



Facultad de
Enfermería

Universidad de Valladolid
Grado en Enfermería
Facultad de Enfermería de Valladolid

UVa

Curso 2023-2024
Trabajo de Fin de Grado

**IDENTIFICACIÓN MICROBIANA
DIRECTA A PARTIR DE FRASCOS DE
HEMOCULTIVO POSITIVOS MEDIANTE
ESPECTROMETRÍA DE MASAS
MALDI-TOF**

DIEGO DEL POZO RODRIGUEZ

Tutor/a: Gabriel Alberto March Rosselló

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	4
1.INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Importancia diagnóstica del hemocultivo	7
1.2 Procesamiento de los hemocultivos en los laboratorios de Microbiología Clínica	8
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS	11
3.1 Estrategia de búsqueda	12
3.2 Estrategia de Evaluación.....	12
3.3 Estrategia de selección	13
4. RESULTADOS.....	14
4.1 Diagrama de flujo PRISMA para revisiones sistemáticas	14
4.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	15
4.3 Importancia de la aplicación de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la práctica asistencial enfermera	18
4.4 Identificación microbiana directa a partir de frascos de hemocultivo crecidos mediante MALDI-TOF	19
5. DISCUSIÓN.....	39
6. CONCLUSIONES	41
6.1 Conclusiones generales.....	41
6.2 Limitaciones del Trabajo	41
6.3 Fortalezas.....	41
6.4 Implicaciones en la práctica clínica.....	42
6.5 Futuras líneas de investigación.....	42
8. BIBLIOGRAFÍA.....	43
7. ANEXOS.....	48
Anexo I: Herramienta de evaluación de la evidencia en estudios observacionales: Guía STROBE (19)	48
Anexo II: Herramienta de evaluación de la evidencia en estudios experimentales: Guía TREND (20).....	49
Anexo III: Tabla de resultados.....	51
Anexo IV: Herramienta de evaluación de la evidencia en Revisiones sistemáticas: Guía PRISMA (22)	54
Anexo V: Herramienta de evaluación de la evidencia en Revisiones bibliográficas: Guía CASPE (23).....	62
Anexo VI: Herramienta de evaluación de los niveles de evidencia científica JBI (24)	64
Anexo VII: Tabla de evaluación de los estudios utilizados	66

ÍNDICE DE SIGLAS

MALDI-TOF: *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*

RUO: *Research Use Only*

CE-IVD: Dispositivos de diagnóstico in vitro vendidos en la unión europea

HCCA: Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico

HF: Procedimiento convencional

MS: Procedimiento del fabricante

SDA: Agar Sabouraud Dextrosa

McF: McFarland

PYR: Pirrolidonicaridamidas

BGNF: Bacterias gramnegativas no fermentadoras

R.P.M.: Revoluciones por minuto

ECN: Estafilococos coagulasa negativa

TFG: Trabajo de fin de grado

JB: Instituto Joanna Briggs

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resultados obtenidos por Pan H <i>et al.</i> (16) de identificación bacteriana directa mediante MALDI-TOF a partir de frascos de hemocultivo crecidos.....	22
Tabla 2: Identificación de bacterias y levaduras directamente de hemocultivos positivos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, extraída de Azula N <i>et al.</i> (17)	27
Tabla 3: Identificación de bacilos Gramnegativos directamente de hemocultivos positivos por espectrometría de masas MALDI-TOF, extraída de Azula N <i>et al.</i> (17)	28
Tabla 4: Resultados de identificación directa mediante MALDI-TOF de bacilos gramnegativos, extraída de Azula N <i>et al.</i> (17)	29
Tabla 5: Resultados de identificación directa por MALDI-TOF frente a la identificación de colonia de cocos grampositivos comprendidos en distintos grupos, extraída de Azula N <i>et al.</i> (17)	29
Tabla 6: Resultados de la identificación de agentes causales de bacteriemia a partir de frascos de hemocultivos positivos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF con un procedimiento artesanal (HF) y con un kit comercial (MS), extraída de Cattani ME <i>et al.</i> (18)	32
Tabla 7. Distribución del <i>score</i> obtenido en la identificación directa de agentes de bacteriemia a partir de frascos de hemocultivo positivos mediante usando un kit artesanal (HF) y un kit comercial (MS), extraída de Cattani ME <i>et al.</i> (18) ...	33
Tabla 8. Identificación de hemocultivos de ambas marcas mediante MALDI-TOF y su comparación con el método bioquímico de rutina, extraída de Wang Y <i>et al.</i> (14)	37

Tabla 9: Fiabilidad de la identificación microbiana directa de bacterias grampositivas mediante MALDI-TOF a partir de frascos de hemocultivos *Thermo*, extraída de Wang Y *et al.* (14)38

Tabla 10: Fiabilidad de la identificación directa de bacterias gramnegativas mediante MALDI-TOF a partir de hemocultivos *Thermo*, extraída de Wang Y *et al.* (14)39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de flujo PRISMA (8) 15

Figura 2: Esquema del MALDI-TOF, imagen tomada de *Croxatto et al.* (9).....17

Figura 3: Procedimiento seguido por Pan H *et al.* (16) para la identificación bacteriana directa a partir de hemocultivo crecido mediante MALDI-TOF..... 21

Figura 4: Procedimiento de preparación de la muestra extraída de Azula N *et al.* (17) para la posterior identificación directa mediante espectrometría de masas MALDI-TOF 25

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Para el correcto manejo de los pacientes que padecen una bacteriemia es indispensable la administración de los antibióticos adecuados lo más rápidamente posible. Para ello se debe conocer la especie bacteriana que está causando la bacteriemia. La espectrometría de masas MALDI-TOF ha irrumpido en los laboratorios de Microbiología Clínica debido a que es capaz de proporcionar una identificación microbiana en unos minutos. Esta ventaja es de gran importancia cuando se aplica a la identificación microbiana directa a partir de frascos de hemocultivos positivos.

OBJETIVOS: El objetivo de este TFG será describir la técnica MALDI-TOF, recopilar los resultados que ofrece de identificación microbiana directa en cuestión de tiempo y capacidad de identificación, comparándola con los procedimientos convencionales.

MATERIAL Y MÉTODOS: Con el propósito de realizar una revisión sistemática se llevó a cabo una búsqueda en *PubMed*, *Scielo* o *Elsevier*. Se seleccionaron estudios relacionados con la espectrometría de masas MALDI-TOF y la identificación directa de hemocultivos.

RESULTADOS: Se han revisado 24 artículos, de los cuales se analizaron cuatro estudios que compararon los métodos de identificación directa de frascos de hemocultivo crecido mediante MALDI-TOF frente a los métodos convencionales de subcultivo en placa de aislamiento. Se ha observado una concordancia de alrededor el 90% y un adelanto de tiempo en unas 17 horas como mínimo con respecto a la identificación convencional.

CONCLUSIONES: La identificación microbiana directa mediante MALDI-TOF ha demostrado una gran concordancia con los resultados convencionales obtenidos a partir del subcultivo en placas de aislamiento, consiguiendo identificaciones válidas en menos tiempo que los métodos convencionales.

PALABRAS CLAVE: MALDI-TOF, hemocultivos, bacteriemia, microbiología

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia diagnóstica del hemocultivo

Las técnicas de detección de patógenos en infecciones del torrente sanguíneo se han desarrollado rápidamente desde los inicios del siglo XX cuando se empezó a utilizar el hemocultivo como base para la detección de microorganismos en este tipo de infecciones.

Por un lado, la bacteriemia se define como la presencia de bacterias en la sangre del paciente. Se diagnostica principalmente mediante aislamiento bacteriano en subcultivos sólidos a partir de frascos de hemocultivos crecidos. El origen de la bacteriemia puede variar dependiendo de las características clínicas del paciente (1).

Por otro lado, la sepsis se trata de un fallo en la función orgánica del paciente que amenaza gravemente su vida, debido a una respuesta inmune inadecuada del cuerpo frente a la infección (1). La sepsis constituye una emergencia grave debido a que puede acabar con la vida del paciente en pocos días si no se realiza el correcto diagnóstico microbiológico y se administra el tratamiento antibiótico adecuado. Cada año en todo el mundo se producen alrededor de 18 millones de casos de sepsis graves, especialmente en unidades de cuidados intensivos, con una mortalidad cercana al 30%; de este modo fallecen unas 1400 personas al día por sepsis (2).

La realización de hemocultivos nos permite llevar a cabo un diagnóstico microbiológico de sepsis, además de otros procesos clínicos como por ejemplo artritis sépticas, endocarditis infecciosas, neumonías que cursan con bacteriemia, infecciones de tracto urinario, meningitis bacterianas agudas que cursan con bacteriemia, y un gran número de enfermedades infecciosas que requieren de un rápido diagnóstico para ser tratadas correctamente (1,3).

Debido a la importancia diagnóstica del hemocultivo positivo, la capacidad de identificar rápidamente el microorganismo es clave para el correcto manejo de los pacientes. Es indispensable obtener la identificación del agente causal de la infección en el menor tiempo posible para que sea posible aplicar el tratamiento

antibiótico efectivo lo más rápidamente posible. Otra razón importante para adelantar el resultado del hemocultivo es la reducción del coste sanitario. Varios estudios han informado de mayores tasas de mortalidad, morbilidad y duración de la estancia hospitalaria en grupos de pacientes que debido a un resultado lento o a la carencia de este, no reciben el tratamiento antibiótico adecuado, encareciéndose así los costes sanitarios (4).

Los hemocultivos se realizan mediante venopunción periférica y debe realizarse en el momento de la tiritona – escalofríos, aunque no se registre subida de temperatura e incluso en algunas situaciones no se vea ningún signo de infección a la vista en un primer momento. El volumen de extracción indicado es de 8 -10 ml en adultos por cada botella (aerobio y anaerobio). Se extraen normalmente dos o tres tandas de hemocultivos. Se recomienda la recogida simultánea de las tandas de hemocultivos debido a que se obtienen resultados similares que cuando se extraen separados en el tiempo (5).

El procedimiento se debe realizar con las máximas condiciones de asepsia, siguiendo los siguientes pasos:

- Uso de mascarilla y guantes
- Los hemocultivos se limpiarán con clorhexidina alcohólica al 2%.
- Seleccionaremos el lugar de punción, se palpará la zona antes de desinfectar y posteriormente desinfectaremos procediendo a la punción. Se inoculará primeramente el frasco aerobio en caso de utilizar un sistema de vacío y palomilla. En cambio, se inoculará primero el frasco anaerobio si se trata de una extracción con aguja. Por último, realizar una agitación suave para después trasladarlos urgentemente al laboratorio de microbiología sin alterar su temperatura (5).

1.2 Procesamiento de los hemocultivos en los laboratorios de Microbiología Clínica

Los frascos de hemocultivos inoculados con sangre del paciente, cuando llegan al servicio de Microbiología, se introducen en sistemas que monitorizan el crecimiento bacteriano. Si el sistema marca como positivo un frasco de hemocultivo se realiza la tinción de Gram para observar si han crecido cocos o

bacilos y su carácter gram. Además, se realiza el subcultivo del frasco de hemocultivo en placas de aislamiento. Las placas se incuban, como mínimo durante 17 horas y una vez crecidas las colonias bacterianas se procede a su identificación.

Existen diversos métodos para llevar a cabo la identificación microbiana a partir de colonias crecidas en las placas de aislamiento. Estos métodos no son directos y sirven como *gold standard* para la identificación microbiana de los microorganismos que causan una bacteriemia. Estos métodos se realizan de la siguiente manera:

Como se ha dicho anteriormente, se realiza un subcultivo del frasco en diversas placas de aislamiento y las placas se incuban como mínimo 17 horas. Cuando las colonias han crecido, podemos realizar la identificación mediante pruebas bioquímicas, las cuales nos demorarán el diagnóstico otras 17 horas para conseguir los resultados. En cambio, si realizamos la identificación mediante el sistema MALDI-TOF, obtenemos la identificación en unos pocos minutos. Gracias a la identificación mediante MALDI-TOF podemos adelantar la identificación de las colonias crecidas en las placas de aislamiento en 17 horas comparado con la identificación bioquímica.

Ante este elevado consumo de tiempo se han instaurado diferentes métodos de identificación directa a partir de frasco de hemocultivo crecido. En estos métodos no se realiza el subcultivo en placas de aislamiento, si no que la identificación se realiza a partir de los frascos de hemocultivo crecidos. Estos métodos pueden ser:

Métodos fenotípicos. Se engloban las pruebas bioquímicas, las galerías multipruebas o los sistemas comerciales automatizados. Es un método tradicional y puede realizar la identificación en unas 17 horas desde que el frasco ha sido marcado como positivo.

Métodos moleculares. Se enfocan en la identificación de los componentes moleculares del microorganismo, es decir, su material genético. Su principal problema en identificaciones directas en hemocultivo son un alto coste y que solo

permiten la detección de las dianas genéticas que incorporan los diferentes kits comercializados. La identificación directa se realiza en unas 3 horas después de que el frasco de hemocultivo haya sido marcado como positivo.

Métodos basados en proteómica. Se basan en el estudio del conjunto de proteínas expresadas por un genoma (proteoma). La técnica basada en proteómica más utilizada es la espectrometría de masas MALDI-TOF que puede proporcionar una identificación microbiana en unos minutos.

Ante estos datos, podemos observar que, tanto en los métodos de subcultivo como en los métodos directos, la identificación bioquímica convencional necesita unas 17 horas para obtener los resultados. En cambio, la identificación directa mediante MALDI-TOF a partir de frasco de hemocultivo crecido se puede obtener en unas 3 horas, incluyendo la preparación técnica de la muestra. Esta diferencia de tiempo es muy significativa ya que se podrá instaurar el tratamiento antibiótico más adecuado lo más rápidamente posible (6,7).

Recientemente la espectrometría de masas MALDI-TOF ha irrumpido en muchos de los laboratorios de Microbiología, ofreciendo una alternativa de identificación rápida y fiable de los microorganismos. Su introducción ha supuesto un acortamiento del tiempo necesario para llevar a cabo la identificación de los microorganismos que causan infecciones del torrente sanguíneo a través del procesamiento de hemocultivos.

Todo esto hace que el MALDI-TOF tenga unas ventajas en la identificación microbiana directa a partir del frasco de hemocultivo crecido:

- Es capaz de realizar la identificación microbiana en unos minutos.
- Permite la identificación de la inmensa mayoría de las especies bacterianas aisladas a partir de frascos de hemocultivo crecidos (7).

2. OBJETIVOS

La introducción del hemocultivo ha tenido una gran importancia en la Microbiología Clínica. Además, la rapidez de la identificación directa mediante MALDI-TOF ha logrado adelantar los resultados y ha facilitado la administración de un tratamiento temprano adecuado. En este contexto, los objetivos de este TFG son los siguientes.

El objetivo general es:

- Describir y desarrollar la técnica MALDI-TOF como método para llevar a cabo la identificación microbiana y recopilar los resultados que ofrece de identificación directa de microorganismos a partir de frascos de hemocultivo positivos.

El objetivo específico es:

- Comparar la técnica MALDI-TOF de identificación microbiana directa con el procedimiento diagnóstico convencional de los frascos de hemocultivo crecidos.
- Estudiar el impacto de la técnica MALDI-TOF en la práctica asistencial del personal de enfermería

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha llevado a cabo una revisión sistemática seleccionando publicaciones sobre la espectrometría de masas dentro de los laboratorios de Microbiología Clínica para llevar a cabo la identificación microbiana a partir de frascos de hemocultivo crecidos.

La elaboración de la pregunta de investigación del presente trabajo se basa en la metodología del **esquema PICO**:

- **P** (Paciente/Problema): Hemocultivos positivos
- **I** (Intervención): Estudiar si la utilización del MALDI-TOF en identificación microbiana directa de hemocultivos es eficaz.
- **C** (Comparador): Procesamiento convencional mediante subcultivo de los hemocultivos positivos.

- ○ (Resultado): Evidencias de la eficacia y ahorro de tiempo con respecto a la identificación microbiana convencional

Por lo tanto, planteamos la siguiente pregunta: ¿Es el MALDI-TOF una herramienta útil para llevar a cabo la identificación microbiana directa a partir del frasco de hemocultivo crecido en comparación con las técnicas convencionales de identificación microbiana?

3.1 Estrategia de búsqueda

La estrategia de búsqueda se ha conseguido mediante el método PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses*).

Se han seleccionado publicaciones extraídas de bases de datos de prestigio reconocido dentro del ámbito científico y biomédico como *PubMed*, *Scielo*, *Dialnet* o *Elsevier*. Estas publicaciones son especialmente relevantes en su tema y actuales respecto a la fecha de publicación.

Como palabras clave se han utilizado: “MALDI-TOF”, “Blood cultures”, “Mass spectrometry”, “Positive blood cultures”, “Microbiology”, “Bacteriemia” y “Enfermería” utilizando los operadores booleanos OR / AND.

También se ha accedido a muchos de los artículos académicos relacionados con el tema de estudio y se han consultado documentos de páginas web de gran valor académico como la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

3.2 Estrategia de Evaluación

La evaluación de los estudios utilizados para los resultados de este trabajo de fin de grado fue realizada con STROBE para los estudios observacionales de carácter retrospectivo y con TREND para la correcta evaluación de los estudios experimentales no aleatorizados.

Se utilizó el diagrama de flujo y checklist PRISMA para la selección de los artículos utilizados en esta revisión, además de la evaluación de las revisiones sistemáticas utilizadas para confirmar los objetivos.

Se utilizó el sistema de nivel de evidencia científica JBI para la evaluación de los niveles de evidencia científica de los estudios utilizados en los resultados.

Se utilizó el sistema de evaluación CASPE para la correcta evaluación de las revisiones bibliográficas contenidas en los resultados.

3.3 Estrategia de selección

La búsqueda de la bibliografía se ha realizado siguiendo los siguientes criterios:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
Estudios que describen el fundamento teórico del MALDI-TOF y sus comparaciones frente a otras técnicas.	Estudios que tratan la identificación de muestras que no son hemocultivos, otros tipos de técnicas o estudios que describan objetivos fuera del ámbito de la microbiología
FILTROS DE INCLUSIÓN	FILTROS DE EXCLUSION
Tener acceso al texto y a su enlace web	Artículos con una fecha de publicación igual o superior a 2001
Artículos publicados en castellano o inglés.	Artículos publicados en otro idioma diferente al castellano o al inglés
Artículos con resumen y estructuración correcta, métodos de procesamiento utilizados, etc.	Artículos sin resumen o sin una metodología definida.

- Todos los artículos encontrados que cumplieran los criterios fueron admitidos.
- La tabla de resultados de los estudios se encuentra en los anexos.
- Las herramientas de evaluación de los estudios utilizados en los resultados se encuentran contenidos en los anexos.

4. RESULTADOS

4.1 Diagrama de flujo PRISMA para revisiones sistemáticas

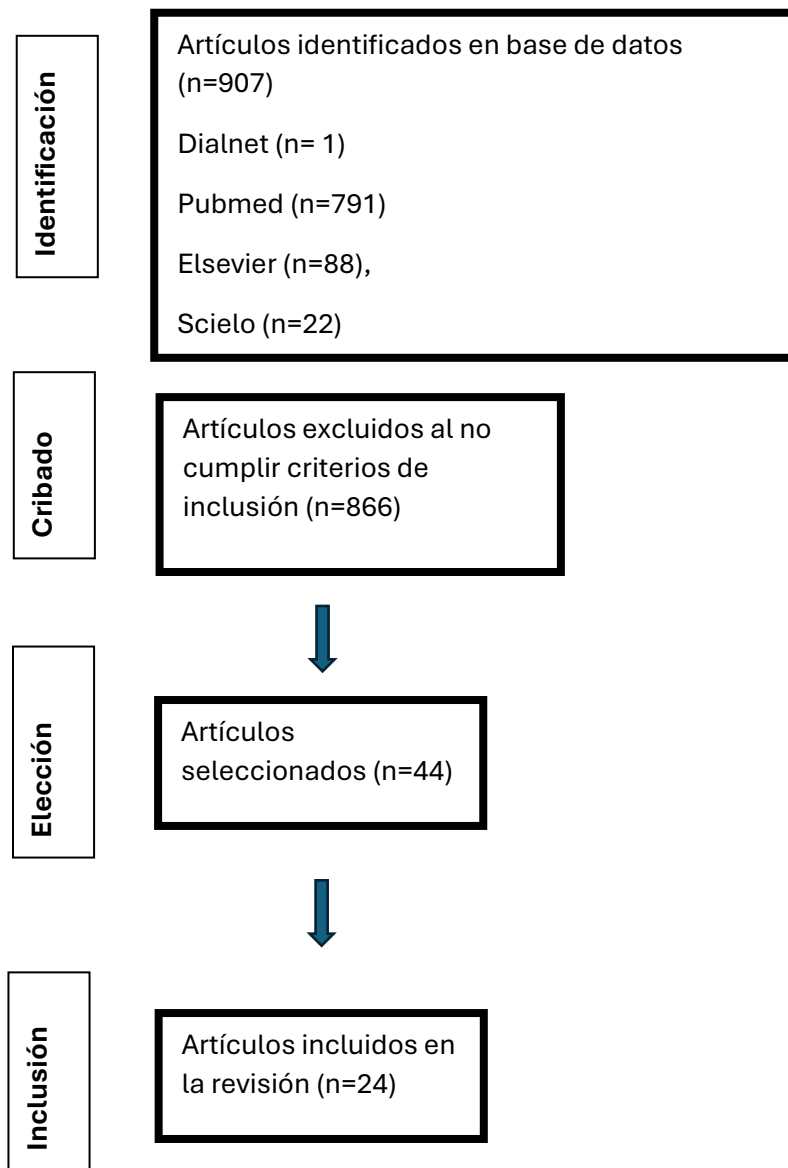


Figura 1: Diagrama de flujo PRISMA, de elaboración propia (8).

4.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF

El MALDI-TOF se fundamenta en la espectrometría de masas que produce, separa y detecta iones en fase gaseosa. El MALDI-TOF consta de tres elementos principales: la fuente de ionización suave MALDI (*Matrix – assisted laser desorption / ionization*), que se combina con el analizador de masas tipo TOF (*Time-of-flight*) y un detector. El desarrollo de esta técnica se remonta a finales de la década de los 80, cuando se observó que, si se utiliza una fuente de laser ultravioleta y se embebía la muestra en una matriz compuesta de moléculas aromáticas, se conseguía una ionización blanda, proporcionando que moléculas lábiles como proteínas, péptidos, azúcares y oligonucleótidos se fragmenten de forma adecuada para ser detectadas (9).

La fuente de ionización (MALDI) forma iones, generados por la pérdida o exceso de electrones. El analizador de masas (TOF) es el componente principal del espectrómetro. El TOF delimita una zona de vuelo en la cual los electrones obtenidos anteriormente con el MALDI son acelerados adquiriendo la misma energía cinética y se separan según su relación masa/carga (m/z). El tiempo que el ion tarda en llegar hasta el detector se denomina tiempo de vuelo que depende su relación masa/carga.

Para llevar a cabo la identificación microbiana mediante MALDI-TOF, necesitamos que las proteínas de los microorganismos a identificar se ionicen. Para ello, las colonias de microorganismos que se pretenden identificar se depositan sobre la placa portamuestras donde a continuación se deposita una disolución matriz que contiene anillos aromáticos en su estructura. Se deja evaporar el disolvente a temperatura ambiente, produciéndose una co-cristalización de la muestra y de la matriz, por lo que las moléculas que queremos analizar quedan embebidas dentro de la estructura de los cristales de la matriz. Después, la placa es introducida en una cámara de alto vacío, donde su superficie es expuesta a disparos de un láser de longitud de onda ultravioleta, por lo que las moléculas orgánicas aromáticas absorben una cantidad considerable de energía por excitación de electrones π (se consideran aquellos

electrones con dobles o triples enlaces) produciéndose así la sublimación del analito y de la matriz.

Cuando las moléculas aromáticas se encuentran en fase gaseosa se estabilizan mediante la liberación de protones que son captados por las proteínas de los microorganismos, generándose así fragmentos de proteínas con carga positiva. A continuación, mediante un electrodo que se coloca a unos pocos milímetros frente a la placa de la muestra se genera un campo eléctrico que acelera estos iones formados hacia el analizador de masas. Los iones entran en un tubo con la misma energía cinética y una trayectoria lineal, por lo que el tiempo que tardan en recorrer el tubo es directamente proporcional a la relación masa/carga (m/z) de estos. De este modo, a menor relación m/z de los iones, menor tiempo necesitan para recorrer el tubo.

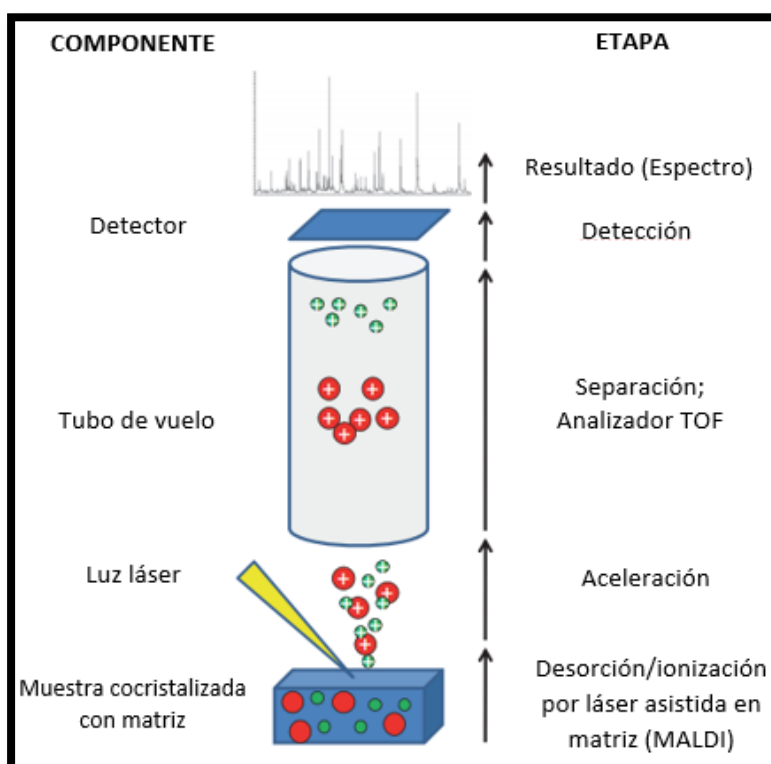


Figura 2: Esquema del MALDI-TOF, imagen tomada de *Croxatto et al. (9)*.

Por último, encontramos el detector de los iones previamente separados. Es habitual que en ionizaciones blandas por MALDI-TOF, la carga (z) sea igual a 1, por lo que el espectro de masas será la representación de la intensidad frente a la masa de iones formados (9-11)

En la actualidad existen tres espectrómetros de masas MALDI-TOF en el mercado que permiten la identificación de microorganismos. El MALDI-TOF FLEX (Bruker Daltonik, Alemania), el VITEK MS (bioMérieux, Francia) y el Clin-ToF-II (Biyong Technologies, China). El coste de identificación, considerando los reactivos y el mantenimiento del equipo, oscila en unos 1,43 €, lo cual lo convierte en una alternativa más económica que las identificaciones bioquímicas convencionales, las cuales oscilan entre los 4 y 8 € por cada identificación (12). Cada uno de los tres tipos de espectrómetros citados anteriormente utiliza una base de datos propia y un *software* para la identificación de microorganismos. El VITEK MS permite dos opciones de trabajo diferentes. Se puede utilizar una versión CE-IVD (Dispositivos de diagnóstico in vitro vendidos en la unión europea) que es una base de datos cerrada, o trabajar con una versión RUO (*Research Use Only*) en la que se puede introducir los microorganismos que se desee en la base de datos y por lo tanto hacer uso de éstos en identificaciones de rutina. El modo de identificación de VITEK MS se basa en el uso de un algoritmo basado en la aproximación de poblaciones, es decir, genera un algoritmo que compara cada especie con el resto para formar un modelo específico. Este espectro se divide en sectores y a cada uno se le da un peso para facilitar la interpretación por parte del ordenador, que genera un modelo matemático basado en matrices. El resultado de la identificación va asociado a un porcentaje entre el 0% y el 100%. En verde aparecen los resultados con un $\geq 99,9\%$ de precisión en la identificación, cuando se consigue la identificación a nivel de género y especie. En amarillo aparecen las identificaciones que posean un bajo grado de discriminación ($<95\%$) y en el que haya más de una posibilidad de identificación sin superar cuatro identificaciones posibles. En rojo aparecerán los casos en los que no se haya conseguido identificar el microorganismo o que el número de posibles identificaciones supere las cuatro identificaciones (12).

El MALDI-TOF FLEX de Bruker trabaja con una comparación entre espectros, consiguiendo un algoritmo estadístico multivariante en el que se valora la masa de los picos, la intensidad y la frecuencia de estos.

Una vez realizado el análisis de proteínas el *software* proporciona un listado de diez microorganismos ordenados de mayor a menor puntuación. Esta puntuación corresponde a un nivel de identificación de tal forma que puntuaciones entre:

- 0,000 y 1,699 indican una identificación poco fiable.
- 1,700 y 1,999 indican una identificación probable de género.
- 2,000 y 2,299 indican una identificación segura de género e identificación probable de especie.
- 2,300 y 3,000 indican una identificación segura de género y alta probabilidad de identificación de especie.

Según estos criterios se pueden aceptar como identificaciones válidas aquellas en las que se obtiene una puntuación $\geq 2,000$ en el primer microorganismo del listado.

El *software* también elabora un índice de consistencia. Es un dato que informa sobre la calidad de la identificación que no afecta a la validez de los resultados, y se establece en función de la concordancia a nivel de especie o de género que existe entre los diez microorganismos propuestos para cada identificación (13).

El Clin-ToF-II de Biyong Technologies utiliza un *software* que muestra los resultados con una puntuación de confianza. Una puntuación < 20 indica que no hay una identificación confiable, una puntuación entre 20 y 25 considera una identificación a nivel de género y una puntuación de confianza ≥ 25 indica una identificación a nivel de género y especie. Se consideran válidas aquellas identificaciones con una puntuación ≥ 25 (14)

4.3 Importancia de la aplicación de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la práctica asistencial enfermera

La importancia de un diagnóstico microbiológico rápido y preciso tiene un alto impacto en la práctica asistencial del personal de enfermería. La correcta administración de antibioterapia en el menor intervalo de tiempo posible conduce a una pronta recuperación de los pacientes y por lo tanto también a una menor

carga asistencial de enfermería en los cuidados. Los cuidados de los pacientes serán más complejos si el paciente se encuentra en un proceso infeccioso sin resolver que si el paciente se recupera completamente de la infección (15)

4.4 Identificación microbiana directa a partir de frascos de hemocultivo crecidos mediante MALDI-TOF

En el primer estudio revisado, realizado por Pan H *et al.* (16), se comparó la identificación microbiana directa a partir de los frascos de hemocultivos positivos mediante MALDI-TOF con una identificación convencional mediante subcultivo en placa de aislamiento (*gold standard*).

Para llevar a cabo la identificación directa a partir del hemocultivo se transfirió una alícuota de 1 ml, se agregó 3 ml de tampón de lisis y la solución final se incubó a temperatura ambiente hasta que se volvió transparente. Luego, las células bacterianas se sedimentaron mediante centrifugación (3500 r.p.m. durante 5 minutos) y el sedimento se resuspendió en 1 ml de solución salina al 0,45% para lavar las células. Después se volvió a someter a centrifugación (10000 r.p.m. durante 2 minutos), se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con solución salina al 0,45% para ajustar la densidad celular a 3-4 McFarland. Se centrifugaron 1,5 ml a 10000 r.p.m. durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante. El sedimento celular se disolvió en 50 µl de ácido fórmico al 70% mediante vortex y se agregaron 50 µl de acetonitrilo puro a la solución, se agitó y se centrifugó durante 10000 r.p.m. durante 2 minutos. Se colocó un microlitro de sobrenadante en una placa portamuestras de acero y se secó al aire, se cubrió con 1 µl de solución matriz HCCA (Bruker Daltonik) y se procedió a la identificación mediante MALDI-TOF FLEX de Bruker utilizando el *software* MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonik). Este procedimiento requirió 2-3 horas para alcanzar la identificación directa.



Figura 3: Procedimiento seguido por Pan H *et al.* (16) para la identificación bacteriana directa a partir de hemocultivo crecido mediante MALDI-TOF

El crecimiento mediante subcultivo en placa de aislamiento (*gold standard*) se llevó a cabo de la siguiente manera. A partir del frasco de hemocultivo se realizó una tinción de Gram para determinar la presencia de bacterias grampositivas o gramnegativas. Posteriormente el hemocultivo se subcultivo en placas de agar sangre, Mconkey, chocolate y agar sangre para anaerobios. Estas placas se incubaron a 35°C en una atmósfera de CO₂ al 5% aeróbica hasta que aparecieron colonias visibles. La identificación se realizó con el sistema microflex MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics). Se tardó 17 horas en obtener el crecimiento en placa. Para su identificación se trasladó una colonia bacteriana pura sobre una placa de acero con un palillo de madera y se añadió una solución de ácido fórmico, se secó y se añadió 1 µL de solución de matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) (Bruker Daltonics) para su posterior identificación mediante MALDI-TOF, la cual se completó en menos de 15 minutos.

De un total de 129 hemocultivos positivos, 57 de ellos presentaron crecimiento de bacterias gramnegativas y 72 grampositivas. Dentro de los 57 aislados gramnegativos se incluyeron 53 aislados de origen aerobio y 4 de origen anaerobio (*Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides ovatus* y dos cepas de *Bacterioides fragilis*). Los 72 aislados grampositivos se dividían en 68 cepas de cocos y 4 cepas de bacilos. Además, se pudo identificar una cepa anaeróbica de *Atopobium parvulum*.

Tabla 1: Resultados obtenidos por Pan H *et al.* (16) de identificación bacteriana directa mediante MALDI-TOF a partir de frascos de hemocultivo crecidos (n=129)

Organisms	No. of isolates with score of (n = 129) culture dependent identification			No. of isolates with score of (n = 129) direct identification		
	>2.0	1.7-2.0	<1.7	>2.0	1.7-2.0	<1.7
Gram-negative bacteria (57)						
<i>Escherichia coli</i>	20			19	1	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13		1	14		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	1		4		1
<i>Acinetobacter baumannii</i>		1			1	
<i>Enterobacter cloacae</i>	2			2		
<i>Proteus mirabilis</i>	1			1		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2				2	
<i>Burkholderia cepacia</i>	1			1		
<i>Pseudomonas fulva</i>	1	1		1		1
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	1			1		
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1				1	
<i>Bacteroides ovatus</i>	1			1		
<i>Chryseobacterium gleum</i>	2				1	1
<i>Bacteroides fragilis</i>	2			2		
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	1					1
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1				1	
Gram-positive Bacteria (72)						
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13	1		2	9	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	11			9	2	
<i>Staphylococcus capitis</i>	8	1		6	3	
<i>Staphylococcus hominis</i>	20			16	4	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2			1	1	
<i>Enterococcus faecium</i>	5			3	1	1
<i>Staphylococcus warneri</i>		2		1		1
<i>Staphylococcus cohnii</i>			1			1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1				1	
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1					1
<i>Atopobium (Strep.) parvulum</i>	1				1	
<i>Corynebacterium striatum</i>	1			1		
<i>Brevibacterium casei</i>	1			1		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1				1	
<i>Streptococcus oralis</i>	1				1	
<i>Corynebacterium alimentans</i>			1			1
Total isolates	119	7	3	86	31	12

En la identificación directa, entre las 57 muestras de aislamientos gramnegativos, 46 (80,70%) proporcionaron una puntuación superior a 2, siete (12,28%) mostraron una puntuación entre 1,7 y 2 y cuatro (7,02%) obtuvieron una puntuación inferior a 1,7. Entre las 72 muestras positivas con aislamientos de bacterias grampositivas, 40 (55,56%) mostraron una puntuación superior a 2, 24 (33,3%) obtuvieron una puntuación entre 1,7 y 2 y ocho (11,1%) mostraron una puntuación inferior a 1,7 (ver tabla 1).

Ocho de los 12 aislados bacterianos con una puntuación inferior a 1,7 mostraron resultados por parte del MALDI-TOF concordantes respecto al *gold standard*. Dos cepas de bacterias gramnegativas solo se identificaron correctamente a nivel de género (*Pseudomonas fulva* y *Ochrobactrum anthropi*). *Streptococcus oralis* fue identificado incorrectamente como *S. pneumoniae*.

A modo de resumen, mediante el método de identificación directo, se concluyó que las 57 muestras con aislados gramnegativos mostraron una concordancia del 96,49% (55/57) con los resultados de la identificación dependiente de cultivo, mientras que las 72 muestras positivas de aislados grampositivos mostraron una concordancia del 97,22% (70/72) con los métodos dependientes de cultivo.

En el segundo estudio revisado, realizado por Azula N *et al.* (17), se comparó la identificación directa de los hemocultivos positivos a estudio mediante MALDI-TOF con la identificación convencional mediante crecimiento en placa de aislamiento (*gold standard*).

Para llevar a cabo la identificación microbiana directa, en un tubo vacutainer (BD Vacutainer) con gel separador se introdujo una alícuota de 6 ml de muestra de frasco de hemocultivo crecido y se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 20 minutos para eliminar las células sanguíneas y las proteínas de la sangre. Se descartó el sobrenadante dejando aproximadamente 1 ml para resuspender los microorganismos depositados en la superficie del gel. La suspensión bacteriana se colocó en un tubo Eppendorf con 1 ml de agua destilada estéril y se dejó a temperatura ambiente 5 minutos para que se produjera el lisado de los hematíes restantes. Después, se centrifugó en una ultracentrífuga (Giumelli Z-127-D) a 13000 r.p.m durante 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y se utilizó el pellet para su análisis mediante espectrometría de masas.

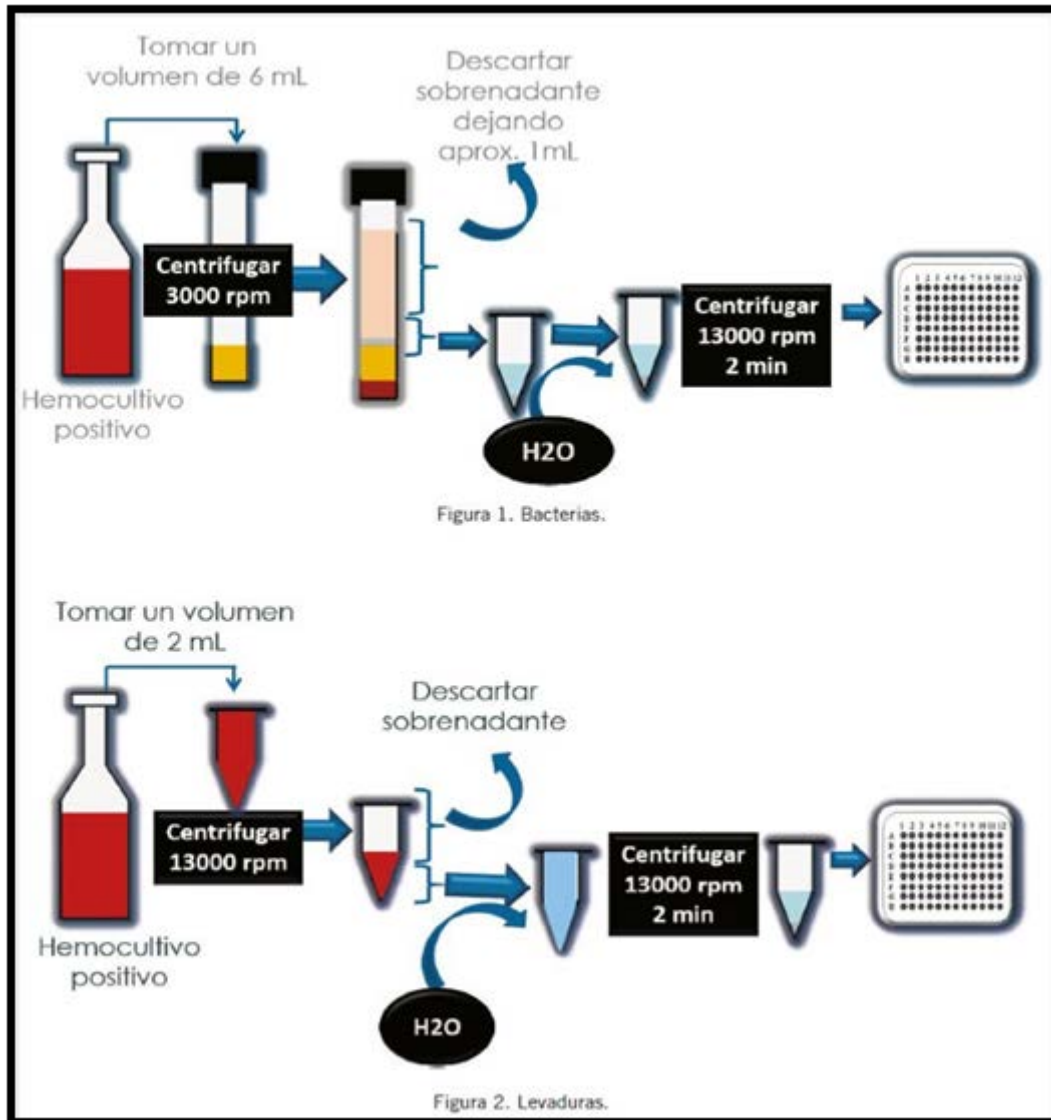


Figura 4: Procedimiento de preparación de la muestra extraída de Azula N *et al.* (17) para la posterior identificación directa mediante espectrometría de masas MALDI-TOF

En el caso de las levaduras, posterior a la tinción de Gram, se introdujeron 2 ml de frasco del hemocultivo positivo en un tubo Eppendorf. Se centrifugó 2 minutos a 13000 r.p.m. Posteriormente se retiró el sobrenadante, se agregó 2 mL de agua estéril, se agito en vórtex 1 min y se incubo en suspensión durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó nuevamente a 13000 r.p.m. durante 2 minutos para sedimentar las levaduras. Para terminar, el sedimento de levaduras libre de células sanguíneas se utilizó para la identificación mediante espectrometría de masas.

Se prosiguió con la extracción de las proteínas y posterior identificación depositando 1 μ L del pellet por duplicado sobre una placa de acero de análisis (Bruker Daltonik). Los pocillos se cubrieron con 1 μ L de ácido fórmico (Fluka) al 70% para bacterias y al 100% para levaduras.

La matriz utilizada para llevar a cabo la identificación mediante el equipo MALDI-TOF consistió en una disolución de ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinámico en acetonitrilo al 50 % y ácido trifluoroacético al 2,5 %. Para prepararla se añadió a 2,5 mg de ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinámico (Fluka Analytical, St. Louis, MO, EE.UU.) 250 μ l de disolvente orgánico y se agitó en vórtex hasta su disolución (13).

La placa portamuestras se colocó en el equipo y se realizó el análisis utilizando el equipo Microflex LT y el *software* FlexControl (Versión 3.1 de Bruker Daltonik). Para la calibración del espectrómetro se utilizó un extracto de proteínas de una cepa de *Escherichia coli* DH5 péptido alfa, que posee proteínas adicionales (BTS; Bruker Daltonik). Los espectros fueron obtenidos mediante el análisis del *software* MALDI Biotyper RTC 3.0 (Bruker Daltonik). Los resultados se compararon con una base de datos y se asignó una puntuación. El tiempo de procesamiento e identificación directa fue de aproximadamente 3 horas. Se consideraron como identificaciones directas válidas las que proporcionaron una puntuación $\geq 1,700$.

La identificación convencional (*gold standard*) empezó con la tinción de Gram de una gota del hemocultivo positivo para conocer la morfología y el carácter gram. Posteriormente el frasco de hemocultivo se resembró en placas de aislamiento utilizando los medios de cultivo agar chocolate, Chrom ID CPS (BioMérieux) y caldo cerebro corazón. Las placas se incubaron en una estufa de CO₂ al 5% a 35°C durante 17 horas para obtener el crecimiento microbiano. Los hemocultivos positivos con bacterias anaerobias fueron resembrados en agar sangre *Brucella* suplementado con hemina (5 μ g/mL) y vitamina K1 (1 μ g/mL) e incubados en condiciones anaerobias durante 2-7 días. A partir del desarrollo de los subcultivos, se realizó la identificación de las colonias aisladas mediante MALDI-TOF el cual tardó entre 10 y 20 minutos. Para los estreptococos del grupo

viridians y *S. pneumoniae* se agregó la prueba de solubilidad en bilis y de optoquinina según las recomendaciones del fabricante (Bruker Daltonik). La identificación del grupo *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus dysgalactiae* se confirmaron mediante la prueba de sensibilidad a la bacitracina, pirrolidonicaridamidasasa (PYR) y aglutinación con partículas de látex para confirmar que se trataba de estreptococos del grupo A, C o G.

Se analizaron 2381 hemocultivos positivos que, como se mencionó anteriormente, fueron analizados por métodos de colonia y por el método MALDI-TOF (método directo). 1330 (55,9%) presentaron crecimiento de cocos grampositivos, 922 (38,7%) presentaron crecimiento de bacilos gramnegativos, 60 (2,5%) de anaerobios, 36 (1,5%) de bacilos grampositivos, 13 (0,51%) de levaduras y 20 (0,78%) a otros microorganismos. Ocho frascos de hemocultivo marcados como positivos por el sistema BACTEC FX de incubación de hemocultivos fueron negativos por cultivo y coloración.

Dentro de los 922 bacilos gramnegativos, el método directo permitió la identificación de enterobacterias a nivel de especie en 674 de 713 frascos de hemocultivo (94,5%) y a nivel de género en 681 de 713 (95,5%).

Con el método directo se logró la identificación correcta de 81,9% y 81,7% a nivel de género y especie respectivamente de los hemocultivos evaluados con una puntuación > 1,7.

Según la tabla 2, la concordancia por ambos métodos fue de un 90% de los casos entre los bacilos gramnegativos, un 76,7% para los cocos grampositivos y un 33,3% para los bacilos grampositivos.

Tabla 2: Identificación de bacterias y levaduras directamente de hemocultivos positivos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, extraída de Azula N *et al.* (17)

Microorganismos	Aislamientos testados (MC) (n)	Identificación de los HP con el método directo por MALDI-TOF MS (MSD)				
		N° ID		Scores		
		correctas	erróneas	<1,7	1,7 – 2,0	≥2,0
Bacilos gram negativos	922	842		80	137	705
<i>Enterobacterales</i>	713	681		32	75	606
BGNNF	201	153		48	62	91
Otros BGN	8	8				8
Cocos gram positivos	1330	1020	7	303	497	530
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	623	465		158	286	179
<i>Staphylococcus aureus</i>	234	194		40	80	114
Otros SCN	242	185		56	74	111
<i>Enterococcus spp.</i>	69	67		2	9	58
<i>Streptococcus spp.</i>	131	93	7	31	42	58
Otros CGP	31	16		15	6	10
Anaerobios	60	46		14	17	29
Levaduras	13	11		2	10	1
<i>Candida parapsilosis</i>	6	6			5	1
<i>Candida guilliermondii</i>	1	1			1	
<i>Candida albicans</i>	1			1		
<i>Trichosporon asahii</i>	5	4		1	4	
Bacilos gram positivos	36	12		24	6	6
Otros microorganismos	20	20			6	14
<i>Campylobacter jejuni</i>	4	4			2	2
<i>Campylobacter fetus</i>	2	2			1	1
<i>Haemophilus influenzae</i>	13	13			3	10
<i>Neisseria meningitidis</i>	1	1				1
Total	2381	1951	7	423	673	1285

HP: Hemocultivos positivos; MC: método de colonia; otros BGN: incluye bacilos gram negativos de la familia Aeromonadaceae; BGNNF: bacilos gram negativos no fermentadores; SCN: estafilococos coagulasa negativos; CGP: cocos gram positivos; ID: identificados/identificación.

Dentro de los bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNNF) se identificaron directamente a nivel de especie 153 de 201 hemocultivos (76,1%). El sistema MALDI-TOF pudo identificar el 91,6% de *Pseudomonas aeruginosa*, el 66,7% de *Stenotrophomonas maltophilia* y el 94,7% de *Acinetobacter baumannii*.

Tabla 3: Identificación de bacilos Gramnegativos directamente de hemocultivos positivos por espectrometría de masas MALDI-TOF, extraída de Azula N *et al.* (17)

Microorganismos	Aislamientos testados (MC) (n)	Identificación de los HP con el método directo por MALDI-TOF MS			
		N°	Scores		
			<1,7	1,7 - 2,0	≥2,0
Bacilos gram negativos					
<i>Enterobacterales</i>					
<i>Escherichia coli</i>	374	358	16	22	336
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	150	144	6	7	137
<i>Klebsiella oxytoca</i>	20	20		2	18
Complejo <i>Enterobacter cloacae</i>	63	59	4	14	45
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10	9	1		9
<i>Citrobacter freundii</i>	11	9	2	2	7
<i>Morganella morganii</i>	10	10			10
<i>Serratia marcescens</i>	43	40	3	22	18
<i>Salmonella</i> spp.	7	7 ¹			7
<i>Proteus mirabilis</i>	20	20		4	16
<i>Providencia stuartii</i>	2	2			2
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	1		1	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2	2		1	1
<i>Aeromonadaceae</i>					
<i>Aeromonas</i> spp.	8	8 ²			8
Total	721	689	32	75	614
Bacilos gram negativos no fermentadores					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	83	76	7	18	58
<i>Pseudomonas putida</i>	8	5	3	3	2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	57	38	19	32	6
<i>Acinetobacter baumannii</i>	18	17	1	1	16
<i>Acinetobacter pittii</i>	4	4		1	3
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2	2		1	1
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	1	1			1
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	1	1			1
Complejo <i>Burkholderia cepacia</i>	8	6	2	3	3
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	6	3	3	3	
Otros BGNNF	13	0	13		
Total	201	153	48	62	91
Total	922	842	80	137	705

HP: Hemocultivos positivos; MC: método de colonia; 1: No es posible la identificación de las diferentes especies o serovariedades de *Salmonella* spp.; 2: No es posible la identificación de las diferentes especies de *Aeromonas* spp.

En total, el sistema MALDI-TOF logró una identificación global para bacterias gramnegativas del 90% a nivel de especie y del 91,3% a nivel de género.

Tabla 4: Resultados de identificación directa mediante MALDI-TOF de bacilos gramnegativos, extraída de Azula N *et al.* (17)

Grupo	n° aislamientos ID por MC	n° HP ID directamente por MSD	% de concordancia de ID a nivel de género	% de concordancia de ID a nivel de especie
BGN	721	689	95,6	93,5 ¹
BGNNF	201	153	76,1	76,1
BGN total	922	842	91,3	90,0 ¹

HP: Hemocultivos positivos; MC: método de colonia; MSD: método directo de espectrometría de masas; BGN: incluye *Enterobacterales* y *Aeromonadaceae*; BGNNF: Bacilos gram negativos no fermentadores; BGN total: incluye BGN y BGNNF; ID: identificados/identificación; 1: No es posible la identificación de las diferentes especies o serovariedades de *Salmonella* spp. ni *Aeromonas* spp.

Los estreptococos se identificaron por metodología directa en el 71% de los casos tanto a nivel de especie como de género.

Con respecto a los estafilococos, se encontraron diferencias entre los estafilococos coagulasa negativos (ECN) y *Staphylococcus aureus*, con un porcentaje de identificación a nivel de especie de un 75,1% y 82,9% respectivamente. Para *S. aureus*, en el 58,8% de los casos la identificación se logró con puntuación >2, mientras que para los ECN esto ocurrió solo en el 44,6% de los casos estudiados.

Tabla 5: Resultados de identificación directa por MALDI-TOF frente a la identificación de colonia de cocos grampositivos comprendidos en distintos grupos, extraída de Azula N *et al.* (17)

Familias	n° aislamientos ID por MC	n° HP ID directamente por MSD	% de concordancia de ID a nivel de género y especie
<i>Staphylococcaceae</i>	1099	844	76,8
<i>Micrococcaceae</i>	31	16	51,6
<i>Enterococcaceae</i>	69	67	97,1
<i>Streptococcaceae</i>	131	93	71,0
CGP total	1330	1020	76,7

ID: identificación/identificados; HP: Hemocultivos positivos; MC: método de colonia; MSD: método directo de espectrometría de masas; CGP: cocos gram positivos.

En 60 botellas de anaerobios se aislaron 62 bacterias anaerobias. El MALDI-TOF identificó directamente 46 de ellas. La concordancia global entre los dos métodos fue del 74,2% con una puntuación >1,7.

El tercer estudio revisado, de los autores Cattani ME *et al.* (18), tuvo como objetivo evaluar el desempeño de dos procedimientos de identificación directa a partir del frasco de hemocultivo crecido. Por una parte, desarrollaron un procedimiento casero denominado HF y por otra parte evaluaron el kit comercial MALDI Sepsityper (procedimiento MS) (Bruker Daltonik). Ambos procedimientos se compararon con un procedimiento convencional de subcultivo en placa de aislamiento para comprobar si influye positivamente utilizar un kit comercial del fabricante frente a un procedimiento casero.

Los frascos fueron analizados por el sistema automatizado de detección microbiana BACTEC FX (bioMérieux).

El procedimiento MS se efectuó según la guía que incluye el kit proporcionado por el fabricante (*Guide Maldi Sepsityper, 2010*). Se introdujo 1 ml de frasco de hemocultivo positivo en un tubo Eppendorf con 200 µl de buffer de lisis. Se realizó una centrifugación para obtener el pellet durante 1 min a 13000 r.p.m. Se agregaron 300 µl de agua (Fluka), se agitó en vórtex 1 min, se agregaron 900 µl de etanol absoluto (Sigma Aldrich) y se agitó nuevamente en vórtex 1 min, se centrifugó 5 minutos a 13000 r.p.m. Al sedimento se le añadió 50 µl de ácido fórmico (Fluka) y 50 µl de acetonitrilo (Sigma Aldrich). Se agitó en vórtex y se centrifugó 3 minutos a 13000 r.p.m.

Para el procedimiento HF se introdujo 1 ml de hemocultivo positivo en un tubo seco con 2 ml de agua destilada estéril. Se agitó en vórtex y se centrifugó 15 minutos a 3000 r.p.m. El sedimento se extrajo con un hisopo y se pasó a un tubo Eppendorf.

A partir de este momento se continuó con el mismo procedimiento, tanto para el procedimiento MS como para el HF. Se depositó 1 µl de pellet por duplicado en la placa portamuestras del sistema. Después de secar la muestra, se añadió sobre cada uno 1 µl de solución matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA, Bruker Daltonics). La placa se dejó secar a temperatura ambiente y se la colocó dentro del equipo.

La calibración del equipo se realizó mediante la utilización de un calibrador BTS (Bruker Daltonics), según el manual de procedimientos y se ingresaron los datos de acuerdo con lo requerido por el *software* SPSS 17.0 IBM, Illinois y STATISTIX 7.0.

Para el procedimiento *gold standard* se sembró una alícuota de hemocultivo en una placa de aislamiento con medio de cultivo de agar sangre y se incubó durante 24 horas hasta que se obtuvo el crecimiento de las colonias. La identificación de la colonia se realizó mediante MALDI-TOF con un *score* ≥ 2 , por pruebas bioquímicas convencionales manuales o automatizadas con el equipo Phoenix BD (EE. UU.) o de las dos maneras. Las identificaciones en placa de aislamiento de estreptococos del grupo viridians y *S. pneumoniae* fueron confirmadas en 17 horas con pruebas bioquímicas convencionales.

El procesamiento de los hemocultivos para la identificación directa se realizó según el protocolo establecido por el fabricante. Se tomó una alícuota de 1 ml de sangre para realizar ambos procedimientos. Para la interpretación de los resultados, se utilizó el sistema de puntuación (*score*) donde se consideraron válidas en forma preliminar las identificaciones con puntuación $\geq 1,7$ para género y especie. El procesamiento de los datos obtenidos fue analizado por la versión 3.1 del *software MALDI Biotyper* (Bruker Daltonik). Todos los resultados se obtuvieron en un tiempo que no superó las 8 horas desde que los frascos de hemocultivo se marcaron como positivos.

Se analizaron 840 hemocultivos positivos con un método de identificación HF y 542 hemocultivos con el procedimiento MALDI Sepsityper / Biotyper (MS). Se llegó a establecer el género y la especie en 670 hemocultivos (79,76%) con el procedimiento HF y en 391 hemocultivos (72,14%) con el procedimiento MS.

Tabla 6: Resultados de la identificación de agentes causales de bacteriemia a partir de frascos de hemocultivos positivos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF con un procedimiento artesanal (HF) y con un kit comercial (MS), extraída de Cattani ME *et al.* (18)

Microorganismos estudiados (grupo/especie)	HF			MS			p
	N.º hmcv + ^a estudiados	ID. positiva	%	N.º hmcv + ^a estudiados	ID positiva	%	
Total	840	670	79,76	542	391	72,14	0,0013
Cocos gram positivos	543	439	80,84	359	266	74,09	0,0203
<i>Staphylococcus aureus</i>	105	102	97,14	66	62	93,94	0,5568
ECN	358	277	77,37	244	174	71,31	0,1121
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	216	165	76,38	148	105	70,94	
<i>Staphylococcus hominis</i>	67	57	85,07	47	35	74,47	
<i>Saphylococcus haemolyticus</i>	29	24	82,76	21	16	76,19	
Otros ECN	46	31	67,39	28	18	64,28	
<i>Enterococcus spp.</i>	36	35	97,22	23	20	86,96	0,3179
<i>Enterococcus faecalis</i>	21	20	95,24	12	10	83,33	
<i>Enterococcus faecium</i>	15	15	100	11	10	90,91	
Grupo estreptococos viridans	29	14	48,27	17	7	41,17	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	15	11	73,33	9	3	33,33	
Bacilos gram negativos	218	171	78,44	128	101	78,90	0,9731
Enterobacterias	173	162	93,64	108	97	89,81	0,3506
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	85	82	96,47	48	43	89,58	
<i>Escherichia coli</i>	48	45	93,75	40	36	90,00	
<i>Enterobacter cloacae</i>	13	12	92,31	10	9	90,00	
Otras enterobacterias	27	23	85,18	10	9	90,00	
Bacilos gram negativos no fermentadores	45	37	82,22	25	16	64,00	0,1577
<i>Acinetobacter baumannii</i>	17	16	94,12	8	5	62,50	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	6	75,00	6	5	83,33	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3	3	100	2	1	50,00	
Otros no fermentadores	17	12	70,58	9	5	55,55	
Anaerobios	29	17	58,62	18	6	33,34	
Hongos levaduriformes	22	7	31,81	12	3	25,00	
<i>Candida albicans</i>	4	3	75	3	2	66,66	
<i>Candida tropicalis</i>	4	1	25	2	1	50,00	
<i>Candida glabrata</i>	2	0	0	2	0	0	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	7	1	14,28	2	0	0	
Otras levaduras	5	2	40,00	3	0	0	
Otros	28	8	28,57	20	4	20,00	
<i>Helicobacter cinaedi</i>	1	1	100	0	0	0	
<i>Campylobacter jejuni</i>	2	2	100	0	0	0	
<i>Mycobacterium mageritense</i>	1	1	100	1	0	0	

HF: procedimiento artesanal; MS: procedimiento basado en el uso del kit comercial MALDI Sepsityper/Biotyper de Bruker Daltonic.
^a hmcv +: hemocultivos positivos.

Las diferencias en la capacidad de identificación del método HF en comparación con el procedimiento MS fueron significativas ($p = 0,0013$), especialmente en el caso de bacterias grampositivas ($p = 0,020$).

Los porcentajes de identificación de *Staphylococcus aureus* fueron de 97,14% para el procedimiento HF y de 93,94% para la MS ($p = 0,5568$). Para la identificación directa de los ECN, los porcentajes de identificación fueron

menores, del 89% con ambos procedimientos, sin observarse diferencias estadísticamente significativas con ambos métodos.

Respecto a las especies de enterococos, la identificación fue de 97,22% con el procedimiento HF y 86,96% con el procedimiento MS. También se observó un porcentaje del 50% en la identificación correcta de las cepas de *Streptococcus viridians*.

En la identificación de *S. pneumoniae*, el número de muestras que se incluyeron en el estudio no fue una muestra lo suficientemente alta como para evaluar los resultados de una forma certera (15 con HF y 9 con MS).

Considerando a todos los bacilos gramnegativos en conjunto no hubo diferencias significativas. La tasa de identificación fue de un 78,44% con el procedimiento HF y de un 78,90% mediante el procedimiento MS. En la identificación de enterobacterias la diferencia fue de 98,64% en HF y 89,81% en MS, ambos porcentajes tampoco tuvieron diferencias significativas.

Tabla 7. Distribución del score obtenido en la identificación directa de agentes de bacteriemia a partir de frascos de hemocultivo positivos mediante usando un kit artesanal (HF) y un kit comercial (MS), extraída de Cattani ME *et al.* (18)

	Score	HF	%	MS	%
< 1,70	1,50-1,69	134	20,00	71	18,15
≥ 1,70	1,70-1,99	160	23,88	120	30,70
≥ 2,00	2,00-2,63	376	56,12	200	51,15

HF: procedimiento artesanal; MS: procedimiento basado en el uso del kit comercial MALDI Sepsityper/Biotyper de Bruker Daltonic.

En el cuarto estudio realizado por el grupo de Wang Y *et al.* (14), se utilizaron 200 cepas de prueba (36 géneros y 61 especies) recolectadas en el Hospital de Shadong afiliado a la Universidad Médica de Shadong (China). En total, se procesaron 91 cepas de bacterias grampositivas, 97 cepas de bacterias gramnegativas y 12 cepas de levaduras del género *Candida*.

Los hemocultivos, en este caso, se prepararon de forma artificial. Para ello, las cepas se sembraron en una placa de agar Columbia, excepto *Haemophilus influenzae* que se sembró en medio de agar chocolate. Las cepas de *Candida* fueron inoculadas en Agar Saboraud Dextrosa (SDA). Las placas se incubaron durante 48 h, se recogió una sola colonia y se subcultivó para la preparación de un hemocultivo con inoculación simulada.

Para ello se extrajeron un total de 2000 ml de sangre de 10 voluntarios sanos. Para la preparación de las cepas, se realizó una suspensión de bacterias/cándidas (0,5 McF), utilizando el sistema turbidimétrico (VITEK Compact, bioMérieux, Francia) y se diluyó 100 veces hasta 10^6 UFC/ml (con 100 μ l a 10 ml de solución salina estéril). A un tubo con 5 ml de sangre se añadió 50 μ l de la suspensión microbiana anterior, consiguiendo una concentración final de 10^4 UFC/ml. Posteriormente la sangre se mezcló con una suspensión de bacterias/cándidas y se inyectó en un frasco de hemocultivo utilizando una jeringa aséptica después de esterilizar la boca del frasco con alcohol al 75%. Los frascos de hemocultivo se mezclaron varias veces y se cargaron en el sistema automático de hemocultivos. Se excluyeron los frascos de hemocultivo que no fueron positivos a los 5 días después de la inoculación.

En una prueba paralela, se utilizaron dos tipos de frascos de hemocultivo aeróbico, incluidos los frascos de hemocultivo VersaTREK REDOX 2 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y los frascos de hemocultivo Scenker (Scenker, China). Se añadieron 50 μ l de solución salina estéril a 5 ml de sangre y se inyectó en un juego de frascos de hemocultivo que se utilizaron como control negativo. Este control negativo se cultivó en un sistema automático de hemocultivo durante 5 días para detectar cualquier contaminación durante el procedimiento.

Para la identificación directa mediante MALDI-TOF los hemocultivos positivos se procesaron de acuerdo con el procedimiento experimental estándar de los kits de identificación de hemocultivos positivos de Bioyong (Bioyong Technologies Inc.). Se extrajeron 200 μ l del frasco de hemocultivo positivo y se introdujeron en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se añadieron 40 μ l de reactivo I de los kits de identificación de hemocultivos positivos al tubo Eppendorf y se mezcló durante 5 segundos.

La mezcla se colocó durante 8 minutos a temperatura ambiente. Después se agregaron al tubo 1000 µl de reactivo II de los kits de identificación y se volvió a agitar durante 5 segundos. La mezcla se centrifugó durante 3 minutos a 300 r.p.m. y se transfirieron 1000 µl del sobrenadante de la centrifugación a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se volvió a centrifugar 3 minutos a 13000 r.p.m. para precipitar las bacterias y se descartó el sobrenadante. Seguidamente se añadieron 1000 µl de reactivo II en la precipitación. Se volvió a agitar 5 segundos y se centrifugó durante 3 min a 13000 r.p.m., se eliminó el sobrenadante y se agregaron 40 µl de reactivo III del kit. A continuación, la mezcla se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 1 minuto y se agregaron 2 µl del sobrenadante a una de las 384 posiciones de la placa portamuestras (Clin-ToF II, Biyong Technologies Inc).

Por último, después de secar el sedimento bacteriano en la placa portamuestras del MALDI-TOF, se añadió 1 µl de reactivo IV y 1 µl de reactivo V a cada posición de la placa. La identificación directa se llevó a cabo mediante sistema MALDI-TOF (Clin-ToF-II; Bioyong Technologies) y el *software* BE V3.2 capturó automáticamente los espectros y los comparó con la base de datos (Clin-ToF-II; Bioyong Technologies Inc.). En 3 horas se logró la identificación microbiana directa.

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba chi-cuadrado de Pearson y la prueba exacta de Fisher para analizar los resultados. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el *software* SPSS V18.0, los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Para la identificación por el método convencional (*gold standard*) se realizó un análisis del frasco de hemocultivo mediante la tinción de Gram después de que el sistema automático de hemocultivo lo marcara como positivo. Se realizó un subcultivo a una placa de agar chocolate y agar columbia (ThermoFisher Scientific). Tras una incubación de 24 se obtuvieron las colonias que fueron identificadas mediante el sistema automático de identificación bioquímica automático VITEK 2 (BioMèrieux) que precisa de unas 17 horas.

Se analizaron 400 hemocultivos positivos, de los cuales 200 fueron hemocultivos de la marca *Thermo* y 200 de la marca *Schenker*.

Tabla 8. Identificación de hemocultivos de ambas marcas mediante MALDI-TOF y su comparación con el método bioquímico de rutina, extraída de Wang Y *et al.* (14)

Strains	Routine biochemical identification	Accurate nos.	Consistency of identification of Thermo positive BCs with routine biochemical identification (%)	Accurate nos.	Consistency of identification of Scenker positive BCs with routine biochemical identification (%)
Gram-positive bacteria	91	86	94.51	86	94.51
Gram-negative bacteria	97	94	96.91	95	97.94
<i>Candida</i>	12	9	75.00	8	66.67
Total	200	189	94.50	189	94.50

Las identificaciones a partir de los hemocultivos de la marca *Thermo* mostraron una precisión del 94,5% (189/200). Respecto a la identificación de bacterias grampositivas como se muestra en la tabla 8 y 9, de las 200 muestras se identificaron 86 bacterias con puntuaciones > 25, mientras que se identificaron 90 cepas con puntuaciones de confianza >20 y una cepa con una puntuación < 20.

Se identificaron un total de 18 cepas de estreptococos con puntuaciones >25, mientras que 2 cepas de *Streptococcus anginosus* se identificaron erróneamente como *Candida parapsilosis* y *Propionibacterium acnes*. Se identificaron 43 cepas de estafilococos con puntuaciones de confianza >25, mientras que 1 cepa de *Staphylococcus hominis* se identificó erróneamente como *Propionibacterium acnes*. Las 14 cepas de enterococos de los hemocultivos Thermo se identificaron correctamente con puntuaciones de confianza >25.

Tabla 9: Fiabilidad de la identificación microbiana directa de bacterias grampositivas mediante MALDI-TOF a partir de frascos de hemocultivos *Thermo*, extraída de Wang Y *et al.* (14)

Pathogens	Reliability score						Wrong number	Error rate (%)	
	Test strains	20-24		≥25.000		<20.000			
	Strains	Distribution Ratio (%)	Strains	Distribution Ratio (%)	Strains	Distribution Ratio (%)			
Staphylococcus									
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	0	0.0	10	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	0	0.0	12	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Staphylococcus capitis</i>	4	0	0.0	4	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Staphylococcus cohnii</i>	2	0	0.0	2	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	5	0	0.0	5	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Staphylococcus hominis</i>	6	1	16.7	5	83.3	0	0.0	1	16.7
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Staphylococcus sciuri</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Staphylococcus simulans</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Staphylococcus warneri</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	0.0	0	0.0
Streptococcus									
<i>Streptococcus agalactiae</i>	6	0	0.0	6	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Streptococcus anginosus group</i>	7	2	28.6	5	71.4	0	0.0	2	28.6
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Streptococcus mitis group</i>	2	0	0.0	2	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3	0	0.0	3	100.0	0	0.0	0	0.0
Enterococcus									
<i>Enterococcus avium</i>	2	0	0.0	2	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	0	0.0	6	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Enterococcus faecium</i>	6	0	0.0	6	100.0	0	0.0	0	0.0
Others									
<i>Bacillus cereus</i>	2	0	0.0	2	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Cladribium tertium</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1	1	100.0	0	0.0	0	0.0	1	100.0
<i>Corynebacterium striatum</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Lactobacillus parvum</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Lactococcus garvieae</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Micrococcus luteus</i>	2	0	0.0	1	50.0	1	50.0	1	50.0
<i>Paenibacillus alvei</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Rothia mucilaginosa</i>	2	0	0.0	2	100.0	0	0.0	0	0.0
All	91	4	98.9	86	94.5	1	1.1	5	5.5

Respecto a las bacterias aisladas de hemocultivos positivos de la marca *Schenker*, se identificaron directamente el 94,5% de ellas (189/200). De las 200 muestras de hemocultivo, se identificaron 86 cepas de bacterias grampositivas de 91 puntuaciones de confianza >25, tres cepas con puntuaciones <20 y se identificaron 20 cepas de estreptococos con puntuaciones >25 mientras que una cepa de *Streptococcus pneumoniae* fue identificada erróneamente como *Streptococcus dysgalactiae*. Por último, se identificaron 42 cepas de *Staphylococcus* con puntuaciones de confianza >25, mientras que 2 cepas de *Staphylococcus epidermidis* se identificaron erróneamente como *Nocardia thailandica*. Las 14 cepas de enterococos aisladas de los hemocultivos *Schenker* se identificaron correctamente con una puntuación de confianza >25.

Respecto a las bacterias gramnegativas, como se muestra en la siguiente tabla, de las 200 muestras de hemocultivo *Thermo* se identificaron 94 cepas bacterianas gramnegativas de las anteriores 200 muestras, con puntuaciones >25 mientras que se identificaron 2 cepas con puntuaciones <20 y 1 cepa se identificó con una puntuación de confianza <20. También se identificaron 47 de 48 cepas de *Enterobacter* aisladas de hemocultivos *Thermo*, que se identificaron correctamente con puntuaciones de confianza > 25, mientras que 1 cepa de *Serratia marcescens* se identificó erróneamente como *Atopobium rimae*. Las 18 cepas de pseudomonas aisladas se identificaron correctamente con una puntuación >25.

Tabla 10: Fiabilidad de la identificación directa de bacterias gramnegativas mediante MALDI-TOF a partir de hemocultivos *Thermo*, extraída de Wang Y et al. (14)

Pathogens	Reliability score								
	20-24			≥25.000		<20.000			
	Test strains	Strains	Distribution Ratio (%)	Strains	Distribution Ratio (%)	Strains	Distribution Ratio (%)	Wrong number	Error rate (%)
<i>Enterobacter</i>									
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	0	0.0	3	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Escherichia coli</i>	10	0	0.0	10	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	0	0.0	7	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Serratia marcescens</i>	4	0	0.0	3	75.0	1	25.0	1	25.0
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	5	0	0.0	5	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Salmonella</i> sp.	5	0	0.0	5	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Proteus mirabilis</i>	6	0	0.0	6	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Citrobacter brasili</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	0	0.0	3	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Morganella morganii</i>	2	0	0.0	2	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Pseudomonas</i>									
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	0	0.0	12	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Pseudomonas montelli</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Pseudomonas putida</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4	0	0.0	4	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Others</i>									
<i>Achromobacter piechadii</i>	1	1	0.0	0	0.0	0	100.0	1	100.0
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> complex	2	0	0.0	2	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Aeromonas caviae/hydrophila/jandaei</i> complex	3	0	0.0	3	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Burkholderia cepacia</i> complex	4	0	0.0	4	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Chryseobacterium gleum/indologenes</i> complex	1	0	0.0	1	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Haemophilus influenzae</i>	5	0	0.0	5	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Moraxella catarrhalis</i>	2	0	0.0	2	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Myroides odoratus</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Pandoraea promerusa</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Providencia stuartii</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	100.0	0	0.0
<i>Rubimonia mammillifera</i>	1	0	0.0	0	0.0	1	100.0	1	100.0
<i>Vibrio cholerae</i>	1	0	0.0	1	100.0	0	0.0	0	0.0
<i>Acinetobacter calcoaceticus/baumannii</i> complex	7	0	0.0	7	100.0	0	0.0	0	0.0
All	97	1	1.0	94	96.9	2	2.1	3	3.1

5. DISCUSIÓN

MALDI-TOF ha sido, con toda probabilidad, el cambio tecnológico de mayor importancia en la Microbiología Clínica en esta última década. En los últimos años esta técnica ha pasado de ser una prometedora técnica del futuro a ser una tecnología totalmente integrada en todos los laboratorios de microbiología aplicados a la actividad clínica diaria (11-13).

Hasta la introducción del MALDI-TOF, la identificación bacteriana, que apenas había avanzado, se basaba en la utilización de los métodos de identificación clásicos. Los únicos avances habían sido la comercialización de galerías de identificación o la automatización de la inoculación y lectura. Prácticamente la totalidad de identificaciones se llevaban a cabo mediante métodos fenotípicos, los cuales se veían limitados debido a que requerían un crecimiento bacteriano, que consume 16-18h, así como los falsos positivos debido a la dificultad de identificación de algunas bacterias cuya actividad bioquímica y enzimática es muy escasa y difícil de identificar mediante estos métodos. (11-13).

El sistema MALDI-TOF permite llevar a cabo una identificación microbiana en cuestión de minutos. Además, se ha comprobado que, según los resultados de los estudios anteriormente desarrollados, la espectrometría de masas MALDI-TOF es capaz de realizar la identificación directa a partir de hemocultivos con una alta fiabilidad, reduciendo los tiempos necesarios para obtener los resultados de identificación microbiana (13). Se ha observado un alto grado de concordancia entre la identificación directa mediante MALDI-TOF con la identificación *gold standard*.

La identificación directa a partir del hemocultivo crecido ha mostrado una concordancia del 86,5% para gramnegativos y del 93% para grampositivos. Para grampositivos, la identificación directa es mayor de un 81% en todos los estudios. También se vio una alta tasa de identificación a nivel de género y especie de estreptococos y estafilococos (14-18).

Específicamente, para enterobacterias la identificación directa es muy efectiva, con una tasa de identificación de más de un 90% (16,17). Dentro de las BGNNF

se observa una tasa de identificación mayor al 70% donde *Pseudomonas aeruginosa* tuvo el mayor porcentaje de identificación, de < 90% (16).

Los kits comerciales para llevar a cabo la identificación directa han proporcionado resultados similares, ofreciendo una concordancia > 70% en todos los procedimientos (17). Además, la utilización de diversas marcas comerciales de frascos de hemocultivo no ha tenido influencia en el porcentaje de identificación directa (14).

Una importante limitación del sistema MALDI-TOF es que no debe realizarse la identificación directa si se observan dos o más morfologías bacterianas diferentes mediante la tinción de gram a partir del frasco de hemocultivo positivo. El motivo es que se analizan proteínas ribosomales de dos o más microorganismos que pertenecen a especies bacterianas diferentes. De este modo se puede generar una identificación errónea, que no se corresponda a ninguno de los microorganismos presentes en el frasco de hemocultivo (17).

En cuanto a los tiempos necesarios para la obtención de los resultados se puede apreciar que la identificación directa es más rápida que la identificación mediante subcultivo en placa de aislamiento (*gold standard*). Se necesitan 17-24 horas para obtener la identificación mediante el procedimiento *gold standard* de subcultivo del hemocultivo como mínimo, mientras que la identificación directa mediante MALDI-TOF requiere solamente entre 1-3 horas. Teniendo en cuenta que la concordancia entre los dos métodos es cercana al 90% de media en los estudios anteriormente citados, podemos decir que el uso de la espectrometría de masas MALDI-TOF reduce los tiempos necesarios para llevar a cabo el diagnóstico microbiológico de las bacteriemias, sin apenas perjudicar la calidad de la identificación (14-18).

6. CONCLUSIONES

6.1 Conclusiones generales

La espectrometría de masas MALDI-TOF es una herramienta indispensable en los laboratorios de Microbiología Clínica. Permite llevar a cabo la identificación microbiana directa de los hemocultivos positivos con tiempos de espera menores a los métodos de identificación tradicionales, permitiendo adelantar 17-24 horas como mínimo el resultado de la identificación. Esta rápida información diagnóstica resulta crucial para el correcto tratamiento antibiótico de los pacientes con bacteriemias, aumentando su supervivencia y disminuyendo los gastos sanitarios.

Además, el MALDI-TOF ha supuesto indirectamente una reducción de la carga asistencial y por lo tanto una mejora en la calidad de cuidados debido a la reducción de la morbimortalidad en unidades de cuidados intensivos, pacientes críticos o de urgencia (15).

6.2 Limitaciones del Trabajo

Han existido ciertas limitaciones en este trabajo de fin de grado que pudieran haber mejorado la calidad de los objetivos desarrollados.

Al haber seleccionado artículos solo en idioma castellano o inglés se pueden haber descartado estudios relevantes para esta revisión sistemática. El mismo problema parece suceder con muchos artículos que podrían haber sido relevantes, pero no eran gratuitos.

6.3 Fortalezas

Este trabajo se realizó siguiendo el modelo PRISMA, cumpliendo así todos los criterios de calidad. De cada artículo seleccionado se ha comprobado su nivel de evidencia, utilizando las herramientas de estudio pertinentes. Solo se han incluido aquellos estudios que atendían a las necesidades de los objetivos.

Por último, la relevancia de nuevas técnicas de identificación microbiana ha aumentado en los últimos años debido a la demanda de pacientes con infecciones causadas por microorganismos que necesitan atención lo más rápido

posible. Este interés de investigación permitió que los artículos fueran de gran interés para el sistema sanitario.

6.4 Implicaciones en la práctica clínica

Las enfermeras son las encargadas de los cuidados a los pacientes infecciosos, muchos de estos en cuidados intensivos o en cualquier unidad de críticos. No obstante, la mayoría de los profesionales sanitarios tienen un gran desconocimiento en sobre qué consecuencias tiene el uso de técnicas de diagnóstico microbiológico más novedosas y rápidas.

Por esto, uno de los fines de este trabajo es aportar información acerca de la técnica MALDI-TOF para poder aumentar el conocimiento de los profesionales sanitarios de estas nuevas técnicas y su implicación en sus actividades asistenciales.

6.5 Futuras líneas de investigación

La espectrometría de masas MALDI-TOF está avanzando hacia proyectos de investigación en base a la utilización de la inteligencia artificial en el *software* de identificación y/o bases de datos de los resultados obtenidos por la técnica. Estos estudios apuntan a futuras líneas de investigación sobre la técnica MALDI-TOF que se basan en la utilización del “Machine learning” con la base de datos del Software utilizado para mejorar la identificación microbiológica. Estos avances podrían acercar los porcentajes de identificación al 100% en especies ya conocidas y mejorar las identificaciones en cultivos polimicrobianos donde la técnica MALDI-TOF está muy limitada (22).

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y fungemia: Hemocultivos y métodos moleculares [Internet]. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid; 2017 [Citado el 16 de mayo del 2024]. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia62.pdf>
2. Sánchez Bermejo R, Rincón Fraile B, Cortés Fadrique C, Fernández Centeno E, Peña Cueva S, Heras Castro EM de las. Hemocultivos: ¿Qué te han contado y qué haces? Enfermería Global. abril de 2012;11(26):146-63. [Citado el 16 de mayo del 2024]. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1695-61412012000200010
3. Martinez RM, Wolk DM. Bloodstream Infections. Microbiology Spectrum. 12 de agosto de 2016;4(4): 10.1128/microbiolspec.dmih2-0031-2016. [Citado el 16 de mayo del 2024]. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.dmih2-0031-2016>
4. Cattoir L, Coorevits L, Leroux-Roels I, Claeys G, Verhasselt B, Boelens J. Improving timelines in reporting results from positive blood cultures: simulation of impact of rapid identification on therapy on a real-life cohort. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1 de diciembre de 2018;37(12):2253-60. [Citado el 16 de mayo del 2024]. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8672911/>
5. Manual del sistema de gestión de calidad del caule recogida y transporte de muestras [internet]. disponible en: <https://www.saludcastillayleon.es/chleon/es/carteraservicios/servicios-centrales/microbiologia-clinica/manual-recogida-transporte-conservacion-muestras.ficheros/2462141-2023-f-ed.3-microbiol%20clin->

[manual%20recogida%20transporte%20y%20conservaci3n%20de%20muestras_firmado.pdf](#)

6. Siller-Ruiz M, Hernández-Egido S, Sánchez-Juanes F, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. Métodos rápidos de identificación de bacterias y hongos. Espectrometría de masas MALDI-TOF, medios cromogénicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2017;35(5):303-13. [citado 23 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-resumen-metodos-rapidos-identificacion-bacterias-hongos--S0213005X16304037>
7. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1 de octubre de 2011;29(8):601-8. [citado el 23 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosasmicrobiologia-clinica-28-articulo-metodos-identificacion-bacteriana-ellaboratorio-S0213005X11001571>
8. Yepes-Nuñez JJ, Urrútia G, Romero-García M, Alonso-Fernández S. Declaración PRISMA 2020: una guía actualizada para la publicación de revisiones sistemáticas. *Revista Española de Cardiología [Internet]*. 2021 Sep 1;74(9):790–9. Disponible en: <https://www.revespcardiol.org/es-declaracion-prisma-2020-una-guia-articulo-S0300893221002748>
9. Croxatto A, Prod'hom G, and Greub G. 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Rev*. 36: 380-407.
10. Fenselau C and Demirev PA. 2001. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 20: 157-171.

11. Jordana-Lluch E, Martró Català E, Ausina Ruiz V. La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* diciembre de 2012;30(10):635-44. [Citado el 16 de mayo del 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7103318/>
12. Cercenado E, Rafael M, Moreno C, García M, Oviaño M, Belén G, et al. Available from: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia65.pdf>
13. March Rosello GA. Nuevos protocolos basados en espectrometría de masas y citometría de flujo para un diagnóstico microbiológico rápido [Internet]. [citado 16 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://uvadoc.uva.es/handle/10324/5618>
14. Wang Y, Jin Y, Bai Y, Song Z, Chu W, Zhao M, et al. Rapid method for direct identification of positive blood cultures by MALDI-TOF MS. *Exp Ther Med.* diciembre de 2020;20(6):235. [citado el 23 de abril de 2024]. Disponible el: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7651779/>
15. Torres Fink I. Nuevas aplicaciones del Sistema Maldi-Tof Ms en la microbiología clínica [Internet] [<http://purl.org/dc/dcmitype/Text>]. Universitat de València; 2022 [citado 21 de junio de 2024]. p. 1. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=321188>
16. Pan H wei, Li W, Li R guo, Li Y, Zhang Y, Sun E hua. Simple Sample Preparation Method for Direct Microbial Identification and Susceptibility Testing From Positive Blood Cultures. *Front Microbiol.* 20 de marzo de 2018;9:481. [Citado el 16 de mayo del 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5869256/>
17. Azula N, Relloso S, Barrios R, Nicola F, Smayevsky J. Identificación directa de microorganismos a partir de hemocultivos positivos utilizando

- espectrometría de masas (MALDI-TOF MS). Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 2022;56(1):17-31. [Citado el 16 de mayo del 2024]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/535/53571937004/html/>
18. 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. Revista Argentina de Microbiología. 1 de julio de 2015;47(3):190-5. [Citado el 16 de mayo del 2024]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-argentina-microbiologia-372-articulo-identificacion-rapida-microorganismos-frascos-hemocultivos-S0325754115000838?redirectNew=true>
19. Von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP. Declaración de la iniciativa STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology): directrices para la comunicación de estudios observacionales. Revista Española de Salud Pública [Internet]. 2008 Jun 1;82(3):251–9. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272008000300002
20. Estudios de intervención no aleatorizados (TREND) [Internet]. www.elsevier.es. [citado el 25 de junio de 2024]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-clinica-2-pdf-13083739>
21. Dematheis F, Walter MC, Lang D, Antwerpen M, Scholz HC, Pfalzgraf MT, et al. Machine Learning Algorithms for Classification of MALDI-TOF MS Spectra from Phylogenetically Closely Related Species *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* and *Brucella suis*. Microorganisms. 17 de agosto de 2022;10(8):1658. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9416640/>

22. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG; PRISMA Group. Declaración PRISMA: una propuesta para mejorar la publicación de revisiones sistemáticas y metaanálisis. Med Clin (Barc). 2010 nov; 135(11):507-11
23. Cabello, J.B. por CASPe. Plantilla para ayudarte a entender una Revisión Sistemática. En: CASPe. Guías CASPe de Lectura Crítica de la Literatura Médica. Alicante: CASPe; 2015. Cuaderno I. p.13-17
24. Joanna Briggs Institute. JBI Levels of Evidence. Working Party. 2013. [Internet]. Disponible en: https://jbi.global/sites/default/files/2019-05/JBI-Levels-of-evidence_2014_0.pdf.

7. ANEXOS

Anexo I: Herramienta de evaluación de la evidencia en estudios observacionales: Guía STROBE (19)

Tabla 1. Declaración STROBE: lista de puntos esenciales que deben describirse en la publicación de estudios observacionales		
Título y resumen	Punto	Recomendación
	1	(a) Indique, en el título o en el resumen, el diseño del estudio con un término habitual (b) Proporcione en el resumen una sinopsis informativa y equilibrada de lo que se ha hecho y lo que se ha encontrado
Introducción		
Contexto/fundamentos	2	Explique las razones y el fundamento científicos de la investigación que se comunica
Objetivos	3	Indique los objetivos específicos, incluida cualquier hipótesis preespecificada
Métodos		
Diseño del estudio	4	Presente al principio del documento los elementos clave del diseño del estudio
Contexto	5	Describa el marco, los lugares y las fechas relevantes, incluido los períodos de reclutamiento, exposición, seguimiento y recogida de datos
Participantes	6	(a) Estudios de cohortes: proporcione los criterios de elegibilidad, así como las fuentes y el método de selección de los participantes. Especifique los métodos de seguimiento Estudios de casos y controles: proporcione los criterios de elegibilidad así como las fuentes y el proceso diagnóstico de los casos y el de selección de los controles. Proporcione las razones para la elección de casos y controles Estudios transversales: proporcione los criterios de elegibilidad y las fuentes y métodos de selección de los participantes (b) Estudios de cohortes: en los estudios apareados, proporcione los criterios para la formación de parejas y el número de participantes con y sin exposición Estudios de casos y controles: en los estudios apareados, proporcione los criterios para la formación de las parejas y el número de controles por cada caso
Variables	7	Defina claramente todas las variables: de respuesta, exposiciones, predictoras, confusoras y modificadoras del efecto. Si procede, proporcione los criterios diagnósticos
Fuentes de datos/medidas	8*	Para cada variable de interés, proporcione las fuentes de datos y los detalles de los métodos de valoración (medida). Si hubiera más de un grupo, especifique la comparabilidad de los procesos de medida
Sesgos	9	Especifique todas las medidas adoptadas para afrontar fuentes potenciales de sesgo
Tamaño muestral	10	Explique cómo se determinó el tamaño muestral
Variables cuantitativas	11	Explique cómo se trataron las variables cuantitativas en el análisis. Si procede, explique qué grupos se definieron y por qué
Métodos estadísticos	12	(a) Especifique todos los métodos estadísticos, incluidos los empleados para controlar los factores de confusión (b) Especifique todos los métodos utilizados para analizar subgrupos e interacciones (c) Explique el tratamiento de los datos ausentes (missing data) (d) Estudio de cohortes: si procede, explique cómo se afrontan las pérdidas en el seguimiento Estudios de casos y controles: si procede, explique cómo se aparearon casos y controles Estudios transversales: si procede, especifique cómo se tiene en cuenta en el análisis la estrategia de muestreo (e) Describa los análisis de sensibilidad
Resultados		
Participantes	13*	(a) Describa el número de participantes en cada fase del estudio; por ejemplo: cifras de los participantes potencialmente elegibles, los analizados para ser incluidos, los confirmados elegibles, los incluidos en el estudio, los que tuvieron un seguimiento completo y los analizados (b) Describa las razones de la pérdida de participantes en cada fase (c) Considere el uso de un diagrama de flujo
Datos descriptivos	14*	(a) Describa las características de los participantes en el estudio (p. ej., demográficas, clínicas, sociales) y la información sobre las exposiciones y los posibles factores de confusión (b) Indique el número de participantes con datos ausentes en cada variable de interés (c) Estudios de cohortes: resume el período de seguimiento (p. ej., promedio y total)
Datos de las variables de resultado	15*	Estudios de cohortes: describa el número de eventos resultado, o bien proporcione medidas resumen a lo largo del tiempo Estudios de casos y controles: describa el número de participantes en cada categoría de exposición, o bien proporcione medidas resumen de exposición Estudios transversales: describa el número de eventos resultado, o bien proporcione medidas resumen
Resultados principales	16	(a) Proporcione estimaciones no ajustadas y, si procede, ajustadas por factores de confusión, así como su precisión (p. ej., intervalos de confianza del 95%). Especifique los factores de confusión por los que se ajusta y las razones para incluirlos (b) Si categoriza variables continuas, describa los límites de los intervalos (c) Si fuera pertinente, valore acompañar las estimaciones del riesgo relativo con estimaciones del riesgo absoluto para un período de tiempo relevante
Otros análisis	17	Describa otros análisis efectuados (de subgrupos, interacciones o sensibilidad)
Discusión		
Resultados clave	18	Resume los resultados principales de los objetivos del estudio
Limitaciones	19	Discuta las limitaciones del estudio, teniendo en cuenta posibles fuentes de sesgo o de imprecisión. Razone tanto sobre la dirección como sobre la magnitud de cualquier posible sesgo
Interpretación	20	Proporcione una interpretación global prudente de los resultados considerando objetivos, limitaciones, multiplicidad de análisis, resultados de estudios similares y otras pruebas empíricas relevantes
Generabilidad	21	Discuta la posibilidad de generalizar los resultados (validez externa)
Otra información		
Financiación	22	Especifique la financiación y el papel de los patrocinadores del estudio y, si procede, del estudio previo en el que se basa el presente artículo

Anexo II: Herramienta de evaluación de la evidencia en estudios experimentales: Guía TREND (20)

El cuestionario TREND (versión 1.0)			
Sección	N.º	Descripción	Ejemplo
Título y resumen	1	Información sobre el procedimiento de asignación de las intervenciones. Resumen estructurado. <i>Información de la población objetivo y de la estudiada. Antecedentes científicos y justificación del método empleado</i>	1
Introducción			
Antecedentes	2	<i>Teorías en las que se basa el diseño de intervenciones sobre el comportamiento</i>	2
Métodos	3	Criterios de selección de participantes, <i>incluidos criterios de inclusión en los diferentes niveles de reclutamiento y el plan de muestreo (ejemplo: ciudades, clínicas, sujetos)</i>	
Participantes		Métodos de reclutamiento (ejemplo: derivación, selección propia), incluido el método de muestreo si se utilizó un plan sistemático de muestreo.	3.1
		Lugares e instalaciones en que se efectuó el registro de datos	3.2
Intervenciones	4	Detalles de las intervenciones propuestas para cada alternativa en estudio, y cómo y cuándo se las administró, incluyendo específicamente: elemento/sustancia; ¿qué fue lo que se administró? Método de administración: ¿cómo se administró el elemento o la sustancia? <i>Unidad de administración: ¿cómo se agrupó a los sujetos durante el proceso de administración? ¿Quién administró la intervención?</i>	4.1
		<i>Instalaciones en las que se administró la intervención</i>	4.2
		Cantidad y duración de la exposición: ¿cuántas sesiones o episodios o acontecimientos se propuso? ¿Cuánto tiempo se propuso que duraran?	4.3
		Cronología: ¿cuánto tiempo se consideró necesario para administrar la intervención a cada unidad?	4.4
		<i>Medidas propuestas para mejorar el cumplimiento o la adhesión al estudio (ejemplo: incentivos)</i>	4.5
Objetivos	5	Objetivos específicos e hipótesis	
Variables	6	Variables principales y secundarias que miden la respuesta, claramente definidas. <i>Métodos utilizados para registrar los datos y todos los métodos utilizados para mejorar la calidad de las determinaciones. Información sobre el empleo de instrumentos validados, tales como pruebas psicométricas o biométricas</i>	6
Tamaño muestral	7	Forma de determinar el tamaño muestral y, cuando resulte adecuado, descripción de los análisis intermedios y de las reglas de parada del estudio	
Método de asignación	8	<i>Unidad de asignación (si la unidad que se asigna a cada alternativa en comparación es un individuo, grupo o comunidad). Procedimiento usado para asignar las unidades, incluida la información sobre cualquier criterio de exclusión (ejemplo: formación de bloques, estratificación, minimización). Inclusión de los métodos utilizados para reducir los sesgos potenciales por no haber distribuido la muestra de forma aleatoria (ejemplo: apareamiento)</i>	8
Enmascaramiento	9	Especificación de si los participantes, los que administraron la intervención y los que valoraron los resultados desconocían o no la asignación de los participantes a las alternativas estudiadas. En caso afirmativo, información acerca de cómo se cumplió el anonimato y las medidas utilizadas para verificarlo	9
Unidad de análisis	10	<i>Descripción de la unidad más pequeña analizada para valorar los efectos de la intervención (ejemplo: individuo, grupo o comunidad). Si la unidad analizada difiere de la unidad asignada en el estudio, qué método analítico se ha usado para controlar esta diferencia (ejemplo: ajustando las estimaciones del error estándar mediante el efecto de diseño o utilizando análisis multivariante)</i>	10
Métodos estadísticos	11	Métodos estadísticos empleados para analizar las variables principales, incluidas las técnicas más sofisticadas de análisis de datos. Métodos estadísticos utilizados para análisis adicionales, como análisis de subgrupos y análisis ajustados. <i>Métodos para gestionar los valores faltantes y, si se incluyen, determinar sus valores. Programas estadísticos utilizados</i>	
Resultados			
Flujo de participantes	12	Flujo de participantes en las diferentes etapas del estudio: reclutamiento, asignación, inclusión y exposición a la intervención, seguimiento y análisis (se recomienda utilizar un diagrama) Reclutamiento: número de participantes cribados; elegibles; no elegibles; que rechazaron la inclusión, e incluidos en el estudio Asignación: número de participantes asignados de acuerdo con las condiciones del estudio del estudio y número de participantes que recibieron estas alternativas Inclusión y exposición a la intervención: número de participantes asignados a cada alternativa del estudio y número de participantes que completaron el seguimiento (ejemplo: pérdidas de seguimiento) Análisis: número de participantes incluidos y excluidos del análisis principal, para cada alternativa	

Reclutamiento	13	Fechas correspondientes a los periodos de reclutamiento y de seguimiento	
Datos basales	14	Datos demográficos basales y características clínicas de los participantes según cada alternativa del estudio. <i>Comparación de los datos basales de las pérdidas de seguimiento y de los participantes que completaron el estudio, en conjunto y según las alternativas estudiadas. Comparaciones entre los datos basales de la población estudiada y de la población diana</i>	14

(Continúa en pág. siguiente)

Med Clín (Barc). 2005;125(Supl. 1):38-42

VALLÉ C, ET AL. ESTUDIOS DE INTERVENCIÓN NO ALEATORIZADOS (TREND)

TABLA 1
El cuestionario TREND (versión 1.0) (continuación)

Sección	N.º	Descripción	Ejemplo
Datos basales, equivalencia	15	Información sobre la equivalencia basal de los grupos estudiados y métodos estadísticos utilizados para controlar las diferencias basales	15
Análisis cuantitativo	16	Número de participantes (denominador) incluidos en el análisis de cada alternativa del estudio, especialmente cuando los denominadores cambian en diferentes resultados; exposición de los resultados en cifras absolutas cuando sea posible Indicación de si la estrategia del análisis se basa en la «intención de tratar» o, en caso contrario, descripción de cómo se analiza a los participantes que no cumplen con el protocolo	16
Resultados y tendencias	17	Para cada variable principal y secundaria, un resumen de los resultados de cada alternativa del estudio, junto con la estimación del efecto (effect size) y un intervalo de confianza para indicar la precisión de su estimación Inclusión de los resultados no modificados o negativos Inclusión de los resultados obtenidos en la comprobación de los mecanismos causales que se supone que explican el efecto de la intervención, en caso de que existan	
Análisis secundarios	18	Resumen de otros análisis efectuados, incluidos análisis de subgrupos o análisis restringidos, indicando si estaban previstos y si son de carácter exploratorio	18
Acontecimientos adversos	19	Resumen de todos los acontecimientos adversos importantes o de los efectos no esperados en cada alternativa del estudio (medidas adoptadas, estimación del tamaño del efecto e intervalos de confianza)	19
Discusión			
Interpretación	20	Interpretación de los resultados, teniendo en cuenta las hipótesis del estudio, las fuentes potenciales de sesgos, imprecisión de las determinaciones, análisis repetitivos y otras limitaciones o debilidades del estudio Discusión de los resultados, considerando los mecanismos mediante los que actúa la intervención (vías causativas), o los mecanismos o explicaciones alternativas, problemas para ponerlos en práctica y para implementarlos Discusión de la investigación: programática, o implicaciones prácticas	
Extrapolación	21	Extrapolación (validez externa) de los resultados del ensayo, considerando: población estudiada, características de la intervención, duración del seguimiento, incentivos, proporción de cumplimiento, lugares e instalaciones específicas que han participado en el estudio, y otros aspectos relacionados con este contexto	
Evidencias en conjunto	22	Interpretación general de los resultados en el marco de la información aportada y de las teorías aceptadas en general	

Anexo III: Tabla de resultados

AÑO	AUTOR	ESTUDIO	OBJETIVO	RESULTADOS	NIVEL DE EVIDENCIA
2018	Pan H wei, Li W, Li R guo, Li Y, Zhang Y, Sun E hua (16)	ESTUDIOS EXPERIMENTALES NO ALEATORIZADOS	Comparación de MALDI-TOF frente a una técnica convencional	Concordancia del 96,89% (125/2129) frente a la técnica convencional	LEVEL 2C
2022	Azula N, Relloso S, Barrios R, Nicola F, Smayevsky J (17)	ESTUDIOS OBSERVACIONALES RETROSPECTIVOS	Comparación de MALDI-TOF frente a una técnica convencional	Se logró la identificación correcta de 81,9% y 81,7% a nivel de género y especie	LEVEL 3E
2015	Cattani ME, Posse T, Hermes RL, Kaufman SC (18)	ESTUDIOS OBSERVACIONALES RETROSPECTIVOS	Comparación de dos kits de identificación directa frente a una técnica convencional	Concordancia del 79,76% (840/670) con el procedimiento HF Concordancia del 72,14% (542/391) con el procedimiento MS	LEVEL 3E
2020	Wang Y, Jin Y, Bai Y, Song Z, Chu W, Zhao M, et al (14)	ESTUDIOS EXPERIMENTALES NO ALEATORIZADOS	Comparación de MALDI-TOF utilizando diferentes frascos de hemocultivo frente a una técnica convencional	Concordancia del 94,5% (378/400) para la marca de hemocultivos A y B	LEVEL 2C

2012	Croxatto A, Prod'hom G, and Greub G (9)	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	Recopilación de datos en referencia al MALDI-TOF	Resultados de identificación generales por MALDI- TOF en Microbiología Clínica	LEVEL 2B
2001	Fenselau C and Demirev PA (10)	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	Recopilación de datos en referencia al MALDI-TOF	Preparación de las muestras para la posterior identificación mediante MALDI-TOF	LEVEL 2B
2012	Jordana-Lluch E, Martró Català E, Ausina Ruiz V (11)	REVISIÓN SISTEMÁTICA	Uso del MALDI-TOF en Microbiología Clínica	Explicación del fundamento teórico y resultados de identificación de cepas bacterianas	LEVEL 2A
2010	Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, and Raoult D (12)	REVISIÓN SISTEMÁTICA	Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF	Diferentes usos clínicos de la espectrometría de masas MALDI-TOF	LEVEL 2 ^a

2014	March Rosselló GA (13)	TESIS DOCTORAL / ESTUDIOS OBSERVACIONALES DE CORTE LONGITUDINAL	Elaboración de un protocolo de procesamiento de muestra para MALDI- TOF	Protocolos de procesamiento de hemocultivos y explicación extensa del fundamento teórico	LEVEL 2C
2022	Torres Fink I (15)	ESTUDIOS OBSERVACIONALES	Estudio de las aplicaciones del MALDI-TOF a la práctica clínica	Implicación del uso del MALDI-TOF en la calidad asistencial del personal de salud de manera indirecta	LEVEL 3C
2022	Dematheis F, Walter MC, Lang D, Antwerpen M, Scholz HC, Pfalzgraf MT, et al (22)	REVISIÓN SISTEMÁTICA	Estudio del uso de la inteligencia artificial en la espectrometría de masas MALDI-TOF	Uso de la tecnología <i>machine learning</i> en el diagnóstico microbiológico mediante MALDI-TOF	LEVEL 2A

Anexo IV: Herramienta de evaluación de la evidencia en Revisiones sistemáticas: Guía PRISMA (22)

GUÍA PRISMA		
Sección/Tema	Número	Ítem
Título		
Título	1	Identificar la publicación como revisión sistemática, metaanálisis o ambos.
Resumen		
Resumen estructurado	2	Facilitar un resumen estructurado que incluya, según corresponda: antecedentes; objetivos; fuente de los datos; criterios de elegibilidad de los estudios, participantes e intervenciones; evaluación de los estudios y métodos de síntesis; resultados; limitaciones; conclusiones e implicaciones de los hallazgos principales; número de registro de la revisión sistemática.

Introducción		
Justificación	3	Describir la justificación de la revisión en el contexto de los que ya se conoce sobre el tema
Objetivos	4	Plantear de forma explícita las preguntas que se desean contestar con relación a los participantes, las intervenciones, las comparaciones, los resultados y el diseño de los estudios (PICOS).
Métodos		
Protocolo y registro	5	Indicar si existe un protocolo de revisión al que se pueda acceder, si está disponible, la información sobre el registro,

		incluyendo su número de registro.
Criterios de elegibilidad	6	Especificar las características de los estudios y de las características utilizadas como criterios de elegibilidad y su justificación
Fuentes de información	7	Describir todas las fuentes de información en la búsqueda y la fecha de la última búsqueda realizada
Búsqueda	8	Presentar la estrategia completa de búsqueda electrónica en, al menos, una base de datos, incluyendo los límites utilizados, de tal forma que pueda ser reproducible
Selección de los estudios	9	Especificar el proceso de selección de los estudios.
Proceso de extracción de datos	10	Describir los métodos para la extracción de datos de las publicaciones y cualquier proceso para obtener y confirmar datos por parte de los investigadores.

Lista de datos	11	Listar y definir todas las variables para las que se buscaron datos y cualquier asunción y simplificación que se hayan hecho.
Riesgo de sesgo en los estudios individuales	12	Describir los métodos utilizados para evaluar el riesgo de sesgo en los estudios individuales (especificar si se realizó al nivel de los estudios o de los resultados) y cómo esta información se ha utilizado en la síntesis de datos.
Medidas de resumen	13	Especificar las principales medidas de resumen

Síntesis de resultados	14	Describir los métodos para manejar los datos y combinar resultados de los estudios, cuando esto es posible, incluyendo medidas de consistencia para cada metaanálisis.
Riesgo de sesgos entre los estudios	15	Especificar cualquier evaluación del riesgo de sesgo que pueda afectar la evidencia acumulativa.
Análisis adicionales	16	Describir los métodos adicionales de análisis, en el caso de que se hiciera, indicar cuáles fueron preespecificados.
Resultados		
Selección de estudios	17	Facilitar el número de estudios cribados, evaluados para su elegibilidad e incluidos en la revisión, y detallar las razones para su exclusión en cada etapa, idealmente mediante un diagrama de flujo.
Características de los estudios	18	Para cada estudio presentar las características para las que se extrajeron los datos.
Riesgo de sesgo en los estudios	19	Presentar datos sobre el riesgo de sesgo en cada estudio y, si está disponible, cualquier

		evaluación del sesgo en los resultados.
Resultados de los estudios individuales	20	Para cada resultado considerado en cada estudio (beneficios o daños), presentar a) el dato resumen para cada grupo de intervención y b) la estimación del efecto con su intervalo de confianza, idealmente de forma gráfica mediante un diagrama de bosque (forest plot).
Síntesis de los resultados	21	Presentar los resultados de todos los metaanálisis realizados,

Universidad de Valladolid		incluyendo los intervalos de confianza y las medidas de consistencia.
Riesgo de sesgo entre los estudios	22	Presentar los resultados de cualquier evaluación del riesgo de sesgo entre los estudios (ver ítem 15).
Análisis adicionales	23	Facilitar los resultados de cualquier análisis adicional, en el caso de que se hayan realizado.
Discusión		
Resumen de la evidencia	24	Resumir los hallazgos principales, incluyendo la fortaleza de las evidencias para cada resultado principal; considerar su relevancia para grupos clave.
Limitaciones	25	Discutir las limitaciones de los estudios y de los resultados y de la revisión
Conclusiones	26	Proporcionar una interpretación general de los resultados en el contexto de otras evidencias, así como las implicaciones para la futura investigación.
Financiación		

Financiación	27	Describir las fuentes de financiación de la revisión sistemática y otro tipo de apoyos, así como el rol de los financiadores en la revisión sistemática.
--------------	----	--

Anexo V: Herramienta de evaluación de la evidencia en Revisiones bibliográficas: Guía CASPE (23)

GUÍA CASPE		
A. ¿Los resultados de la revisión son válidos?		
	SI	NS/NC
¿Se hizo la revisión sobre un tema claramente definido?		
2. ¿Buscaron los autores tipos de artículos adecuados?		
3. ¿Crees que estaban incluidos los estudios importantes y pertinentes?		
4. ¿Crees que los autores de la revisión han hecho suficiente esfuerzo para valorar la calidad de los estudios incluidos?		
5. Si los resultados de los diferentes estudios han sido mezclados para obtener un resultado "combinado", ¿era razonable hacer eso?		
B. ¿Cuáles son los resultados?		
6. ¿Cuál es el resultado global de la revisión?		
7. ¿Cuál es la precisión del resultado/s?		
C. ¿Son los resultados aplicables en tu medio?		
	SÍ	NS/NC
8. ¿Se pueden aplicar los resultados en tu medio?		
9. ¿Se han considerado todos los resultados importantes para tomar la decisión?		

10. ¿Los beneficios merecen la pena frente a los perjuicios y costes? Aunque no esté planteado explícitamente en la revisión, ¿qué opinas?	27	Describir las fuentes de financiación de la revisión sistemática y otro tipo de apoyos, así como el rol de los financiadores en la revisión sistemática
--	----	---

Anexo VI: Herramienta de evaluación de los niveles de evidencia científica JBI (24)

Levels of Evidence- Effectiveness (Instituto Joanna Briggs)	
Level 1- Experimental Designs	Level 1.a- Systematic review of Randomized Controlled Trials
	Level 1.b – Systematic review of RCTs and other study designs
	Level 1.c - RCT
	Level 1.d – Pseudo-RCTs
Level 2- Quasi-experimental designs	Level 2.a – Systematic review of quasi-experimental studies
	Level 2.b - Systematic review of quasi-experimental studies and other lower study designs
	Level 2.c – Quasi-experimental prospectively controlled study
	Level 2.d – Pretest – post-test or historic/retrospective control group study
Level 3- Observational- Analytic Designs	Level 3.a - Systematic review of comparable cohort studies
	Level 3.b - Systematic review of comparable cohort and other lower study designs
	Level 3.c - Cohort study with control group
	Level 3.d – Case – controlled study
	Level 3.e – Observational study without a control group
Level 4- Observational- Descriptive	Level 4.a – Systematic review of descriptive studies
	Level 4.b – Cross-sectional study

Studies	Level 4.c - Case series
	Level 4.d – Case study
Level 5- Expert Opinion and Bench Research	Level 5.a – Systematic review of expert opinion
	Level 5.b – Expert consensus
	Level 5.c – Bench research/single expert opinion

Anexo VII: Tabla de evaluación de los estudios utilizados

GUÍA STROBE																							
Autor y año	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Total
Azula N, Relloso S, Barrios R, Nicola F, Smayevsky J (17)	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	No	No	18/22
Cattani ME, Posse T, Hermes RL, Kaufman SC (18)	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No	Si	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	No	No	18/22
March Rosello GA (13)	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	No	Sí	No	17/22
Torres Fink I (15)	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	No	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	No	No	No	17/22

REVISIONES BIBLIOGRÁFICAS	ITEMS GUÍA CASPE										TOTAL
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Croxatto A, Prod'hom G, and Greub G (9)	Sí	Sí	Sí	NS	Sí	Ver Tabla de contenidos	No se muestran.	No	Sí	Sí	6
Fenselau C and Demirev PA (10)	Sí	Sí	Sí	NS	Sí		No se muestran	No	Sí	Sí	6

REVISIONES SISTEMÁTICAS	ITEMS DE PRISMA																											TOTAL
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
Jordana-Lluch E, Martró Català E, Ausina Ruiz V (11)	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No	No	Sí	Sí	No	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	No	23/27
Seng P, Rolain JM, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, and Raoult D (12)	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No	No	Sí	Sí	No	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí	20/27
Dematheis F, Walter MC, Lang D, Antwerpen M, Scholz HC, Pfalzgraf MT, et al (22)	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	Sí	No	No	Sí	No	No	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	20/27

ENSAYOS CLÍNICOS ALEATORIZADOS	GUIA TREND																									TOTAL
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
Pan H wei, Li W, Li R guo, Li Y, Zhang Y, Sun E hua (16)	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	Sí	No	No	Sí	Sí	No	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí	19/27
Wang Y, Jin Y, Bai Y, Song Z, Chu W, Zhao M, et al (14)	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	20/27	