DESCRIPCIÓN DEL ANÁLISIS MICROBOLÓGICO REALIZADO MEDIANTE MALDI-TOF EN MUESTRAS DE LA FUNDACIÓN SANTA FE DE BOGOTÁ.

Fredy Orlando Guevara Pulido

Especialista en Medicina Interna

Especialista en Infectología

Christian René Parra Moreno

Residente Medicina Crítica y cuidado intensivo

Universidad Del Rosario

José Nicolás Rojas Montenegro

Residente Medicina crítica y cuidado intensivo

Universidad Del Rosario

Universidad Colegio Mayor De Nuestra Señora Del Rosario
Facultad De Ciencias De La Salud
Hospital Universitario Fundación Santa Fe De Bogotá
Medicina Critica Y Cuidado Intensivo
Bogotá D.C, Junio 2016

DESCRIPCIÓN DEL ANÁLISIS MICROBOLÓGICO REALIZADO MEDIANTE MALDI-TOF EN MUESTRAS DE LA FUNDACIÓN SANTA FE DE BOGOTÁ.

Hospital Universitario Fundación Santa Fe de Bogotá

Investigación en Posgrados de Medicina

Autores:

CHRISTIAN RENE PARRA MORENO
Médico – Universidad del Tolima.
Residente institucional medicina crítica y cuidado intensivo, universidad del rosario.
Autor principal.
hackers182@hotmail.com

JOSÉ NICOLÁS ROJAS MONTENEGRO
Médico cirujano – Universidad el Bosque.
Residente institucional medicina crítica y cuidado intensivo, universidad del rosario.
Autor principal.
dr.nicolas.rojas@hotmail.com

TUTOR TEMÁTICO:
DR. FREDY ORLANDO GUEVARA PULIDO.
Médico Cirujano.
Especialista en Medicina Interna - Universidad El Bosque.
Subespecialidad en Infectología – Universidad Nacional de Colombia.
Infectólogo Grupo de Infectología Crítica y Trasplantes Hospital Universitario Fundación Santa Fe de Bogotá.
Investigador principal
freddyorlando79@gmail.com

ASESOR METODOLÓGICO:
DR. JORGE CARRIZOSA GONZALEZ.
Médico Universidad del Tolima y Epidemiólogo Universidad del Tolima – Universidad de Antioquia.
Residente institucional medicina crítica y cuidado intensivo, Universidad del Rosario.
magnusdronjak@hotmail.com

“La Universidad del Rosario no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

AGRADECIMIENTOS

Laboratorio Clínico Hospital Universitario Fundación Santa Fe de Bogotá.

DEDICATORIA

“A nuestros padres quienes con tanto esfuerzo han logrado que nuestros sueños sigan adelante”

TABLA DE CONTENIDO

PAG.

RESUMEN 10

INTRODUCCION 14

1. Problema de investigación. 16
2. Justificación. 17
3. Pregunta de investigación 18
4. Marco teórico. 19
5. Objetivos. 23
   - 5.1 Objetivo general. 23
   - 5.2 Objetivos específicos. 23
6. Metodología. 24
   - 6.1 Tipo de estudio. 24
   - 6.2 Muestra. 24
   - 6.3 Población Objetivo. 24
   - 6.4 Población de estudio. 24
   - 6.5.1 Criterios de inclusión. 24
   - 6.5.2 Criterios de exclusión. 24
   - 6.6 Descripción de variables. 24
   - 6.7 Análisis de MALDI-TOF MS. 25
   - 6.8 Información recolectada. 26
   - 6.9 Sesgos y limitaciones 26
   - 6.10 Análisis estadístico. 26
7. Consideraciones éticas. 27
8. Cronograma. 28
9. Presupuesto. 29
10. Resultados y análisis. 31
11. Discusión 34
12. Conclusiones y recomendaciones 36
13. Referencias bibliográficas 37
14. Anexos 40

LISTA DE TABLAS Y GRÁFICAS

PAG.

Tabla 1. Variables de estudio. 25

Tabla 2. Cronograma. 28

Tabla 3. Presupuesto global por fuentes de financiación. 29

Tabla 4. Descripción y cuantificación de los equipos de uso propio. 29

Tabla 5. Descripción del software. 29

Tabla 6. Materiales y suministros. 30

Tabla 7. Porcentajes de concordancia de aislamientos MALDI-TOF MS y VITEK II. 33

Tabla 8. Discordancias obtenidas por identificación MALDI-TOF MS vs VITEK II. 33

Gráfica 1. Porcentajes de distribución según el tipo de cultivo. 31

Gráfica 2. Porcentajes de distribución según aislamiento. 32

LISTA DE ANEXOS

Anexo1. Totalidad de muestras correlacionadas en MALDI –TOF MS y VITEK 2.

LISTA DE SIGLAS

MALDI-TOF MS: (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectometry) ó espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo.

MS: espectrometría de masas

UCI: Unidad de cuidado intensivo.

BacT/ALERT: Es una marca registrada de biomerieux; es un sistema automatizado que incuba, agita y monitoriza los frascos de hemocultivos para detectar crecimiento microbiano.

DESCRIPCIÓN DEL ANÁLISIS MICROBOLÓGICO REALIZADO MEDIANTE MALDI-TOF EN MUESTRAS DE LA FUNDACIÓN SANTA FE DE BOGOTÁ.

RESUMEN

Introducción:

La rápida detección e identificación bacteriana es fundamental para el manejo de los pacientes críticos que presentan una patología infecciosa, esto requiere de métodos rápidos y exactos para el inicio de un correcto tratamiento. En Colombia se usan pruebas microbiología convencional. No hay estudios de espectrofotometría de masas en análisis de muestras de pacientes críticos en Colombia.

Objetivo general:

Describir la experiencia del análisis microbiológico mediante la tecnología MALDI-TOF MS en muestras tomadas en la Fundación Santa Fe de Bogotá.

Materiales y Métodos:

Entre junio y julio de 2013, se analizaron 147 aislamientos bacterianos de muestras clínicas, las cuales fueron procesadas previamente por medio del sistema VITEK II. Los aislamientos correspondieron a 88 hemocultivos (60%), 28 urocultivos (19%), y otros cultivos 31 (21%).

Resultados:

Se obtuvieron 147 aislamientos con identificación adecuada a nivel de género y/o especie así: en el 88.4% (130 muestras) a nivel de género y especie, con una concordancia del 100% comparado con el sistema VITEK II. El porcentaje de identificación fue de 66% en el grupo de bacilos gram negativos no fermentadores, 96% en enterobacterias, 100% en gérmenes fastidiosos, 92% en cocos gram positivos, 100% bacilos gram negativos móviles y 100% en levaduras. No se encontró ninguna concordancia en bacilos gram positivos y gérmenes del genero *Aggregatibacter*.

Conclusiones:

El MALDI-TOF es una prueba rápida para la identificación microbiológica de género y especie que concuerda con los resultados obtenidos de manera convencional.

Faltan estudios para hacer del MALDI-TOF MS la prueba oro en identificación de gérmenes.

Palabras Clave: *MALDI – TOF MS, VITEK II, identificación bacteriana*.

DESCRIPTION OF MICROBIOLOGICAL ANALYSIS BY MALDI-TOF MADE IN SAMPLES OF THE FOUNDATION SANTA FE DE BOGOTA.

ABSTRACT

Introduction:

Rapid detection and bacterial identification is essential for the management of critically ill patients who have an infectious disease, this requires quick and accurate for the start of proper treatment methods. In Colombia conventional microbiology tests are used. No studies mass spectrometry analysis of samples in critically ill patients in Colombia.

Objective:

Describe the experience of microbiological analysis by MALDI-TOF MS in samples taken at the Santa Fe de Bogota Foundation technology.

Materials and Methods:

Between June and July 2013, 147 bacterial isolates from clinical samples, which were previously processed by the VITEK IIsystem were analyzed. 88 isolates were blood cultures (60%), 28 urine cultures (19%), and other crops 31 (21%).

Results:

Of the 147 isolates obtained proper identification to genus and / or species as follows: 88.4% in (130 samples) to genus and species, with a correlation of 100% compared to the VITEK II system. The identification percentage was 66% in gram negative bacilli group nonfermenting, 96% in Enterobacteriaceae, 100% in fastidious bacteria, 92% in gram-positive cocci, gram-negative bacilli 100% and 100% mobile yeast. There was no correlation in gram-positive bacilli and germs of the genus *Aggregatibacter*.

Conclusions:

The MALDI-TOF MS is a quick and easy for microbiological identification of genus and species which correlates with results obtained conventionally test. There are no studies to make the MALDI-TOF MS gold proof identification of germs.

Keywords: *MALDI – TOF MS, VITEK II, bacterial identification.*

INTRODUCCIÓN

MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectometry) ó espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo, es una técnica se utiliza comúnmente en la biología y estudios clínicos para la búsqueda de nuevos marcadores potenciales asociados con condiciones patológicas (1).

En la última década se ha vuelto una herramienta popular y se ha incrementado su uso de manera exponencial, a pesar de la preparación de la muestra y el procesamiento de datos.

La identificación rápida de microorganismos causantes de bacteriemia es crucial para el manejo del paciente y el tratamiento. El crecimiento y la recuperación de los microorganismos a partir de cultivos de sangre se facilita mucho por sistemas automatizados que supervisan los organismos que proliferan hasta que se puede detectar el crecimiento microbiano significativo. identificaciones preliminares se pueden hacer de la tinción de Gram, pero la identificación del organismo definitiva se logra a través de un repique en un medio nutritivo sólido lo cual puede retrasar la identificación y el manejo, la espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo se puede utilizar para identificar el organismo de una manera rápida y con una efectividad muy alta (2). Los retrasos en la identificación obstaculizan la capacidad del médico para optimizar la terapia antiinfecciosa, lo que podría exponer a los pacientes a una terapia poco efectiva o la exposición excesiva a un antiinfeccioso de amplio espectro aumentando problemas de toxicidad e inducción de resistencia antimicrobiana.

Estudios recientes han encontrado que la rápida y precisa identificación de microorganismos patógenos se asocia con menor mortalidad de los pacientes, reducción del tiempo de hospitalización, menores tasas de bacteriemia recurrente y por lo tanto disminución en los costos de hospitalización (2,3,4).

En la literatura se han reportado protocolos en los cuales MALDI-TOF MS puede ser usado con muestras tomadas directamente de hemocultivos previamente positivos, eliminando el

requisito que tienen otros métodos como lo son el crecimiento de colonias puras en medios sólidos, aunque no existe total validación clínica en estos casos. (5).

Sin embargo, el costo del equipo de MALDI-TOF MS y los kits para preparación de las muestras lo convierten en una opción costosa y limitada para la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica del país, Actualmente no existe consenso en cuanto a qué método debe integrarse en los laboratorios de microbiología clínica. MALDI-TOF MS surge como una opción de identificación rápida y efectiva (6).

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.

La sepsis como síndrome de fisiológico y patológicos de anomalías bioquímicas inducidas por la infección, es un importante problema de salud pública, una de sus principales vías de detección es la toma de hemocultivos, en los últimos años a nivel mundial se ha reportado un cambio en la epidemiología de los aislamientos de importancia clínica, presentando un perfil de resistencia a los principales antibióticos de uso clínico e incluso a aquellos de uso restringido o limitado como cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos como ertapenem y meropenem, sumado a la demora en identificación del foco de infección y el agente causal, lo que puede suponer un aumento a la exposición a terapia antiinfecciosa ineficaz o exposición excesiva a un antiinfeccioso de amplio espectro (7).

Esta patología afecta principalmente a pacientes que presentan antecedentes clínicos de importancia como enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diabetes mellitus, alcohólicos, neonatos, hospitalizaciones prolongadas y estancias en UCI.

Después de la publicación de los primeros informes científicos en los mediados de los noventa sobre la técnica de MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectometry) ó espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo y el aumento en el número de estudios de seguimiento de proveedores comerciales comenzaron a adaptar esta técnica a las demandas de los laboratorios de diagnóstico clínico (8).

En el último par de años, los equipos MALDI-TOF MS permitieron una disponibilidad comercial e identificación microbiana de calidad y rapidez en el ámbito de un laboratorio de microbiología clínica.

El fenómeno reciente de la resistencia hace de vital importancia, el pronto diagnóstico, manejo oportuno y adecuado de las infecciones hospitalarias. Pero existe un gran obstáculo en el manejo de estas infecciones, como lo es la demora en el diagnóstico, surgiendo MALDI-TOF MS como una opción que podría disminuir el tiempo diagnóstico y la estancia hospitalaria, disminuyendo indirectamente costos de hospitalización (9).

2. JUSTIFICACIÓN

La espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo MALDI-TOF, se puede aplicar a muestras biológicas con una preparación mínima. La muestra preparada se mezcla con un compuesto de bajo peso molecular que absorbe fuertemente la luz láser, pero es estable en presencia de muestras biológicas.

La matriz de la muestra seca se expone entonces a múltiples pulsos de un láser ultravioleta, que hace que la matriz para sublimar y la muestra para ionizar. Los iones cargados son entonces acelerados bajo un campo eléctrico hacia un detector, y el tiempo de vuelo en aceleración se utiliza para calcular la relación masa a carga (m / z) de cada pico individual (10).

El espectro resultante puede concordar mediante un algoritmo contra una base de datos de espectros de referencia. identificaciones microbianas pueden realizarse directamente a partir de una sola colonia. Esto a diferencia de la identificación tradicional realizada por métodos automatizados que requieren el aislamiento o repique de una colonia individual para ser procesados por método automatizado como VITEK 2 hace que el tiempo de identificación difiera en más de 12 horas (11).

MALDI-TOF MS surge como una técnica rápida que en cuestión de minutos, identifica de manera confiable hasta el 99% el germen que se encuentra en el cultivo, estudios recientes comparan los métodos tradicionales automatizados como VITEK 2 con MALDI-TOF MS y sugieren concordancias de exactitud entre el 80-90%, es por esto que este proyecto pretende determinar el comportamiento de los aislamientos y su comparación por medio de estos dos sistemas automatizados, reduciendo tiempo en el diagnóstico microbiológico, lo que permitirá plantear estrategias epidemiológicas en el manejo y prevención de las diferentes infecciones, inicio temprano de antiinfeccioso, terapia dirigida y consecuentemente disminución en estancia hospitalaria (3).

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

- ¿Puede ser el MALDI-TOF MS una herramienta de identificación de gérmenes en el paciente críticamente enfermo?

4. MARCO TEORICO

La importancia del adecuado manejo del paciente infectado radica en un tratamiento dirigido a la etiología más probable con un inicio rápido de la terapia antimicrobiana. Aún hoy en día es necesario el inicio de una terapia antibiótica empírica debido al tiempo que requiere diagnosticar con certeza la etiología de la infección. Desde tiempo atrás, el estándar oro para la identificación etiológica han sido los cultivos realizados en el laboratorio, sin embargo, esta técnica requiere la inversión de mucho tiempo, materiales, personal y entrenamiento. Si bien es cierto que se han realizado avances en diferentes campos en pro de lograr un diagnóstico más rápido, entre los que se encuentran la automatización de procesos, las técnicas desarrolladas se asocian a tiempos de incubación prolongados y a un costo mayor que no es fácilmente aplicable en un país como Colombia.

La espectrometría de masas es una técnica por la cual por medio de análisis permite determinar la distribución molecular de una sustancia en función de su masa, surgiendo en la década de los 50, sin embargo, hasta la década de los 80 es donde surgen equipos de espectrometría de masas los cuales permiten determinar con precisión la composición química e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos por medio de la relación de carga y masa (z/m) (12). La técnica de espectrometría de masas ha extendido su campo diferentes áreas, hasta la práctica clínica con el surgimiento de MALDI-TOF MS.

En 1985 Karas y colaboradores (5) acuñan el termino (MALDI) proveniente del inglés "Matrix assisted laser desorption ionization" bajo el principio de que una combinación adecuada de la longitud de onda del láser y de la matriz, una proteína puede ser ionizado, de este detector de iones asociado surge el termino (TOF) cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés Time-Of-Flight, generando así la sigla espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo, el cual permite la medición de biomoléculas que son biopolímeros como azúcares, lípidos, proteínas y macromoléculas que pueden hacerse frágiles y fragmentarse cuando se estudian con métodos convencionales de laboratorio (6).

La espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo se ha convertido recientemente en una herramienta de la práctica clínica como el método de mayor uso para medir biomoléculas, disminuyendo los tiempos de identificación de agentes infecciosos logrando complementar la identificación fenotípica convencional que se usa a diario en la microbiología clínica (13).

La espectrometría de masas (MS) se puede aplicar a muestras elementales hasta grandes proteínas y polímeros, mostrando medidas exactas para el cálculo de fórmulas empíricas, cada compuesto brinda huellas de fragmentación que se usan para identificar muestras por comparación con bases de datos de estos fragmentos. Se pueden detectar también patrones de grupos funcionales y abundancias isotópicas por medio de fragmentación controlada para la elucidación estructural de nuevos compuestos (2). El esquema general y concepto de esta técnica consiste en la generación de iones por medio de una fuente, separándolos de acuerdo en función de carga y masa dentro de un campo electromagnético para una posterior recogida de datos análisis de la masa de todos los iones clasificándolos y cuantificándolos. La MS brinda ventajas comparada con las técnicas convencionales de detección ya que no implica la absorción o emisión de luz y se puede obtener mucha información con una cantidad muy pequeña de muestra (14).

En la literatura se ha reportado mediante MALDI-TOF MS para su funcionamiento se pueden tomar muestras de colonias, cultivos; hemocultivos, urocultivos, cultivos de piel o secreción, en protocolos experimentales los cuales no poseen una validación clínica (5). Estas muestras se pasan a cristalización posteriormente a una matriz y se inserta en una placa de acero inoxidable el equipo aplica un láser al vacío generando desorción/ ionización en esta última se genera un impacto electrónico por medio del bombardeo a las moléculas con un haz de electrones de alta energía, los cuales pueden disociar electrones de los enlaces generando cationes radicales que son iones positivos con un electrón no apareado (15). El equipo se encarga de medir el tiempo de vuelo que toma en llegar al identificador espectrofotométrico identificando así las huellas de fragmentación que son patrones característicos los cuales se comparan con la biblioteca digital del equipo mediante

software; estos patrones se han estandarizado a microorganismos previamente en la base de datos del equipo, arrojando un porcentaje de concordancia para género y especie (16-17).

En la práctica clínica existe otro equipo que funciona con MS, el MALDI Biotyper® de la compañía BRUKER el cual funciona bajo el mismo principio de espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo, a diferencia del porcentaje de concordancia este establece puntajes para una identificación de especie mayor a 2, para género entre 1,7 y 2 y menos a este lo clasifica como de baja confiabilidad para la muestra analizada (13,14,18).

MALDI-TOF MS se usa en la práctica clínica para la identificación de bacterias gram positivas, gram negativas, levaduras y micobacterias. Legarra y colaboradores (12) han comparado el rendimiento de la técnica en identificación obteniendo porcentajes de 0,39% de error, mucho más bajo al compararse con técnicas de secuenciación de uso estándar en la microbiología clínica como VITEK II.

Estudios de concordancia a nivel mundial han reportado porcentajes de concordancia para bacilos gram negativos no fermentadores 85% (19), aerobios 95%, anaerobios estrictos 86,4% (12), familia *Enterobacteriaceae* 95% (15,20), gérmenes fastidiosos 94% (21), cocos gram positivos 90%, (22), levaduras 100% (23) al igual que para bacilos gram negativos móviles (24,25). Estas concordancias tienen una significancia clínica importante optimizando el tiempo en diagnóstico microbiológico (26).

La eliminación de los tiempos de incubación en colonias y repiques, mediante el uso de muestras directas de cultivos; hemocultivos, urocultivos, cultivos de piel o secreción en medios líquidos mediante la estandarización de protocolos en estudios experimentales, aun sin validación clínica con el uso de MALDI-TOF MS han mostrado resultados prometedores, reduciendo aún más los tiempos en la identificación temprana (3,24,27). En la literatura mundial se ha reportado el análisis directo de hemocultivos para gram positivos un 94% y para gram negativos 67% (17,28). Estas diferencias son concordantes en los estudios con una mayor concordancia para las bacterias gram negativas, las variaciones

entre estos se han evidenciado en los tiempos de centrifugación de las muestras, tiempos de hemocultivo y el número de centrifugaciones (29-30).

Al comparar espectros de proteínas ribosomales (31) la MS por desorción/ionización láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo, se han reportado casos similares en *Streptococcous*, (17,32) *Enterobacter cloacae* (33), *Escherichia coli* y *Shigella* spp y microorganismos encapsulados como *Klebsiella pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* (33,34). Estos problemas se han ido corrigiendo mediante la actualización del software de la biblioteca del equipo, se ha observado a su vez mejores resultados en la identificación de varios grupos de microorganismos como *Mycobacteria*, *Campylobacter*, *Helicobacter pylori*, *Clostridia* y *Neisseria*, alcanzando casi un 100% de identificación positiva (14-35).

Demostrando una disminución en los tiempos de diagnóstico, disminución en el tiempo de uso de antiinfecciosos de amplio espectro y complicaciones derivadas de su uso (16), disminución en el tiempo de estancia hospitalaria el MALDI – TOF MS requiere una inversión cercana a los 200,000 USD (14), para posteriormente tener un bajo costo en los kits de procesamiento y análisis de muestras aproximadamente 0,5 USD por cada muestra, siendo una herramienta de diagnóstico costo-efectiva (28,36).

El potencial en el diagnóstico temprano por espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo cada día toma más importancia en la práctica clínica y los laboratorios de microbiología clínica, como una próxima herramienta para la detección de microorganismos resistentes basándose en las proteínas ribosomales, en el momento los estudios no son concluyentes en la identificación de estos patrones, pero se cree que es un área donde esta herramienta puede tener gran ventaja frente a los métodos automatizados convencionales, por el rápido tiempo en el diagnóstico, gran porcentaje de concordancia y disminución de costos.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Describir la experiencia del análisis microbiológico mediante la tecnología MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectometry) en muestras tomadas en la Fundación Santa Fe de Bogotá.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Confirmar el género y especie de cultivos por medios automatizados VITEK 2 y MALDI-TOF MS.
- Estimar el porcentaje de concordancia entre el método VITEK II y MALDI-TOF MS.
- Identificar gérmenes de difícil crecimiento en métodos convencionales de microbiología haciendo uso del MALDI-TOF MS.

6. METODOLOGIA

6.1 Tipo de estudio.

Se realizó un tipo de estudio de corte transversal descriptivo sobre la experiencia del análisis microbiológico mediante la tecnología MALDI-TOF MS.

6.2 Muestra.

Se tomaron por conveniencia el total de los cultivos que fueron identificados como positivos por método automatizado BacT/ALERT realizados en la Fundación Santa Fe de Bogotá, entre junio y julio de 2013.

6.3 Población Objetivo.

Pacientes con sepsis hospitalizados en las unidades de cuidados intensivos en la Fundación Santa Fe de Bogotá, entre junio y julio de 2013.

6.4 Población de estudio.

Cultivos positivos de pacientes con diagnóstico de sepsis, hospitalizados en las unidades de cuidado intensivo médico y quirúrgico de la Fundación Santa Fe de Bogotá, entre junio y julio de 2013.

6.5.1 Criterios de inclusión.

- Aislamientos provenientes de cultivos positivos, procesados por método automatizado BacT/ALERT.

6.5.2 Criterios de exclusión.

- No existe criterio de exclusión para el estudio.

6.6 Descripción de variables.

Las variables recolectadas en el estudio fueron: el tipo de muestra, germen aislado, especie, género para VITEK II como para MALDI-TOF MS. Ver anexo 1.

Variable	Definición operativa	Naturaleza y nivel de medición	Nivel operativo
Tipo de muestra	Tipo de cultivo al que pertenece la muestra.	Hemocultivo. Urocultivo. Cultivo de secreción.	Cualitativa Nominal
Germen	Tipo de germen	Bacilos gram negativos no fermentadores Enterobacterias Bacilos gram negativos móviles Cocos gram positivos Gérmenes fastidiosos Levaduras Aggregatibacter Bacilos gram positivos	Cualitativa Nominal
Especie y género	Tipo de especie y género	Tipo de especie y género Negativo	Cualitativa Nominal

Tabla 1. Variables de estudio.

6.7 Análisis deMALDI-TOF MS.

Al obtener un hemocultivo, urocultivo o cultivo de secreciones positivo, se procedió a realizar su identificación por el método estándar del laboratorio VITEK II y a su vez realizar el análisis por medio de la espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo, usando el protocolo brindado por la casa matriz biomerieux comercializadora del equipo en el cual; al tener un hemocultivo positivo,se toma 1 mililitro de este, y se lleva a 500 revoluciones por minuto en centrifuga durante un periodo de 5 minutos, buscando remover las células rojas, las cuales se desechan, posteriormente el sobrenadante se centrifuga a 14000 revoluciones por minuto durante 5 minutos, se desecha el sobrenadante obtenido y se resuspende el pellet en 1 mililitro de agua estéril destilada, se lleva a vortex por 1 minuto y se centrifuga de nuevo a 14000 revoluciones por minuto durante 5 minutos.

Luego de la centrifugación, se agregan al pellet 5 mililitros de ácido fórmico, y se lleva a incubación por 5 minutos a temperatura ambiente. Se toma la muestra y se le adicionan 5 mililitros de acetonitrilo, llevándose posteriormente a vortex y luego de nuevo a centrifugación a 14000 revoluciones por minuto durante 2 minutos, posteriormente se

toman 2 mililitros del sobrenadante obtenido los cuales se depositan en el pozo marcado de la placa de acero del kit del equipo, se inicia proceso automatizado.

6.8 Información recolectada.

Se analizaron 147 aislamientos bacterianos de muestras clínicas, las cuales fueron procesadas simultáneamente por medio del sistema VITEK II. Los aislamientos correspondieron a 88 hemocultivos (60%), 28 urocultivos (19%), y otros cultivos 31 (21%).

6.9 Sesgos y limitaciones.

Una limitación fue no obtener mayor información relevante para el estudio, no se tuvo en cuenta información clínica de los pacientes que pudiesen ser relevantes, o que pudieran generar alguna interacción o confusión de los resultados obtenidos.

Se requieren estudios con mayor complejidad metodológica para poder realizar una comparación a fondo entre las dos técnicas.

6.10 Análisis estadístico.

Se recolecto una base de datos en Excel Microsoft office profesional plus 2013, los resultados obtenidos se analizaron las variables descritas previamente en frecuencias absolutas y relativas para VITEK II y MALDI-TOF MS.

7. CONSIDERACIONES ETICAS

Este proyecto se rige bajo la resolución Nº 008430 DE 1993 (4 DE OCTUBRE DE 1993) del Ministerio de Salud de la República de Colombia. Se cumple con las indicaciones del Título IV ¨La bioseguridad de las investigaciones¨ capítulo I ¨de la investigación con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos¨.

El Laboratorio clínico de la fundación santa fe de Bogotá cuenta con las instalaciones y equipo de laboratorio adecuados para la realización de este proyecto. Los investigadores fueron entrenados por el personal profesional del laboratorio y estuvo bajo constante supervisión durante la elaboración del trabajo experimental del proyecto. (Artículos 63 y 65).

Las muestras seleccionadas para el estudio fueron de pacientes requieren para el manejo de su patología la toma de los cultivos, de los cuales se tomó una parte de la muestra de cultivo para el análisis de este estudio, por lo tanto, no se realizó ninguna intervención adicional. Estas se encuentran clasificadas según el Articulo 67 como grupo de riesgo IV ya que los microorganismos representan un riesgo elevado tanto para el individuo como para la comunidad, por tanto, se tomaron las medidas de seguridad pertinentes para el transporte, manipulación y desecho del material biológico.

Según el artículo 11 esta es una investigación sin riesgo: Son estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y aquellos en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, sicológicas o sociales de los individuos que participan en el estudio.

Este estudio cumple con los lineamientos de la declaración de Helsinki, donde los investigadores se comprometen a publicar los resultados, sean positivos o negativos, se mantendrá la confidencialidad de los datos de pacientes de donde proceden las muestras.

8. CRONOGRAMA.

Mes												
Actividades	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Realización de protocolo y logística del proyecto												
Realización de Base de datos												
Análisis de resultados												
Elaboración del documento y resultados del proyecto												
Publicación												

Tabla 2. Cronograma.

9. PRESUPUESTO.

Los gastos serán cubiertos por parte de los investigadores, y el acceso a base de datos, la asesoría temática y metodológica, así como la licencia de los programas estadísticos fueron financiados por la Universidad del Rosario.

Tabla 3. Presupuesto global por fuentes de financiación.

RUBROS	CONTRAPARTIDA	TOTAL
	Recursos propios	
Equipos	$ 1.000.000	$ 1.000.000
Software	$ 300.000	$ 300.000
Materiales y suministros	$ 100.000	$ 100.000
TOTAL	**$ 1.400.000**	**$ 1.400.000**

Tabla 4. Descripción y cuantificación de los equipos de uso propio.

EQUIPO	JUSTIFICACIÓN	CONTRAPARTIDA RECURSOS PROPIOS
Computador Portátil	Almacenamiento y manejo de la información	$ 1.000.000
TOTAL		**$ 1.000.000**

Tabla 5. Descripción del software.

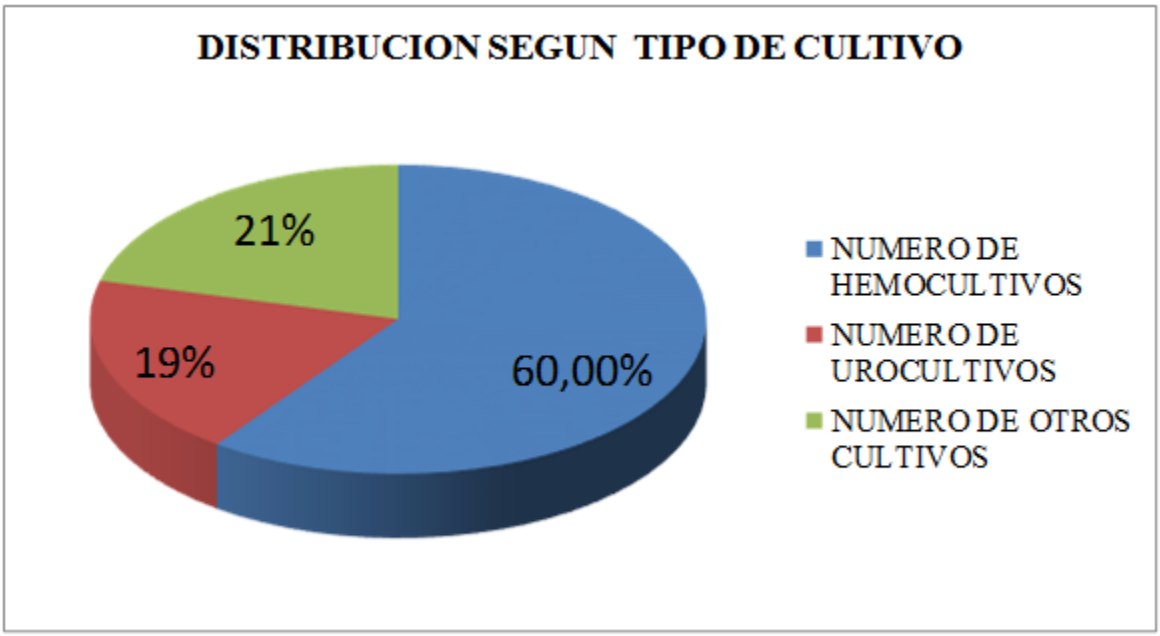
SOFTWARE	JUSTIFICACIÓN	CONTRAPARTIDA RECURSOS PROPIOS
Microsoft Excel	Almacenamiento de la información	$ 300.000
TOTAL		**$ 300.000**

Tabla 6. Materiales y suministros.

MATERIAL	VALOR UNIDAD	CANTIDAD	CONTRAPARTIDA RECURSOS PROPIOS
Formato de recolección de la información	$ 100	400	$ 40.000
Memorias USB	$ 20000	3	$ 60.000
TOTAL			**$ 100.000**

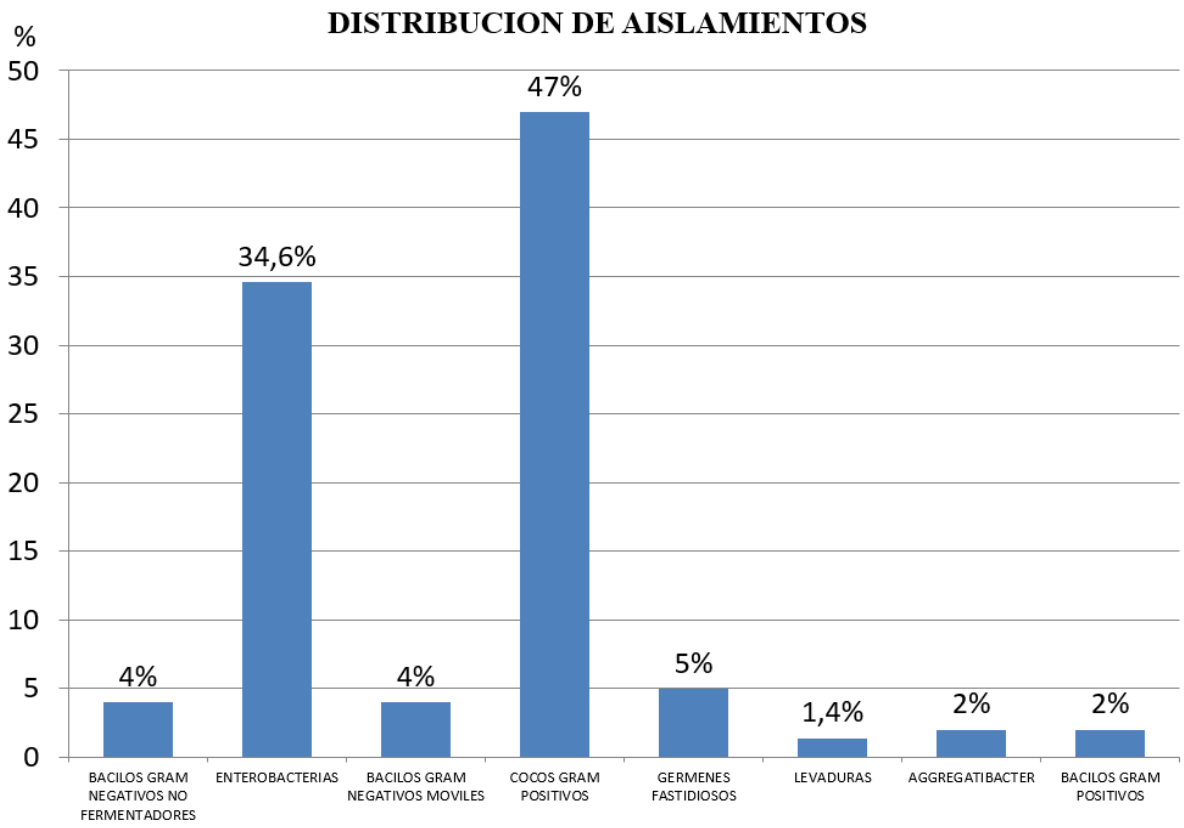
10. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

En este estudio se obtuvieron un total de 147 cultivos provenientes de muestras de las unidades de cuidados intensivos de la Fundación Santa Fe de Bogotá en el periodo comprendido entre junio y julio de 2013, los cuales se distribuyeron en; hemocultivos (60%), otros cultivos (21%) que representaban secreción de piel, esputo, colección abdominal, secreción vaginal, nasal, ocular y coprocultivo, urocultivo (19%).Ver gráfica 1.



Gráfica 1. Porcentajes de distribución según el tipo de cultivo.

Dentro de estos cultivos la distribución de los aislamientos según el análisis por espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo se dividieron las muestras en Bacilos gram negativos no fermentadores (4%), Enterobacterias (34,6%), bacilos gram negativos móviles (4%), cocos gram positivos (47%), gérmenes fastidiosos (5%), levaduras (1,4%), a *Aggregatibacter* (2%), bacilos gram positivos (2%). Ver gráfica 2.



Gráfica 2. Porcentajes de distribución según aislamiento.

En los aislamientos se logró una identificación adecuada a nivel de género y/o especie en el 88.4% (130 muestras), con una concordancia del 100% comparado con el sistema VITEK. El porcentaje de concordancia fue de 66% en el grupo de bacilos gram negativos no fermentadores, 96% en enterobacterias, 100% en gérmenes fastidiosos, 92% en cocos gram positivos, 100% bacilos gram negativos móviles y 100% en levaduras. No hubo ninguna concordancia en bacilos gram positivos y gérmenes del genero *Aggregatibacter*.Ver tabla 6.

Aislamientos	MALDI-TOF	VITEK II	Porcentaje concordancia
Bacilos gram negativos no fermentadores	6	4	66%
Enterobacterias	51	49	96%
Bacilos gram negativos móviles	6	6	100%
Cocos gram positivos	69	64	92%
Gérmenes fastidiosos	7	7	100%
Levaduras	2	2	100%
Aggregatibacter	3	0	0%
Bacilos gram positivos	3	0	0%

Tabla 7. Porcentajes de concordancia de aislamientos MALDI-TOF MS y VITEK II.

De los 147 aislamientos obtenidos a partir de las muestras de cultivos ya mencionados, 17 de ellos fueron discordantes al ser comparados MALDI – TOF MS contra VITEK 2. Ver tabla 7.

Identificación MALDI –TOF MS	Identificación VITEK 2.
Acinetobacter baumannii	*Enterococcus faecium*
Acinetobacter baumannii	*Enterococcus faecium*
Aggregatibacter segnis	*Serratia marcescens*
Aggregatibacter segnis	*Serratia marcescens*
Aggregatibacter segnis	*Serratia marcescens*
Arthrobacter Castelli	No se observó crecimiento a los 3 días de incubación
Corynebacterium jeikeium	*Kocuria rosea+staphylococcus xylosus*
Enterococcus faecalis	Negativo a las 24 horas
Enterococcus faecalis	Negativo a las 24 horas
Escherichia coli	*Staphylococcus arlettae*
Klebsiella pneumoniae	Crecimiento de gérmenes contaminantes por toma
Lactobacillus jensenii	Cultivo negativo
Morganella morganii	*Proteus mirabilis*
Morganella morganii	*Proteus mirabilis*
Staphylococcus epidermidis	Hemocultivos negativos a los 6 días de incubación
Staphylococcus epidermidis	Hemocultivos negativos a los 6 días de incubación
Streptococcus pneumoniae	*Staphylococcus aureus*

Tabla 8. Discordancias obtenidas por identificación MALDI-TOF MS vs VITEK II.

11. DISCUSIÓN.

Los métodos convencionales de diagnóstico microbiológico usados en la actualidad para la identificación de gérmenes en el paciente críticamente enfermo han sido de utilidad por años a pesar de los inconvenientes con respecto a la exactitud en identificación y rapidez en la obtención de los resultados, lo que conlleva a un retraso en el tiempo de inicio de una adecuada terapéutica antimicrobiana y a un inadecuado espectro de cubrimiento. En los últimos años se ha visto reflejado como el inicio temprano de un antibiótico y la elección adecuada dirigida hacia un germen especifico disminuyen mortalidad, estancia hospitalaria y costos, de la mano de una disminución en índices de resistencia y toxicidad que puede generarse por la mala elección de un grupo terapéutico antiinfeccioso (4). Actualmente en nuestro país la automatización de procesos y las técnicas desarrolladas para la identificación de gérmenes en el laboratorio de microbiología se asocian a tiempos de incubación prolongados y a un costo mayor que no es fácilmente aplicable en un país como Colombia.

MALDI-TOF MS surge como el método más usado para la medición de biomoléculas desde el año 2008 para identificación de bacilos gram negativos (37) y a través de los años se ha visto el aumento en el número de publicaciones y uso en el ámbito clínico, lo cual ha permitido disminuir los tiempos en la identificación y el entendimiento de esta técnica.

En nuestro estudio se ha logrado una concordancia de 66% en el grupo de bacilos gram negativos no fermentadores, resultado que se aleja a lo reportado Mellmann y Cloud en 2008 donde se acerca al 85% lo cual se puede atribuir a que en nuestro estudio se tomaron muestras directas de hemocultivos, urocultivos, cultivos de piel y secreciones en medios líquidos y se ha reportado en la literatura que la comparación de espectros ribosomales en MS desorción/ionización láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo puede tener variaciones al usar esta técnica descrita en protocolos experimentales la cuales no se han validado (17,24,27,19). Respecto a las enterobacterias una concordancia del 96% fue evidenciada en el presente estudio, tal como se ha demostrado en los estudios de Seng y Saffert (15,20) donde la concordancia fue cercana al 95%. En cuanto a los

gérmenes fastidiosos se ha logrado una concordancia superior al 94% (21), siendo en el nuestro del 100%. Para los cocos gram positivos nuestra concordancia fue del 92%, similar a lo reportado por Schulthess (22). La concordancia en las levaduras fue del 100% igual a la reportada por Buchan en 2013.Los bacilos gram negativos móviles, entre ellos *campylobacter* han sido gérmenes de difícil identificación, sin embargo, mediante MALDI-TOF MS hemos logrado una concordancia del 100%, equiparable a lo reportado en la literatura mundial (38).

Los porcentajes de concordancia incorrectas al ser comparada con el método de referencia VITEK II, podrían deberse a la similitud espectros de proteínas ribosomales (31) en MS por desorción/ionización láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo, al igual que la variación en la técnica al usar muestras directas de cultivos, sin embargo la espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo es un método confiable, rápido y seguro, que puede ser unido a un sistema temprano de alertas en el hospital y disponibilidad del laboratorio 24 horas, generando una toma adecuada de conductas hacia el direccionamiento de una acertada terapéutica antiinfecciosa encaminada a la reducción de la resistencia bacteriana, comorbilidad, mortalidad, costos en el manejo del paciente críticamente enfermo.

Este estudio al ser de corte transversal descriptivo de mínimo riesgo, sin intervención en pacientes a partir de muestras de cultivos que ya se encuentran en el laboratorio de microbiología, evita la generación de sesgos y limitaciones en el análisis de datos. La recolección de información, mediante datos secundarios ya existentes ha permitido el adecuado desarrollo del estudio. Se considera que la muestra no presento deficiencias si se compara al tamaño de las mismas en estudios similares.

12. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

- El MALDI-TOF MS es una prueba rápida y sencilla para la identificación microbiológica de género y especie que concuerda con los resultados obtenidos de manera convencional.
- Se obtuvo concordancia global del 88,4% del total de las muestras a nivel de género y especie entre MALDI-TOF MS y VITEK II.
- MALDI-TOF MS permite la identificación de gérmenes de difícil crecimiento en métodos tradicionales de microbiología clínica.
- Faltan estudios para hacer del MALDI-TOFMS la prueba oro en identificación de gérmenes.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrew M. Robinson A, James E, et al. Preparation of positive blood cultures for direct MALDI-ToF MS identification. Journal of Microbiological Methods, 28 May 2016.

2. Joanna H, Jan M, Zenon J, et al. Challenges in biomarker discovery with MALDI-TOF MS. Clinica Chimica ActaVolume 458, 1 July 2016.
3. Biswas S, Rolain J, et al. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. Journal of Microbiological Methods. (2013) 92:14-24.
4. Riedel S, Carroll K, et al. Early Identification and Treatment of Pathogens in Sepsis: Molecular Diagnostics and Antibiotic Choice. Clin Chest Med. 2016 Jun;37(2):191-207.
5. Andrew E, Erin J, Amit A, et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: A Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. Clin Microbiol Rev. 2013 Jul; 26(3): 547–603.
6. Neelja S, Manish K, Pawan K, et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Front Microbiol. 2015; 6: 791.
7. Singer M, Deutschman C, Warren C, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 2016;315(8):801-810.
8. Buchan B, Ledeboer N. Emerging Technologies for the Clinical Microbiology Laboratory. Clin Microbiol Rev. 2014 Oct; 27(4): 783–822.
9. Stephanie S, Bereneice M, Susan R, et al. Effectiveness of Practices to Increase Timeliness of Providing Targeted Therapy for Inpatients with Bloodstream Infections: A Laboratory Medicine Best Practices Systematic Review and Meta-analysis. Clin Microbiol Rev. 2016 Jan; 29(1): 59–103.
10. Yun F, Jianfeng F. Rapid laboratory diagnosis for respiratory infectious diseases by using MALDI-TOF mass spectrometry. J Thorac Dis. 2014 May; 6(5): 507–511.
11. Yang L, Bing G, Genyan L, et al. MALDI-TOF MS versus VITEK 2 ANC card for identification of anaerobic bacteria. J Thorac Dis. 2014 May; 6(5): 517–523.
12. Paulette L, Marcela M, et al. Impacto de la espectrometría de masas por MALDI-TOF MS en la identificación rápida de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia clínica. Rev Chilena Infectol 2013; 30 (2): 140-146.
13. Andreas W, Lukas S, jette J, et al. MALDi – TOF MS in microbiological dianostics – identification of microorganisms and beyond. Appl Microbiol Biotechnol (2012) 93: 965-974.
14. Eigner U, Holfelder M, Oberdorfer K, et al. Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. Clin Lab. 2009. 55(7–8):289–296.
15. Saffert R, Cunningham S, Ihde S, et al. Comparison of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometer to BD Phoenix automated microbiology system for identification of gram-negative bacilli. J Clin Microbiol 2011; 49: 887-92.
16. Biswas S, Rolain J, et al. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. Journal of Microbiological Methods. (2013)

92:14-24.
17. La Scola B, Raoult D, et al. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. PLoS ONE 2009; 4: e8041.
18. Right J, Claydon M., Soufian M, et al. Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. J. Microbiol. Methods (2002) 48, 127–138.
19. Chen Y, Liu Y, Teng S, et al. Evaluation of the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry Bruker Biotyper for identification of Penicillium marneffei, Paecilomyces species, Fusarium solani, Rhizopus species, and Pseudallescheria boydii.Front Microbiol. 2015 Jul 8;6:679.
20. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al. Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis 2009; 49:543-51.
21. Couturier M, Mehinovic E, Croft A, et al. Identification of HACEK clinical isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2011; 49: 1104-6.
22. Bettina S, Katharina B, Guido V, et al. Identification of Gram-Positive Cocci by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: Comparison of Different Preparation Methods and Implementation of a Practical Algorithm for Routine Diagnostics. J Clin Microbiol. 2013 Jun; 51(6): 1834–1840.
23. Buchan B, Ledeboer N, et al. Advances in identification of clinical yeast isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2013 May;51(5):1359-66.
24. Schmidt V, jarosch A, März P, et al. Rapid identification of bacteria in positive blood culture by matrix-assited laser desorption ionization time-of-flight mass espectrometry. Eur J Clin Microbiol Infec Dis (2012) 31: 311-317.
25. Bizzini A, Durussel C, Bille J, et al. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol 2010 48(5):1549–1554.
26. Seng P, Drancourt M, La Scola B, et al. Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-asssited laser desorption ionization time-of-flight mass septrometry. Clin Infect Dis 2009; 49: 543 – 51.
27. Christner M, Rohde H, Wolters M, et al Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprint- ing. J Clin Microbiol (2010) 48(5):1584–1591.
28. A Ferroni, S Suaréz, JL Beretti, et al. Real-Time Identification of Bacteria and Candida Species in Positive Blood Cultures Broths by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. Jurnal of Clinical Microbiology. (2010) May: vol 48 Nº 5: 1542-1548.
29. Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann A, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time- of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. Clin Microbiol Infect (2010)16:1631–1638.
30. Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, et al. Matrix-assisted laser desorption

ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. J Clin Microbiol 2010 48(4):1481–1483.
31. Hoffman H, Stindl S, Ludwig W, et al. Enterobacter hormaechei subsp. Oharae subsp. Nov., E. Hormaechei subsp. Hormaechei comb. Nov., and E. Hormaechei subsp. Steigerwaltii subsp. Nov., three new subspecies of clinical importance. J Clin Microbiol 2005; 43(7): 3297-303.
32. García P, Allende F, Legarrafa P, et al. Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. Rev Chilena Infectol 2012; 29 (3): 263-272.
33. Doern G, Vautour M, Gaudet B, et al. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. J. Clin. Mi- crobiol. 1994 32:1757–1762.
34. Harbarth S, GarbinoJ. Pugin J, et al. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. Am. J. Med. 2003 115:529–535.
35. Jeong S, Hong J, Kim JO, et al. Identification of Acinetobacter Species Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry.Ann Lab Med. 2016 Jul;36(4):325-34.
36. Ibrahim E, Sherman S, Ward V, et al. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infec- tions on patient outcomes in the ICU setting. Chest 2000 118:146–155.
37. Mellmann A, Cloud J, Maier T, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionizationtime-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of non-fermenting bacteria. J Clin Microbiol 2008; 46: 1946-54.
38. Bessède E, Solecki O, Sifré E, et al. Identification of Campylobacter species and related organisms by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. Clin Microbiol Infect. 2011 Nov;17(11):1735-9.

14. ANEXOS

Anexo1. Totalidad de muestras correlacionadas en MALDI –TOF MSy VITEK 2.

Detección MALDI –TOF MS	**Aislamiento VITEK 2**
Acinetobacter baumannii	*Acinetobacter baumannii*
Acinetobacter baumannii	*Acinetobacter baumannii*
Acinetobacter baumannii	*Enterococcus faecium*
Acinetobacter baumannii	*Enterococcus faecium*
Aggregatibacter segnis	*Serratia marcescens*
Aggregatibacter segnis	*Serratia marcescens*
Aggregatibacter segnis	*Serratia marcescens*
Arthrobacter castelli	No se observó crecimiento a los 3 dias de incubacion
Campylobacter fetus	*Campylobacter fetus*
Campylobacter fetus	*Campylobacter fetus*
Campylobacter fetus	*Campylobacter fetus*
Campylobacter fetus	*Campylobacter fetus*
Campylobacter fetus	*Campylobacter fetus*
Campylobacter fetus	*Campylobacter fetus*
Candida glabrata	*Candida glabrata*
Candida tropicalis	*Candida tropicalis*
Corynebacterium jeikeium	*Kocuria rosea+staphylococcus xylosus*
Enterobacter cloacae	*Enterobacter cloacae complex*
Enterococcus faecalis	Negativo a las 24 horas
Enterococcus faecalis	Negativo a las 24 horas
Enterococcus faecalis	*Enterococcus faecalis*
Enterococcus faecalis	*Enterococcus faecalis*
Enterococcus faecalis	*Enterococcus faecalis*
Enterococcus faecalis	*Enterococcus faecalis*
Enterococcus faecalis	*Enterococcus faecalis*
Enterococcus faecium	*Enterococcus faecalis*
Enterococcus faecium	*Enterococcus faecalis*
Enterococcus faecium	*Enterococcus faecium*
Enterococcus faecium	*Enterococcus faecium*
Enterococcus faecium	*Enterococcus faecium*
Enterococcus faecium	*Enterococcus faecium*
Enterococcus faecium	*Enterococcus faecium*
Enterococcus faecium	*Enterococcus faecium*
Enterococcus faecium	*Enterococcus faecium*

Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Staphylococcus arlettae*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli+enterobacter cloacae+raoultella planticola*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli+klebsiella pneumoniae*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Escherichia coli	*Escherichia coli*
Haemophilus influenzae	*Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae	*Haemophilus influenzae*
Haemophilus influenzae	*Haemophilus influenzae*
Haemophilus influenzae	*Haemophilus influenzae*
Haemophilus influenzae	*Haemophilus influenzae*
Haemophilus influenzae	*Haemophilus influenzae*
Haemophilus influenzae	*Haemophilus influenzae*
Klebsiella pneumoniae	*Klebsiella pneumoniae*
Klebsiella pneumoniae	Crecimiento de gérmenes contaminantes por toma
Klebsiella pneumoniae	*Klebsiella pneumoniae*
Klebsiella pneumoniae	*Klebsiella pneumoniae*
Lactobacillus jensenii	Cultivo negativo
Morganella morganii	*Proteus mirabilis*
Morganella morganii	*Proteus mirabilis*
Proteus mirabilis	*Proteus mirabilis*
Proteus mirabilis	*Proteus mirabilis*
Proteus mirabilis	*Proteus mirabilis*
Proteus mirabilis	*Proteus mirabilis*
Pseudomonas aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*
Pseudomonas aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*
Staphylococcus aureus	*Staphylococcus aureus*
Staphylococcus aureus	*Staphylococcus aureus*
Staphylococcus aureus	*Staphylococcus aureus*
Staphylococcus aureus	*Staphylococcus aureus*
Staphylococcus aureus	*Staphylococcus aureus*
Staphylococcus aureus	*Staphylococcus aureus*
Staphylococcus aureus	*Staphylococcus aureus*
Staphylococcus aureus	*Staphylococcus aureus*
Staphylococcus aureus	*Staphylococcus aureus*
Staphylococcus aureus	*Staphylococcus aureus*
Staphylococcus aureus	*Staphylococcus aureus*
Staphylococcus aureus	*Staphylococcus aureus*
Staphylococcus aureus	*Staphylococcus aureus*
Staphylococcus aureus	*Staphylococcus aureus*
Staphylococcus aureus	*Staphylococcus aureus*
Staphylococcus aureus	*Staphylococcus aureus*
Staphylococcus epidermidis	Hemocultivos negativos a los 6 días de incubación
Staphylococcus epidermidis	Hemocultivos negativos a los 6 días de incubación
Staphylococcus epidermidis	*Staphylococcus epidermidis*
Staphylococcus epidermidis	*Staphylococcus epidermidis*
Staphylococcus epidermidis	*Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis	*Staphylococcus epidermidis*
Staphylococcus epidermidis	*Staphylococcus epidermidis*
Staphylococcus epidermidis	*Staphylococcus epidermidis*
Staphylococcus hominis	*Staphylococcus hominis*
Staphylococcus hominis	*Staphylococcus hominis*
Staphylococcus hominis	*Staphylococcus hominis*
Staphylococcus hominis	*Staphylococcus hominis*
Staphylococcus hominis	*Staphylococcus hominis*
Staphylococcus hominis	*Staphylococcus hominis*
Staphylococcus hominis	*Staphylococcus hominis*
Staphylococcus hominis	*Staphylococcus hominis*
Streptococcus agalactiae	*Streptococcus agalactiae*
Streptococcus agalactiae	*Streptococcus agalactiae*
Streptococcus agalactiae	*Streptococcus agalactiae*
Streptococcus agalactiae	*Streptococcus agalactiae*
Streptococcus agalactiae	*Streptococcus agalactiae*
Streptococcus constellatus	*Streptococcus constellatus*
Streptococcus intermedius	*Streptococcus intermedius*
Streptococcus intermedius	*Streptococcus intermedius*
Streptococcus parasanguinis	*Streptococcus parasanguinis*
Streptococcus parasanguinis	*Streptococcus parasanguinis*
Streptococcus parasanguinis	*Streptococcus parasanguinis*
Streptococcus pneumoniae	*Streptococcus pneumoniae*
Streptococcus pneumoniae	*Streptococcus pneumoniae*
Streptococcus pneumoniae	*Streptococcus Pneumoniae*
Streptococcus pneumoniae	*Streptococcus pneumoniae*
Streptococcus pneumoniae	*Staphylococcus aureus*
Streptococcus pyogenes	*Streptococcus pyogenes*
Streptococcus sanguinis	*Streptococcus sanguinis*
Streptococcus sanguinis	*Streptococcus sanguinis*