

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

NESTOR OTONIEL MARTÍNEZ CASAS

Estudiante de Pregrado en

Bacteriología y Laboratorio Clínico



Clínica  ColSanitas

Sustentación de Tesis de Grado para optar por el título: Bacteriólogo y Laboratorista Clínico

DRA. VILMA YAMILE MARTÍNEZ GRANADOS

ASESOR INTERNO

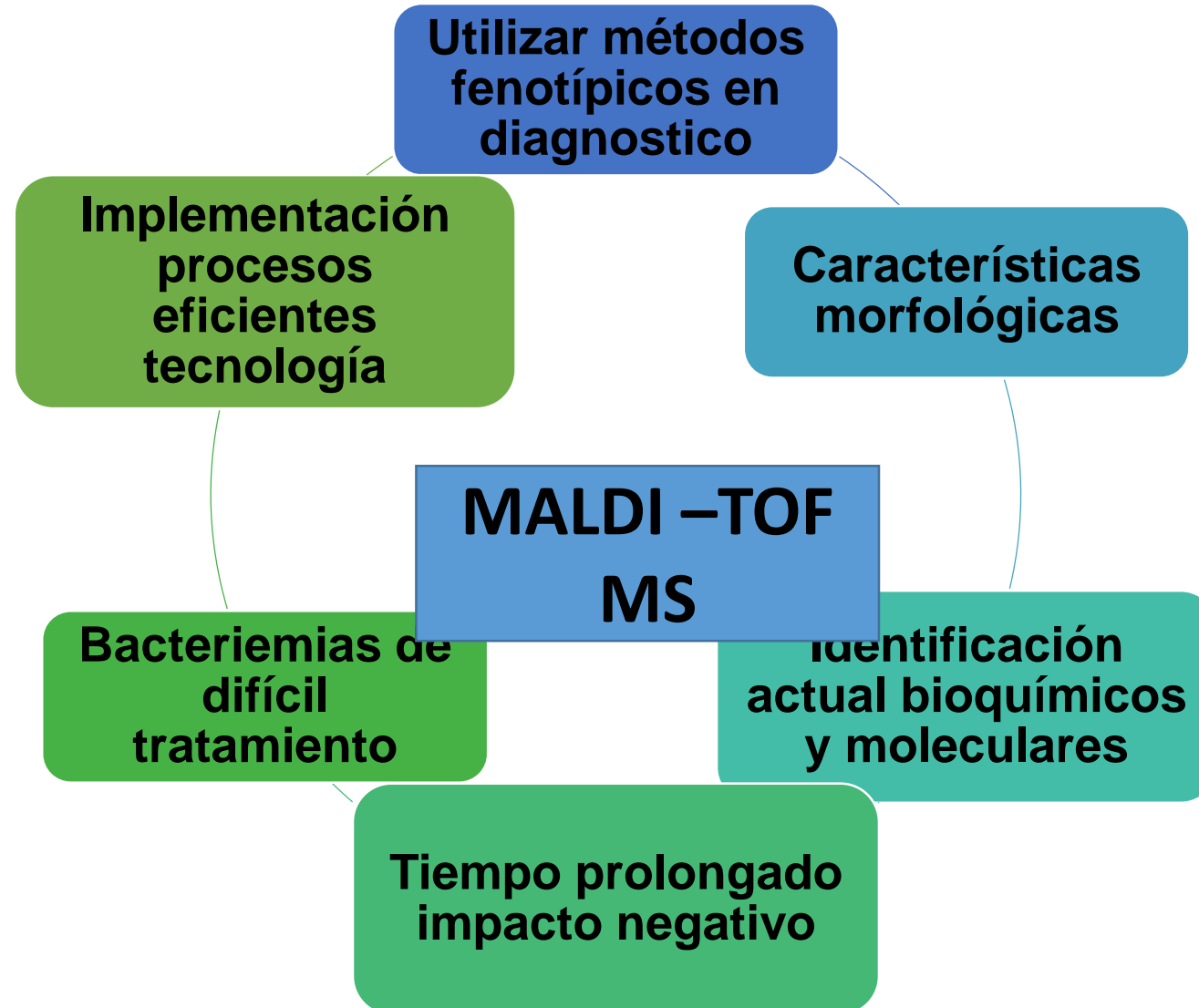
Bacterióloga Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Docente en Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

DR. JOSÉ ARNULFO PÉREZ

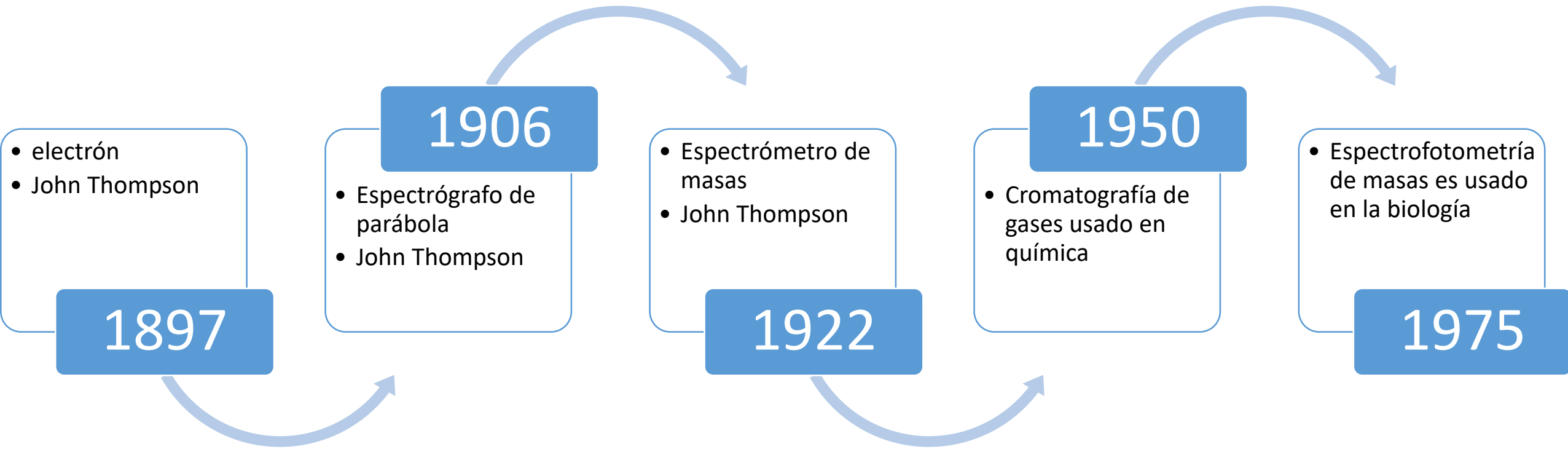
ASESOR EXTERNO

Médico Patólogo. MSc
Director médico Banco de sangre. Clínica Colsanitas S.A

INTRODUCCIÓN

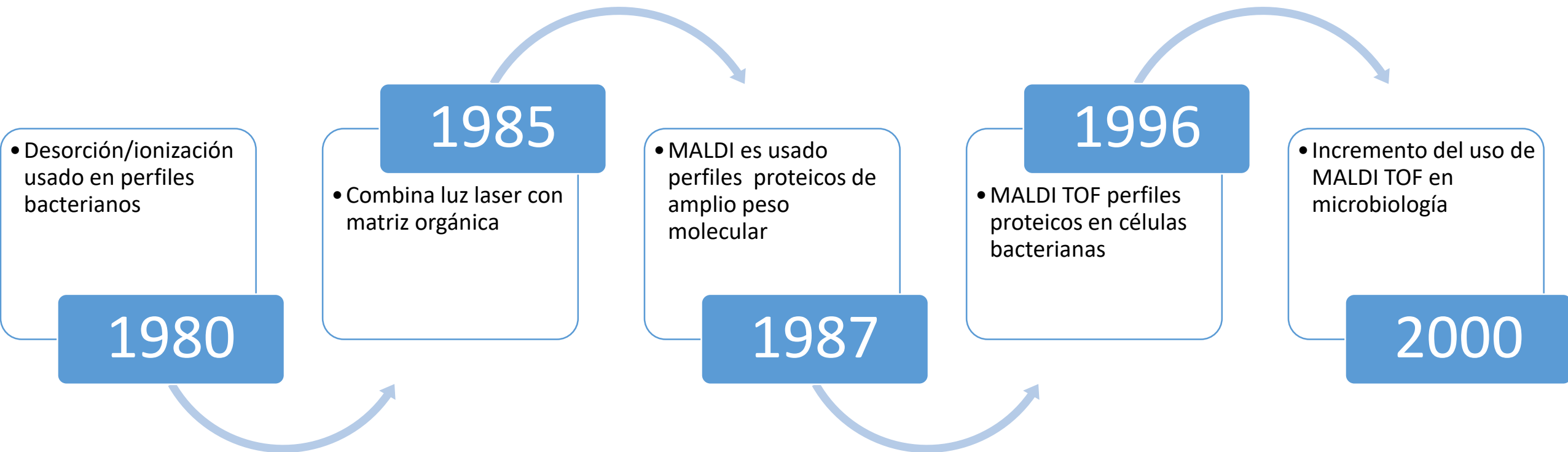


ANTECEDENTES

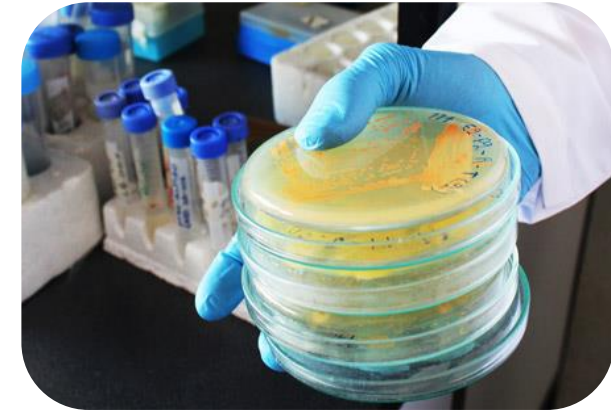
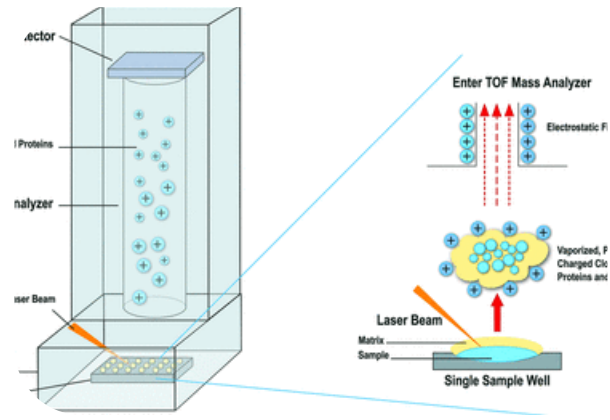
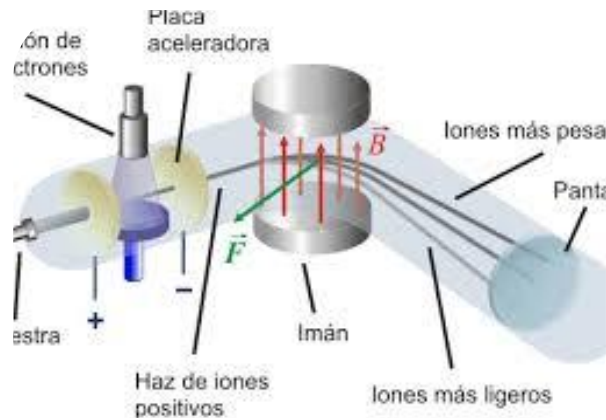


Tomado de: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion_proteinas.pdf.

Tomado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X16301847>.



MARCO TEÓRICO



1. Espectrofotometría de masas

2. MALDI TOF MS

3. hemocultivo

4. Identificación bacteriana

1. <http://www2.montes.upm.es/dptos/digfa/cfisica/magnet/espectrometro.html>
2. <http://www.linchem.aaccjnls.org/content/61/1/100>
3. <http://www.biomerieux-diagnostics.com/bact-alert-culture-media>
4. <http://corpogensolutions.com/servicios/identificaci%C3%B3n-molecular-de-bacterias-y-hongos>

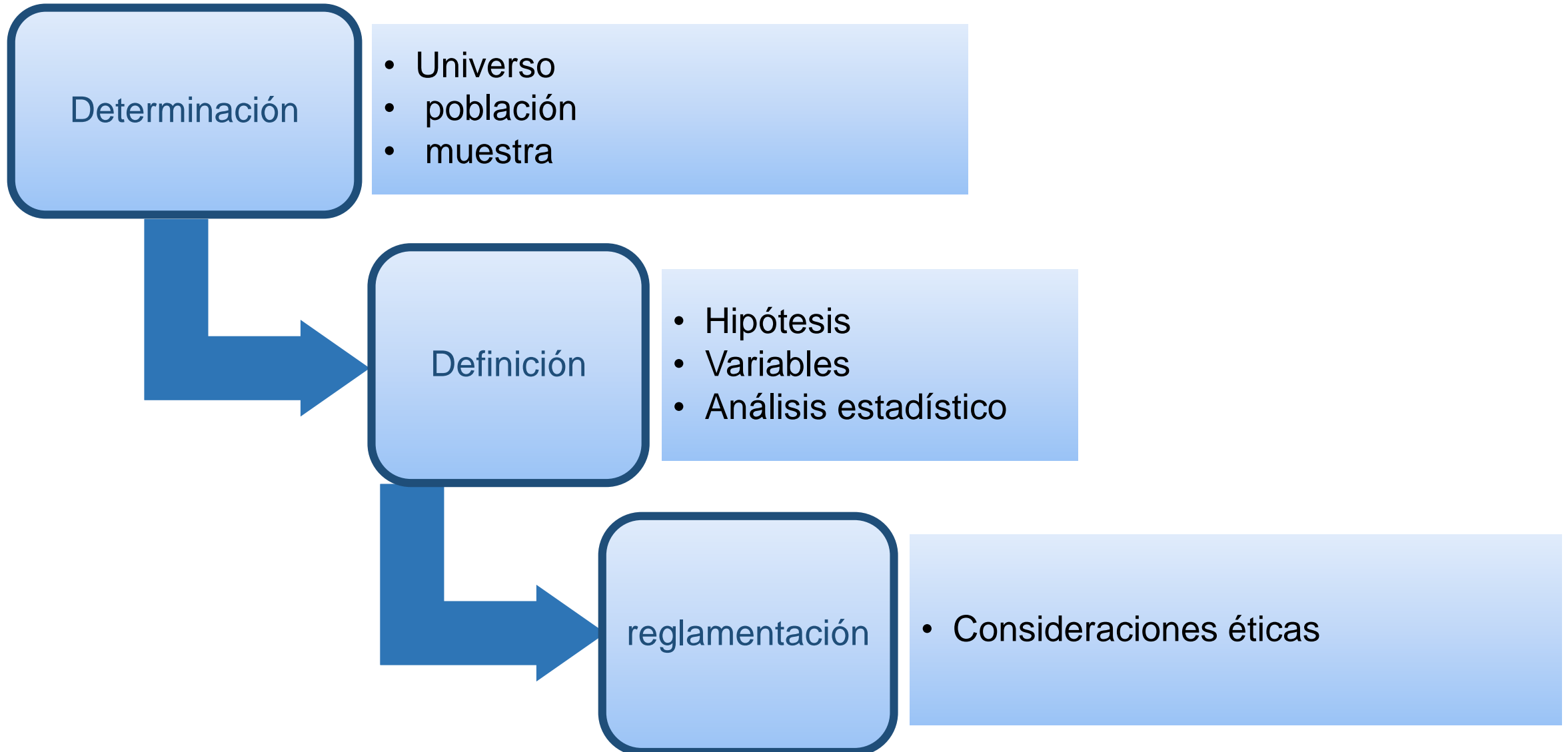
OBJETIVO PRINCIPAL

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

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las características demográficas de la población en estudio.
2. Caracterizar los microorganismos hallados en los hemocultivos de acuerdo a su coloración de Gram por su afinidad y morfología

DISEÑO METODOLÓGICO



Universo: Pacientes con solicitud médica o remisión de hemocultivo, recepcionados en el área de microbiología del laboratorio central de referencia de la Clínica Colsanitas S.A., en la ciudad de Bogotá.

Población: corresponde a 1.300 muestras de hemocultivo que en promedio son recibidas durante un mes en el área de microbiología de los cuales 216 son positivas y se aísla algún germen de interés clínico

Muestra: conformada por 100 hemocultivos positivos, que cumplían con los criterios de inclusión procesados en el equipo BacT/ALERT 3D[®] provenientes de CRS, CUC, CL103 durante enero y febrero de 2018, muestreo no probabilístico, consecutivo y a conveniencia, siguiendo las recomendaciones dadas por el Instituto de Estándares de Laboratorio y Clínica (CLSI 2012)

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- Pacientes con orden médica de hemocultivos seriados (3 muestras), provenientes de clínica Reina Sofía, Clínica Universitaria Colombia y clínica calle 103 de la ciudad de Bogotá.
- Hemocultivos positivos de pacientes mayores de edad previamente incubados por equipo BacT/ALERT 3D®
- Hemocultivos positivos monobacterianos previamente observados mediante coloración de Gram.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- Hemocultivos positivos provenientes de otros centros de la organización, clientes externos, unidad renal y ciudades
- Hemocultivos positivos de pacientes pediátricos
- Hemocultivos positivos con más de una forma bacteriana observado en coloración de Gram.
- Hemocultivos positivos con presencia compatible de estructuras fúngicas mediante coloración de Gram.

HIPÓTESIS:

Ho: método directo tiene una concordancia con el método convencional por MALDI-TOF., y no presentan ventaja sobre el método convencional

Ha: el método directo por MALDI-TOF presenta una ventaja sobre el método convencional.

VARIBLES:

- ✓ **Se estudiaron variables demográficas: sexo, edad, lugar de origen de la muestra.**
- ✓ **Variabes relacionadas con las características del hemocultivo: número de la botella positiva ,clasificación bacteriana , morfología bacteriana y metodología de identificación bacteriana.**

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- ✓ **Análisis descriptivo de variables de interés**
- ✓ **Variabes cualitativas: frecuencias absolutas y relativas**
- ✓ **Objetivo principal: índice kappa mínimo aceptado 0,85**
- ✓ **Nivel de desempeño: 0,95- 1 (95-100%)**
- ✓ **Datos: analizados en Stata v.13.0**

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Declaración del Helsinki



Normatividad vigente para Colombia



Resoluciones N° 2378 de 2008 y N° 8430 de 1993 del Ministerio de Salud

Categorizada como “SIN RIESGO”.
pautas éticas para la investigación en salud OMS



Vitek MS® es un dispositivo biomédico con certificación IVD para muestras humanas según INVIMA



no se tomaron ni se modificaron las decisiones clínicas con los resultados de la prueba alterna

protocolo de estudio fue sometido para evaluación ética al Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI).

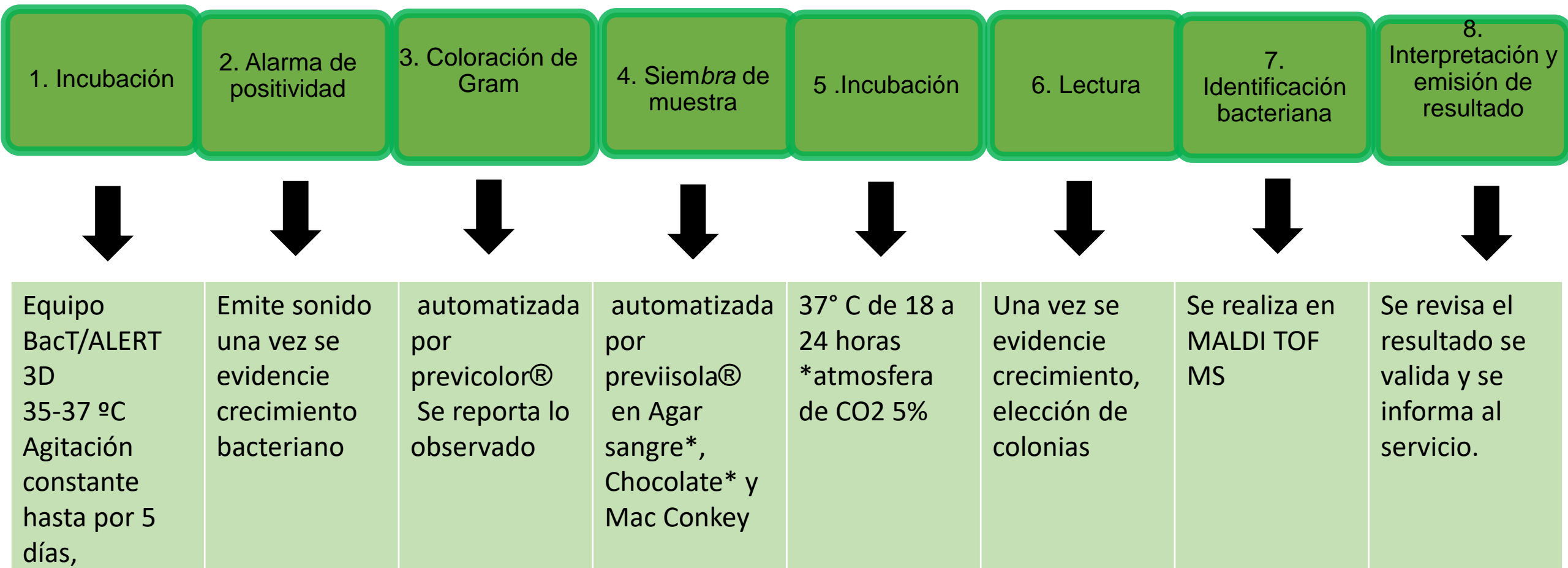


procesos de habilitación y acreditación de Clínica Colsanitas

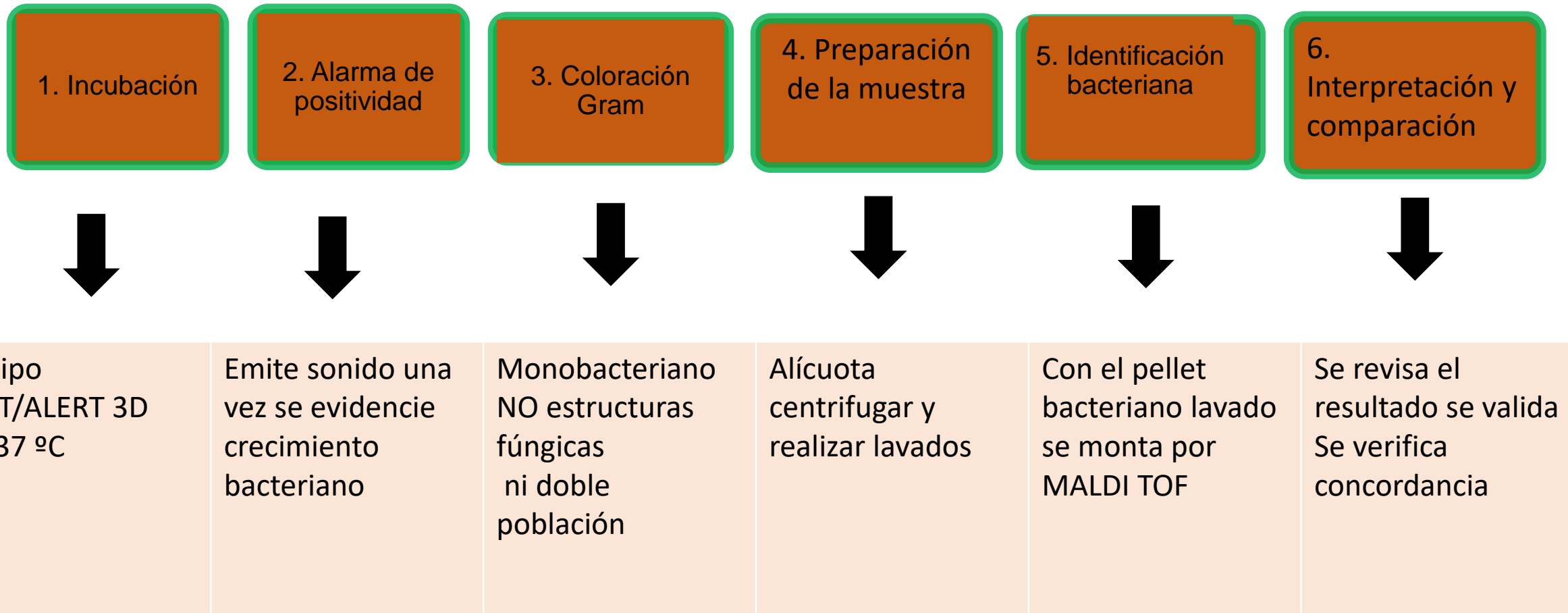


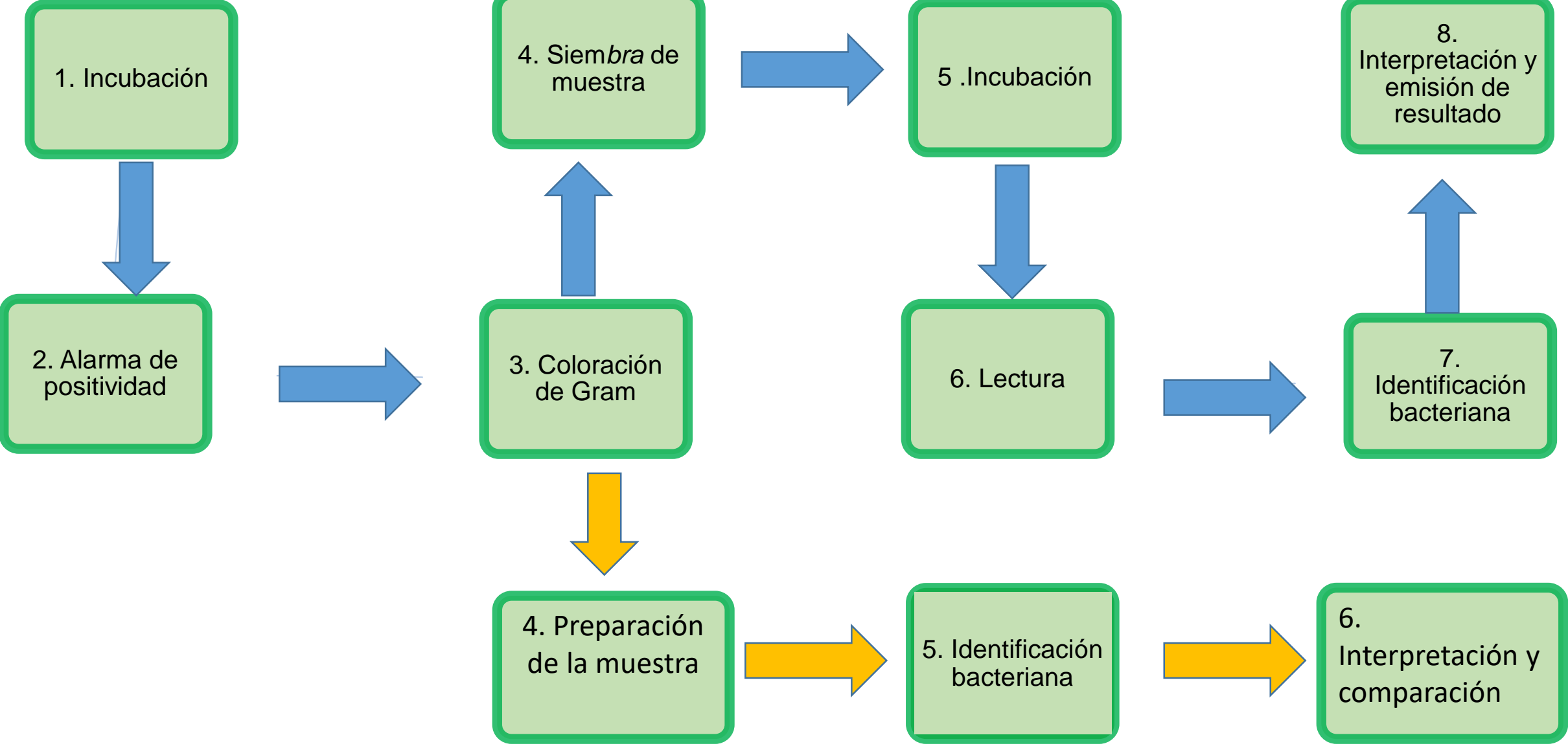
se mantuvo la confidencialidad de la información
Los datos solamente se publicarán cuando concluya el estudio y de forma consolidada

METODOLOGÍA CONVENCIONAL

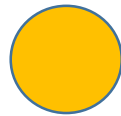


METODOLOGÍA DIRECTA





Metodología convencional



Metodología directa

Resultados método directo

- Se registraron en la base de datos
- Se compararon con los obtenidos en método convencional

Resultados método convencional

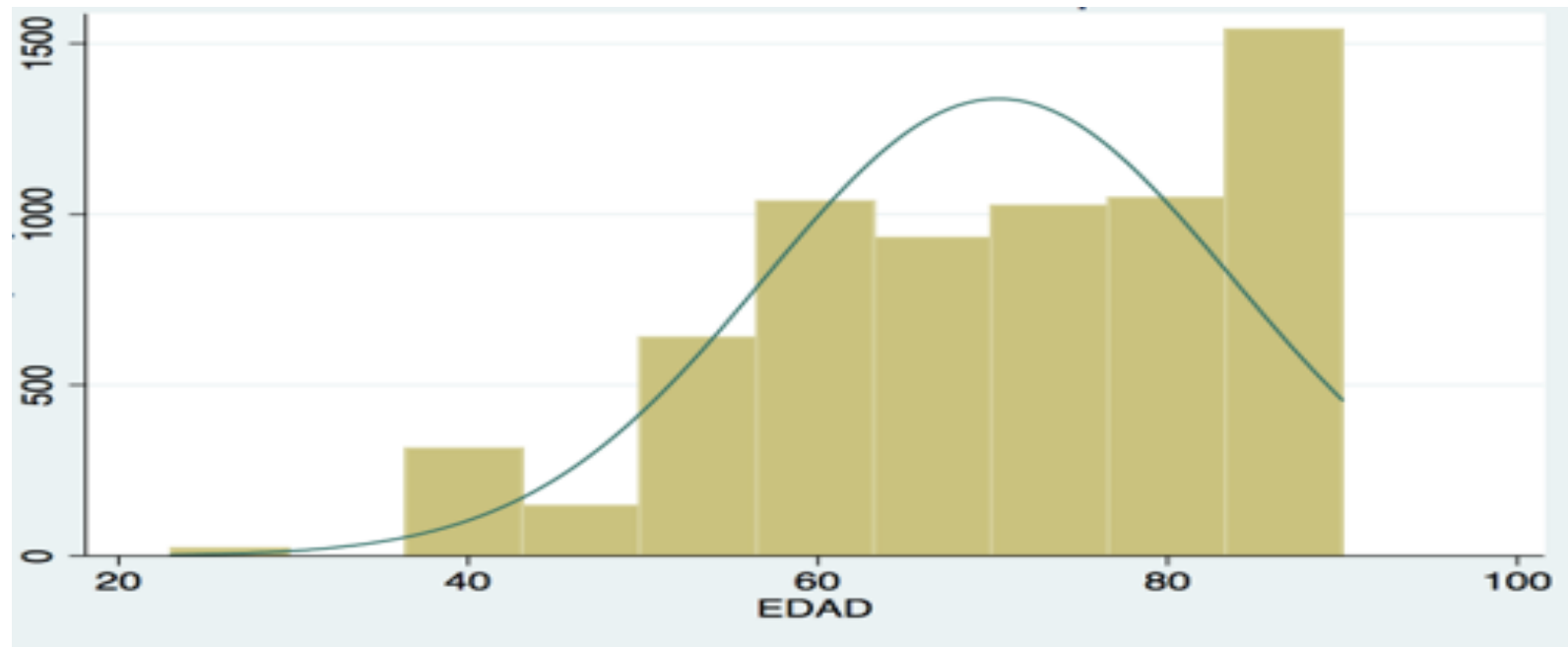
- Fueron obtenidos del sistema de información ERP
- Se registraron en la base de datos

Análisis estadístico

- Se estimó el índice Kappa (κ), estableciendo un nivel mínimo aceptado del 0,85 (85%) y un nivel de desempeño esperado entre 0,95-1 (95-100%).

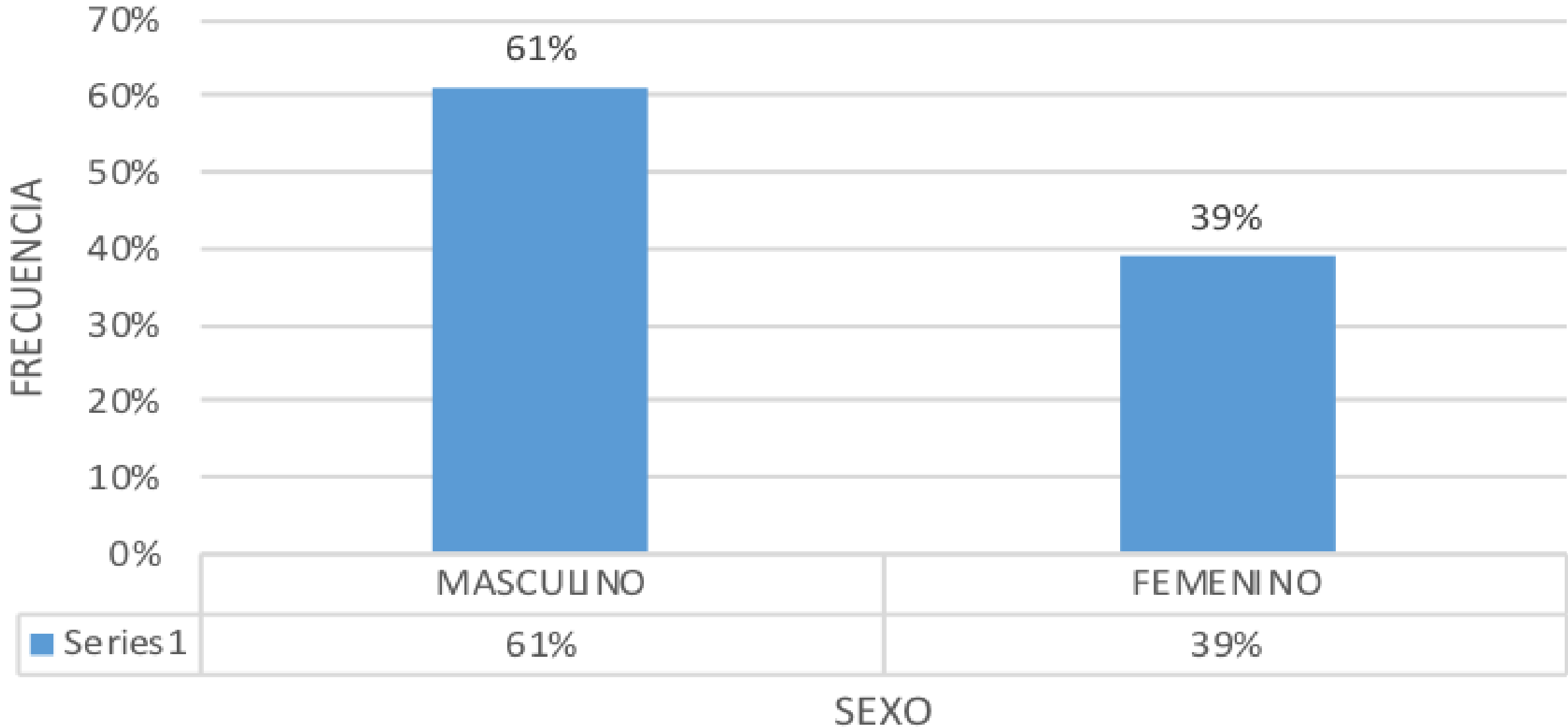
RESULTADOS

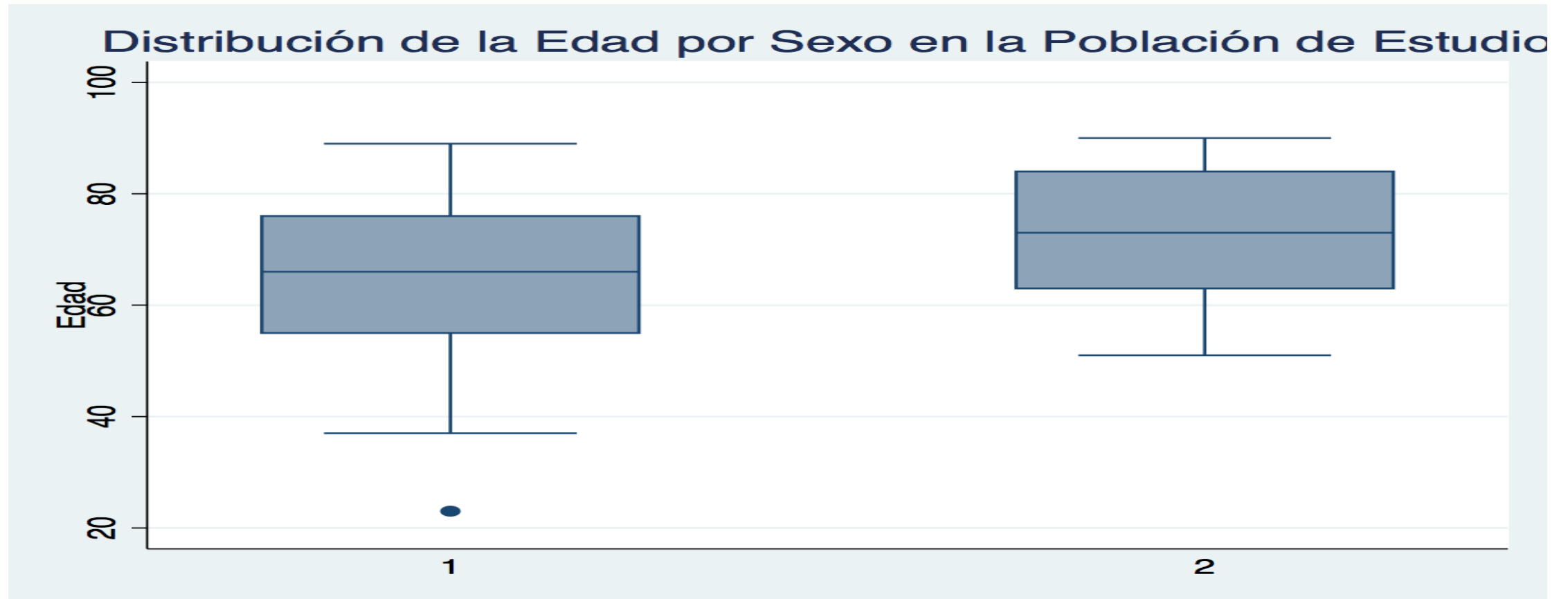
Histograma de Distribución de la Edad



La media para la edad de la población estudiada corresponde a 67 años desviación estándar de +/- 14.70 años.

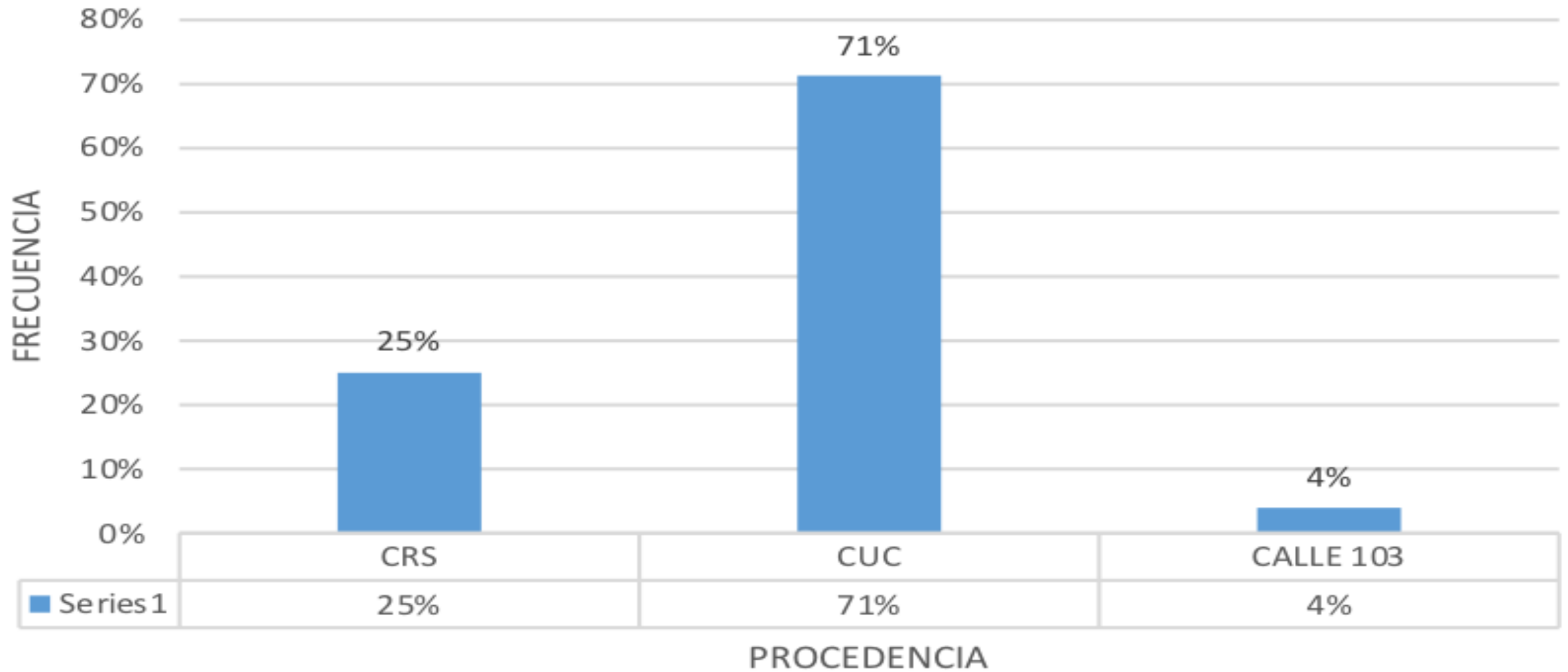
DISTRIBUCIÓN DE SEXO



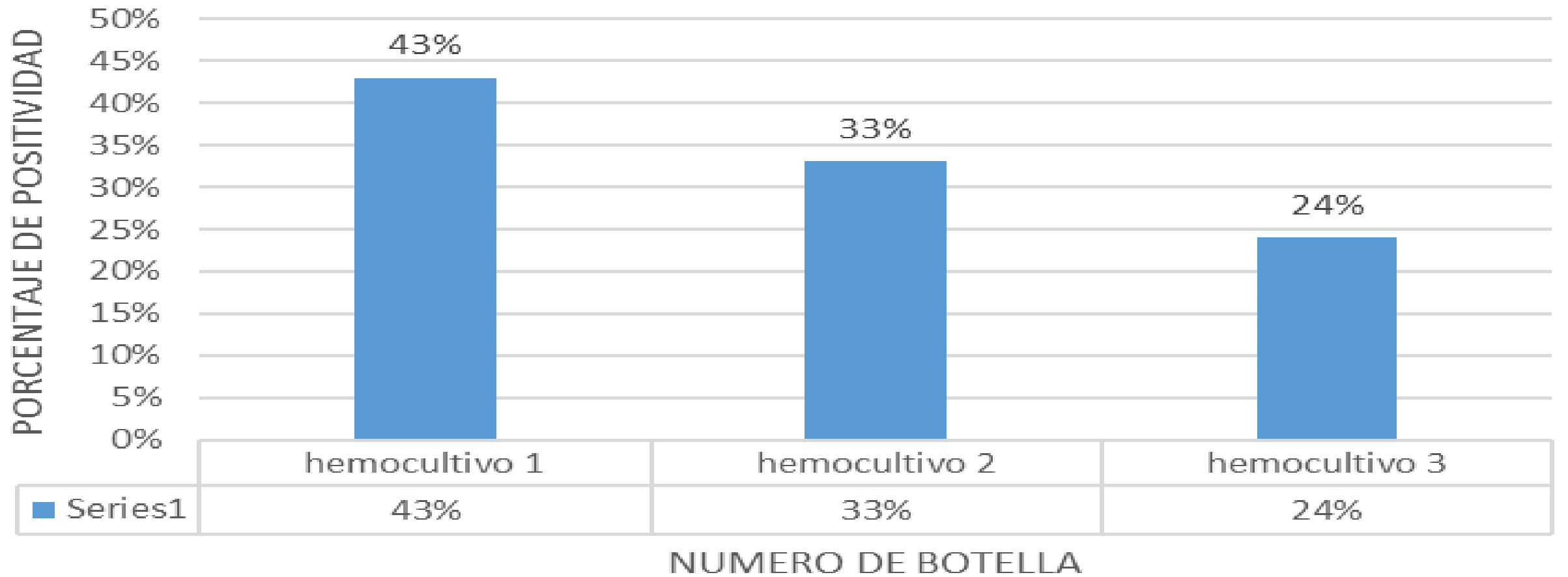


Del 61 % analizado del sexo masculino (1), la media de edad de 63,88 años con una desviación estándar +/- 15.60 años, y del 39% del sexo femenino (2) la media de edad fue de 72.2 años con una desviación estándar +/- 11.65.

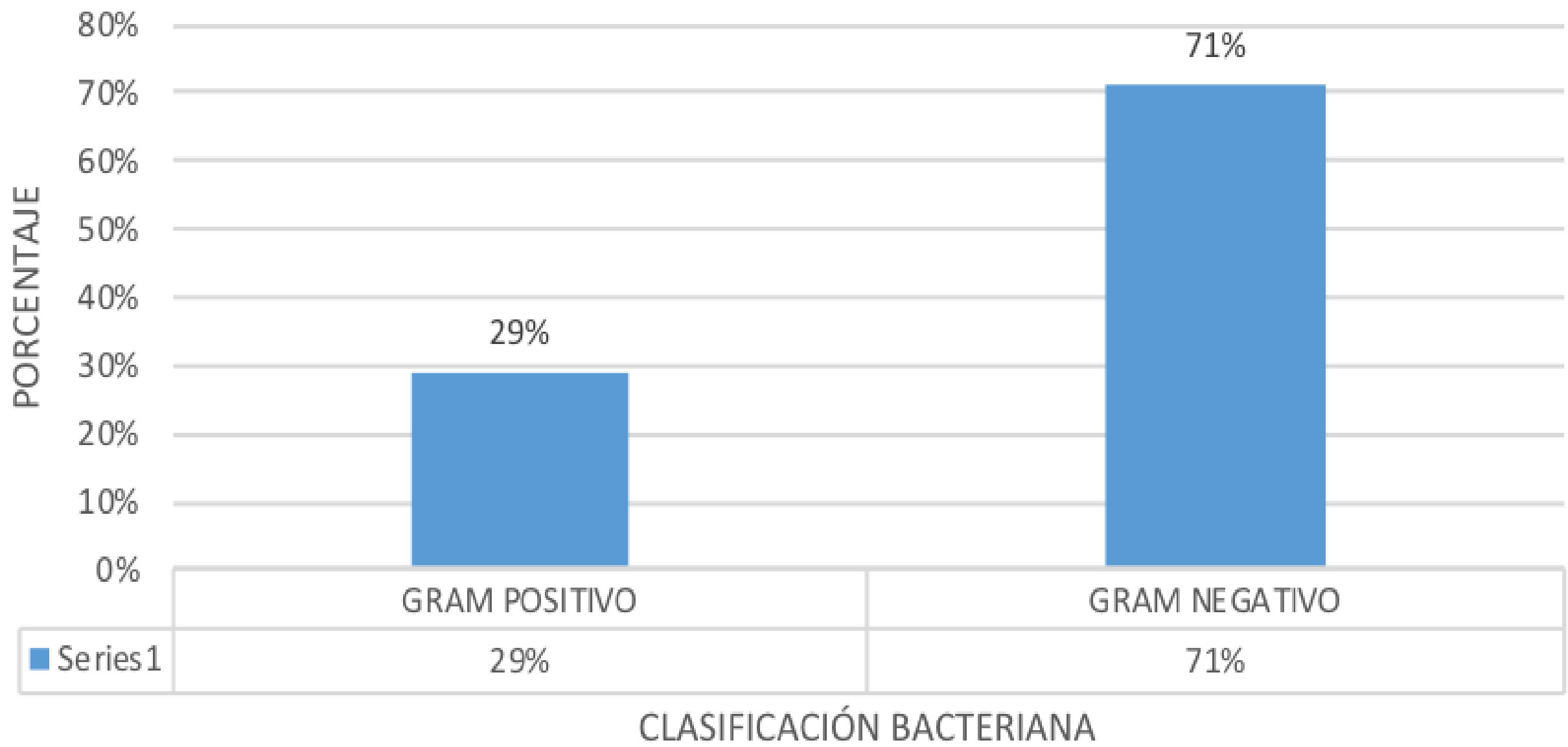
LUGAR ORIGEN DE LA MUESTRA



BOTELLA DE HEMOCULTIVO POSITIVO

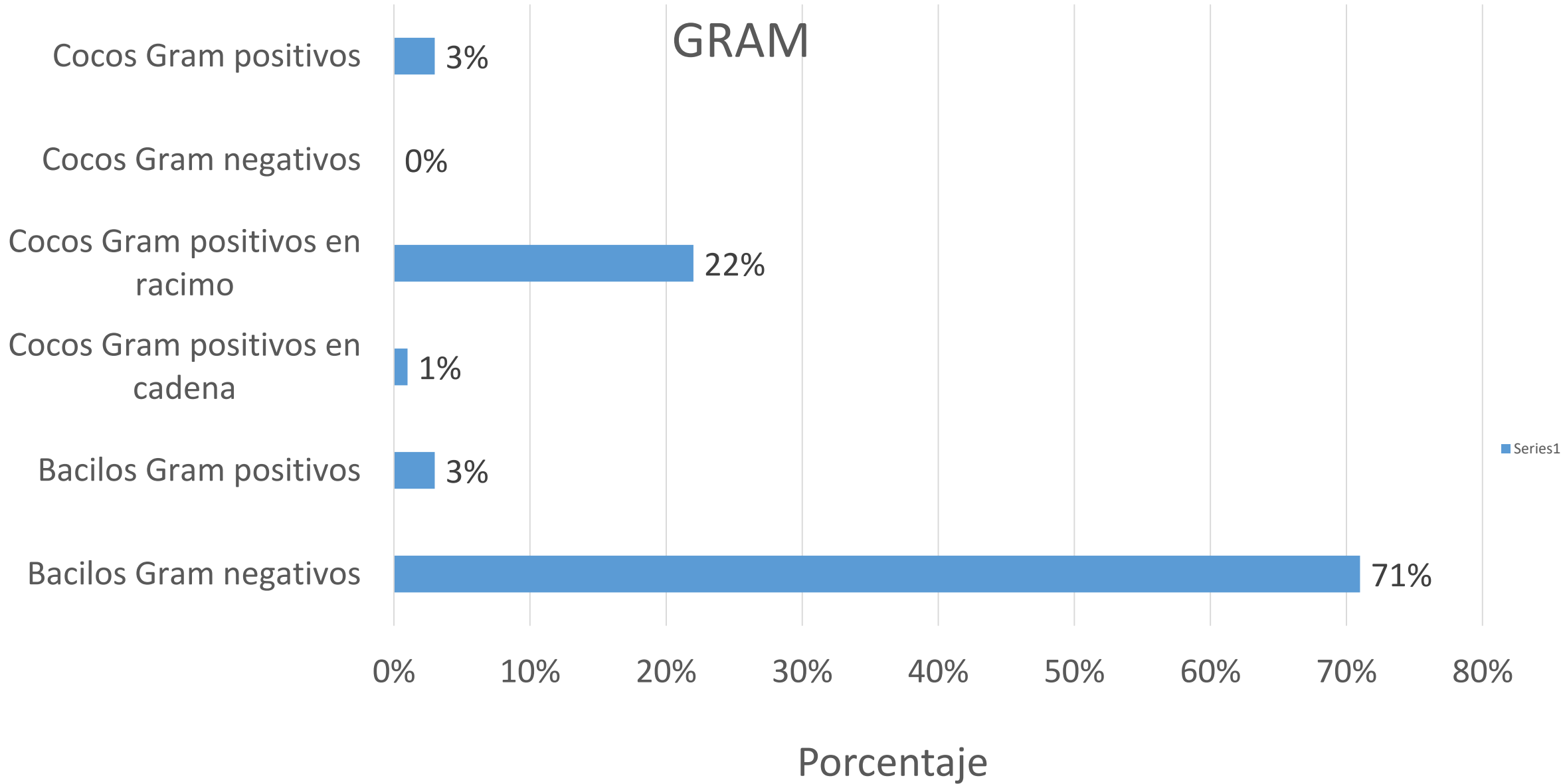


DISTRIBUCIÓN POR COLORACIÓN DE GRAM



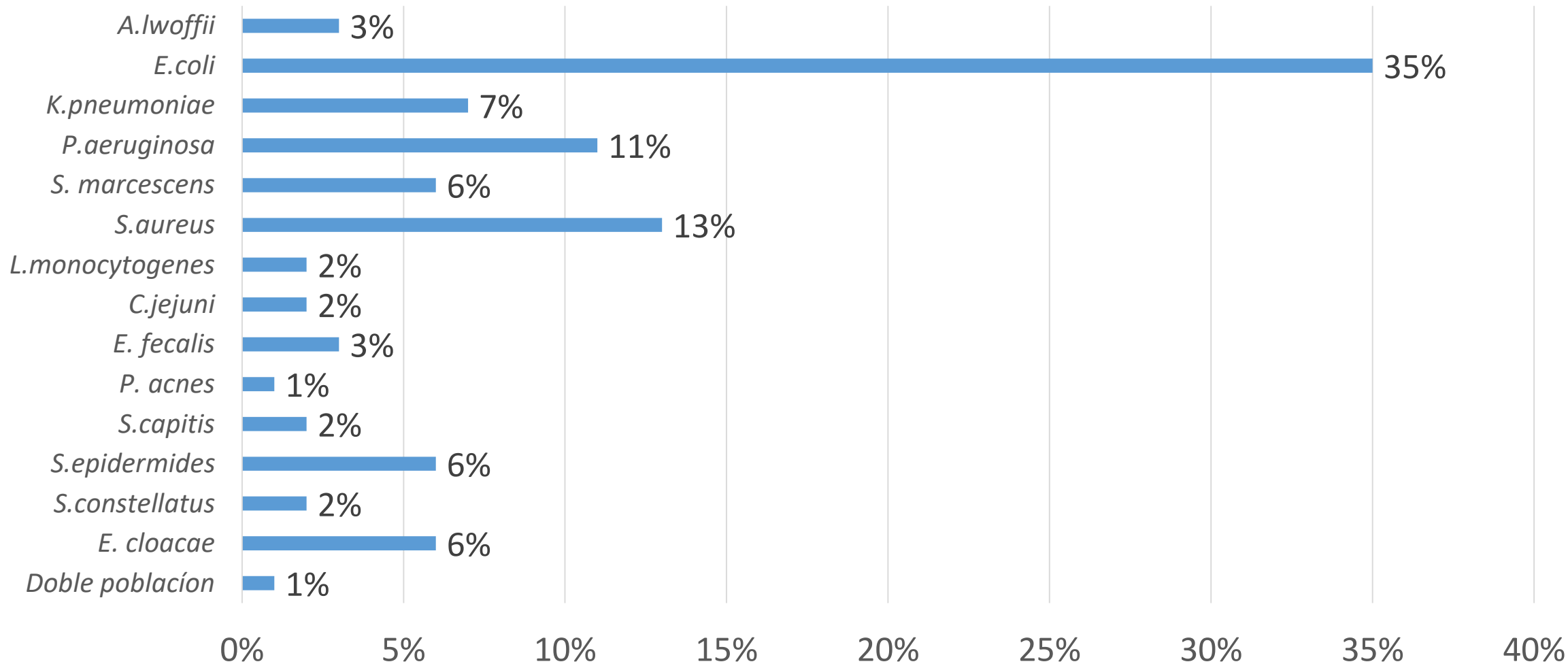
DISTRIBUCIÓN MORFOLOGÍA BACTERIANA EN TINCIÓN DE GRAM

Morfología Bacteriana



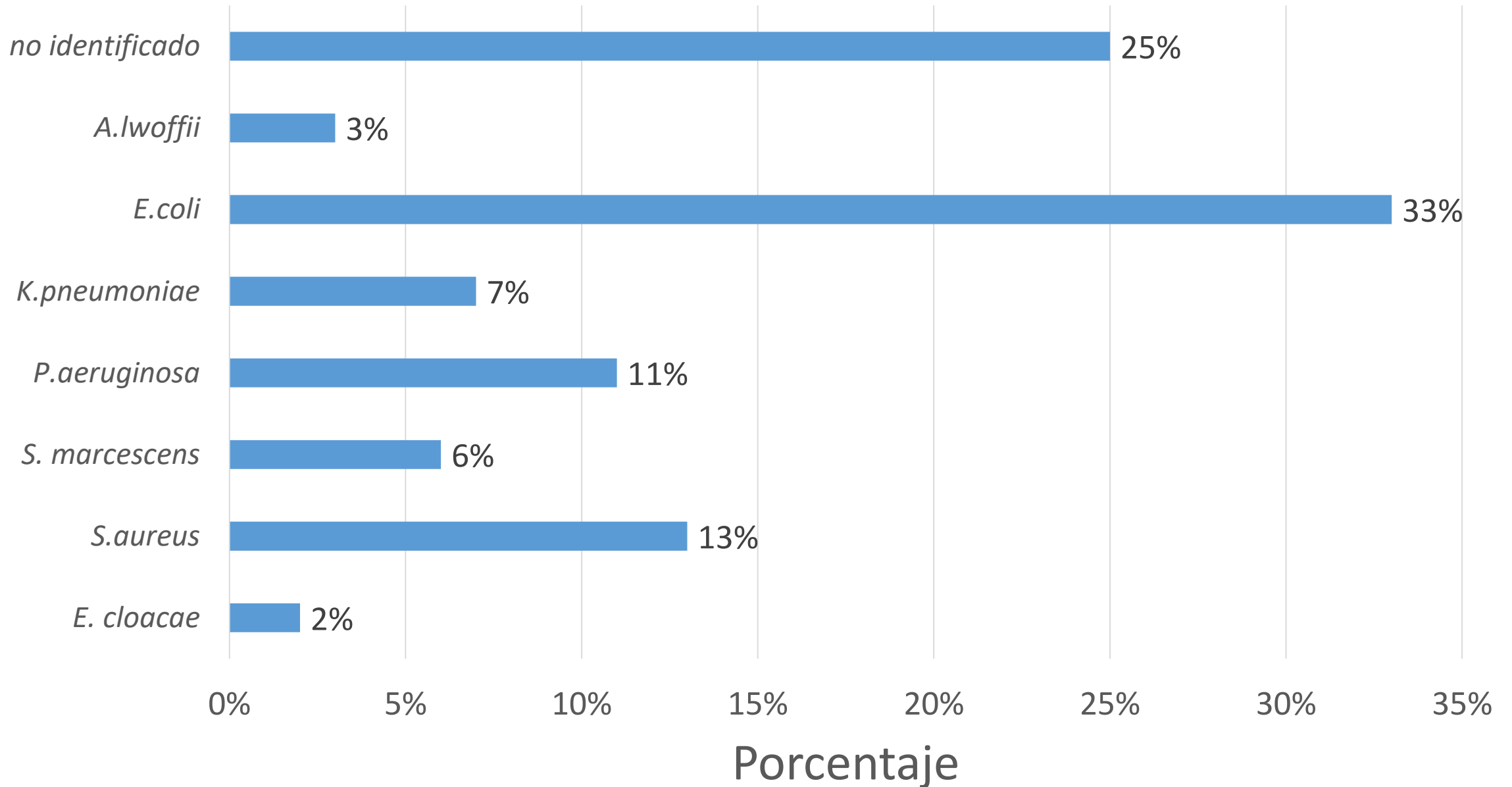
Distribución Identificación Bacteriana Método Convencional

Identificación Bacteriana

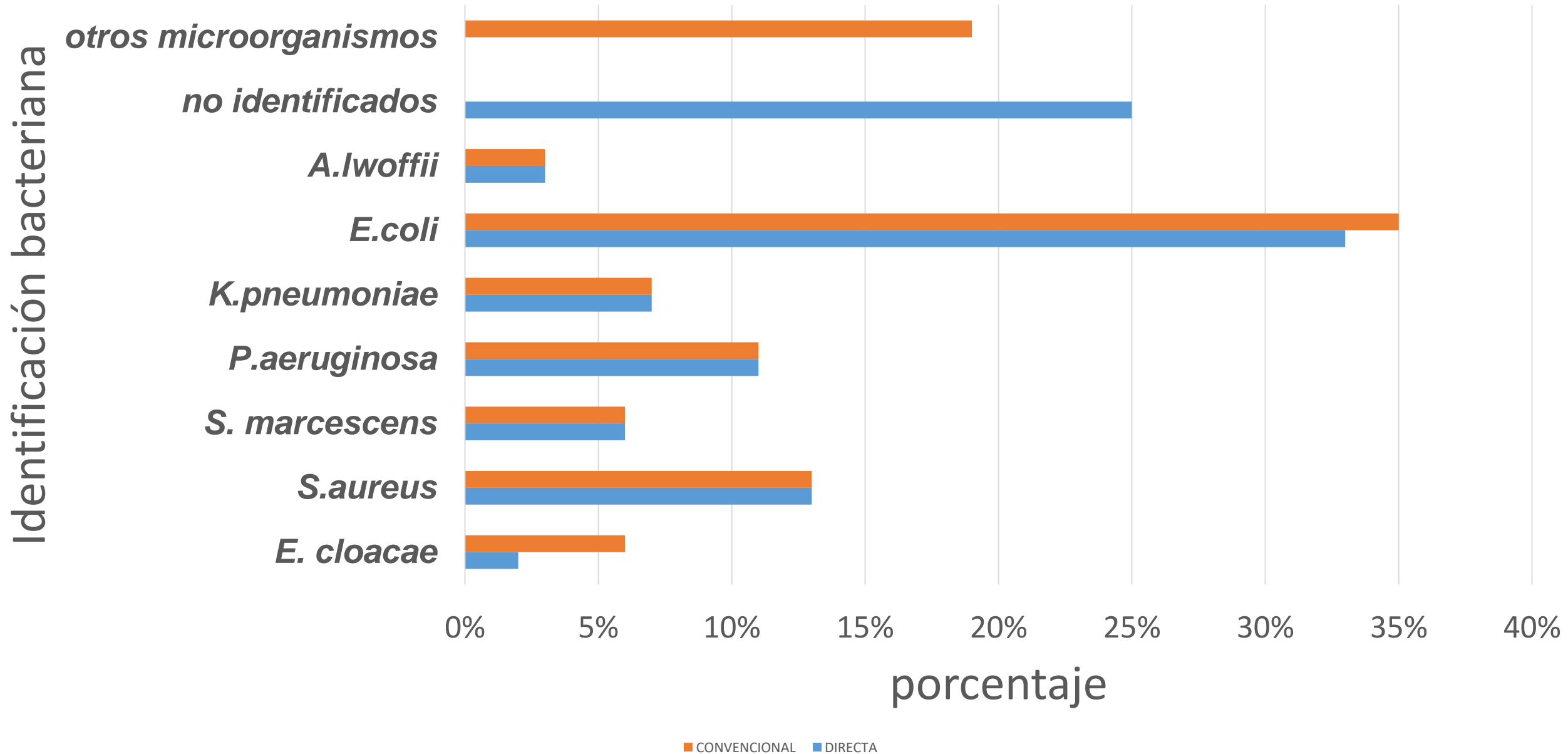


Porcentaje

Distribución Identificación Bacteriana Método Directo



Comparativo entre las metodologías



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

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

Categorización de índice Kappa

Pobre $\kappa < 0.20$

débil $\kappa: 0.21 - 0.40$

Moderada $\kappa: 0.41 - 0.60$

Buena $\kappa: 0.61 - 0.80$

Muy buena: $0.81 - 1.00$

DISCUSIÓN

Los hemocultivos, paraclínico idóneo para confirmar bacteremias en sospecha de sepsis

- Según el consenso colombiano de sepsis realizado en 2017.(1)

La oportunidad es fundamental para establecer una terapia eficaz en bacteremias

- Entre más eficiente sea el diagnóstico etiológico de la bacteriemia aumenta en un 8% evolución e inicio de tratamiento. (2)

MALDI TOF reduce el tiempo de identificación de hemocultivos positivos

- El 11.3 % de los pacientes recibieron terapia antibiótica antes de 24 horas de positivización del hemocultivo. (3)

1.Campaña para sobrevivir a la sepsis : recomendaciones internacionales para el tratamiento de la sepsis y el choque septicémico : 2016

2.. Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K, Aepfelbacher M. Rapid Identification of Bacteria from Positive Blood Culture Bottles by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption – Ionization Tim

3, Cattani ME, Posse T, Hermes RL, Kaufman SC. Identificación rápida de microorganismos de frascos de hemocultivos por espectrometría de masas. Comparación de 2 procedimientos diagnósticos. Rev Argent Microbiol [Internet]. 2015 [cited 2017 Apr 12];47(3):190–5. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754115000838>

Clínica Universitaria Colombia, es el lugar de donde proviene el mayor número de muestras con positividad

- Asociado a la complejidad de la clínica, a su capacidad instalada y la atención integral entre usuarios contributivos y MP
- De instituciones regionales, universitarias y hospitales de alta complejidad es de donde proviene el mayor número de muestras (1)

Se evidencia mediante coloración de Gram mayor frecuencia de morfología Gram negativa que Gram positiva

- En 10 hospitales de Colombia se demostró que los microorganismos más frecuentemente hallados corresponden a Gram negativos con un 74%, Gram positivos un 20 % y estructuras fúngicas 6 %. (2)

(1) Sakarikou C, Ciotti M, Dolfa C, Angeletti S, Favalli C. Rapid detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains derived from blood cultures by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *BMC Microbiol* [Internet]. 2017;17(1):54. Available from: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-017->

(2) Rosa GD La. Epidemiología y pronóstico de pacientes con infección del torrente sanguíneo en 10 hospitales de Colombia. 2008;141–9.

La mayor forma bacteriana del estudio corresponde bacilos Gram negativas

- La prevalencia de microorganismos aislados en hospitales de Colombia corresponden a Enterobacterias.
- es similar a lo reportado en este estudio en donde la mayor forma bacteriana corresponde a bacilos Gram negativos seguido de cocos Gram positivos .(1)

similitudes significativas por los dos métodos en algunos microorganismos

- La mayoría de microorganismos Gram negativos del estudio fueron identificados correctamente por el método directo a diferencia de los Gram positivos
- porque según la literatura son exigentes para su identificación debido a su contenido proteico, estructura y envoltura celular por su alto porcentaje de peptidoglicano (2)

Interferencias para que índice kappa estuviera por debajo del limite esperado

- El índice kappa arroja un resultado de concordancia del 68 % (0,6807) con un valor $p=0.000$, encontrándose en la categoría de bueno según el índice de concordancia de índice kappa (3)

(1) Pacheco R, Osorio L, Correa AM, Villegas MV. Prevalencia de bacterias Gram negativas portadoras del gen bla KPC en hospitales de Colombia. 2014;34:81–90.

(2) Relloso MS, Nievas J, Fares S, Farquharson V, Mujica MT, Romano V, et al. Evaluación de la espectrometría de masas : MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de hemocultivos Rev Argent Microbiol [Internet]. 2015;47(2):103–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2015.02.004>.

(3) Lopez de ullibbarri GL PF s. medidas de concordancia; indice kappa. 1999.

CONCLUSIONES

- Se observó una mayor frecuencia de positividad en los hemocultivos analizados en la población de estudio, para el sexo femenino con una media de edad de 72,2 años
- La mayoría de las muestras obtenidas provienen de la Clínica Universitaria Colombia debido a su capacidad instalada con 625 Camas y a la variabilidad de usuarios atendidos por los diferentes regímenes de atención en salud al que pertenecen.

CONCLUSIONES

- Se encontró una mayor frecuencia de microorganismos Gram negativos en la muestra analizada
- El estudio demostró que los microorganismos Gram negativos presentan mayor concordancia en identificación por la metodología MALDI TOF MS que los microorganismos Gram positivos.
- La metodología MALDI TOF MS es la más opcionada en la obtención de identificación bacteriana rápida por método directo, sin embargo, es necesario mejorar el proceso de preparación de pellet bacteriano antes de su análisis.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios por ser mi guía, mi luz y por darme las fuerzas necesarias en cada momento difícil de mi vida.
- A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca quien me abrió las puertas y me dio la oportunidad de formarme como profesional.
- Al Laboratorio Clínico Sanitas por su apoyo como auxiliar de Laboratorio, como estudiante y ahora como futuro Bacteriólogo.
- Al Doctores José Arnulfo y Vilma Yamile por su asesoramiento en el mismo.

BIBLIOGRAFÍA

- ✓ http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion_proteinas.pdf
- ✓ <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X16301847>
- ✓ <http://www2.montes.upm.es/dptos/digfa/cfisica/magnet/espectrometro.html>
- ✓ <http://www.linchem.aaccjnls.org/content/61/1/100>
- ✓ <http://www.biomerieux-diagnostics.com/bact-alert-culture-media>
- ✓ <http://corpogensolutions.com/servicios/identificaci%C3%B3n-molecular-de-bacterias-y-hongos>
- ✓ Pacheco R, Osorio L, Correa AM, Villegas MV. Prevalencia de bacterias Gram negativas portadoras del gen bla KPC en hospitales de Colombia. 2014;34:81–90.
- ✓ Rellos MS, Nievas J, Fares S, Farquharson V, Mujica MT, Romano V, et al. Evaluación de la espectrometría de masas : MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de hemocultivos Rev Argent Microbiol [Internet]. 2015;47(2):103–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2015.02.004>.
- ✓ Lopez de ullibbarri GL PF s. medidas de concordancia; indice kappa. 1999.
- ✓ Sakarikou C, Ciotti M, Dolfa C, Angeletti S, Favalli C. Rapid detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains derived from blood cultures by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). BMC Microbiol [Internet]. 2017;17(1):54. Available from: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-017->
- ✓ Rosa GD La. Epidemiología y pronóstico de pacientes con infección del torrente sanguíneo en 10 hospitales de Colombia. 2008;141–9.