, Zhiqiang Sun, Xiaohan Li, et al. ESBL bacteria-identified models based on MALDI-TOF-MS technique. *Med Sci Monit Basic Res* 2014;20:176-183
68. French K, Evans J, Tanner H, et al. The Clinical Impact of Rapid, Direct MALDI-ToF Identification of Bacteria from Positive Blood Cultures. *PLoS ONE* 2016;11(12):e0169332.
69. Mahé P, Arsac M, Chatellier S, Monnin V, Perrot N, Mailler S, et al. Automatic identification of mixed bacterial species fingerprints in a MALDI-TOF mass-spectrum. *Bioinformatics.* 2014 May 1;30(9):1280-6
70. Cassagne C, Normand AC, Bonzon L, L'Ollivier C, Gautier M, Jeddi F, et al. Routine identification and mixed species detection in 6,192 clinical yeast isolates. *Medical Mycology* 2016;54:256–265
71. Vestal ML. Evolution of Quantitative MALDI-TOF Mass Spectrometry for Clinical Applications. *Clinical Chemistry* 2016;62(1):20–23

72. Perez KK, Olsen RJ, Musick WL, Cernoch PL, David JR, Land GA, et al. Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. *Arch Pathol Lab Med* 2013;137:1247–54.

## CAPITULO 7

### RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Mi nombre es Isaí Medina Piñón, nací en la ciudad de Chihuahua, Chih., el 26 de diciembre de 1984. Soy hijo de QBP. Arturo Medina Martínez y Lic. Beatriz Piñón López. Realicé mis estudios de secundaria y preparatoria en el Tecnológico de Monterrey Campus Chihuahua. El título de Médico Cirujano y Partero lo obtuve en la Universidad Autónoma de Chihuahua, en la generación 2002-2009. La especialidad de Medicina Interna la realicé en el Hospital Christus Muguerza del Parque en la Ciudad de Chihuahua, avalada por la Universidad de Monterrey, generación 2012-2016. Durante este periodo fui nombrado jefe de residentes por 2 años consecutivos, tuve estancia en el extranjero en Enfermedades Infecciosas en el Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica de Chile, y recibí la Medalla “*Dr. Pedro Leal Solís*” como mención especial en la titulación. En 2016, recibí la Certificación por el Consejo Mexicano de Medicina Interna para el periodo 2016-2021. Actualmente me encuentro en proceso de terminación de la especialidad en Infectología por la Universidad Autónoma de Nuevo León en Monterrey, NL., generación 2016-2018. En el 2017, tuve oportunidad de estancia en el departamento de Enfermedades Infecciosas en trasplantados e inmunosuprimidos del *Walter C. Mackenzie* Health Sciences Center de la Universidad de Alberta, Canadá. Además, recibí el reconocimiento al Estudiante de Distinguido de Posgrado UANL 2017.