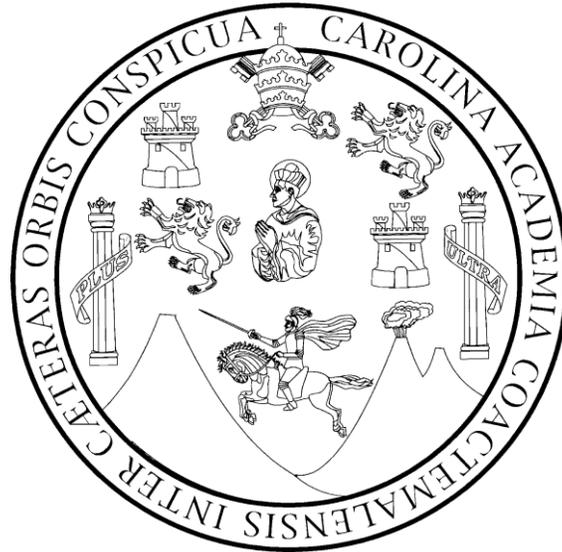


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS



**EFICIENCIA EN LA REDUCCIÓN DEL TIEMPO, UTILIZANDO EL  
MÉTODO MALDI-TOF VS EL MÉTODO VITEK EN LA  
IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA RUTINARIA DE  
HEMOCULTIVOS.**

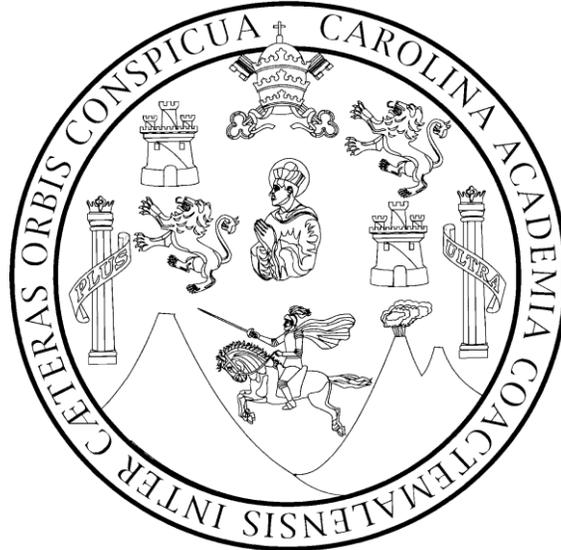
**Juan Carlos Barrera Toledo**

**TUTORES**

**PhD. Sergio Alejandro Melgar Valladares  
Dra. Edith Oregón Romero**

Guatemala, junio 2021.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS



**EFICIENCIA EN LA REDUCCIÓN DEL TIEMPO, UTILIZANDO EL MÉTODO MALDI-TOF VS EL MÉTODO VITEK EN LA IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA RUTINARIA DE HEMOCULTIVOS.**

**Juan Carlos Barrera Toledo**

**TUTORES**

**PhD. Sergio Alejandro Melgar Valladares  
Dra. Edith Oregón Romero**

**TESIS DOCTORAL**

**Presentada ante las autoridades de la  
Escuela de Estudios de Postgrado de la  
Facultad de Ciencias Médicas  
para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biomédicas**

Guatemala, junio 2021.



ESCUELA DE  
ESTUDIOS DE  
POSTGRADO

# Facultad de Ciencias Médicas

## Universidad de San Carlos de Guatemala

DCB-OIP-001-2021

### ORDEN DE IMPRESIÓN DE TESIS DOCTORAL

**Nombre del Doctorando:** Juan Carlos Barrera Toledo

**Registro Académico No.:** 200810265

**No. de CUI:** 1697092640101

**Título de la Tesis:** "EFICACIA EN LA REDUCCION DEL TIEMPO UTILIZANDO LA TECNICA MALDI-TOF VS EL METODO VITEK EN LA IDENTIFICACION MICROBIOLOGICA RUTINARIA DE HEMOCULTIVOS".

**Nombre de la Tutora:** Dra. Edith Oregón Romero

**Nombre del Tutor:** Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares

El Director de la Escuela de Estudios de Postgrados, considerando que ante mí se presentan los siguientes documentos: el Acta de Examen de Defensa de Tesis donde consta que el sustentante ha sido aprobado al defender su tesis antes titulada y el dictamen de la Coordinación Académica donde se indica que se ha cumplido con los requisitos necesarios para impresión de tesis como exige el programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

Por lo tanto, se **AUTORIZA LA IMPRESIÓN** del documento final, con las características que se establecen en los lineamientos para la presentación de la tesis del Doctorado en Ciencias Biomédicas.

Guatemala, 04 de junio de 2021

JUNIO 4, 2021

Dr. Rigoberto Velásquez Paz MSc.  
Director  
Escuela de Estudios de Postgrado

C.c. Archivo.  
RVP/lamo



## Facultad de Ciencias Médicas Universidad de San Carlos de Guatemala

### DICTAMEN DEL COORDINADOR ACADEMICO DEL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

REF DOC-CIB81-2020  
Guatemala, 19 de octubre 2020

La Coordinación del Doctorado en Ciencias Biomédicas hace constar, que se realizó la revisión del trabajo de tesis doctoral del estudiante **JUAN CARLOS BARRERA TOLEDO**, con carnet número **200810265**

Título de Tesis

***“EFICACIA EN LA REDUCCION DEL TIEMPO UTILIZANDO LA TECNICA MALDI-TOF VS EL METODO VITEK EN LA IDENTIFICACION MICROBIOLOGICA RUTINARIA DE HEMOCULTIVOS”.***

El cual ha cumplido con los requisitos solicitados por la Escuela de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ciencias Médicas, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Por todo lo anterior se **AUTORIZA LA IMPRESIÓN** del documento en mención, solicitándole cumpla con la estructura y formato para el Doctorado, entregando 3 copias del mismo a esta Coordinación.

  
Dra. Elisa del Carmen Hernández de Rodas  
Coordinadora  
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas  
Facultad de Ciencias Médicas,  
Universidad de San Carlos de Guatemala, USAC.  
doctoradocib@email.com

“DID Y ENSEÑANZA A TODOS”





# Facultad de Ciencias Médicas

## Universidad de San Carlos de Guatemala

ACTA No.1/2021

**EXAMEN DE DEFENSA DE TESIS DOCTORAL  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS**

En la Ciudad de Guatemala, a los 16 días, del mes de abril del año dos mil veintiuno, siendo las 11:30 horas, reunidos en el Aula Digital del Doctorado en Ciencias Biomédicas, los infrascritos miembros de la terna examinadora que practicaron el **EXAMEN GENERAL PRIVADO DE TESIS DOCTORAL**, al estudiante:

**JUAN CARLOS BARRERA TOLEDO**

Quien contestó satisfactoriamente todas las preguntas que le fueron formuladas sobre su tesis que se titula.

**EFICIENCIA EN LA REDUCCIÓN DEL TIEMPO, UTILIZANDO EL MÉTODO MALDI-TOF VS EL MÉTODO VITEK EN LA IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA RUTINARIA DE HEMOCULTIVOS**

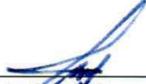
Los Tutores que dirigieron la tesis fueron: Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares de la Universidad de San Carlos de Guatemala y Dra. Edith Oregón Romero de la Universidad de Guadalajara, México.

Considerando las proposiciones presentadas en la misma, hemos **APROBADO** por **UNANIMIDAD** de votos con las notas de **AAA**.

Acto continuo la Dra. Elisa del Carmen Hernández López de Rodas, Coordinadora y en nombre de la **UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA** y de la **FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS y ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**, le informa al estudiante el resultado del examen, elabora la presente **ACTA** y envía la misma a la Dirección de la Escuela de Estudios de Postgrado para efectos correspondientes. En fe de lo cual firmamos la presente **ACTA** en el mismo lugar y fecha arriba indicados.

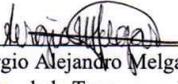
**“ID Y ENSEÑADA TODOS”**

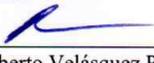
(f)   
Dra. Elisa del Carmen Hernández López de Rodas  
Coordinadora del Exámen

(f)   
Dr. Alberto García Gonzalez  
Miembro de la Terna examinadora

(f)   
Dr. José María Gramajo Garmendez  
Miembro de la Terna examinadora



(f)   
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares  
Miembro de la Terna examinadora

Vo.Bo. (f)   
Dr. Rigoberto Velásquez Paz  
Director de la Escuela de Estudios de Postgrado



## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, antes que nada, por brindarme la oportunidad de vivir, ser mi luz y fuente de sabiduría, amor, templanza y guía en este sueño.

A mi familia, amigos y compañeros de este Doctorado en Ciencias Biomédicas.

A la tricentenaria Universidad de San Carlos de Guatemala, mi alma mater y a la Universidad de Guadalajara, México por todo su apoyo.

Al Hospital General San Juan de Dios especialmente al personal del Área de Bacteriología y Tuberculosis y Hongos; que contribuyeron grandemente en la elaboración de la presente investigación.

## ÍNDICE

### I. ANTECEDENTES (MARCO TEÓRICO)

A. Enfermedades Infecciosas .....	1
B. Septicemias.....	1
1. Factores de riesgo.....	2
2. Cuadro clínico.....	2
3. Tratamiento.....	3
C. Importancia del Área de Bacteriología y Tuberculosis y Hongos del Laboratorio Clínico del Hospital General San Juan de Dios.....	4
D. Diagnóstico microbiológico de septicemias.....	5
1. Coloraciones o tinciones.....	5
a. Tinción de Gram.....	6
b. Tinción ácido alcohol resistente.....	6
c. Otras.....	6
2. Hemocultivos.....	6
3. Identificación presuntiva por morfología de colonias (cultivo).....	7
a. Medios no selectivos. ....	7
b. Medios selectivos.....	7
4. Método de identificación microbiológica por medio de pruebas bioquímicas.	
a. Hemólisis.....	8
1) Alfa Hemólisis.....	8
2) Beta Hemólisis.....	8
3) Gamma Hemólisis.....	8
b. Producción de pigmentos en medios de agar.....	8
c. Crecimiento en medio Líquido.....	9
5. Identificación semi y automatizada.....	9
6. Susceptibilidad antibiótica (Concentración Inhibitoria Mínima).....	9
E. Espectrometría de masas Maldi-tof .....	11
1. Principio.....	11
a. Fuente de ionización.....	11
b. Analizador de masas .....	11

c. Detector.....	11
2. Primeras aplicaciones de espectrometría de masas en microbiología.....	13
3. Espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología en la actualidad.....	13
4. Identificación de microorganismos a partir de colonias puras. ....	14
5. Identificación microbiológica a partir de hemocultivos.....	14
6. Identificación de microorganismos a partir de muestra directa.....	14
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>15</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>18</b>
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>VI. DISEÑO METODOLÓGICO: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
A. Sede del Estudio.....	20
B. Tipo y diseño de la investigación.....	20
C. Unidad de análisis.....	20
1. Unidad primaria de muestras.....	20
2. Unidad de análisis.....	20
3. Unidad de información.....	20
D. Población y muestra.....	20
1. Población o universo.....	20
2. Marco muestral.....	20
3. Muestra.....	20
4. Tamaño de muestra.....	21
5. Método y técnica de muestreo.....	21
E. Criterios de Selección.....	21
a. Inclusión.....	21
b. Exclusión.....	21
c. No exclusión.....	21
F. Variables.....	21
1. Dependientes.....	21
2. Independientes.....	21

G. Aspectos Bioéticos.....	21
1. Protección de personas y animales.....	21
2. Confidencialidad de datos.....	21
3. Derecho de privacidad.....	21
4. Financiamiento.....	21
H. Metodologías para el análisis de muestras de hemocultivos. ....	23
1. Marcas de Identificación microbiológica y baterías (Método No. 1) o estándar de oro.....	23
2. Método VITEK (Método utilizado actualmente).....	23
3. Espectrometría de masas o proteómica MALDI-TOF (Método No. 3).	
I. Microorganismos.....	24
1. Bacterias gram positivo.....	24
2. Bacterias gram negativo.....	24
3. Hongos miceliales y levaduriformes (otros).....	24
J. Diseño estadístico del estudio. ....	24
4. Parámetros.....	24
5. Tipo de datos.....	24
K. Procesamiento de datos.....	25
L. Periodo de estudio.....	26
M. Limitación del estudio. ....	26
N. Alcance.....	26
O. Consideraciones éticas.....	27
P. Recursos. ....	27
1. Recursos humanos.....	27
2. Recursos institucionales.....	27
3. Recursos físicos.....	28
a. Material de oficina.....	28
b. Equipos.....	28
c. Material de laboratorio (no equipo).....	29
d. Reactivos. ....	29

Q. Procedimientos.....	30
Fase pre-analítica.....	30
1. Recepción de muestras.....	30
2. Selección y procesamiento de muestras.....	30
Fase analítica.....	30
3. Inoculación de medios de cultivo. ....	30
4. Identificación microbiológica por método VITEK.....	30
5. Identificación microbiológica por método MALDI-TOF.....	31
a. Estandarización.....	31
b. Preparación de láminas para análisis a partir de cultivo.....	31
c. Preparación de láminas para análisis directo de la muestra. ....	31
d. Lectura en espectrofotómetro de masas.....	32
<b>I. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
<b>II. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
<b>III. CONCLUSIONES.....</b>	<b>53</b>
<b>IV. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>
<b>VI. ANEXOS.....</b>	<b>66</b>

## **LISTA DE SIMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS**

**AB:** Área de Bacteriología

**ATB:** Antibiograma

**ATCC:** American Type Culture Collection

**ATBH:** Área de Bacteriología y Tuberculosos y Hongos

**CDC:** Centro para el Control y Prevención de Enfermedades

**CIM:** Concentración Inhibitoria Mínima

**CIOMS:** Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas

**CBM:** Concentración Bactericida Máxima

**IL:** Interleucina

**EI:** Enfermedades Infecciosas

**HGSJDD:** Hospital General San Juan de Dios

**LPS:** Lipopolisacaridos

**Maldi-Tof:** Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight

**MT-MD:** Maldi-tof muestra directa

**MT-C:** Maldi-tof cultivo

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**POE:** Procedimiento Operativo Estándar

**PAMP's:** Patrones Moleculares Asociados a Patógenos

**SDS:** Dodecil Sulfato de Sodio

**SIRS:** Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica

**TNF:** Factor de Necrosis Tumoral

**VK:** Vitek

## LISTA DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS

### **Tabla 1**

*Frecuencia y porcentajes de bacterias Gram positivo identificadas como agente causal de septicemias en pacientes de los diferentes servicios del HGSJDD (n=156).*

### **Tabla 2**

*Frecuencia y porcentajes de bacterias Gram negativo identificadas como agente causal de septicemias en pacientes de los diferentes servicios del HGSJDD (n=79).*

### **Tabla 3.**

*Frecuencia y porcentajes de levaduras identificadas como agente causal de septicemias en pacientes de los diferentes servicios del HGSJDD (n=5).*

### **Grafica 1**

*Agentes causales de septicemias (n=240)*

### **Tabla 4**

*Reducción del tiempo en el diagnóstico microbiológico de hemocultivos positivos de bacterias Gram positivo (n=156).*

### **Tabla 5**

*Reducción del tiempo en el diagnóstico microbiológico de hemocultivos positivos de bacterias Gram negativo (n=79).*

### **Tabla 6**

*Reducción del tiempo en el diagnóstico microbiológico de hemocultivos positivos de levaduras (n=5).*

### **Grafica 2**

*Reducción de tiempo de respuesta diagnóstica (n=240)*

## RESUMEN

La presente investigación tuvo por objetivo realizar el primer estudio en Guatemala, que utilizó la técnica espectrométrica Maldi-tof (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight) para medir la eficacia en la reducción del tiempo en el diagnóstico microbiológico rutinario de hemocultivos, utilizando para ello 240 muestras de hemocultivos positivos, provenientes de pacientes que se encontraban en los diferentes servicios del Hospital General San Juan de Dios (HGSJDD).

El diagnóstico microbiológico, se realizó utilizando tres metodologías:

- Método 1: Identificación bioquímica automatizada por método Vitek. (método utilizado actualmente dentro del laboratorio clínico).
- Método 2: Identificación automatizada por espectrometría de masas y/o proteómica (Maldi-tof) a partir de cultivos puros (método por implementar con manuales e instrucciones de la casa comercial).
- Método 3: Identificación automatizada por espectrometría de masas y/o proteómica (Maldi-tof) a partir de muestras directas (nueva metodología estandarizada por el investigador).

Los resultados fueron evaluados con base al diseño estadístico “apareado o emparejado en grupo” de la siguiente manera: (Método 1 versus Método 2), (Método 2 versus Método 3).

La reducción de tiempo de respuesta obtenida utilizando la tecnología Maldi-tof fue de 108 horas para bacterias gram positivo, 84 horas para bacterias gram negativo y 240 horas en el caso de levaduras. Paralelamente se diseñó, desarrolló, estandarizó e implementó un método inexistente en Guatemala que permite realizar identificaciones microbiológicas a través de muestras directas, brindando resultados confiables, rápidos y certeros. La eficacia de esta metodología fue comprobada y justificada con un análisis de correlación Kappa, en el cual no se obtuvieron discordancias.

Con esta investigación se pretende brindar una nueva alternativa que permita reducir la morbimortalidad de los pacientes con septicemias, promover el ahorro de insumos hospitalarios, ahorro en antibióticos utilizados de forma innecesaria, reducir el tiempo de estancia de los pacientes en el nosocomio y contribuir a combatir la resistencia antibiótica que actualmente es un problema de salud de gran importancia.

## **I. ANTECEDENTES (MARCO TEÓRICO)**

### **A. Enfermedades Infecciosas**

Una enfermedad infecciosa (EI) es la manifestación clínica provocada por la invasión de un microorganismo como bacterias, hongos y virus entre otros, dentro de un organismo metabólica y estructuralmente superior. Las EI se transmiten directamente desde el individuo infectado a través de secreciones, piel, mucosas o indirectamente, a partir de la contaminación del aire, fómites o alimentos contaminados (Gordis, 2005).

### **B. Septicemia**

Se define como septicemia a la EI generalizada debido a la existencia de un foco infeccioso en el interior del cuerpo, en el cual se encuentran microorganismos en el torrente sanguíneo y como consecuencia, se presentan un sinnúmero de síntomas que provocan la muerte del paciente en el caso de un incorrecto o tardío abordaje antibiótico (Cattani, Posse, & Hermes, 2015).

El origen o puerta de entrada, puede ser: el sistema nervioso (la meningitis es una causa frecuente de septicemia), la piel (quemaduras o heridas mal curadas), las vías respiratorias (bronquitis o neumonía), el aparato digestivo o el vientre (apendicitis o peritonitis), las vías urinarias (cistitis o nefritis) y el corazón (endocarditis); así como posterior a procedimientos quirúrgicos o ser de origen nosocomial (Aebersold & Mann, 2003).

## **1. Factores de riesgo**

Los principales factores de riesgo son: edad, origen de la infección, inmunosupresión, alcoholismo o toxicomanía por vía intravenosa, cirrosis, tratamiento antibiótico previo (Resistencia antibiótica), diabetes no controlada y/o antecedentes quirúrgicos (Aebersold & Mann, 2003).

## **2. Cuadro clínico**

La sintomatología de evolución es muy variable, puede ser desde asintomática y curarse de manera espontánea posterior a una reacción inmunológica adecuada y/o hasta provocar síntomas a nivel sistémico. Los primeros síntomas son poco específicos (fiebre alta o, por el contrario, descenso de la temperatura (hipotermia), cansancio intenso, aumento de la frecuencia cardíaca (taquicardia) y respiratoria (taquipnea), escalofríos (sobre todo en caso de bacteriemia) o descenso de la presión arterial (hipotensión, que puede ser severa) (Mellmann, Cloud, Maier, Keckevoet, Ramminger, Iwen, 2008).

El organismo se ve alterado por los daños ocasionados posterior a la invasión microbiana pero también por la reacción inflamatoria masiva provocada por el sistema inmunitario la cual concluye en fallo multiorgánico (Mellmann et al., 2008). Al mismo tiempo, los capilares se contraen para compensar una circulación más lenta en los tejidos; la coagulación se activa provocando una coagulación intravascular diseminada que pueden llevar a la aparición de zonas moradas o azuladas e incluso necrosis, gangrena y amputación (Aebersold & Mann, 2003). De manera general, al empeorar el cuadro de la sepsis, aumenta la mortalidad. Se ha observado (un 30% de mortalidad en casos de sepsis

severa y más de un 50% de mortalidad en casos de shock séptico en los servicios de reanimación) (Aebersold & Mann, 2003).

### **3. Tratamiento**

Una vez establecido el diagnóstico de septicemia debe iniciarse de inmediato el tratamiento antibiótico. Dicha terapia debe ser generalizada, es decir administrar un grupo de antibióticos que brinden cobertura para todos los microorganismos que probablemente sean los agentes etiológicos de la infección, no debiendo esperarse el diagnóstico de laboratorio (hemocultivo). De igual forma si es factible, pueden solicitarse otras pruebas sanguíneas como Procalcitonina e Interleucina-6 entre otras (Mosko et al., 2016).

De igual manera debe reequilibrarse alteraciones hemodinámicas y respiratorias (oxigenación, aporte de líquidos por vía intravenosa, transfusiones, administración de medicamentos vaso depresores) (Bright, Clayton, & Soufian, 2000).

A nivel quirúrgico, es necesario evaluar y detectar la puerta de entrada del foco infeccioso, con el objetivo de decidir una posible intervención a nivel local (desbridamiento de un absceso, drenaje quirúrgico, ablación de un catéter) (Clark, Kaleta, Arora, & Wolk, 2013).

Actualmente, existen otros tratamientos, o están en curso de experimentación, sin embargo, la administración de antibióticos a corto plazo y las medidas de apoyo

hemodinámico y de reanimación, son las bases mejor establecidas para el tratamiento de una septicemia (Bright et al., 2000).

### **C. Importancia del Área de Bacteriología y Tuberculosis y Hongos del Laboratorio Clínico del Hospital General San Juan de Dios.**

El Hospital General San Juan de Dios (HGSJDD) es un centro asistencial de tercer nivel del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social en Guatemala, responsable de brindar atención médica integral, oportuna, eficiente y eficaz a toda la población.

El Área de Bacteriología y Tuberculosis y Hongos (ATBH) del laboratorio clínico, ubicado en el primer nivel del HGSJDD está enfocada en investigación, docencia y diagnóstico tanto de micobacterias como de hongos patógenos.

Las técnicas utilizadas en dichas áreas para el diagnóstico microbiológico son: tinción de gram, análisis bioquímicos para identificación bacteriana (manual y automatizado) y susceptibilidad antibiótica (difusión en disco, E-test y/o Concentración Inhibitoria Mínima). Sin embargo, estas técnicas presentan varias deficiencias, dentro de las que pueden mencionarse: alta probabilidad de contaminación y medición errónea de una concentración Mcfarland específica, lo cual nos brindaría resultados de susceptibilidad erróneos, y; un tiempo prolongado para obtener datos útiles de diagnóstico (02-10 días). El cultivo tanto en medio líquido como sólido, posee mejor sensibilidad, sin embargo, requiere entre 2-8 semanas de incubación para evidenciar el crecimiento de micobacterias (Marinach-Patrice, Lethuillier, Marly, Brossas, Gene & Symoens, 2009).

Durante el año 2016, ingresaron al área 1563 muestras de hemocultivos para diagnóstico microbiológico, de las cuales 965 fueron diagnosticadas como positivas, se obtuvieron datos de identificación aproximadamente entre el día cinco y seis y un espectro de resistencia dentro del día siete u ocho.

## **D. Diagnóstico microbiológico de septicemias**

### **1. Coloraciones o tinciones**

El análisis de las muestras debe iniciarse evaluando de forma ordinaria la morfología del agente causal o bien, si fuese el caso, evidenciar ausencia del mismo. Se realiza un extendido en una lámina portaobjetos para posteriormente aplicar la tinción elegida según sea el caso. Las muestras pueden prepararse de diferentes formas para hacer a los microorganismos más fácilmente visibles y mostrar sus características estructurales (Gherardi et al., 2012).

Las suspensiones en fresco permiten valorar algunos elementos, como motilidad bacteriana, recuento de leucocitos, detección de parásitos o protozoos o bien, visualización de estructuras fúngicas. Por otra parte, las tinciones microbiológicas permiten observar a los microorganismos en función de la capacidad de los mismos para retener, o no, determinados colorantes (Gherardi et al., 2012).

- a. **Tinción de Gram:** Es de gran importancia en microbiología, ya que permite hacer diferenciaciones taxonómicas, separando a los microorganismos en dos grandes grupos (gram-positivas, de color violeta azulado; y gram-negativas, de color granate o rojo-rosado), según se comporten ante esta tinción (Koneman, Allen & Janda, 2002).
- b. **Tinción ácido-alcohol resistente:** Se basa en que ciertos microorganismos no pierden la coloración por una mezcla de ácido y alcohol si han sido previamente teñidos con fucsina fenicada. Se dice que son microorganismos ácido-alcohol resistente (Koneman, Allen & Janda, 2002).
- c. **Otras:** hematoxilina férrica, tricromía, May Grunwald-Giemsa, Wright-Giemsa (Koneman, Allen & Janda, 2002).

## 2. Hemocultivos

El hemocultivo, o cultivo de sangre, es una prueba de laboratorio que se realiza para detectar la presencia de microorganismos en el torrente sanguíneo, fundamentalmente bacterias y hongos, por medio de una muestra de sangre, ya sea periférica o de catéter (Marinach-Patrice et al., 2009).

El análisis de hemocultivo se realiza ante la sospecha de una bacteriemia o fungemia. Las manifestaciones clínicas de estas infecciones pueden ser muy variadas y en ocasiones provocar otras patologías (Clark, Kaleta, Arora, & Wolk, 2013).

La muestra de sangre se coloca en medios de cultivo que permitan favorecer la proliferación de los microorganismos, para posteriormente identificar al agente causal y analizar su sensibilidad antibiótica. (Clark, Kaleta, Arora, & Wolk, 2013).

### **3. Identificación presuntiva por morfología de colonias (cultivos)**

Gracias al cultivo microbiológico se obtiene información adicional que es muy valiosa para aislar e identificar a los microorganismos. Los medios de cultivo, pueden clasificarse en:

- a. Medios no selectivos:** (agar sangre y agar chocolate): Permiten el crecimiento de todas las especies posibles de microorganismos (bacterias y levaduras) al poseer suplementos enriquecidos; dicho medio esta propenso a contaminación por microorganismos comensales a nivel ambiental (Lewis, Wei & Siuzdak, 2006).
  
- b. Medios selectivos:** Son útiles en el aislamiento de especies de importancia médica, se adicionan sustancias inhibidoras que permiten seleccionar microorganismos patógenos. Los medios más utilizados son: (agar MacConkey, agar CLED, agar XLD, agar VCAT o VCN). Los medios selectivos se utilizan para sembrar diferentes tipos de muestras, y la interpretación de los cultivos primarios se realiza a las 24-48 h de incubación. Durante el examen visual, se deben apreciar las principales características de las colonias: tamaño, forma, grado de elevación, borde, color, superficie, densidad, consistencia y olor (Lewis et al., 2006).

#### 4. Métodos de identificación microbiológica por medio de pruebas bioquímicas.

a. **Hemólisis:** Es una reacción que se observa por transiluminación producto de la capacidad que poseen las bacterias de hemolizar los glóbulos rojos presentes en el medio de cultivo es utilizada para identificación presuntiva, principalmente de estreptococos (Koneman, Allen & Janda, 2002).

1) **alfa-hemólisis:** Lisis parcial de los glóbulos rojos presentes en el medio de cultivo, originando una decoloración de color verde (ej.: *S. pneumoniae*, estreptococos del grupo viridans).

2) **beta-hemólisis:** Lisis total de los hematíes presentes en el medio de cultivo (ej.: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*).

a. **Producción de pigmentos en medio de agar:** Es la característica constitutiva de cada microorganismo al estar presentes en condiciones idóneas y medios de cultivos específicos (los cuales poseen diversos colorantes, indicadores de pH, nutrientes y otros componentes que permiten identificar presuntivamente ciertos géneros y/o especies) como por ejemplo: verde y en ocasiones con brillo metálico (*Pseudomonas aeruginosa*), rojo y/o rosado (*Serratia marcescens*), azul (*Kluyvera spp.*), púrpura (*Chromobacterium violaceum*) o marrón negruzco (*Prevotella melaninogenica*) (Koneman et al., 2002).

**b. Crecimiento en medios líquidos:** Los microorganismos de igual forma como en los medios sólidos pueden desarrollarse en medios líquidos, siempre y cuando posean los nutrientes necesarios que se los permitan. Algunos de estos medios son: caldo tioglicolato y caldo Brain-Heart-Infusion (BHI), este último utilizado principalmente para hemocultivos. (Koneman et al., 2002).

## **5. Identificación microbiológica automatizada**

Existen varios métodos de identificación semiautomatizada y automatizada que superan a los métodos convencionales por su fácil realización y el menor tiempo que requieren para alcanzar el objetivo. Además, muchos de estos permiten realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos al mismo tiempo. Dentro de los métodos de identificación automatizada comercializados se encuentran: Vitek2® (bio-Mérieux), MicroScan Walk-Away® (Dade), Phoenix® (Becton-Dickinson) y Wider® (Soria Melguizo). La principal característica de estos métodos es su fácil y cómoda realización, permitiendo conseguir la identificación de la especie, dado que en su base de datos incluyen a la gran mayoría de las bacterias clínicamente importantes (Lay & Holland, 2000).

## **6. Susceptibilidad antibiótica (Concentración Inhibitoria Mínima)**

La sensibilidad antibiótica es una de las más importantes funciones que realiza un laboratorio de microbiología clínica (Koneman et al., 2002). Dentro de los principales beneficios se encuentran:

- Permiten apoyar a dirigir la terapéutica una vez que el microorganismo es conocido.
- Desarrollar políticas de uso de antimicrobianos.
- Vigilar la aparición de nuevos mecanismos de resistencia.
- Detectar precozmente la diseminación epidémica de una cepa, tanto a nivel hospitalario como comunitario.

Lo más importante es saber interpretar los resultados y darles el significado que realmente tienen; principalmente evitar inconvenientes por los mecanismos de resistencia actuales (Ferraro, 2001).

Los métodos para realizar sensibilidad antibiótica pueden clasificarse así:

- a. Métodos cuantitativos:** son aquellos procedimientos que permiten determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y/o la concentración bactericida mínima (CBM).
- 1. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM):** Es la mínima concentración de antibiótico que, en un período de tiempo determinado, es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de un inóculo bacteriano previamente estandarizado. La determinación de la CIM puede realizarse por micro o macro dilución en caldo, dilución en agar o E-test.

**2. Concentración Bactericida Mínima (CBM):** Es la mínima concentración de un antibiótico que, en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte *in vitro* del 99.9% de una población bacteriana previamente estandarizada.

**b. Métodos cualitativos:** Son aquellos procedimientos que permiten clasificar directamente a un microorganismo como sensible o resistente. El método de Kirby Bauer o difusión en disco es el más utilizado en la práctica diaria, desde sus inicios. (Ferraro, 2001).

## **E. Espectrofotometría de Masas y/o proteómica (Maldi-tof)**

### **1. Principio**

La espectrometría de masas, es una técnica de análisis que permite determinar la distribución de las moléculas de una sustancia en función de su masa. Un espectrómetro de masas posee tres elementos principales: Una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector con el objetivo de producir, separar y detectar iones en fase gaseosa (Barnes, Fernández & Caba, 2013).

#### **a. Fuente de ionización:**

Al aplicar una fuente de ionización, se genera una molécula cargada por la pérdida o exceso de electrones. En el caso del Maldi-tof, la muestra es embebida en una matriz orgánica, la cual cristaliza en contacto con el aire. Esta mezcla se pone en contacto con la tarjeta de material conductor y es irradiada por un láser. La energía del láser causa

una desestructuración de la matriz generando una nube de partículas. Los iones de dicha nube son sometidos a un campo eléctrico, a través del cual serán detectados.

Los iones obtenidos son llevados hacia el analizador y posteriormente, al detector. La matriz orgánica juega un papel fundamental para los procesos electroquímicos ya que la misma absorbe energía del láser. Algunas de las matrices más utilizadas son el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-trans cinámico, el ácido 2,5-dihidrobenczoico, o el ácido sinapínico (Cherkaoui, Hibbs, Emonet, Tangomo & Girard, 2010).

#### **b. Analizador de masas**

Es el componente principal de un espectrómetro de masas. Su estructura delimita una zona de vuelo a través de la cual los iones son acelerados adquiriendo una elevada energía cinética, separándose según su proporción masa/carga ( $m/z$ ). El periodo de tiempo que tarda cada ion en llegar hasta el detector es denominado tiempo de vuelo y depende de dicha proporción (Jung et al., 2017).

#### **c. Detector**

A partir de la información recogida por el detector, se genera el espectro de masas, que separa los diferentes iones de la muestra a partir de su “tiempo de vuelo” (Sauer & Kliem, 2010). En el eje de las ordenadas, se representan los valores del cociente  $m/z$ , mientras que en el eje de las abscisas se representa la intensidad, es decir, el número de iones que un determinado cociente  $m/z$  ha impactado contra el detector (Aebersold & Mann, 2003).

## **2. Primeras aplicaciones de la espectrometría de masas a la microbiología**

Un estudio publicado en 1975 utilizó pirólisis para la identificación de microorganismos liofilizados. La desventaja del pirólisis se debe al pequeño tamaño y el rango de las masas obtenidos, lo cual brinda escasa información estructural (Holland, Wilkes, Rafii, Sutherland, Persons & Voorhees, 2006).

En 1996 se publicaron los primeros estudios en los que se analizaban células bacterianas intactas sin ninguna extracción previa, recubriéndola con una matriz orgánica (Claydon, Davey, Edwards-Jones, & Gordon, 2006).

A partir de estos estudios muchos otros utilizaron la Espectrometría de Masas (EM) para resolver problemas microbiológicos, almacenando en bases de datos las secuencias identificadas de cada especie (Keys, Dare, Sutton, Wells, Lunt, & McKenna, 2004). Poco a poco las bases de datos se fueron ampliando con espectros de los microorganismos más relevantes (Du, Yang, Guo & Song, 2002).

## **3. La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología en la actualidad**

Diversas plataformas han permitido a los laboratorios de microbiología clínica el acceso a la tecnología Maldi-tof, la cual desde sus inicios tenía por objetivo brindar grandes aportes a la investigación básica. Desde la comercialización de estas plataformas, el número de publicaciones en las que se describe el uso de la EM para la identificación de microorganismos ha aumentado de manera exponencial (Angeletti et al., 2015).

#### **4. Identificación de microorganismos a partir de colonias puras**

Los microorganismos a estudiar pueden ser colonias bacterianas, levaduriformes u hongos filamentosos, únicamente es necesario apegarse a los protocolos de trabajo establecidos para cada microorganismo (Zabbe, Zanardo, Mégraud & Bessède, 2015).

#### **5. Identificación microbiológica a partir de hemocultivo**

La identificación de microorganismos mediante Maldi-tof directamente de hemocultivos positivos, permite reducir el tiempo de obtención del resultado en comparación con los métodos convencionales, ofreciendo la posibilidad de mejorar el manejo de los pacientes con sepsis (Dauer & Kliem, 2010).

#### **6. Identificación de microorganismos a partir de muestra directa**

Dado que estas plataformas necesitan una concentración mínima de bacterias para lograr una identificación, resulta difícil la aplicación de la EM a la muestra directa sin pasar por el cultivo. Aun así, sí se han realizado identificaciones en estudios, cuando existe una considerable concentración de microorganismos en muestras como la orina (Legarraga, Moraga, Lam, Qeoffroy & Zumaran, 2013).

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades infecciosas son un problema de salud pública que, a pesar de los avances médicos en cuanto a su diagnóstico, sigue cobrando vidas en todo el mundo (OMS, 2014).

En conjunto con la alta prevalencia de dichas enfermedades, se encuentran los mecanismos de resistencia antibiótica que provocan que todas las terapias descritas hasta el momento no sean del todo efectivas.

Se define como septicemia a la infección grave y generalizada de todo el organismo, debido a la existencia de un foco infeccioso en el interior del cuerpo, en el cual se encuentran microorganismos en el torrente sanguíneo y de forma secundaria, se presentan un sinnúmero de síntomas que provocan en su mayoría la muerte del paciente (Cattani et al., 2015).

El diagnóstico microbiológico de septicemias se realiza por medio de análisis de hemocultivos, los cuales actualmente requieren como mínimo siete días para poder brindar un diagnóstico certero. Dicho lapso en la mayoría de ocasiones, es demasiado largo para poder tomar decisiones y salvaguardar la vida de los pacientes, razón por la cual es necesario mejorar los protocolos de diagnóstico actualmente utilizados (Mosko et al., 2016).

Los métodos de diagnóstico microbiológico se basan en el cultivo, seguido de la identificación fenotípica del microorganismo una vez aislado; y el tiempo necesario para su obtención, puede variar de cuatro a siete días en el caso de los hemocultivos. Dado que la

identificación microbiológica repercute directamente en el manejo del paciente y su pronóstico, son necesarias nuevas herramientas diagnósticas capaces de detectar e identificar cualquier microorganismo de manera rápida y confiable.

A lo largo de los últimos años, con el objetivo de reducir el tiempo necesario para la identificación de los microorganismos implicados en diferentes tipos de procesos infecciosos, se han desarrollado diferentes técnicas moleculares basadas en la amplificación genética. Por otro lado, la espectrometría de masas ha surgido como una alternativa rápida y eficaz a los métodos convencionales para la identificación de microorganismos.

Del mismo modo, siendo el Hospital General San Juan de Dios (HGSJDD) uno de los dos hospitales de referencia nacional, es necesario utilizar los recursos de forma óptima, brindando diagnósticos rápidos y certeros, permitiendo que exista un flujo activo de pacientes en el nosocomio.

El problema entonces, deriva de la alta morbimortalidad provocada por las septicemias, así como el largo tiempo empleado en el diagnóstico y los mecanismos de resistencia antibiótica que van cada día en aumento.

### III. JUSTIFICACIÓN

La Organización Mundial de la Salud -OMS- en 2014, informó que los pacientes hospitalizados poseen un 64% de mayor probabilidad de muerte por infecciones nosocomiales con respecto a los pacientes ambulatorios, esto debido a la administración de terapias antibióticas inadecuadas, agentes causales fastidiosos y a mecanismos de resistencia antibiótica.

Con base en lo antes mencionado y tomando en cuenta que en Guatemala el HGSJDD es un Centro Asistencial de tercer nivel, del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPASS); que tiene por objetivo brindar servicios de alta calidad a la población guatemalteca se realizó el primer estudio en Guatemala que utilizó la tecnología Maldi-tof para reducir el tiempo en el diagnóstico microbiológico de hemocultivos positivos en pacientes que asistieron a los diferentes servicios de este nosocomio, lo que justificó este estudio. El estudio se llevó a cabo en el área de Bacteriología (AB) y de Tuberculosis y Hongos (ATBH) del laboratorio clínico.

La utilización del método espectrométrico Maldi-tof está fundamentado en la identificación de patrones proteicos ribosomales únicos y específicos de ionización que se obtienen de cada microorganismo. Identificando dichos patrones en un corto tiempo (Barnes et al., 2013), permite reducir el tiempo de diagnóstico, de esta manera se pretende salvaguardar de mejor manera la vida de los pacientes, observar una reducción de costos en insumos hospitalarios y gastos en antibióticos utilizados de forma inadecuada, pero principalmente, reducir las tasas de morbilidad de pacientes con septicemias por fallo terapéutico o inadecuada administración de antibióticos.

#### **IV. HIPÓTESIS**

La tecnología Maldi – tof proporcionará un tiempo de respuesta diagnóstico menor que la tecnología Vitek.

## V. OBJETIVOS

### A. General:

Evaluar la eficiencia en la reducción del tiempo en la identificación microbiológica rutinaria de hemocultivos, utilizando el método espectrométrico Maldi-tof versus el método Vitek.

### B. Específicos:

1. Desarrollar, estandarizar e implementar un protocolo único que permita la identificación de microorganismos por el método espectrométrico Maldi-tof a partir de la muestra de hemocultivo.
2. Caracterizar microbiológicamente (identificar género, especie y subespecie) los cultivos puros provenientes de muestras de hemocultivos positivos utilizando los métodos Vitek y Maldi-tof.
3. Diagnosticar microbiológicamente utilizando espectrometría de masas y/o proteómica a partir de muestras directas, los hemocultivos positivos provenientes de los pacientes de los diferentes servicios del HGSJDD.
4. Cuantificar y comparar los tiempos del diagnóstico microbiológico de cada uno de los métodos (Vitek, Maldi-tof a partir de cultivo puro y Maldi-tof a partir de muestras directas).

## VI. DISEÑO METODOLÓGICO: MATERIALES Y MÉTODOS

- A. Sede del estudio:** Laboratorio clínico del Hospital General San Juan de Dios.
- B. Tipo y diseño de la investigación:** Descriptivo, transversal y de carácter prospectivo.
- C. Unidad de análisis:**
- 1. Unidad primaria de muestreo:** Pacientes que se encontraban en los diferentes servicios del HGSJDD con diagnóstico presuntivo de septicemia.
  - 2. Unidad de análisis:** Resultados obtenidos posterior a realizar el diagnóstico de septicemia.
  - 3. Unidad de información:** Microorganismos identificados como agentes causales de septicemias y tiempo de diagnóstico.
- D. Población y muestra:**
- 1. Población o universo:** Pacientes que se encontraban en los diferentes servicios del HGSJDD.
  - 2. Marco muestral:** Todos los servicios del HGSJDD que solicitaron análisis microbiológico en muestras de hemocultivos de pacientes con diagnóstico presuntivo de septicemia entre los meses de septiembre a noviembre del 2018.
  - 3. Muestra:** Hemocultivos o cultivo de sangre, es una prueba de laboratorio que se realiza para detectar la presencia de microorganismos, fundamentalmente bacterias y hongos, en sangre tanto periférica, umbilical o de catéter de pacientes de los diferentes servicios del HGSJDD a los que les solicitaron análisis microbiológico en el periodo establecido.

4. **Tamaño de la muestra:** 240 muestras de hemocultivos positivos, calculado en el programa GRANMO 7.12 en base a los datos internos del laboratorio clínico del HGSJDD (ver Anexo 1).
5. **Método y técnica de muestreo:** Probabilístico.

#### E. Criterios de selección

1. **Inclusión:** Muestras que cumplieron con fase pre-analítica (asepsia en toma de muestra, volumen adecuado, identificación, solicitud de laboratorio).
2. **Exclusión:** Muestras que no cumplieron con los criterios de la fase pre-analítica.
3. **No inclusión:** Muestras contaminadas, o que durante el proceso del análisis no brindaron un resultado válido.

#### F. Variables

1. **Dependientes:** Caracterización microbiológica, Tiempos de identificación microbiológica por cada método.
2. **Independientes:** Métodos Maldi-tof y Vitek.

#### G. Aspectos Bioéticos

1. **Protección de personas y animales:** El autor declara que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.
2. **Confidencialidad de los datos:** El autor declara que ha seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos (ver Anexo 5 y 7).
3. **Derecho a la privacidad y consentimiento informado:** El autor declara que en esta investigación no aparecen datos de pacientes.
4. **Financiamiento:** Autofinanciado. (CIOMS, 2016).

Con base a la pauta 10 de CIOMS denominada: “Modificaciones y dispensas del consentimiento informado”, la cual se establece lo siguiente:

Un comité de la investigación puede conceder una exención del requisito de consentimiento informado si está convencido de que la investigación:

- a. No sería factible o viable sin dicha exención.
- b. Tiene un valor social importante.
- c. Entraña apenas riesgos mínimos para los participantes.

“Deben respetarse estas tres condiciones para conceder la exención del consentimiento informado cuando los datos o muestras biológicas no pueden vincularse a la persona y la investigación tiene un valor social importante. En esta situación, el investigador no conoce a los participantes y en consecuencia, no puede comunicarse con ellos para obtener un consentimiento informado. Por otro lado, debido a que los datos o muestras no permitirían identificar a las personas, los riesgos para estas no son más que mínimos” (CIOMS, 2016).

Por lo tanto, se justifica el uso de datos en cuanto al tiempo de respuesta diagnóstica de las metodologías Vitek y Maldi-tof, así como el uso de las bacterias aisladas para comparar el desempeño de los tres métodos a estudio, recalcando que con base al objetivo de la investigación los datos obtenidos serán únicamente del tiempo y desempeño metodológico. De igual forma es importante mencionar que para dicha investigación fue realizada en orden y con todos los permisos respectivos por parte del comité de investigación del Hospital General San Juan de Dios (ver Anexo 5 y 7).

## H. Metodologías para el análisis de muestras de hemocultivos

- 1. Método Vitek (Método No. 1):** Metodología automatizada utilizada actualmente para la identificación microbiológica, está basada en patrones bioquímicos de fermentación de azúcares (ver POE-6).

El sistema Vitek es un sistema automatizado de identificación bacteriana y estudio de sensibilidad antimicrobiana. La identificación de las bacterias se basa en la inoculación de una suspensión de microorganismos en tarjetas con determinados paneles de reacciones bioquímicas.

- 2. Espectrometría de Masas Maldi-tof a partir de cultivos (Método No. 2):** Metodología nueva basada en patrones moleculares proteicos únicos y específicos de cada microorganismo (ver POE-7 y POE-8).

- 3. Espectrometría de Masas Maldi-tof a partir de muestras directas (Método No. 3):** Metodología nueva evaluada; basada en patrones moleculares proteicos únicos y específicos de cada microorganismo, a partir de muestras directas de los recipientes con hemocultivos positivos. (ver POE-8 y POE-9).

**I. Microorganismos:** Los microorganismos a identificar pertenecen a los siguientes grupos y se encuentran caracterizadas en el anexo 4.

1. Bacterias Gram positivo.
2. Bacterias Gram negativo.
3. Hongos miceliales, levaduriformes y/o micobacterias.

**J. Diseño estadístico del estudio:** Considerando los antecedentes para el diagnóstico e identificación microbiológica de hemocultivos, y que se esperaba por lo menos una reducción de al menos 24 horas de diferencia en el tiempo de respuesta diagnóstica para el nuevo método. El cálculo de muestra se estableció para un diseño apareado o emparejado de un grupo, en el cual, cada muestra fue procesada por ambos métodos, evaluándose por medio de una prueba de hipótesis unilateral.

El nivel de significancia establecido fue de 0.05 (alfa), con un poder de 95% y una desviación estándar de las diferencias de 55.44 horas. El tamaño de muestra mínimo requerido fue de 58 casos. El cálculo se realizó utilizando el programa GRANMO 7.12 (IMIM, Barcelona, España), cuya salida literalmente indica: “Aceptando un riesgo alfa de 0.05 y un riesgo beta de 0.05 en un contraste unilateral, se precisan **58** sujetos para detectar una diferencia igual o superior a las 24 unidades. Se asume una desviación estándar de 55.44” (Nave, 2018).

**1. Comparación entre métodos de hemocultivo Maldi-tof y Vitek.**

- a. Estadística descriptiva: Promedio y desviación estándar de cada método, promedio y desviación estándar de la diferencia de tiempos de respuesta entre métodos. Características complementarias también en forma descriptiva, incluyendo resultado final del hemocultivo (Nave, 2018).

- b. Por ser una comparación de dos métodos, se utilizó un diseño pareado con una respuesta continua (horas de cultivo), se realizó una prueba de hipótesis unilateral para la media de las diferencias de tiempo entre ambos métodos, por medio de la prueba de t de Student pareada. Esto determinó si la diferencia obtenida es significativa (mayor a 24 horas) (Nave, 2018).
- c. Complementariamente, los datos se operativizaron en función del resultado del cultivo, según tipo de microorganismo y evaluándose específicamente por grupos por medio de la misma prueba. Esto determinó si la diferencia se mantiene para cualquier tipo de microorganismo o no (Nave, 2018).
- d. Si los resultados de los microorganismos tenían variación entre los métodos y no era un caso fortuito, se realizó un análisis de concordancia entre ambos por medio del índice Kappa (Nave, 2018).

**2. Comparación Maldi-tof directo contra Maldi-tof hemocultivo.**

- a. Se realizó una comparación de promedios y desviación estándar además de una prueba de t de Student para diferencias pareadas (Nave, 2018).
- b. Se realizó un análisis de concordancia entre ambos métodos por medio del índice kappa (Nave, 2018).

**K. Procesamiento de datos:** Se calcularon los parámetros antes descritos (ver inciso G), utilizando Excel de Microsoft Office para la recolección y ordenamiento de datos y para el cálculo de indicadores, los paquetes estadísticos Open Epi y GRANMO 7.2.

**L. Periodo de estudio:** El tiempo necesario para obtener las 240 muestras fue de 3 meses.

**M. Limitaciones de la Investigación.**

1. Poca Información (nueva metodología utilizada para diagnóstico microbiológico).
2. Recursos Institucionales.
3. Número de muestras.
4. Tiempo de muestreo.
5. Modificaciones en proceso de estandarización.
6. Tiempo en validación e implementación de procesos.

**N. Alcances**

1. Contribuir a mejorar el diagnóstico microbiológico en el laboratorio del HGSJDD.
2. Reducción de gastos hospitalarios.
3. Reducción de gastos en terapia antibiótica.
4. Reducción de morbimortalidad por septicemias.
5. Contribuir a disminuir la probabilidad de colapso hospitalario reduciendo el tiempo de estancia de los pacientes.

**O. Consideraciones éticas.** Se obtuvieron los siguientes documentos:

1. Dictamen de aprobación del Comité de Ética e Investigación del Hospital General San Juan de Dios (ver Anexo 5).
2. Solicitud para realizar análisis microbiológico brindado por el personal médico.

**P. Recursos**

**1. Recursos humanos.**

a. Investigador:

MSc. Juan Carlos Barrera Toledo, QB.

b. Tutores:

PhD. Sergio Melgar (USAC).

PhD. Edith Oregón Romero (UDG).

c. Personal de Bacteriología y ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD.

**2. Recursos institucionales.**

- a. Instalaciones del Área de Bacteriología y Tuberculosis y Hongos (ATBH) del laboratorio clínico, del Hospital General San Juan de Dios (HGSJDD).

### **3. Recursos físicos.**

#### **a. Material de Oficina.**

- 1) Hojas de papel bond blancas.
- 2) Lapiceros.
- 3) Ganchos.
- 4) Computadora marca Compac Intel® Core i6. Doble núcleo y 12 GB de memoria RAM.
- 5) Impresora marca Canon Mp 240.

#### **b. Equipo.**

- 1) Bata de algodón.
- 2) Guantes de látex.
- 3) Mascarilla N95.
- 4) Recipientes para recolección de muestras.
- 5) Láminas portaobjetos.
- 6) Láminas cubreobjetos.
- 7) Microscopio óptico.
- 8) Recipiente para descarte de muestras.
- 9) Cabina de seguridad biológica nivel 3.
- 10) Cronómetro.
- 11) Espectrómetro de Masas (Maldi-tof).
- 12) Equipo Vitek.

**c. Materiales o instrumentos de laboratorio.**

- 1) Pinzas.
- 2) Piseta.
- 3) Bandeja porta láminas.
- 4) Agua desmineralizada estéril.
- 5) Aceite de inmersión.

**d. Reactivos.**

- 1) Tinción de Gram (Cristal violeta, Lugol, alcohol, acetona, Safranina).
- 2) Medios de cultivo (Agar Sangre, Agar Chocolate, MacConkey, Columbia).
- 3) Baterías (Medios TSI, LIA, MIO, Citrato, Urea).
- 4) Botellas para hemocultivos (Bact Alert).
- 5) Tarjetas para ID (Vitek).
- 6) Láminas para Vitek MS (Maldi-tof).
- 7) Matriz de extracción (acetonitrilo y alcohol ácido).
- 8) Asas calibradas de 1 $\mu$ L.
- 9) Vórtex.
- 10) Refrigerador.

## **Q. Procedimientos.**

### **Fase pre-analítica.**

#### **1. Recepción de muestras.**

La recepción de muestras se llevó a cabo por el personal técnico del área de Bacteriología y ATBH.

#### **2. Selección y procesamiento de muestras.**

A cada muestra que cumplió con los criterios de inclusión establecidos, se le realizó el frote para tinción de Gram, el cual fue procesado por el personal técnico de las áreas ya mencionadas, dichos frotos fueron analizados por el doctorando, para evaluar si existe contaminación y clasificar así al agente causal (Ver POE's-1-5).

### **Fase analítica.**

#### **3. Inoculación en medios de cultivo**

La inoculación de muestras en medios de cultivo (Agar Sangre, Agar chocolate y MacConkey) fue realizada por el personal técnico de AB y ATBH. La evaluación e interpretación de los cultivos fue realizada por el doctorando (Ver POE's- 1 - 5).

#### **4. Identificación microbiológica por método Vitek.**

Posterior a la identificación y clasificación por medio del cultivo, se procedió a realizar el estándar de Mcfarland e inocular tanto las baterías (método manual) como las tarjetas Vitek para realizar la posterior identificación de género y especie bacteriana (Ver POE -6).

## **5. Identificación microbiológica por medio del método de Espectrometría de Masas y/o proteómica (Maldi-tof).**

### **a. Estandarización (Ver POE-7).**

Se realizó el montaje de muestras de hemocultivo positivas y negativas (directas) para cualquier microorganismo; evaluando y utilizando los tiempos y concentraciones indicadas en el inserto.

### **b. Preparación de láminas para análisis a partir de cultivos (Ver POE-7).**

- Se colocó la cepa control (*Escherichia coli* ATCC 1884).
- Se prepararon las láminas de muestras clínicas, colocando de 1 a 2 colonias dentro del pozo a analizar.
- Se verificó el grosor del montaje de la lámina.
- Dejó secar por 2 minutos.
- Agregó 1  $\mu$ L de matriz (acetonitrilo al 10%).
- Dejó secar nuevamente por 3 minutos.
- Preparó la lámina para lectura en espectrofotómetro de masas.

### **c. Preparación de láminas para análisis a partir de muestras directas (Ver POE-8).**

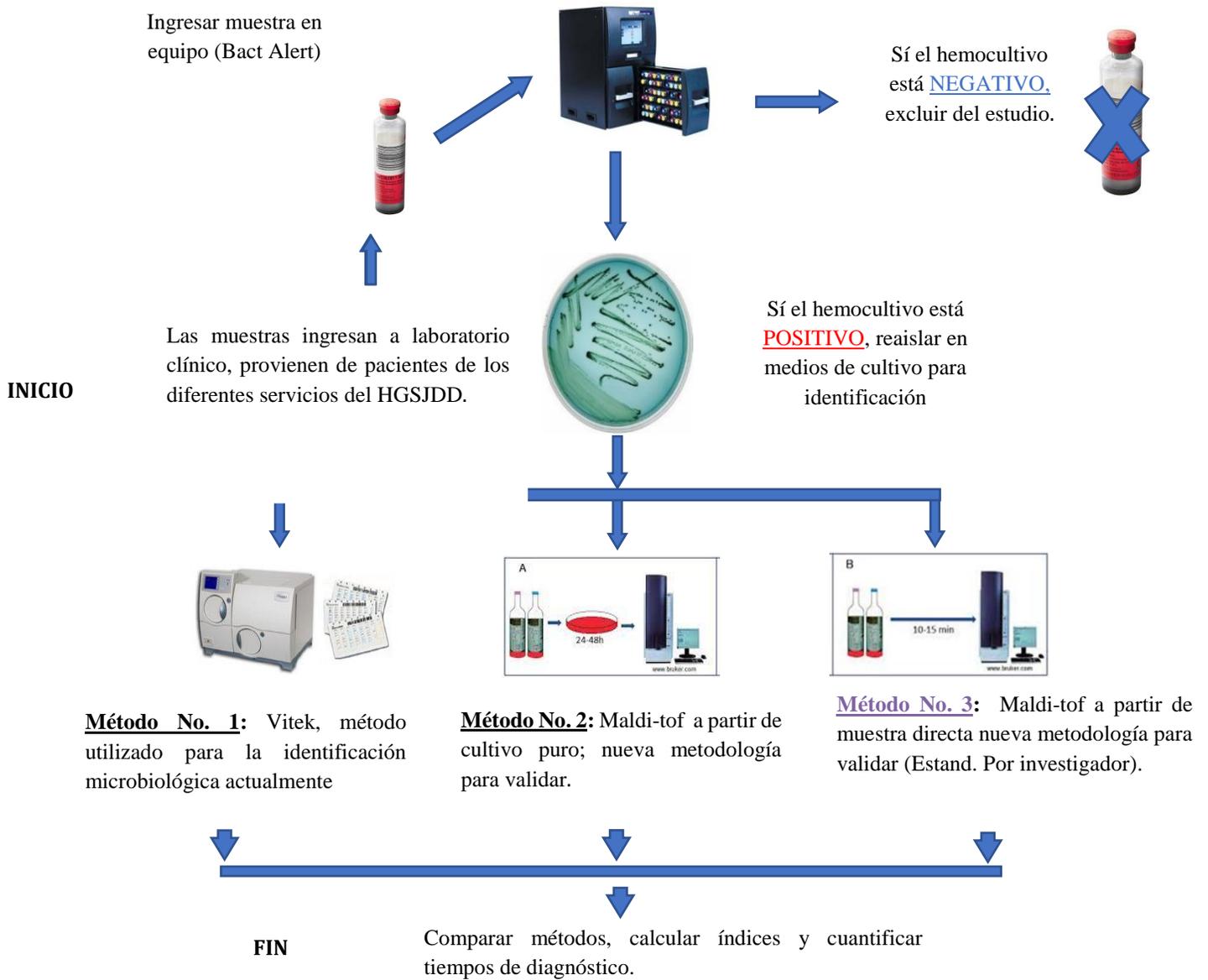
- Posterior a verificar la ausencia de contaminación por medio de la TG se procedió a:

- Colocar de 1 a 2 colonias de cepa control (*E. coli* ATCC 1884) en los posos asignados para calibración.
- Se prepararon las láminas de muestras clínicas, colocando de 50 a 75  $\mu$ L de muestra dentro del pozo a analizar.
- Dejó secar por 5 minutos
- Agregó 1  $\mu$ L de matriz (acetonitrilo al 10%).
- Dejó secar nuevamente por 3 minutos.
- Preparó la lámina para lectura en espectrofotómetro de masas.

**d. Lectura en espectrofotómetro de masas y/o proteómica (Maldi-tof)  
(Ver POE-7 y POE-8).**

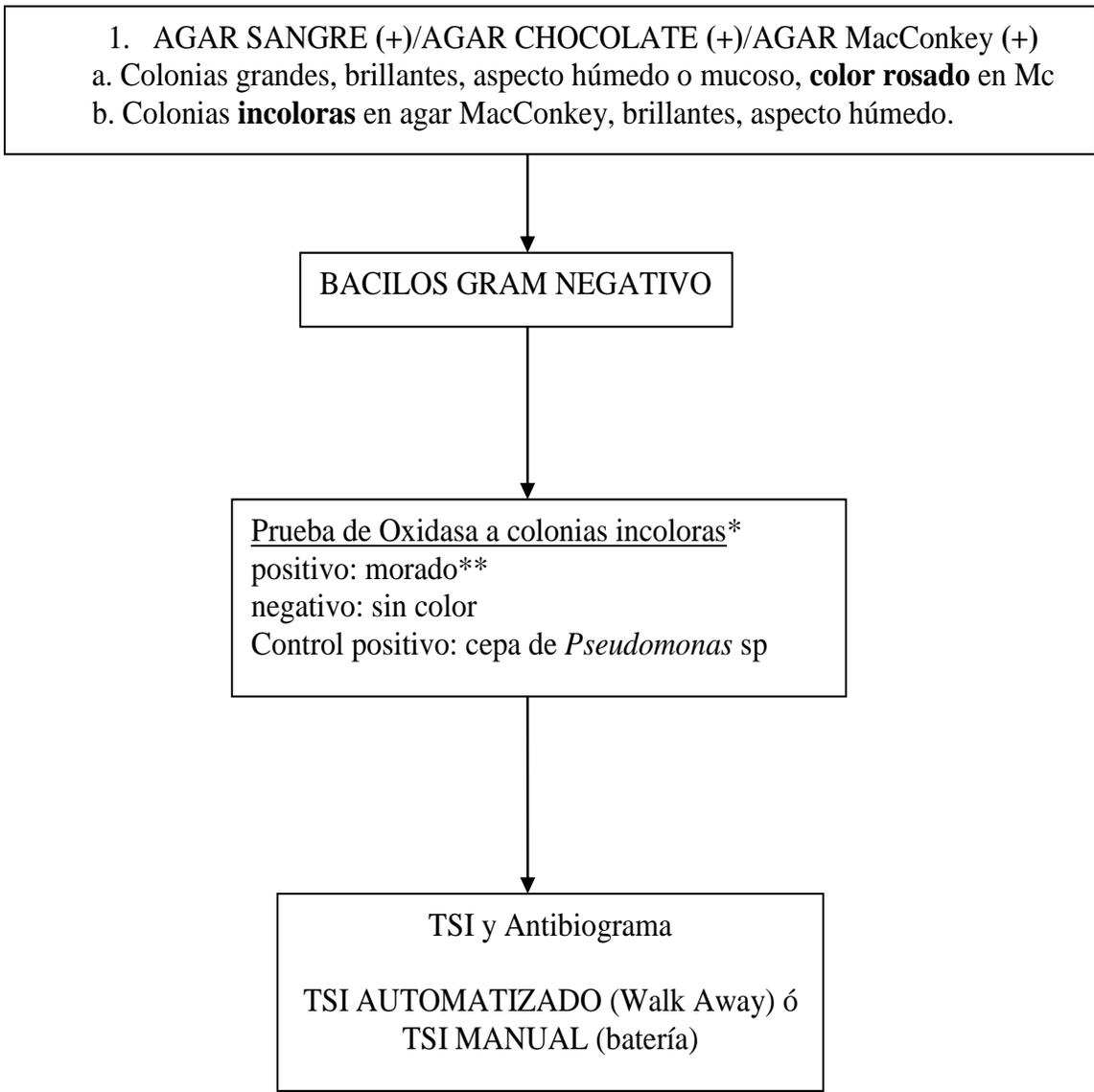
- Se registró la lámina en estación de adquisición.
- Se programaron las muestras en sistema Maldi - tof (Vitek-MS.)
- Se redujo la presión en equipo y abrir (opción programada en el sistema).
- Se introdujo la lámina a analizar.
- Se aumentó la presión y cerró el equipo (Opción programada en el sistema).
- Inició la lectura.
- Analizó pozos.
- Interpretó espectros (Evaluar longitudes de onda de cada molécula).
- Identificó microorganismos.
- Validó identificación (Observar que el porcentaje de concordancia sea superior al 95%).

 <p>HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS Guatemala, Centroamérica</p>	 <p>LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Hospital General San Juan de Dios Área de Bacteriología y Tuberculosis y Hongos</p>		
<p><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR NO. 1</b></p>		<p><b>FLUJOGRAMA DE TRABAJO PARA EL DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA DE HEMOCULTIVOS</b></p>	<p>Fecha: 07/06/2018</p>	<p>POE-1</p>



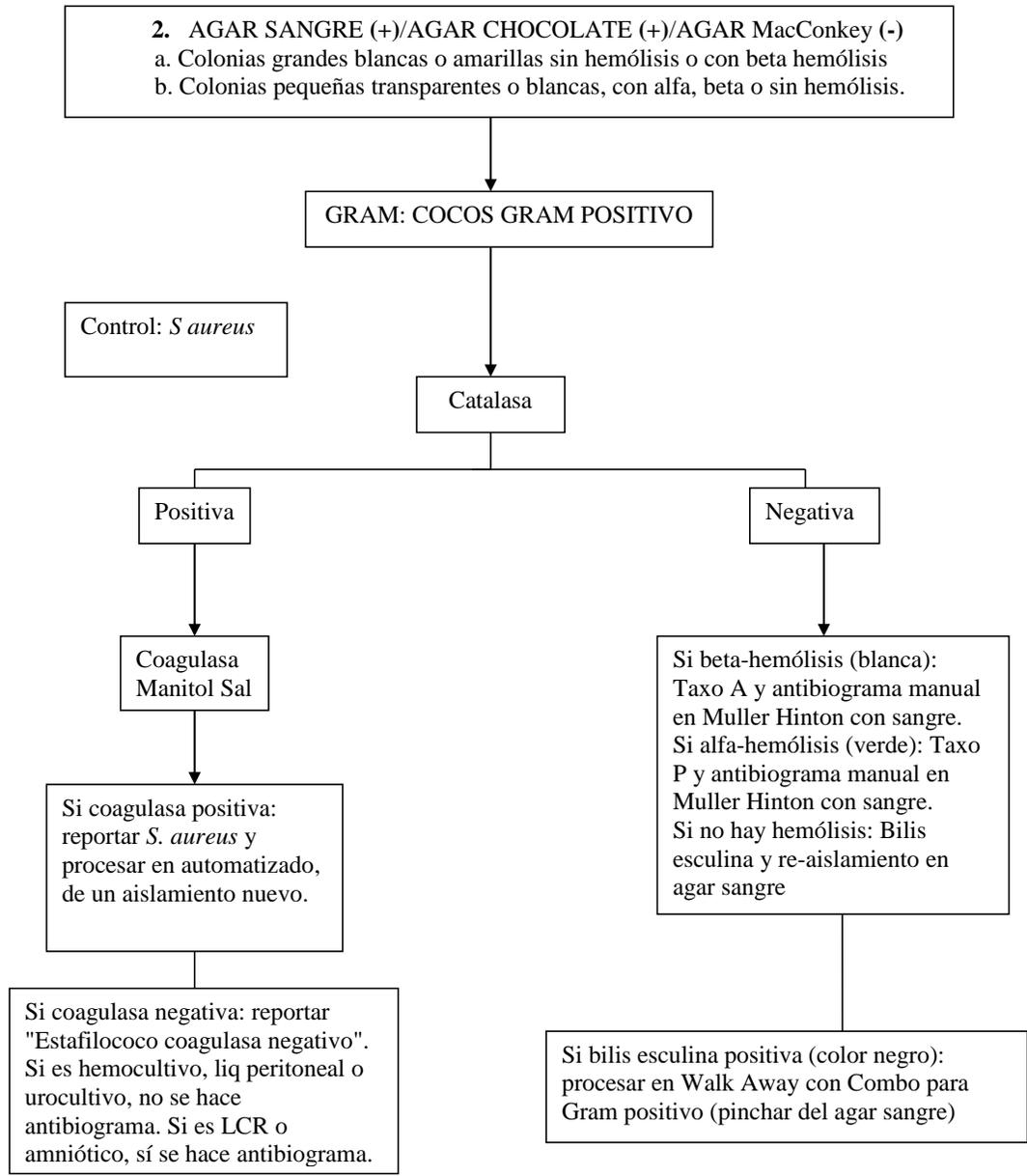
Elaborado por: MSc. Juan Carlos Barrera Toledo

 <p>HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS Guatemala, Centroamérica</p>	 <p>LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Hospital General San Juan de Dios Área de Bacteriología y Tuberculosis y Hongos</p>		
<p><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR NO. 2</b></p>		<p><b>PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA DE HEMOCULTIVOS DE BACTERIAS GRAM NEGATIVO</b></p>	<p>Fecha: 07/06/2018</p>	<p>POE-2</p>



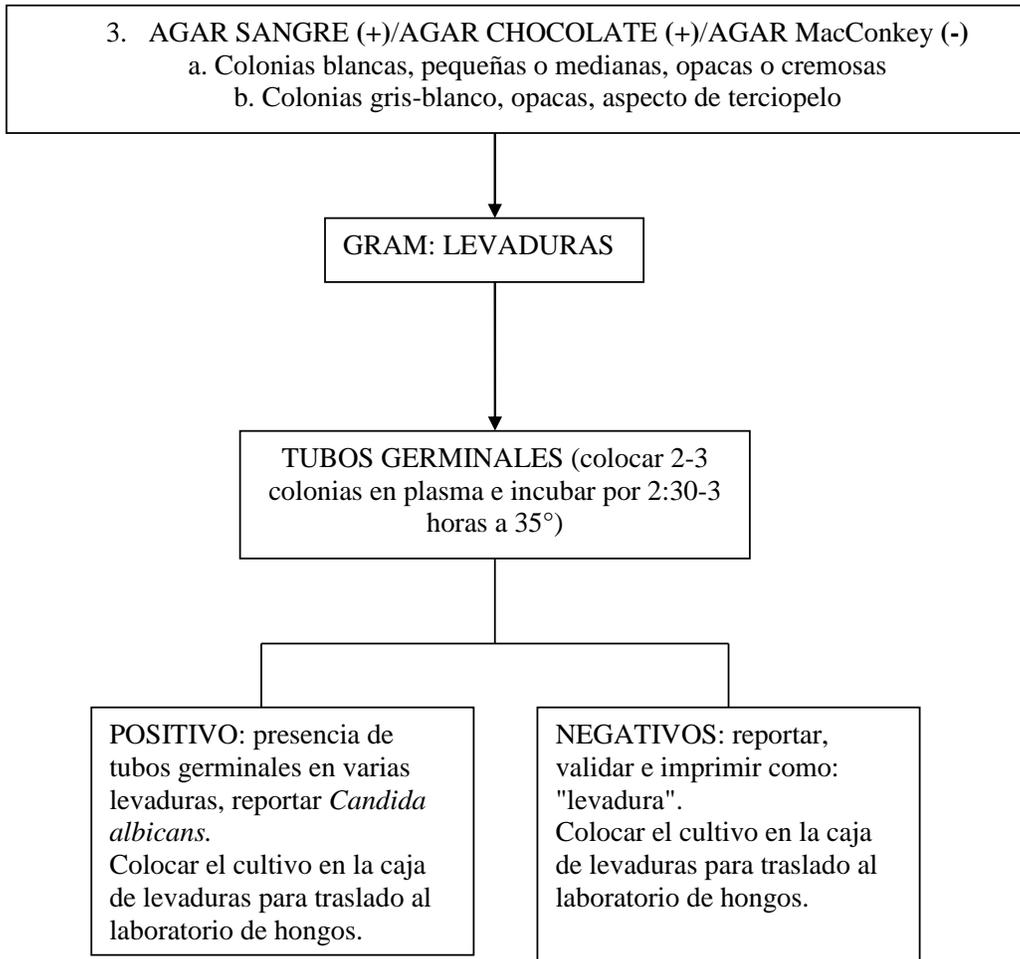
Elaborado por: Procedimiento Operativo Estándar del Laboratorio clínico del HGSJDD

 HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS Guatemala, Centroamérica	 LABORATORIO CLÍNICO	Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Hospital General San Juan de Dios Área de Bacteriología y Tuberculosis y Hongos	 Fecha: 07/06/2018	 POE-3
<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR NO. 3</b>		<b>PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA DE HEMOCULTIVOS DE BACTERIAS GRAM POSITIVO</b>		



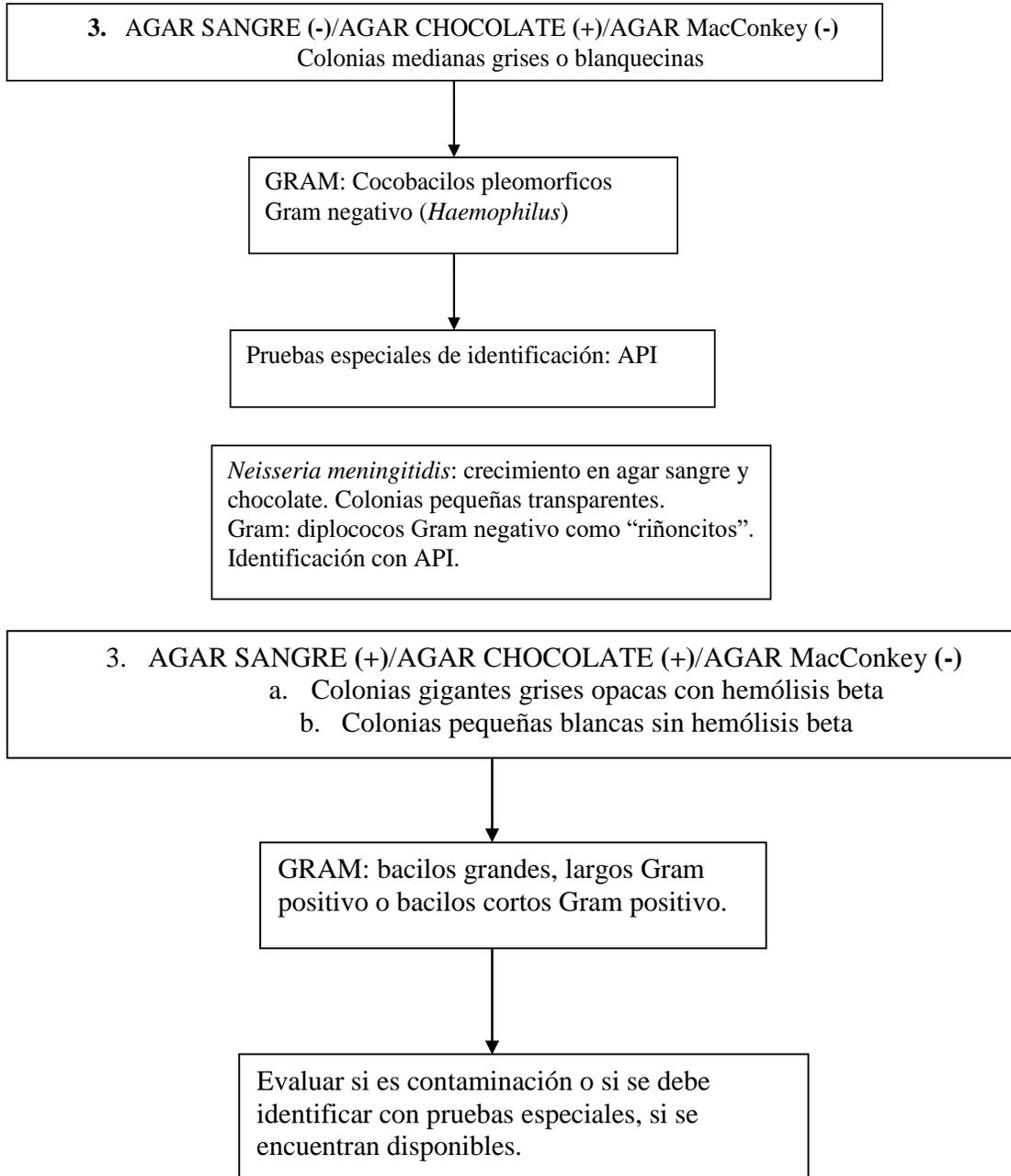
Elaborado por: Procedimiento Operativo Estándar del Laboratorio Clínico del HGSJDD

 <p>HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS Guatemala, Centroamérica</p>	 <p>LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Hospital General San Juan de Dios Área de Bacteriología y Tuberculosis y Hongos</p>		
<p><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR NO. 4</b></p>		<p><b>PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA EN HEMOCULTIVOS DE LEVADURAS</b></p>	<p>Fecha: 07/06/2018</p>	<p>POE-4</p>



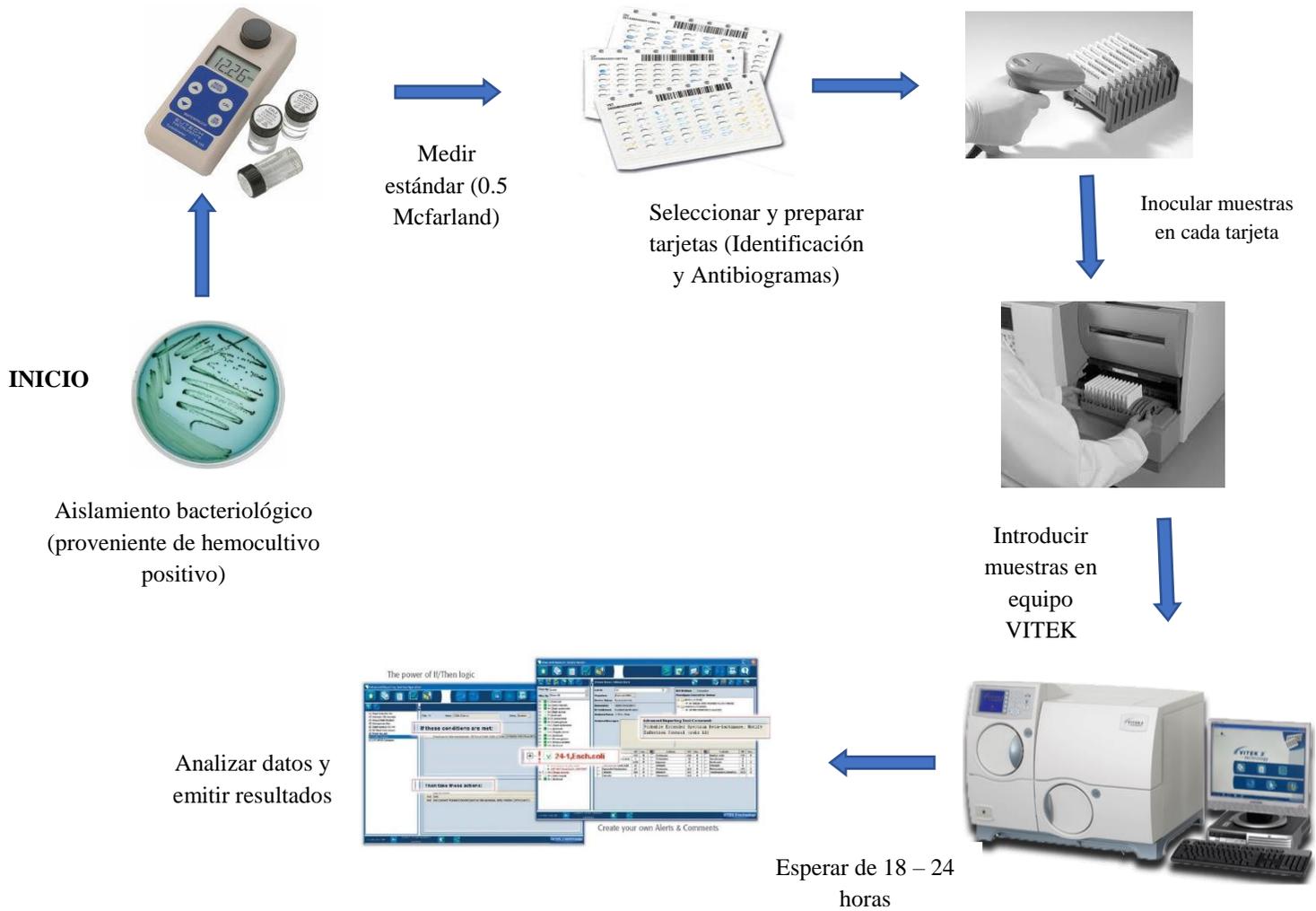
Elaborado por: Procedimiento Operativo Estándar del Laboratorio Clínico del HGSJDD

 <p>HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS Guatemala, Centroamérica</p>	 <p>LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Hospital General San Juan de Dios Área de Bacteriología y Tuberculosis y Hongos</p>		
<p><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR NO. 5</b></p>	<p><b>PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA DE HEMOCULTIVOS DE BACTERIAS CON REQUERIMIENTOS ESPECIALES</b></p>		<p>Fecha: 07/06/2018</p>	<p>POE-5</p>



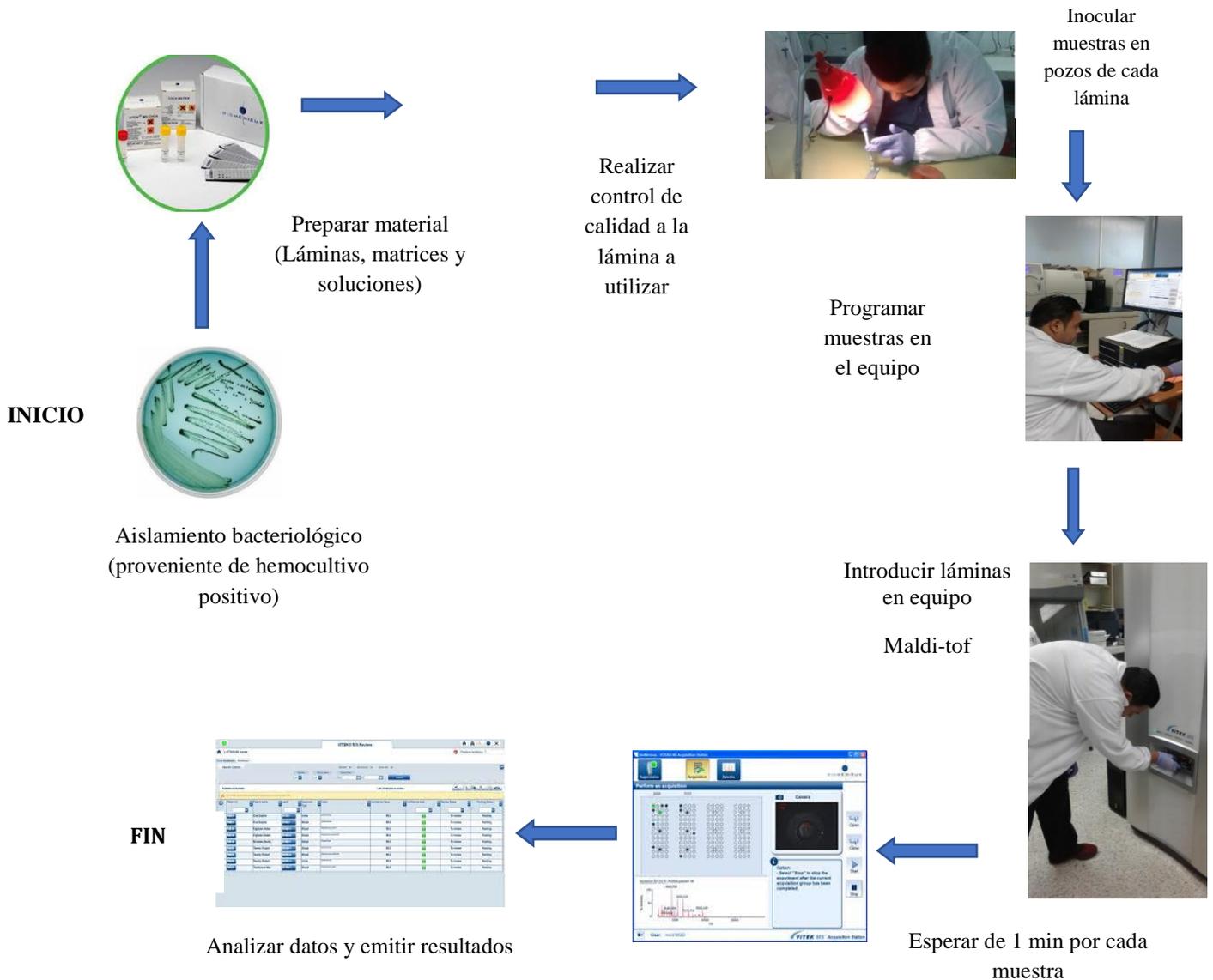
Elaborado por: Procedimiento Operativo Estándar del Laboratorio Clínico del HGSJDD

 <p>HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS Guatemala, Centroamérica</p>	 <p>LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Hospital General San Juan de Dios Área de Bacteriología y Tuberculosis y Hongos</p>		
<p><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR NO. 6</b></p>		<p><b>FLUJOGRAMA DE TRABAJO PARA IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA DE HEMOCULTIVOS POR MÉTODO VITEK</b></p>	<p>Fecha: 07/06/2018</p>	<p>POE-6</p>



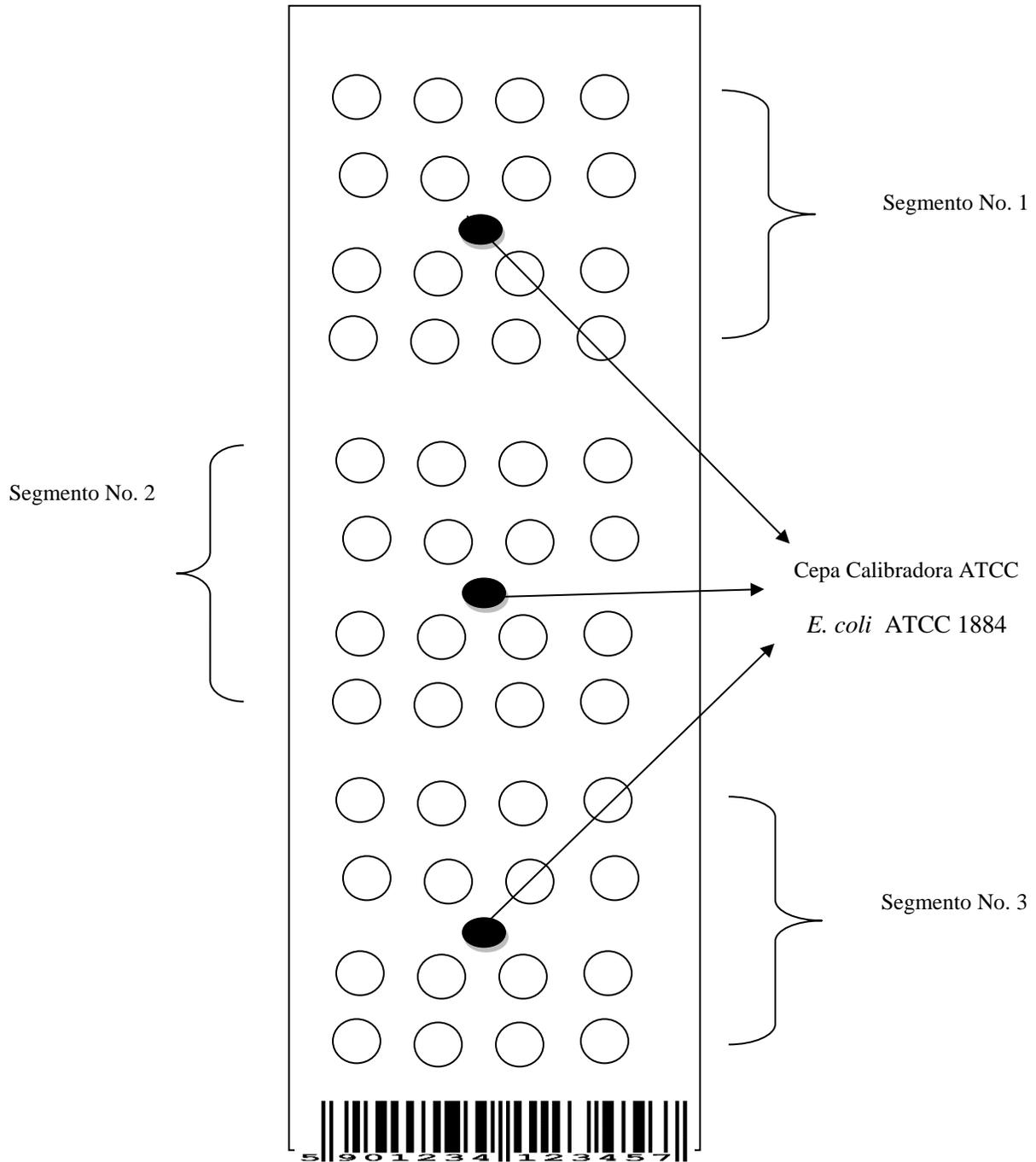
Elaborado por: MSc. Juan Carlos Barrera Toledo

 <p>HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS Guatemala, Centroamérica</p>		<p>Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Hospital General San Juan de Dios Área de Bacteriología y Tuberculosis y Hongos</p>		
<p><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR NO. 7</b></p>		<p><b>FLUJOGRAMA DE TRABAJO PARA IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA DE HEMOCULTIVOS POR MÉTODO MALDI - TOF</b></p>	<p>Fecha: 07/06/2018</p>	<p>POE-7</p>



Elaborado por: MSc. Juan Carlos Barrera Toledo

 <p>HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS Guatemala, Centroamérica</p>	 <p>LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Hospital General San Juan de Dios Área de Bacteriología y Tuberculosis y Hongos</p>	 <p>UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA</p>	 <p>HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS</p>
<p><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR NO. 8</b></p>	<p><b>FLUJOGRAMA DE TRABAJO PARA REALIZAR CONTROL DE CALIDAD EN LÁMINAS UTILIZADAS PARA IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA DE HEMOCULTIVOS POR MÉTODO MALDI - TOF</b></p>		<p>Fecha: 07/06/2018</p>	<p>POE-8</p>



 <p>HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS Guatemala, Centroamérica</p>	 <p>LABORATORIO CLÍNICO</p>	<p>Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Hospital General San Juan de Dios Área de Bacteriología y Tuberculosis y Hongos</p>		
<p><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR NO. 9</b></p>		<p><b>FLUJOGRAMA DE TRABAJO PARA LA IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA DE HEMOCULTIVOS DIRECTOS UTILIZANDO EL MÉTODO MALDI-TOF</b></p>	<p>Fecha: 30/08/2018</p>	<p>POE-9</p>



Elaborado por: MSc. Juan Carlos Barrera Toledo

## VII. RESULTADOS

Considerando los antecedentes de tiempo de respuesta diagnóstica y que se esperaba al menos una reducción de 24 horas utilizando el nuevo método, se calculó el número de muestras para un diseño apareado o emparejado de un grupo, evaluándose por medio de una prueba de hipótesis unilateral. El nivel de significancia establecido fue de 0.05 (alfa), con un poder de 95% y una desviación estándar de las diferencias esperada de 55.44 horas. El número de muestra mínimo a requerir es de 58 casos, según lo calculado en el programa GRANMO 7.12.

### A. Frecuencias y porcentaje de agentes etiológicos de septicemias

El total de muestras procesadas fue de 240, de las cuales 156 pertenecían al género gram positivo siendo; *Staphylococcus epidermidis* el mayormente aislado (47.1%) en hemocultivos de vía central, ya que en el caso de los hemocultivos periféricos es considerado como agente contaminante. De igual forma *Streptococcus pneumoniae*, *Corynebacterium striatum* y *Aerococcus viridans* fueron los encontrados en menor porcentaje (0.6%)

**Tabla 1**

*Frecuencia y porcentajes de bacterias Gram positivo identificadas como agente causal de septicemias en pacientes de los diferentes servicios del HGSJDD (n=156).*

ID. Microbiológica	F	% GP	% FT
<i>Aerococcus viridans</i>	1	0.6	0.4
<i>Corynebacterium striatum</i>	1	0.6	0.4
<i>Staphylococcus aureus</i>	26	16.8	10.8
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	73	47.1	30.4
<i>Staphylococcus hominis</i>	32	20.6	13.3
<i>Staphylococcus capitis</i>	6	3.9	2.5
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	7	4.5	2.9
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3	1.9	1.3
<i>Streptococcus mitis</i>	2	1.3	0.8
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	0.6	0.4
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	2.6	1.7
Total	156	100.6	65.0

F: Frecuencia / % GP: Porcentaje de Gram positivo / % GN: Porcentaje de Gram negativo / % LEV: Porcentaje de levaduras / % FT: Porcentaje de frecuencia total

En cuanto a las bacterias gram negativo se observa que *Acinetobacter baumannii* es el identificado en mayor porcentaje (21.3%), así como *Bacillus cereus* y *Pseudomonas stutzeri* en (1.3%) en menor porcentaje.

**Tabla 2**

*Frecuencia y porcentajes de bacterias Gram negativo identificadas como agente causal de septicemias en pacientes de los diferentes servicios del HGSJDD (n=79).*

ID. Microbiológica	F	% GN	% FT
<i>Acinetobacter baumannii</i>	17	21.3	7.1
<i>Bacillus cereus</i>	6	7.5	2.5
<i>Enterobacter cloacae</i>	10	12.5	4.2
<i>Escherichia coli</i>	14	17.5	5.8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	17.5	5.8
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	1.3	0.4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	18.8	6.3
<i>Salmonella group</i>	2	2.5	0.8
Total	79	98.8	32.9

F: Frecuencia / % GP: Porcentaje de Gram positivo / % GN: Porcentaje de Gram negativo / % LEV: Porcentaje de levaduras / % FT: Porcentaje de frecuencia total.

Finalmente, en los microorganismos levaduriformes se observaron únicamente 5 casos de los cuales el 80% eran causados por *Candida tropicalis* y el 20% por *Candida albicans*.

**Tabla 3.**

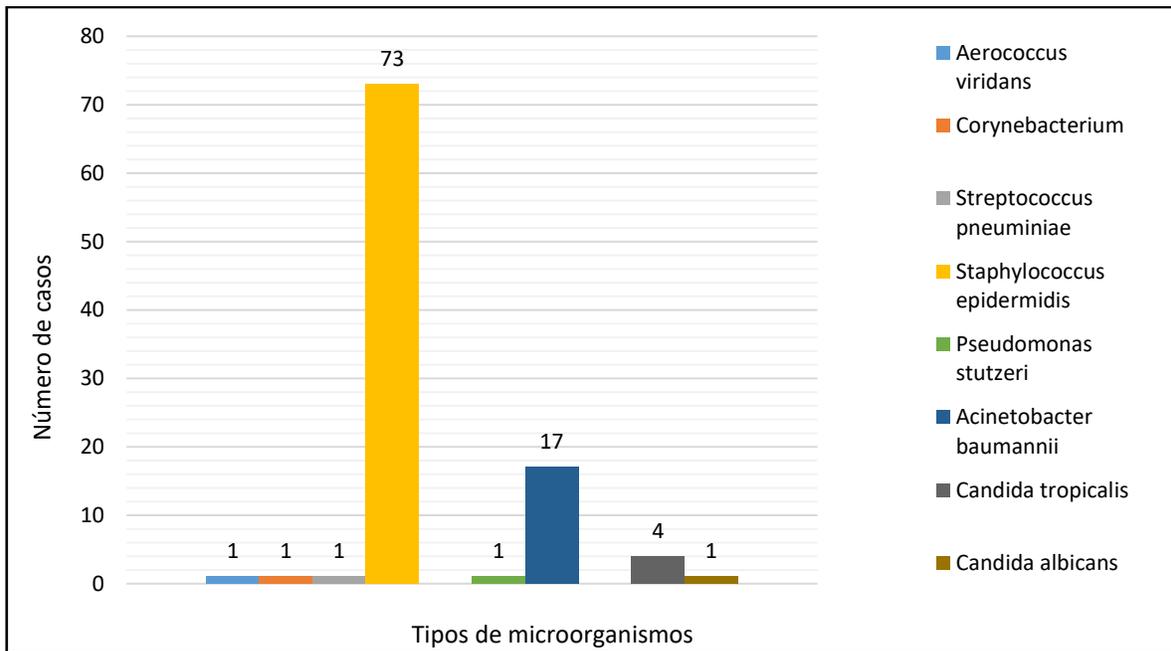
*Frecuencia y porcentajes de levaduras identificadas como agente causal de septicemias en pacientes de los diferentes servicios del HGSJDD (n=5).*

ID. Microbiológica	F	% LEV	% FT
<i>Candida tropicalis</i>	4	80.0	1.7
<i>Candida albicans</i>	1	20.0	0.4
Total	5	100.0	2.1

F: Frecuencia / % GP: Porcentaje de Gram positivo / % GN: Porcentaje de Gram negativo / % LEV: Porcentaje de levaduras / % FT: Porcentaje de frecuencia total

**Grafica 1**

*Agentes causales de septicemias (n=240)*



F: Frecuencia / % GP: Porcentaje de Gram positivo / % GN: Porcentaje de Gram negativo / % LEV: Porcentaje de levaduras / % FT: Porcentaje de frecuencia total

**B. Reducción de tiempo en la identificación microbiológica rutinaria de hemocultivos positivos.**

En cuanto a la identificación de microorganismos gram positivo, se puede observar una reducción de tiempo de 65.7 horas comparando el método Vitek (VTK) con respecto al método Maldi-tof cultivo (MT-C). De igual forma se observa una reducción de tiempo de 42.9 horas al comparar el método MT-C con respecto al método Maldi-tof muestra directa (MT-MD).

**Tabla 4**

*Reducción del tiempo en el diagnóstico microbiológico de hemocultivos positivos de bacterias Gram positivo (n=156).*

ID. Microbiológica	(t) VTK	(t) MT-C	(t) MT-MD	t (VTK vs MT-C)	t (MT-C vs MT-MD)
<i>Aerococcus viridans</i>	190.2	98.2	44.2	92.0	54.0
<i>Corynebacterium striatum</i>	234.8	99.2	77.2	135.6	22.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	157.2	113.1	64.4	44.1	48.7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	155.8	112.0	64.7	43.8	47.3
<i>Staphylococcus hominis</i>	156.3	111.9	64.1	44.4	47.8
<i>Staphylococcus capitis</i>	157.6	111.6	62.9	46.0	48.7
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	158.1	112.1	64.0	46.0	48.1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	170.0	113.2	64.8	56.8	48.5
<i>Streptococcus mitis</i>	177.2	99.8	64.0	77.4	35.9
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	190.9	99.2	77.2	91.7	22.0
<i>Enterococcus faecalis</i>	157.7	112.9	63.7	44.8	49.2
Promedio de tiempo	173.2	107.6	64.6	65.7	42.9

t: tiempo en h / MT-C: Maldi-tof cultivo / MT-MD: Maldi-tof muestra directa

De igual manera para a la identificación de microorganismos gram negativo se puede observar una reducción de tiempo de 38.7 horas comparando el método VTK con respecto al método MT-C; así como una reducción de tiempo de 45.0 horas al comparar el método MT-C con respecto al método MT-MD.

**Tabla 5**

*Reducción del tiempo en el diagnóstico microbiológico de hemocultivos positivos de bacterias Gram negativo (n=79).*

ID. Microbiológica	(t) VTK	(t) MT-C	(t) MT-MD	t (VTK vs MT-C)	t (MT-C vs MT-MD)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	150.4	112.4	64.2	38.0	48.2
<i>Bacillus cereus</i>	152.2	115.2	64.7	37.0	50.5
<i>Enterobacter cloacae</i>	151.0	112.5	65.0	38.5	47.5
<i>Escherichia coli</i>	152.2	110.3	64.6	41.9	45.7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	149.4	111.1	63.6	38.3	47.5
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	140.4	110.2	77.2	30.2	33.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	150.6	110.5	63.6	40.1	46.9
<i>Salmonella group</i>	158.8	113.3	72.4	45.5	40.9
Promedio de tiempo	150.6	111.9	66.9	38.7	45.0

t: tiempo en h / MT-C: Maldi-tof cultivo / MT-MD: Maldi-tof muestra directa

Finalmente, para a la identificación de microorganismos levaduriformes, se puede observar una reducción de tiempo de 119.4 horas comparando el método VTK con respecto al método MT-C. De igual forma se observa una reducción de tiempo de 126.5 horas al comprar el método MT-C con respecto al método MT-MD.

**Tabla 6**

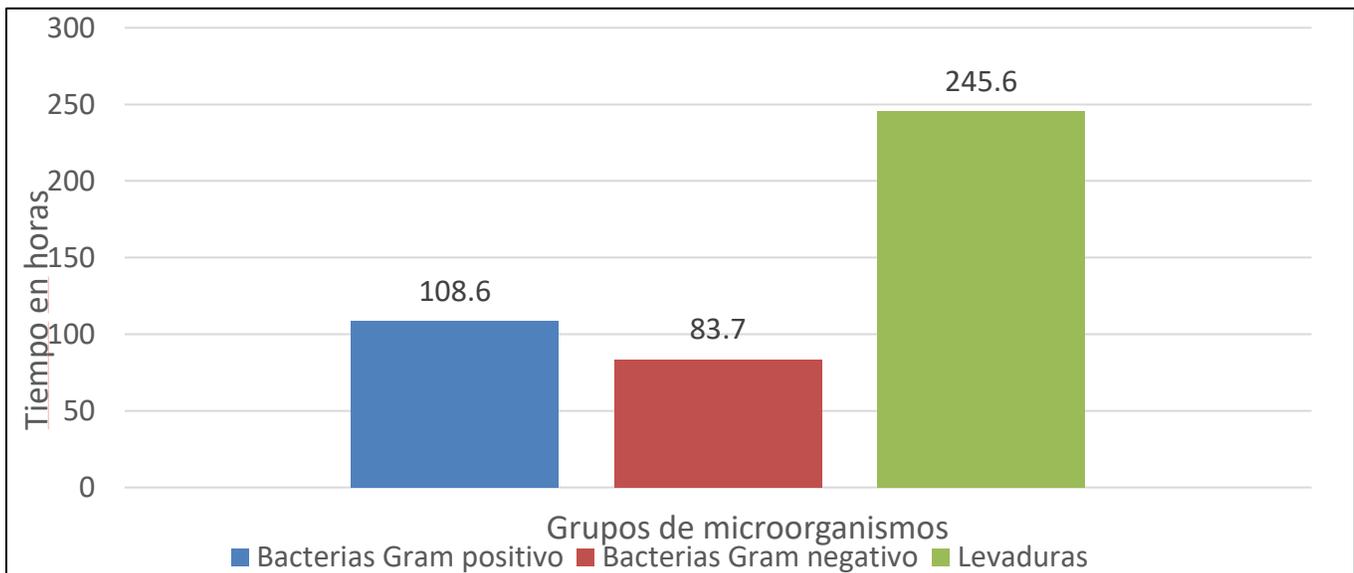
*Reducción del tiempo en el diagnóstico microbiológico de hemocultivos positivos de levaduras (n=5).*

ID. Microbiológica	(t) VTK	(t) MT-C	(t) MT-MD	t (VTK vs MT-C)	t (MT-C vs MT-MD)
<i>Candida tropicalis</i>	318.0	201.2	70.0	116.8	131.3
<i>Candida albicans</i>	320.4	198.4	77.2	122.0	121.2
Promedio de tiempo	319.2	199.8	73.6	119.4	126.2

t: tiempo en h / MT-C: Maldi-tof cultivo / MT-MD: Maldi-tof muestra directa

**Grafica 2**

*Reducción de tiempo de respuesta diagnóstica (n=240)*



t: tiempo en h / MT-C: Maldi-tof cultivo / MT-MD: Maldi-tof muestra directa

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

La presente investigación tuvo por objetivo realizar el primer estudio en Guatemala que utilizó la tecnología espectrométrica Maldi-tof para medir la eficacia en la reducción del tiempo en el diagnóstico microbiológico rutinario de hemocultivos positivos en pacientes que asisten a los diferentes servicios del HGSJDD. Para dicho fin fue necesario comparar los siguientes métodos: Vitek ( Sistema que utiliza tarjetas con reactivos colorimétricos y una suspensión de un cultivo puro microbiano; para identificar de forma automatizada el perfil bioquímico), Espectrometría de Masas Maldi-tof a partir de aislamientos o cultivos microbiológicos puros y Espectrometría de Masas Maldi-tof utilizando muestras directas. Con esta última se promovió el diseño, desarrollo, estandarización e implementación de un método inexistente en Guatemala, el cual permitió obtener resultados confiables rápidos y certeros brindando un menor tiempo de respuesta diagnóstico. De las 240 muestras analizadas, 156 fueron identificadas con bacterias gram positivo, 79 con bacterias gram negativo y cinco con levaduras.

El hemocultivo o cultivo de sangre, es una prueba de laboratorio que se realiza para identificar la presencia de microorganismos en el torrente sanguíneo fundamentalmente bacterias y hongos (Holland et al., 2006). Se realiza ante la sospecha de un proceso infeccioso en curso o la necesidad de identificar el microorganismo que causa dicha infección con el objetivo de instaurar el tratamiento farmacológico más efectivo (Kohlmann et al., 2015).

Existen varios métodos para la identificación microbiológica de hemocultivos, motivo por el cual se compararon los tres antes mencionados, observándose una reducción de tiempo estadísticamente significativa (ver Anexo 2 y Anexo 3) a favor de la espectrometría de masas de tipo Maldi-tof. La peculiaridad de utilizar la espectrometría de masas como una alternativa para la mejora de los diagnósticos de septicemias se debe a que está basada en la producción, separación y detección de

iones en fase gaseosa, utilizando para ello una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector de espectros que permite obtener datos directamente del material proteico puro para su análisis en menor tiempo (Clark, Kaleta, Arora, & Wolk, 2013).

El material obtenido es embebido en una matriz orgánica que cristaliza en contacto con el aire en una tarjeta de material conductor que es irradiada por un láser. Los iones obtenidos son dirigidos hacia el analizador de masas y posteriormente al detector, el cual analiza los patrones. Cada microorganismo posee un patrón único y específico que permitirá identificar al agente causal con gran certeza y en un corto tiempo (uno a dos minutos aproximadamente) (Clark, Kaleta, Arora, & Wolk, 2013). Es importante mencionar que los métodos convencionales necesitan aproximadamente cinco a siete días para obtener una correcta identificación (Osthoff et al., 2017).

Tomando en cuenta las ventajas y respetando el principio del método espectrométrico Maldi-tof, se analizaron cultivos microbiológicos puros y la variante con muestras directas, este último con el objetivo de acortar aún más el tiempo necesario para el diagnóstico de septicemias. Las frecuencias evidencian que el 65% de las septicemias fueron causadas por bacterias gram positivo, siendo el género *Staphylococcus sp.* el que se encontraba en mayor frecuencia (ver Tabla 1) y *Aerococcus viridans*, *Corynebacterium striatum* y *Streptococcus pneumoniae* en menor frecuencia. *Corynebacterium striatum* es considerado como agente contaminante (Zabbe, Zanardo, Mégraud & Bessède, 2015).

Las septicemias causadas por bacterias gram positivo cobran gran importancia, debido a que son los microorganismos identificados con mayor frecuencia siendo los principales representantes: *Staphylococcus aureus* MRSA y *Streptococcus pyogenes*. Estas bacterias poseen en su estructura peptidoglicano (PNG) y ácido teicoico (LTA), dos moléculas que son reconocidas como patrones

moleculares asociados a patógenos (PAMPs), activan directa y ampliamente el sistema inmune adaptativo promoviendo la liberación de altas cantidades de  $TNF\alpha$ , la  $IL-1\beta$ , la  $IL-6$ , el  $INF\gamma$ ,  $IL-8$ ,  $IL-18$ ,  $IL-2$ ,  $IL-12$ ,  $IL-10$ , las cuales son las responsables de los daños multiorgánicos y principalmente de las afecciones cardíacas (Luethy & Johnson, 2018).

La frecuencia de septicemias causada por bacterias gram negativo fue del 32.9%, de los cuales *Acinetobacter baumannii* se encontró en mayor frecuencia y *Pseudomonas stutzeri* en menor (ver Tabla 2). Estos casos constituyen un complejo, en el que a consecuencia de una respuesta anómala del huésped se desencadenan una serie de mecanismos fisiopatológicos celulares y moleculares que se traducen en daño multiorgánico (Luethy & Johnson, 2018). Este daño es causado por la presencia de los lipopolisacáridos (LPS), el principal factor de virulencia reconocido por el complejo proteico  $NF-\kappa B$ , que promueven la producción y liberación de citocinas proinflamatorias responsables en su mayoría del Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS) (Zárate, Romano, Nievas & Smayevsky, 2014).

La Tabla 3 evidencia que el 2.1% de los casos de septicemias fueron provocados por levaduras del género *Candida sp.*; siendo *Candida tropicalis* la causante del 80% de los mismos. Según datos del Centro de Control de Enfermedades Infecciosas del CDC de Atlanta, estos patógenos han llegado a ocupar el cuarto lugar dentro de las infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo, probablemente por la presión de selección a algunos agentes antifúngicos. Algunas de estas levaduras presentan resistencia intrínseca a un tipo de antifúngico (insensibilidad), o desarrollan resistencia secundaria (luego de haber estado en contacto con él); por esta razón se hace necesaria su adecuada identificación a nivel de especie (Singhal, Kumar, Kanaujia, & Viridi, 2015).

Kumate y colaboradores (2016) en su tratado “Infectología Clínica”, hacen hincapié en la importancia de la correcta y rápida identificación microbiológica, esto debido a que la terapia antibiótica recomendada en el caso de las septicemias es de la línea más alta disponible, es decir, en el caso de los gram negativo carbapenémicos y/o Piperacilina/Tazobactam y en el caso de los gram positivo vancomicina y/o Linezolid, para posteriormente realizar un desescalamiento antibiótico y redirección de la terapia con base a los antibiogramas brindados. Esta conducta es recomendada con el objetivo de evitar fallo terapéutico, progresión de la infección y daño multiorgánico.

El desescalamiento y la redirección antibiótica son de suma importancia debido que de forma indirecta, permitirá reducir la resistencia antimicrobiana, un problema de gran importancia en la actualidad (Kumate et al., 2016).

Por otro lado, como ya se mencionó, el objetivo de reducir el tiempo de respuesta promovió el diseño, desarrollo, ejecución e implementación de una nueva metodología no utilizada en Guatemala, la cual permitió realizar la identificación microbiológica de hemocultivos positivos, a partir de las muestras directas. Para el diseño de esta metodología, se utilizó el procedimiento establecido por Hoyos-Mallecot y colaboradores (2013). El procedimiento aquí descrito fue modificado de la siguiente manera: Se utilizaron tubos cónicos, para facilitar la decantación de la muestra, en vez de los tubos de ensayo ordinarios. En el paso 2, se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% en lugar de 200  $\mu\text{L}$  de SDS al 5%, debido a que no se obtenía una cantidad suficiente de extracto proteico para analizar. El paso 3, se repitió tres veces, ya que fue necesario lavar y centrifugar dos veces más por el cambio de volúmenes y concentración del SDS, así como para eliminar interferentes. En el paso 7, se resuspendió el extracto proteico en 500  $\mu\text{L}$  de agua miliQ en lugar de 1 mL, ya que la cantidad de agua era suficiente y no afectaba la integridad de la muestra. Se colocaron 2  $\mu\text{L}$  de extracto proteico en cada una de las posiciones de la lámina y se fijaron con 1  $\mu\text{L}$  de matriz

orgánica. Posteriormente, la muestra fue secada al aire y leída con el espectrómetro de masas (Maldi-tof).

En cuanto a los resultados, la Tabla 4 evidencia la diferencia entre los tiempos de respuesta al comparar las tres técnicas. En bacterias gram positivo se observa una diferencia de 65.7 horas a favor de la técnica espectrométrica Maldi-tof utilizando cultivos puros, con respecto a la técnica Vitek. De igual forma, se observó una diferencia de 42.9 horas a favor de la técnica Maldi-tof utilizando muestras directas, con respecto a la técnica Maldi-tof utilizando cultivos puros, por lo que puede concluirse que, en cuanto a septicemias causadas por bacterias gram positivo, se puede brindar un tiempo menor de respuesta aproximado de 108 horas.

La Tabla 5 evidencia que en bacterias gram negativo, la diferencia es de 38.7 horas a favor de la técnica Maldi-tof utilizando cultivos puros, con respecto a la técnica Vitek; de igual forma se observó una diferencia de 45.0 horas a favor de la técnica Maldi-tof utilizando muestras directas con respecto a la técnica Maldi-tof utilizando cultivos puros, por lo que puede concluirse que en cuanto a septicemias causadas por bacterias gram negativo, se puede brindar un tiempo menor de respuesta aproximado de 84 horas.

La Tabla 6 evidencia que en levaduras, la diferencia es de 119.4 horas a favor de la técnica Maldi-tof utilizando cultivos puros, con respecto a la técnica Vitek. De igual forma se observó una diferencia de 126.2 horas a favor de la técnica Maldi-tof utilizando muestras directas, con respecto a la técnica Maldi-tof utilizando cultivos puros, por lo que puede concluirse que en cuanto a septicemias causadas por bacterias gram positivo se puede brindar un tiempo menor de respuesta aproximado de 240 horas.

Las diferencias entre cada uno de los grupos probablemente se deben a sus composiciones, lo cual podría favorecer a los tiempos de respuesta en algunas metodologías. El peptidoglicano en el caso de

los gram positivo, los lipopolisacáridos en los gram negativo y la quitina en el caso de las levaduras (Verroken et al., 2016).

Los datos antes descritos en cuanto disminución en tiempos de respuesta, son semejantes a los datos reportados por Ageletti y colaboradores (2015), quienes realizaron un estudio similar comparando tiempos de respuesta, antes y después de la introducción de la tecnología Maldi-tof. Los datos obtenidos fueron una reducción de 71.73 horas en la identificación para bacterias gram positivo y 64.03 en la identificación de bacterias gram negativo. No se comparó el tiempo de respuesta en levaduras, pero sí se calculó para microorganismos anaerobios, en los cuales se observó una reducción de 47.62 horas.

En cuanto a las ventajas de utilizar la tecnología Maldi-tof son: menor tiempo de respuesta diagnóstica, abordaje antibiótico certero en un menor tiempo, evitar daño multiorgánico en los pacientes por uso excesivo e inadecuado de antibióticos innecesarios, ahorro de insumos hospitalarios, menor tiempo de estancia hospitalaria, disminución de costos en terapia antibióticas, combate indirecto a la resistencia antimicrobiana (De la Pedrosa, Gimeno & Cantón, 2016).

Las principales limitaciones del estudio fueron: la poca información con respecto al tema, la escasa cantidad de estudios con respecto a la Espectrometría de Masas Maldi-tof, esto debido a que la tecnología es relativamente nueva en el ámbito microbiológico; y en cuanto a la nueva metodología diseñada, no es útil para septicemias mixtas. Esto debido a que es necesario contar con las bacterias de forma individual para ser identificadas y esto se logra únicamente con cultivos microbiológicos.

Finalmente es importante mencionar que con la presente investigación se pretendió brindar a la población guatemalteca una alternativa eficiente que permita brindar resultados rápidos, confiables y certeros en el diagnóstico de septicemias.

## IX. CONCLUSIONES

- A. Se diseñó, desarrolló, estandarizó e implementó un protocolo único en Guatemala, que permite la identificación de microorganismos patógenos a partir de muestras directas de hemocultivos positivos, utilizando la tecnología espectrométrica Maldi-tof.
- B. La identificación de microorganismos pertenecientes al género gram positivo fue *Staphylococcus epidermidis* el mayormente identificado (47.1%) y *Streptococcus pneumoniae*, *Corynebacterium striatum* y *Aerococcus viridans* el encontrado en menor porcentaje (0.6%).
- C. En cuanto a las bacterias gram negativo se observó que *Acinetobacter baumannii* es el identificado en mayor porcentaje (21.3%), *Bacillus cereus* y *Pseudomonas stutzeri* en menor porcentaje (1.3%).
- D. La identificación de microorganismos levaduriformes evidenció únicamente 5 casos de los cuales el 80% eran causados por *Candida tropicalis* y el 20% por *Candida albicans*.
- E. La diferencia entre los tiempos de respuesta en bacterias gram positivo fueron 65.7 horas a favor de la técnica espectrométrica Maldi-tof utilizando cultivos puros, con respecto a la técnica Vitek y 42.9 horas a favor de la técnica Maldi-tof utilizando muestras directas, con respecto a la técnica Maldi-tof utilizando cultivos puros.

- F. La diferencia entre los tiempos de respuesta en bacterias gram negativo fueron 38.7 horas a favor de la técnica Maldi-tof utilizando cultivos puros, con respecto a la técnica Vitek y 45.0 horas a favor de la técnica Maldi-tof utilizando muestras directas, con respecto a la técnica Maldi-tof utilizando cultivos puros.
- G. La diferencia entre los tiempos de respuesta en levaduras fue de 119.4 horas a favor de la técnica Maldi-tof utilizando cultivos puros, con respecto a la técnica Vitek y 126.2 horas a favor de la técnica Maldi-tof utilizando muestras directas, con respecto a la técnica Maldi-tof utilizando cultivos puros.

## X. RECOMENDACIONES

- A. Probar la nueva metodología estandarizada con otros tipos de muestras como orinas y líquidos corporales.
  
- B. Realizar un estudio de proyección que permita cuantificar la reducción de costos en antibióticos e insumos hospitalarios.
  
- C. Realizar un estudio de impacto que permita evidenciar la reducción de morbimortalidad de pacientes con septicemias.

**XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- Aebersold, R., & Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422(6928), 198-207. <https://doi.org/10.1038/nature01511>
- Angeletti, S., Dicuonzo, G., D'Agostino, A., Avola, A., Crea, F., Palazzo, C., Dedej, E., & Florio, L. (2015). Turnaround time of positive blood cultures after the introduction of matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. *New Microbiological*, 38(3), 379-386. PMID: 26147149
- Angeletti, S. (2017). Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (Maldi-tof MS) in clinical microbiology. *Journal of Microbiological Methods*, 138, 20-29. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.09.003>
- Bright, J. J., Claydon, M. A., Soufian, M., & Gordon, D. B. (2002). Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. *Journal of Microbiological Methods*, 48(2-3), 127-138. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(01\)00317-7](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(01)00317-7)
- Cattani, M. E., Posse, T., Hermes, R. L., & Kaufman, S. C. (2015). Identificación rápida de microorganismos de frascos de hemocultivos por espectrometría de masas. Comparación de dos procedimientos diagnósticos. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), 190-195. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.06.001>
- Cherkaoui, A., Hibbs, J., Emonet, S., Tangomo, M., Girard, M., Francois, P., & Schrenzel, J. (2010). Comparison of two matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 1169-1175. <https://doi.org/10.1128/jcm.01881-09>

- Claydon, M. A., Davey, S. N., Edwards-Jones, V., & Gordon, D. B. (1996). The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nature Biotechnology*, *14*(11), 1584-1586. <https://doi.org/10.1038/nbt1196-1584>
- Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A., & Wolk, D. M. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, *26*(3), 547-603. <https://doi.org/10.1128/cmr.00072-12>
- Contreras, S., Rodríguez, D., Vera, F., Balcells, M., Celis, L., Legarraga, P., Roman, J., & García, P. (2020). Identificación de especies de micobacterias mediante espectrometría de masas Maldi-tof. *Revista Chilena de Infectología*, *37*(3), 252-256. <http://doi.org/10.4067/s0716-10182020000300252>
- Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas. (2016). *Pautas éticas internacionales para la investigación relacionada con la salud con seres humanos*. Suiza: Organización Panamericana de la Salud.
- De la Pedrosa, E. G. G., Gimeno, C., Soriano, A., & Cantón, R. (2016). Estudios de coste-efectividad con Maldi-tof e impacto clínico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *34*, 47-52. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(16\)30191-4](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(16)30191-4)
- Drevinek, M., Dresler, J., Klimentova, J., Pisa, L., & Hubalek, M. (2012). Evaluation of sample preparation methods for Maldi-tof MS identification of highly dangerous bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, *55*(1), 40-46. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2012.03255.x>

- Du, Z., Yang, R., Guo, Z., Song, Y., & Wang, J. (2002). Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, *74*(21), 5487–5491. <https://doi.org/10.1021/ac020109k>
- Dupont, C., Sivadon-Tardy, V., Bille, E., Dauphin, B., Beretti, J. L., Alvarez, A. S., Degand, N., Ferroni, A., Rottman, M., Herrmann, J. L., Nassif, X., Ronco, E., & Carbonnelle, E. (2010). Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems. *Clinical Microbiology and Infection*, *16*(7), 998–1004. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03036.x>
- Emonet, S., Shah, H. N., Cherkaoui, A., & Schrenzel, J. (2010). Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clinical Microbiology and Infection*, *16*(11), 1604-1613. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03368.x>
- Ferraro, M. (2001). National Committee for Clinical Laboratory Standards Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Eleventh Informational Supplement*, Ref: 21M100-S11 NCCLS.
- Fernández Olmos, A., Bou Olmos, G., Cercenado E., Cantón, R., García de La Fuente, C., Saéz Nieto, J. A., Valdezate Ramos, S. (2013). Métodos de identificación bacteriana en el Laboratorio de microbiología. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

- Ferreira, L., Sanchez-Juanes, F., Gonzalez-Avila, M., Cembrero-Fucinos, D., Herrero-Hernandez, A., Gonzalez-Buitrago, J. M., & Munoz-Bellido, J. L. (2010). Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(6), 2110-2115. <https://doi.org/10.1128/jcm.02215-09>
- Ferreira, L., Sánchez-Juanes, F., Porrás-Guerra, I., García-García, M. I., García-Sánchez, J. E., González-Buitrago, J. M., & Muñoz-Bellido, J. L. (2011). Microorganisms direct identification from blood culture by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(4), 546-551. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03257.x>
- Galán, F., García-Agudo, L., Guerrero, I., Marín, P., García-Tapia, A., García-Martos, P., & Rodríguez-Iglesias, M. (2015). Evaluación de la espectrometría de masas en la identificación de levaduras de interés clínico. *Clinical Microbiology and Infection*, 33(6), 372-378. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.003>
- García, P., Allende, F., Legarraga, P., Huilcaman, M., & Solari, S. (2012). Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. *Revista Chilena de Infectología*, 29(3), 263-272. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182012000300003>
- Gherardi, G., Angeletti, S., Panitti, M., Pompilio, A., Di Bonaventura, G., Crea, F., Avola, A., Fico, L., Palazzo, C., Sapia, G., Visaggio, D., & Dicuonzo, G. (2012). Comparative evaluation of the Vitek-2 Compact and Phoenix systems for rapid identification and antibiotic susceptibility testing directly from blood cultures of Gram-negative and Gram-positive isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 72(1), 20-31. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.09.015>

Gordis, L. (2005). *Epidemiología*. Elsevier.

Holland, R. D., Wilkes, J. G., Rafii, F., Sutherland, J. B., Persons, C. C., Voorhees, K. J., & Lay., J. O. Jr (1996). Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10(10), 1227-1232. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0231\(19960731\)10:10<1227::aid-rcm659>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0231(19960731)10:10<1227::aid-rcm659>3.0.co;2-6)

Hoyos-Mallecot, Y., Miranda-Casas, C., Cabrera-Alvargonzalez, J. J., Gómez-Camarasa, C., Pérez-Ramirez, M. D., & Navarro-Marí, J. M. (2013). Identificación bacteriana directamente del hemocultivo mediante una técnica rápida de espectrometría de masas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(3), 152-155. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.09.003>

Jung, J. S., Hamacher, C., Gross, B., Sparbier, K., Lange, C., Kostrzewa, M., & Schubert, S. (2016). Evaluation of a semiquantitative matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry method for rapid antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(11), 2820–2824. <https://doi.org/10.1128/jcm.01131-16>

Kohlmann, R., Hoffmann, A., Geis, G., & Gatermann, S. (2015). Maldi-tof mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid pathogen identification from positive blood cultures. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(4), 469-479. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.04.004>

Keys, C. J., Dare, D. J., Sutton, H., Wells, G., Lunt, M., McKenna, T., McDowall, M & Shah, H. N. (2004). Compilation of a Maldi-tof mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infection, Genetics and Evolution*, 4(3), 221–242.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.02.004>

Koneman, E., Allen, S., & Janda, E. (2002). *Diagnóstico Microbiológico*. Médica Panamericana.

Kumate, J., Gutiérrez, G., Muñoz, O., Santos, I., Solórzano, F., & Miranda, G. (2016). *Infectología clínica*. Méndez Editores

Lay, J. O., & Holland, R. D. (2000). Rapid identification of bacteria based on spectral patterns using Maldi-tof MS. *Mass spectrometry of proteins and peptides*, 461–487. <https://doi.org/10.1385/1-59259-045-4:461>

Legarraga, P., Moraga, M., Lam, M., Geoffroy, E., Zumarán, C., & García, P. (2013). Impacto de la espectrometría de masas por Maldi-tof MS en la identificación rápida de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia clínica. *Revista Chilena de Infectología*, 30(2), 140–146. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182013000200004>

Lewis, J. K., Wei, J., & Siuzdak, G. (2006). Matrix-assisted laser desorption / ionization mass spectrometry in peptide and protein analysis. *Encyclopedia of analytical chemistry*, (pp. 5880-5894). John Wiley & Sons.  
<https://doi.org/10.1002/9780470027318.a1621>

- Luethy, P. M., & Johnson, J. K. (2018). The Use of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) for the Identification of Pathogens Causing Sepsis. *Journal of Applied Laboratory Medicine*, 3(4), 675-685. <https://doi.org/10.1373/jalm.2018.027318>
- Mahon, C. R., & Manuselis, G. (2005). *Textbook of diagnostic microbiology*. Saunders Company.
- Mellmann, A., Cloud, J., Maier, T., Keckevoet, U., Ramminger, I., Iwen, P., Dunn, J., Hall, G., Wilson, D., LaSala, P., Kostrweza, M & Harmsen, D. (2008). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6), 1946–1954. <https://doi.org/10.1128/jcm.00157-08>
- Marinach-Patrice, C., Lethuillier, A., Marly, A., Brossas, J.-Y., Gené, J., Symoens, F., Datry, A., Guarro, J., Mazier, D., & Hennequin, C. (2009). Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(7), 634–642. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02758.x>
- Mosko, M. J., Nakorchevsky, A. A., Flores, E., Metzler, H., Ehrich, M., Van, D. J., Sherwood, J., & Nygren, A. O. (2016). Ultrasensitive detection of multiplexed somatic mutations using mass spectrometry. *Journal of Molecular Diagnostics*, 18(1), 23-31. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.08.001>
- Moura, H., Woolfitt, A. R., Carvalho, M. G., Pavlopoulos, A., Teixeira, L. M., Satten, G. A., & Barr, J. R. (2008). Maldi-tof mass spectrometry as a tool for differentiation of invasive and noninvasive streptococcus pyogenes isolates. *Immunology & Medical Microbiology*, 53(3), 333-342. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2008.00428.x>

- Nave, F. (2018). *Estadística para la investigación*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, Unidad de Publicaciones y Divulgación.
- Oviaño García, M., Rodríguez Sánchez, B., Caballero Pérez, J. de D., Muñoz Bellido, J. L. (2019). Aplicaciones de la espectrometría de masas Maldi-tof en Microbiología Clínica. En E. Cercenado Mansilla & R. Cantón Moreno (Eds.), *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Servicio de Microbiología.
- Osthoff, M., Gürtler, N., Bassetti, S., Balestra, G., Marsch, S., Pargger, H., Weisser, M., & Egli, A. (2017). Impact of maldi-tof MS based identification directly from positive blood cultures on patient management: a controlled clinical trial. *Clinical Microbiology and Infection*, 23(2), 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.08.009>
- Organización Mundial de la Salud. (2014). *Enfermedades Infecciosas*, recuperado de: [https://www.who.int/topics/infectious\\_diseases/es/](https://www.who.int/topics/infectious_diseases/es/)
- Sauer, S., & Kliem, M. (2010). Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 74–82. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2243>
- Santos, C., Paterson, R. R. M., Venancio, A., & Lima, N. (2010). Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), 375–385. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04448.x>

- Scola, B., & Raoult, D. (2009). Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Plos One*, *4*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008041>
- Schmidt, V., Jarosch, A., März, P., Sander, C., Vacata, V., & Kalka-Moll, W. (2011). Rapid identification of bacteria in positive blood culture by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *31*(3), 311–317. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1312-0>
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015). Maldi-tof mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, *6*(791). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
- Szabados, F., Michels, M., Kaase, M., & Gatermann, S. (2011). The sensitivity of direct identification from positive blood culture bottles by matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry is low. *Journal Clinical Microbiology and Infectology*, *17*(2), 192-195. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03229.x>
- Verroken, A., Defourny, L., le Polain de Waroux, O., Belkhir, L., Laterre, P. F., Delmée, M., & Glupczynski, Y. (2016). Clinical impact of Maldi-tof MS identification and rapid susceptibility testing on adequate antimicrobial treatment in sepsis with positive blood cultures. *PloS One*, *11*(5), e0156299. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156299>
- Zabbe, J. B., Zanardo, L., Mégraud, F., & Bessède, E. (2015). Maldi-tof mass spectrometry for early identification of bacteria grown in blood culture bottles. *Journal of Microbiological Methods*, *115*, 42-46. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.04.009>

Zárate, M. S., Romano, V., Nievas, J., & Smayevsky, J. (2014). Utilidad de la espectrometría de masas Maldi-tof en la identificación microbiana anaeróbica. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(2), 98-102. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70055-0](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70055-0)

## XII. ANEXOS

### Anexo 1

#### *Cálculo de muestra (n).*

Debe de tenerse en cuenta los siguientes parámetros:

- El número de muestras a evaluar debe establecerse en base a la prevalencia esperada (muestras confirmadas con cultivo).
- Utilizar un nivel de confianza al 95%.
- Utilizar un límite de error igual al 4%.

La fórmula para el cálculo de muestras a evaluar es:

$$n = (NC^2 * \hat{p} * \hat{q}) / \Delta^2$$

- $NC = \text{Nivel de confianza (95\%)} = 1.96.$
- $\hat{p} * \hat{q} = (\text{prevalencia} * \text{complemento}).$
- $\Delta = \text{Límite de error} = 0.04.$

**Anexo 2***Cálculo de parámetros estadísticos (Vitek vs Maldi-tof Cultivo)*

	Tiempo Vitek	Tiempo Maldi – tof cultivo
Media	157.2117762	113.5839838
Varianza	2714.485308	1216.134387
Observaciones	799	799
Coeficiente de correlación de Pearson	-0.032337042	
Diferencia hipotética de las medias	24	
Grados de libertad	798	
Estadístico t	18.28501267	
<b>P(T&lt;=t) una cola</b>	<b>5.96365E-63</b>	
<b>Valor crítico de t (una cola)</b>	<b>1.646765344</b>	

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

**Anexo 3**

*Cálculo de parámetros estadísticos (Maldi-tof cultivo vs Maldi-tof muestra directa).*

	Tiempo (Maldi-tof cultivo puro)	Tiempo (Maldi-tof muestras directas).
Media	113.5839838	64.88802315
Varianza	1216.453822	255.2078155
Observaciones	240	240
Coefficiente de correlación de Pearson	0.140243413	
Diferencia hipotética de las medias	24	
Grados de libertad	239	
Estadístico t	10.54886872	
<b>P(T&lt;=t) una cola</b>	<b>6.57034E-22</b>	
<b>Valor crítico de t (una cola)</b>	<b>1.651254165</b>	

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

## Anexo 4

### Caracterización microbiológica por familias según la reacción a la tinción de Gram

#### COCOS GRAM POSITIVO

- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus epidermidis*.
- *Staphylococcus hominis*.
- *Staphylococcus haemolyticum*.
- *Staphylococcus lugdunensis*.
- *Staphylococcus saprophyticus*.
- *Micrococcus*.
- *Stomatococcus*.
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus pneumoniae*.
- *Streptococcus del grupo viridans*:
- *S. mutans*.
- *S. sanguis*.
- *S. mitis*.
- *S. salivarius*.
- *S. Anginosus*.
- *Streptococcus bovis*.
- *Streptococcus milleri*.
- *Streptococcus anaerobios*.
- *E. faecalis*.
- *E. faecium*.
- *E. gallinarum*.
- *E. raffinosus*.
- *E. casseliflavus*.
- *Pediococcus*.
- *Leuconostoc*.
- *Stomatoccus*.
- *Gemella*.
- *Aerococcus*.
- *Lactococcus*.

#### BACILOS GRAM POSITIVOS

- *B. anthracis*.
- *B. cereus*.
- *C. diphtheriae*.
- *C. ulcerans*.
- *C. pseudotuberculosis*.
- *C. jeikeium*.
- *C. ureolyticum*.
- *C. amycolatum: idem al anterior*.
- *N. brasiliensis*.
- *N. otitidis caviarum*.
- *Rhodococcus*.
- *R. equi*.

- *Gordona*.
- *Tsukamurella*.
- *Actinomadura*.
- *Streptomyces somaliensis*.
- *Tropheryma whippelii*.
- *Listeria monocytogenes*.
- *Lactobacillus*.
- *Erysipelothrix rhusiopathiae*.
- *Anaerobios*
- *Clostridium*.
- *Actinomyces*

#### COCOS GRAM NEGATIVOS

- *Neisseria*.
- *N. gonorrhoeae*.
- *N. meningitidis*.
- *Moraxella*.
- *M. catarrhalis*.

#### BACILOS GRAM NEGATIVOS

##### FERMENTADORES

- *Escherichia coli*.
- *Klebsiella*.
- *Salmonella*:
- *S. typhi*.
- *S. paratyphi A y B*.
- *S. choleraesuis*.
- *S. typhimurium*.
- *S. enteritidis*.
- *Shigella*.
- *Proteus mirabilis*.
- *Serratia marcescens*.
- *Citrobacter*.
- *Enterobacter*.
- *Providencia*.
- *Morganella*.
- *Yersinia*.
- *Edwardsella*.
- *V. cholerae*.
- *V. mimicus*.
- *V. damsela*.
- *Plesiomonas shigelloides*.
- *Aeromonas*.

**NO FERMENTADORES**

- *P. aeruginosa*.
- *P. fluorescens*.
- *P. putida*.
- *Burkholderia*:
- *B. cepacia*.
- *B. pseudomallei*.
- *Stenotrophomonas maltophilia*.
- *Acinetobacter baumannii*.
- *Legionella pneumophila*.
- *Francisella tularensis*.
- *Gardnerella vaginalis*.
- *Pasteurella*.
- *P. multocida*.
- *Bartonella*.
- *Bordetella*
- *B. pertussis*.
- *B. parapertussis*.
- *B. bronchiseptica*.
- *Brucella*:
- *B. melitensis*.
- *B. abortus*.
- *B. suis*.
- *B. canis*.
- *Haemophilus*:
- *H. influenzae*.

- *H. parainfluenzae*.
- *H. aegyoticus*.
- *H. haemolyticus*.
- *H. parahaemolyticus*.
- *H. ducreyi*.
- *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.
- *Cardiobacterium hominis*.
- *Kingella kingae*.
- *Eikenella corrodens*.
- *Haemophilus aphrophilus*.
- *Streptobacillus moniliformis*.
- *Calymmatobacterium granulomatis*.

**MICROORGANISMOS GRAM VARIABLES  
(LEVADURAS Y OTROS).**

- *Micobacterium* (bacilos acidoalcoholresistentes o BAAR).
- *Treponemas* (espirales).
- *Leptospira*(espirales).
- *Borrellia* (espirales).
- *Micoplasma* (sin pared celular).
- *Rickettsia* (bacterias intracelulares).
- *Coxiella* (bacterias intracelulares).
- *Chlamydia* (bacterias intracelulares).

**Anexo 5**

*Aprobación de anteproyecto y uso de datos por parte del Laboratorio Clínico del Hospital General San Juan de Dios*

**HOSPITAL GENERAL "SAN JUAN DE DIOS"  
COMITÉ DE INVESTIGACION  
REGISTRO DE INVESTIGACION**

No.

DATOS GENERALES: Barrera Toledo, Juan Carlos Apellido  
1 Apellido 2 Nombres

TELÉFONO: 4255-7164

TITULO: Eficacia en la reducción de tiempo en el diagnóstico microbiológico de hemocultivos positivos utilizando espectrofotometría de masas y/o proteómica (MALDI - TOF).

TIPO DE INVESTIGACION: Observacional Experimental

Departamento:

- |                                   |                              |                                |
|-----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| 1. Anestesiología                 | 8. Neurología                | 15. Farmacia                   |
| 2. Cirugía                        | 9. Ortopedia y Traumatología | 16. <u>Laboratorio Clínico</u> |
| 3. Cuidados Intensivos de Adultos | 10. Pediatría                | 17. Nutrición                  |
| 4. Emergencia de Adultos          | 11. Radiología               | 18. Psicología                 |
| 5. Ginecología y Obstetricia      | 12. Consulta Externa         | 19. Trabajo Social             |
| 6. Medicina                       | 13. Patología                | 20. Otros                      |
| 7. Neurocirugía                   | 14. Enfermería               |                                |

Nivel: 1. Pre-grado Universidad: USAC  
 2. Post-grado UFM Facultad: Ciencias Médicas 3.  
 Otras UVG OTRAS: \_\_\_\_\_  
 UMG

**UNICAMENTE PARA ESTUDIOS DE TESIS**  
 Asesor: PhD. Mirna Vásquez/ PhD. Edith Obregón/ Licda. Laura Valenzuela /Lic. César Conde  
 Revisor: PhD. Elisa Hernández

Firma y Sello de Jefe del Depto: \_\_\_\_\_  
 Firma y Sello de Jefe del Depto: \_\_\_\_\_

Firma y Sello del Representante del Sub-Comité \_\_\_\_\_  
 Vo. Bo. Coordinador del Comité de Investigación \_\_\_\_\_

**PARA USO EXCLUSIVO DEL DEPARTAMENTO DE DOCENCIA E INVESTIGACION**

Fecha de Aprobación de Tema 10 / 5 / 2018  
 Fecha de Aprobación de Proyecto: \_\_\_\_\_  
 Fecha de Aprobación de Informe Final: \_\_\_\_\_

**Anexo 6**

*Aprobación de Protocolo de Investigación por Comité de Investigación del HGSJDD.*

**Hospital General "San Juan de Dios"  
Guatemala, C.A.**

Oficio CI-546/2,018

22 de noviembre de 2018

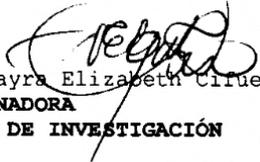
Master  
Juan Carlos Barrera Toledo  
Estudiante de Doctorado en  
Ciencias Biomédicas  
Facultad de Ciencias Médicas  
Universidad de San Carlos de  
Guatemala

Master Barrera:

El Comité de Investigación de este Centro Asistencial, le informa que el Protocolo de la Investigación titulada: **"EFICIENCIA EN LA REDUCCIÓN DEL TIEMPO, UTILIZANDO EL MÉTODO MALDI - TOF VS EL MÉTODO VITEK EN LA IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA RUTINARIA DE HEMOCULTIVOS"**, ha sido aprobado para su ejecución con la condición que los costos de los materiales corran por cuenta del interesado.

Atentamente,



  
Dra. Mayra Elizabeth Cifuentes Alvarado  
COORDINADORA  
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

c.c. archivo

Julia

Teléfonos Planta 2321-9191 ext. 6015  
Teléfono Directo 2321-9125  
Correo electrónico [comiteinvestigacionhospigen@gmail.com](mailto:comiteinvestigacionhospigen@gmail.com)

Anexo 7

Aprobación de Protocolo de Investigación por Facultad de Ciencias Médicas y Escuela de Estudios de Postgrado.



ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

# Facultad de Ciencias Médicas Universidad de San Carlos de Guatemala

TRANS.A06.CA.EEP.083-2018  
Guatemala, 23 de agosto de 2018

Señores  
Junta Directiva  
Facultad de Ciencias Médicas  
Centro Universitario Metropolitano  
Presente

Señores:

Para su conocimiento y efectos correspondiente transcribo el **PUNTO TERCERO, INCISO 3.1, 3.2 y 3.3 del Acta 06/2018, del CONSEJO ACADÉMICO**, de sesión ordinaria celebrada el 09 de agosto de 2018.

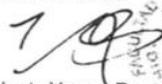
**TERCERO:** El Doctor Carlos Humberto Vargas Reyes MSc., Director de la Escuela de Estudios de Postgrado, a través de **PROV.DIR.EEP.113-2018** traslada oficio **Ref.DOC.CIB.0102.2018** suscrito por la Doctora Elisa Hernández de Rodas, Coordinadora del Doctorado de Ciencias Biomédicas, por medio del cual traslada 17 Protocolos de Investigación de la Tesis Doctoral, para la aprobación por parte del Consejo Académico de la Escuela de Estudios de Postgrado, trabajos realizados en el Seminario de Investigación I y II de los estudiantes del Doctorado en Ciencias Biomédicas.

**EL CONSEJO ACADÉMICO, ACUERDA:**

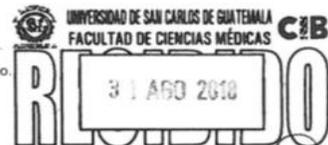
- 3.1 **APROBAR** los 17 Protocolos de Investigación de la Tesis Doctoral, para la aprobación por parte del Consejo Académico de la Escuela de Estudios de Postgrado, trabajos realizados en el Seminario de Investigación I y II de los estudiantes del Doctorado en Ciencias Biomédicas.
- 3.2 **NOTIFICAR** a la Dra. Elisa Hernández de Rodas, Coordinadora del Doctorado de Ciencias Biomédicas y trasladar los 17 protocolos de Investigación de la Tesis Doctoral.
- 3.3 **TRASLADAR** a la Honorable Junta Directiva de la Facultad de Ciencias Médicas, para su conocimiento.

Atentamente,

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

  
Dr. Carlos Humberto Vargas Reyes MSc.  
Director  
Escuela Estudios de Postgrado

Adjunto 2 folios  
Dra. Elisa Hernández de Rodas, Coordinadora del Doctorado de Ciencias Biomédicas: Archivo.  
CHVR/icsp



2ª. Avenida 12-40, Zona 1, Guatemala, Guatemala  
Tel. 2230-2000

Nº. de Folio: \_\_\_\_\_ Hora: 12:27 Firma: \_\_\_\_\_

**Anexo 8**

*Aprobación de Informe Final de Investigación por Comité de Investigación del HGSJDD*

**Hospital General "San Juan de Dios"  
Guatemala, C.A.**

Oficio CI-005/2,020

7 de enero de 2,020

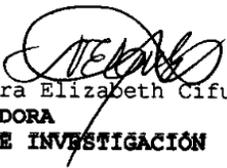
Máster  
Juan Carlos Barrera Toledo  
Estudiante de Doctorado en  
Ciencias Biomédicas  
Facultad de Ciencias Médicas  
Universidad de San Carlos de  
Guatemala

Máster Barrera:

El Comité de Investigación de este Centro Asistencial, le comunica que el Informe Final de la Investigación titulada: **"EFICIENCIA EN LA REDUCCIÓN DEL TIEMPO, UTILIZANDO EL MÉTODO MALDI - TOF VS EL MÉTODO VITEK EN LA IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA RUTINARIA DE HEMOCULTIVOS"**, ha sido aprobado para su impresión y divulgación.

Atentamente,



  
Dra. Mayra Elizabeth Cifuentes Alvarado  
COORDINADORA  
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

c.c. archivo

Julia

Teléfonos Planta 2321-9191 ext. 6015  
Teléfono Directo 2321-9125  
Correo electrónico [comiteinvestigacionhospigen@gmail.com](mailto:comiteinvestigacionhospigen@gmail.com)

Anexo 9

Carta de Comité de ética e investigación

**ZUGUEME**

COMITE ETICA INDEPENDIENTE  
3ª CALLE 11-36 ZONA 15, COLONIA TECUN UMAN  
TEL-FAX. (502) 23 69 1885  
e-mail: [comitedeticazuquma@gmail.com](mailto:comitedeticazuquma@gmail.com) [www.zugume.org](http://www.zugume.org)  
GUATEMALA, GUATEMALA 01015

OFZU1201-20

Guatemala 05 septiembre 2020

MSc.  
**JUAN CARLOS BARRERA TOLEDO**  
Investigador Principal

MSc. Barrera:

Por este medio le informamos que en sesión celebrada por este Comité el día 02 septiembre 2020, se discutió el EFICIENCIA EN LA REDUCCIÓN DEL TIEMPO, UTILIZANDO EL MÉTODO MALDI - TOF VS EL MÉTODO VITEK EN LA IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA RUTINARIA DE HEMOCULTIVOS, tomando en cuenta la Pauta 10 CIOMS 2018 que indica la dispensa de consentimiento informado:

"Un comité de ética de la Investigación puede conceder una exención del requisito de consentimiento informado si está convencido de que la investigación:

- a) no sería factible o viable sin dicha exención,
- b) tiene un valor social importante y
- c) entraña apenas riesgos mínimos para los participantes"

Consideramos que el estudio fue realizado en muestras que fueron solicitadas por el personal médico, y solamente se aplicó una nueva técnica para su procesamiento. Esto no conllevó ningún riesgo para el paciente, tiene un valor social importante y el investigador no tuvo ningún contacto con el paciente, por lo que cumple con las condiciones para dispensa de consentimiento informado.

Atentamente,

  
Dra. Ligia Urizar  
Secretaria

c.c. archivo

**ZUGUEME**  
COMITE ETICA INDEPENDIENTE  
GUATEMALA, C. A.

## Anexo 10

### *Carta de finalización de trabajo de tesis y aprobación para inicio de proceso de defensa de tesis (USAC)*

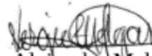
Guatemala, 13 de octubre de 2020

Dra. Elisa del Carmen Hernández de Rodas  
Coordinadora  
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas  
Facultad de Ciencias Médicas  
presente

Estimada Dra. Hernández de Rodas:

Sea la presente portadora de cordiales saludos. Me dirijo a Ud. en esta oportunidad para comunicarle que he revisado la tesis del MSc. Juan Carlos Barrera Toledo, estudiante del Doctorado en Ciencias Biomédicas, titulada “EFICACIA EN LA REDUCCION DE TIEMPO, UTILIZANDO EL METODO MALDI-TOF VS EL METODO VITEK EN LA IDENTIFICACION MICROBIOLOGICA RUTINARIA DE HEMACULTIVOS”. Me permito también informar que ya el trabajo de tesis se ha concluido y el MSc. Barrera puede proceder a la defensa de su tesis.

Sin otro particular, me suscribo,



PhD. Sergio Alejandro Melgar Valladares  
Tutor del Programa de  
Doctorado en Ciencias Biomédicas,

cc. MSc. Juan Carlos Barrera Toledo

Anexo 11

Carta de finalización de trabajo de tesis y aprobación para inicio de proceso de defensa de tesis (USAC)



**Facultad de Ciencias Médicas**  
**Universidad de San Carlos de Guatemala**

El PhD. **Sergio Alejandro Melgar Valladares**, profesor Titular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, de la Universidad de San Carlos de Guatemala

**CERTIFICA:**

Que el estudiante del Doctorado en Ciencias Biomédicas JUAN CARLOS BARRERA TOLEDO carnet. 200810265. Ha realizado bajo su dirección el trabajo de tesis titulado: "EFICACIA EN LA REDUCCION DEL TIEMPO UTILIZANDO LA TECNICA MALDI-TOF VS EL METODO VITEK EN LA IDENTIFICACION MICROBIOLÓGICA RUTINARIA DE HEMOCULTIVOS" y que a mi juicio reúne las condiciones para optar al grado de Doctor.

Se extiende la presente certificación a los 16 días del mes de octubre de 2020.

PhD. Sergio Alejandro Melgar Valladares

Lic. Sergio Alejandro Melgar Valladares  
BIOLOGO  
COLEGIADO No. 1450

**Anexo 12**

*Carta de finalización de trabajo de tesis y aprobación para inicio de proceso de defensa de tesis (UDG)*



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

IICB/017/2020

**DRA. ELISA DEL CARMEN HERNANDEZ DE RODAS**  
**COORDINADORA DEL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**  
**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**PRESENTE.**

Por medio de la presente reciba cordiales saludos y al mismo tiempo notifico a usted que el alumno **MSc. Juan Carlos Barrera Toledo** ha concluido su trabajo de tesis doctoral titulado "EFICIENCIA EN LA REDUCCIÓN DEL TIEMPO, UTILIZANDO EL MÉTODO MALDI-TOF VS EL MÉTODO VITEK EN LA IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA RUTINARIA DE HEMOCULTIVOS".

Juan Carlos se encuentra listo para presentar la defensa del grado de Doctorado una vez que concluya los trámites administrativos correspondientes.

Sin más por el momento me despido y quedo en espera de cualquier duda al respecto.

**Atentamente**  
**"Piensa y Trabaja"**

**Año de la Transición Energética en la Universidad de Guadalajara**  
**Guadalajara, Jalisco a 13 de octubre de 2020**



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
Centro Universitario de Ciencias de la Salud  
**IICB**  
**Dra. Edith Oregon Romero**  
**Coordinadora del Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad de Guadalajara**  
**Tutor del Doctorado en Ciencias Biomédicas USAC**

c.c.p. archivo

**Anexo 13**

*Constancia de aprobación de referencias bibliográficas por Biblioteca y centro de documentación Dr. Julio de León Méndez.*



**Universidad de San Carlos de Guatemala**  
**Facultad de Ciencias Médicas**  
**Biblioteca y Centro de documentación**  
**"Dr. Julio de León Méndez"**



**Constancia digital de aprobación de referencias bibliográficas**

<b>Fecha de entrega:</b> 26/05/2021	<b>Grado a obtener:</b> Doctor en Ciencias Biomédicas (Doctorado)	
<b>Eficiencia en la reducción del tiempo, utilizando el método MALDI-tof vs el método Vitek en la identificación microbiológica rutinaria de hemocultivos.</b>		
<b>Autor - DPI:</b> 1697092640101	<b>Autor - Registro E.:</b> 200810265	<b>Autor :</b> Juan Carlos Barrera Toledo
<b>Bibliotecario que revisó las referencias:</b> Alba Dely Ramos Méndez		
<b>Asesor:</b> Sergio Alejandro Melgár Valladares, Edith Oregon Romero		

**ADMINISTRACIÓN DE BIBLIOTECA**

**NOTA:** Esta es una constancia de que se le revisaron y aprobaron las referencias bibliográficas del trabajo de graduación mencionado.



Para verificar que la siguiente constancia es emitida por la Biblioteca y sus datos estén correctos escanea el código QR o ingresa al siguiente enlace:  
<http://bibliomed.usac.edu.gt/constancia/verificar.php?ad=3&red=99ff7&id=464&cod=0b8d6>

## Anexo 14

Primera publicación, realizada en la revista científica del colegio de Médicos y Cirujanos de Guatemala.

Revista Médica Gt, Colmedegua, Vol. 158 Núm. 2 2019 ISSN: 2074-7004, e-ISSN: 2664-3667

### Reducción del tiempo de respuesta en el diagnóstico microbiológico rutinario de hemocultivos. Reduction of response time in routine microbiological diagnosis of blood cultures.

Juan Barrera<sup>(1,2)</sup>, Sergio Melgar<sup>(2)</sup>, Edith Oregón<sup>(3)</sup>, Elisa Hernández<sup>(2)</sup>

- 1 Departamento de Laboratorio Clínico, Hospital General San Juan de Dios, Guatemala.
- 2 Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- 3 Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, México.

Correspondencia: Dr. Juan Carlos Barrera Toledo [juanc.7barrera@hotmail.com](mailto:juanc.7barrera@hotmail.com)  
Recibido: 13-11-2019 Aceptado: 20-11-2019

#### Resumen

*El presente estudio tuvo por objetivo cuantificar la reducción del tiempo en el diagnóstico microbiológico rutinario de hemocultivos positivos, utilizando para ello 240 muestras provenientes de pacientes que se encontraban en los diferentes servicios del Hospital General San Juan de Dios (HGSJDD), dichas muestras fueron identificadas utilizando tanto el método Vitek como el método Maldi-tof, obteniéndose resultados favorables en cuanto a la reducción de respuesta diagnóstica a favor de la tecnología Maldi-tof.*

**Palabras clave:** *microbiología, espectrometría de masas, septicemia*

#### Abstract

*The objective of this study was to quantify the reduction of time in the routine microbiological diagnosis of positive blood cultures, to detect 240 samples from patients in the different services of the San Juan de Dios General Hospital (HGSJDD), the samples were identified using both the Vitek method and the Maldi-tof method, obtaining*

*favorable results in terms of reducing diagnostic response in favor of Maldi-tof technology*

**Keywords:** *microbiology, mass spectrometry, septicemia*

#### Introducción

Septicemia se define como la enfermedad infecciosa generalizada debido a la existencia de un foco infeccioso en el interior del cuerpo, en el cual se encuentran microorganismos en el torrente sanguíneo y como consecuencia se presentan un sinnúmero de síntomas que provocan la muerte del paciente.<sup>(1)</sup> El diagnóstico microbiológico de septicemias se realiza por medio del análisis de hemocultivos,<sup>(2)</sup> los cuales actualmente requieren un promedio de cinco a siete días para brindar un diagnóstico certero.<sup>(3)</sup> La identificación de microorganismos en el laboratorio se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante distintas pruebas.<sup>(4)</sup> Dentro de las pruebas bioquímicas utilizadas se encuentra el método Vitek. Este usa tarjetas con reactivos colorimétricos, que son inoculadas con una suspensión de cultivo

## Anexo 15

Segunda publicación, realizada en la revista de *Ciencia Tecnología y Salud (CTS)*,  
*Universidad de San Carlos de Guatemala*.



---

# Ciencia, Tecnología y Salud

---

Revista Centroamericana de Investigación y Postgrado  
Universidad de San Carlos de Guatemala

El infrascrito co-editor de la Revista *Ciencia, Tecnología y Salud*, hace constar que

## Juan Carlos Barrera Toledo

Ingresó un manuscrito a la revista titulado: Diseño, estandarización e implementación de una nueva técnica para el diagnóstico rápido de hemocultivos positivos, utilizando la tecnología Maldi-tof en Guatemala con el número 905 y se encuentra aprobado para su publicación en el volumen 8, número 1. Se extiende la siguiente para usos de la interesada.

Guatemala, 13 de noviembre 2020

*"Id y enseñad a todos"*