

Universidad de Costa Rica

Sede Rodrigo Facio

Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de

Licenciatura en Microbiología y Química Clínica

Aplicación de la identificación directa mediante MALDI-ToF para acelerar el diagnóstico
de infecciones del tracto urinario en muestras de orina

Allison Priscilla Flores Araya

B72988

Julio, 2023

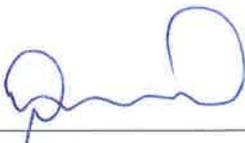


Los que aquí firmamos damos fe que este trabajo posee todas las correcciones indicadas el día de la presentación oral de este trabajo final de graduación.



Dra. Ana Fernanda Vásquez Mendoza

Tutora



Dr. César Rodríguez Sánchez

Lector



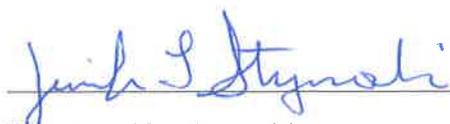
Dr. Bruno Lomonte Vigliotti

Lector



Dr. Fernando García

Presidente del tribunal



Dra. Jennifer Stynoski

Profesor designado

Índice de contenidos

Resumen	4
Antecedentes.....	6
Generalidades de las Infecciones del Tracto Urinario (ITU).....	6
Agentes patógenos más comúnmente implicados en ITU.....	7
Epidemiología de las ITU.....	8
Infecciones complicadas.....	9
Diagnóstico de ITU.....	11
Urocultivo e identificación tradicional.....	13
Diagnostic stewardship.....	15
Pruebas de detección sistemática.....	16
Otras metodologías para identificación de microorganismos implicados en ITU.....	17
Biología molecular.....	17
Espectrometría de masas.....	17
Justificación.....	21
Hipótesis.....	23
Objetivos.....	23
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos.....	23
Metodología.....	24
Resultados.....	27
Fase 1: Selección de la metodología para la identificación directa.....	27
Fase 2: Aplicación de la metodología de identificación directa.....	29
Fase 3: Análisis estadístico.....	31
Discusión.....	32
Conclusiones.....	37
Referencias.....	38

Índice de tablas

Cuadro 1. Agentes patógenos más comunes asociados a infecciones nosocomiales y comunitarias.....	7
Cuadro 2. Criterios para el diagnóstico de las infecciones del tracto urinario.....	12
Cuadro 3. Técnicas de detección sistemática para asistir en el diagnóstico de ITU.....	16
Cuadro 4. Resultados del análisis de 20 muestras mediante urocultivo tradicional e identificación directa por MALDI-ToF empleando la metodología de preparación del Sepsityper Kit® (Bruker Daltonik).....	27
Cuadro 5. Resultados de la identificación (ID) y su respectivo <i>score</i> mediante la identificación directa con el MALDI-ToF y el método de lavados con agua grado molecular al aplicar ácido fórmico y sin este.	28
Cuadro 6. Resultados del proceso de identificación directa con el MALDI-ToF al aplicar la metodología de lavados con agua grado molecular según el grupo de microorganismos.....	29
Cuadro 7. Resultados del proceso de identificación directa con el MALDI-ToF al aplicar la metodología de lavados con agua grado molecular según el grupo de microorganismos tomando en cuenta las muestras con recuentos superiores a 100 000 UFC/mL.....	30
Cuadro 8. Porcentajes de identificación (%ID) de las muestras que presentan BGN y <i>E. coli</i> específicamente con recuentos superiores a 100 000 UFC/mL según su aspecto.....	30

Índice de gráficos

Gráfico 1. Gráfico 1. Resultado de la prueba exacta de Fisher que compara la metodología con el Sepsityper Kit® (Bruker Daltonik) (Técnica 1) y la metodología de lavados con agua grado molecular en muestras con un recuento mayor a 100 000 UFC/mL (Técnica 2).....	31
--	----

Resumen

Las infecciones del tracto urinario constituyen una de las primeras causas de enfermedad en pacientes ambulatorios y de infecciones intrahospitalarias; y se pueden presentar de forma subclínica o sintomática. Son causadas, principalmente, por la bacteria *Escherichia coli*, y su tratamiento consiste en la administración de antibióticos.

El análisis de muestras de orina es un proceso rutinario en el laboratorio y de importancia para el diagnóstico y monitoreo de múltiples enfermedades, entre ellas las infecciones urinarias. Para este análisis se recurre al urocultivo tradicional como estándar de oro, el cual implica aislar e identificar el agente causal de la infección. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado otras metodologías e instrumentos para agilizar la identificación bacteriana y hacer del diagnóstico un proceso fluido y eficiente que lleve a un tratamiento oportuno; como lo propone el concepto del “*Diagnostic stewardship*”. Dentro de las tecnologías desarrolladas con este fin se encuentra el MALDI-ToF, el cual ha tomado una gran relevancia en la identificación bacteriana mediante técnicas de proteómica.

En la presente investigación se pretende demostrar que es posible analizar muestras de orina mediante la técnica de MALDI-ToF directo para acelerar la identificación bacteriana. Para lograr esto se analizaron muestras de orina por urocultivo convencional y MALDI-ToF directo para la identificación bacteriana. Además, se determinaron los parámetros físicos, químicos y microbiológicos de las muestras analizadas por espectrometría de masas para estudiar cuáles de estos parámetros influyen en la identificación bacteriana, y con ello establecer aquellos que guíen la selección de muestras de orina.

Con este fin, se procedió a realizar un estudio preliminar empleando muestras de orina recolectadas por chorro medio con técnica aséptica. En este estudio preliminar se determinaron las características físicas y microbiológicas que generaban los mejores resultados de identificación mediante la técnica de MALDI-ToF directo. Además, se compararon variaciones metodológicas en el tratamiento de la muestra con el fin de determinar la técnica ideal y realizar posteriormente un estudio más amplio con aproximadamente 100 muestras. Las metodologías de tratamiento comparadas fueron: kit comercial Sepsityper[®] MALDI-ToF, extracción de proteínas con etanol y ácido fórmico y lavados con agua grado molecular.

El método de lavados con agua grado molecular presentó los mayores porcentajes de identificación. Se observó, además, que las muestras de orina con mayor cantidad de resultados concordantes entre el análisis convencional y el directo fueron aquellas con ligera turbidez y con un solo microorganismo como agente causante de la infección que esté en un recuento de más de 100 000 UFC/mL.

En cuanto al porcentaje de identificación mediante MALDI-ToF directo se obtuvo un 84% para bacilos Gram-negativos, con un 87% específicamente para *Escherichia coli*, bajo las condiciones descritas anteriormente (muestras ligeramente turbias con un microorganismo en más de 100 000 UFC/mL). Mientras que para las muestras con bacterias Gram-positivas, levaduras y más de un microorganismo se obtuvo porcentajes de identificación sumamente bajos.

Los resultados de este trabajo pretenden aportar a la reducida lista de estudios disponibles hasta la fecha sobre identificación directa con MALDI-ToF en muestras de orina. Si bien la técnica muestra gran potencial, aún no ha sido definido un método estándar para su uso. En este proyecto se experimenta con variaciones metodológicas de la preparación de la muestra y se comparan los porcentajes de identificación con cada una de ellas. Además, se trabaja con muestras de orina muy variadas en cuanto a sus parámetros físicos, químicos y microbiológicos (diversidad en las especies y recuentos bacterianos). Todo lo anterior contribuye a que el estudio abarque múltiples aspectos importantes que brindan una guía en la selección de muestras para futuros ensayos y para la próxima implementación de esta técnica en los laboratorios clínicos.

Antecedentes

Generalidades de las Infecciones del Tracto Urinario (ITU)

Las infecciones del tracto urinario se pueden definir como un “proceso inflamatorio que implica la invasión y multiplicación de microorganismos en el tracto urinario” (Orrego-Marín et al., 2014, p. 1). Este proceso se puede originar por el ascenso de microorganismos a través de la uretra hacia la vejiga, evento más frecuente, o por microorganismos presentes en la sangre, es decir, bacteriemias y fungemias, que llegan al tracto urinario y logran establecer una infección (Forbes et al., 2005). Las ITU constituyen una de las primeras causas de enfermedad en pacientes ambulatorios y de infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) (Yabar et al., 2017).

Estas infecciones pueden presentarse de forma subclínica o sintomática y la gravedad de los síntomas dependen de la localización de la infección a lo largo del tracto urinario (Forbes et al., 2005). El signo principal es la fiebre, la cual se presenta en todas las edades, pero es de especial importancia en niños y niñas menores de 2 años (Lascano et al., 2017). En edades mayores se observan signos y síntomas más específicos, los más frecuentes son: dolor lumbar, suprapúbico o abdominal, tenesmo vesical, dolor al orinar, polaquiuria y urgencia miccional (Guevara et al., 2011; Orrego-Marín et al., 2014).

Las infecciones urinarias se pueden clasificar según diversas características. Si se toma en cuenta el punto de vista epidemiológico se pueden dividir en infecciones comunitarias y nosocomiales (o IAAS), siendo estas últimas las más asociadas a complicaciones. Si se habla de la gravedad de la infección se tienen las infecciones no complicadas, asociadas mayormente a mujeres, y las infecciones complicadas, las cuales suelen ser difíciles de tratar y pueden llevar a un daño renal, bacteriemia u otras complicaciones. Otra forma de separar las ITU es según la localización anatómica afectada; en caso de una infección en las vías urinarias inferiores se suelen ver síntomas específicos (disuria, polaquiuria, urgencia miccional), mientras que una afectación en las vías superiores presenta, además de lo anterior, síntomas sistémicos como fiebre y dolor lumbar (Forbes et al., 2005).

Agentes patógenos más comúnmente implicados en ITU

Las Enterobacterias son el grupo más importante de patógenos causantes de ITU. Dentro de este grupo destacan *Proteus* sp., *Klebsiella* sp. y *Enterobacter* sp. Sin embargo, el principal agente causante de infecciones urinarias es *Escherichia coli*, que causa alrededor de 75-95% de las ITU. Otra bacteria Gram-negativa de relevancia es *Pseudomonas aeruginosa*, debido a su frecuente aparición en infecciones nosocomiales y sus múltiples mecanismos de resistencia. En cuanto a las bacterias Gram-positivas, las más frecuentes en este tipo de infecciones son: *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus agalactiae*. Por último, dentro del grupo de las levaduras, *Candida albicans* es el agente patógeno más frecuente (Pigrau, 2013).

Cabe destacar que la prevalencia de un microorganismo como agente causante del cuadro depende de muchos factores, siendo los más importantes el entorno en el cual se encuentre la persona, ya sea hospitalario o en la comunidad (Ver Cuadro 1), y los factores de riesgo que presente. Por ejemplo, se ha visto que en la población diabética los agentes patógenos más frecuentes son *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp. y *Candida* sp. (Pigrau, 2013).

Cuadro 1. Agentes patógenos más comunes asociados a infecciones nosocomiales y comunitarias (Pigrau, 2013).

Tipo de infección		Agentes asociados
Infecciones comunitarias	Infecciones no complicadas	<i>E. coli</i> uropatógena (UPEC)
	Infecciones recurrentes	<i>Proteus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp. y <i>Enterobacter</i> sp.
	Otros	<i>S. saprophyticus</i> y <i>Enterococcus</i> sp.
Infecciones nosocomiales		<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella</i> sp., <i>Proteus</i> sp., <i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus</i> sp. y <i>Enterococcus</i> sp.

Epidemiología de las ITU

Como se mencionó anteriormente, las ITU son algunas de las infecciones más frecuentes tanto a nivel comunitario como nosocomial. Se ha reportado que la prevalencia de ITU durante la infancia es similar en ambos sexos, aunque es mayor en niñas y en niños no circuncidados. En la población pediátrica se observan síntomas muy inespecíficos como fiebre (Lascano et al., 2017).

En la edad adulta la incidencia en varones es baja durante la mayor parte de la vida; sin embargo, aumenta a partir de los 60 años debido al agrandamiento benigno de la próstata, lo cual interfiere con el vaciamiento de la vejiga. En cuanto a la población femenina se ha reportado una prevalencia muy alta por razones anatómicas, ya que la uretra es más corta y está próxima a la región perianal, la cual tiene una mayor humedad y temperatura que favorece el crecimiento microbiano (Forbes et al., 2005). Por estas razones se reporta que entre un 40-50% de la población femenina presenta una ITU en algún momento de su vida, y un 11% de estas mujeres tendrá al menos una infección por año (Orrego-Marín et al., 2014). Además, las mujeres entre 20 y 40 años afectadas por una ITU tienen un 50% de probabilidad de adquirir una segunda infección dentro del primer año, por lo que la tasa de recurrencia de las ITU es muy alta (Forbes et al., 2005).

Adicionalmente, existen algunas poblaciones particularmente afectadas por las ITU. La primera es la población hospitalizada, ya que las ITU constituyen la mitad de las infecciones nosocomiales en pacientes intervenidos con sondas y catéteres urinarios de forma prolongada, y son la segunda causa más común de bacteriemia en pacientes hospitalizados, llegando a producir sepsis e incluso la muerte (Forbes et al., 2005; Wilson & Gaido, 2004). La segunda población en riesgo corresponde a las personas embarazadas, esto porque los cambios morfológicos y fisiológicos facilitan el desarrollo de bacteriurias asintomáticas, cistitis y pielonefritis agudas, poniendo en riesgo tanto a la madre como al feto (Herraiz et al., 2005). Calderón et al. (2013) reporta que las infecciones urinarias son la causa más frecuente de complicaciones perinatales serias y la tercera causa de sepsis neonatal, y se ha observado una incidencia alrededor del 5-10% (Bogantes & Solano, 2010; Herraiz et al., 2005).

Infecciones complicadas

La mayoría de las complicaciones derivan de factores predisponentes del paciente o de microorganismos resistentes a los antibióticos de primera línea (Guevara et al., 2011). Sin embargo, la gravedad de la ITU también puede estar afectada por la localización de la infección, siendo las infecciones de las vías urinarias altas las más susceptibles a complicaciones. Por ejemplo, hasta un 40% de los pacientes con pielonefritis pueden llegar a desarrollar una bacteriemia (Almeida et al., 2020).

En general, los factores de riesgo están asociados a la obstrucción de las vías urinarias, lo cual lleva a una inflamación, dificultad del vaciamiento de la vejiga y retención urinaria que favorece la multiplicación microbiana. En estos casos, antes de dar tratamiento antimicrobiano, se debe tratar la condición de fondo para eliminar la raíz del problema y reducir la posibilidad de recaídas. Se ha reportado, por ejemplo, que las ITU pueden ser complicaciones de prostatitis, diabetes, talasemias, enfermedades renales, anomalías estructurales y neurológicas (Forbes et al., 2005). Aunado a esto, se tienen otras condiciones predisponentes como: litiasis renal, multiparidad, prolapso de órganos pélvicos (Orrego-Marín et al., 2014), y otras como insuficiencia renal crónica (IRC), estenosis de uretra, antecedente de cirugía (urológica, general o ginecológica), administración previa de antibiótico por infección de vías urinarias y cáncer de próstata (Garza-Montúfar et al., 2018). Según los estudios de Guevara et al. (2011), los cálculos renales y la diabetes son de los factores de riesgo más comúnmente reportados como causa de infección del tracto urinario.

Además, como se mencionó anteriormente, la población hospitalizada es muy susceptible a las ITU, y esto está asociado muchas veces a la instrumentalización de las vías urinarias, ya sea un catéter, sonda de Foley, dilataciones uretrales o una cistouretrografía (Garza-Montúfar et al., 2018). En estos casos se ha observado que estos instrumentos no solo facilitan el ascenso de microorganismos de la piel del paciente y de los manipuladores de la sonda por el tracto urinario, sino que también dificultan el vaciamiento vesical (Pigrau, 2013).

Otra población muy afectada por ITU, y a la cual se debe prestar especial atención, son las personas embarazadas. Durante la gestación ocurren múltiples cambios fisiológicos como el aumento del volumen urinario y de la filtración glomerular, hipertrofia de la

musculatura ureteral y aumento del reflujo vesicoureteral (Bogantes & Solano, 2010; Denzell & Lefevre, 2000). Asimismo, la estasis urinaria se desencadena por el incremento del 50% del volumen circulante y el consecuente aumento del filtrado glomerular (Herraiz et al., 2005). Sumado a esto ocurren cambios morfológicos por la evidente compresión mecánica sobre los uréteres, principalmente el uréter derecho debido a la rotación del útero hacia la derecha; a razón de esto, el 90% de los casos de pielonefritis durante el embarazo afecta el riñón derecho. Adicionalmente, se describe en la literatura que el vaciamiento incompleto de la vejiga favorece el reflujo vesicoureteral y la migración ascendente de los microorganismos (Pigrau, 2013).

Otros cambios importantes durante la gestación se dan a nivel hormonal por el aumento de progesterona, prostaglandinas y estrógenos. La acción de la progesterona y algunas prostaglandinas genera una disminución del tono y de la contractilidad ureteral y vesical, y esto a su vez favorece el reflujo vesicoureteral (Herraiz et al., 2005; Pigrau, 2013). Por su parte, los estrógenos pueden comprometer la respuesta inmune y disminuir la capacidad del tracto urinario para combatir la infección (Denzell & Lefevre, 2000).

Por último, existen factores durante el embarazo que favorecen el crecimiento bacteriano. Entre ellos se puede mencionar la alta concentración de azúcares y aminoácidos en la orina, la alcalinización de esta y la presencia de estrógenos; estos últimos incluso facilitan la adherencia de los patógenos al epitelio urinario (Denzell & Lefevre, 2000; Herraiz et al., 2005).

Para esta población es muy importante hablar sobre un concepto llamado bacteriuria asintomática (BA), la cual se puede definir como un “aislamiento positivo de una muestra tomada de manera adecuada, pero sin signos ni síntomas reportados” (Forbes et al., 2005). La BA en las gestantes es un factor predisponente para el desarrollo de complicaciones como pielonefritis aguda, anemia materna e hipertensión arterial. Se reporta que la progresión a pielonefritis aguda en madres con BA no tratada es de 40%; no obstante, se reduce a 3-4% si se trata a tiempo. En el caso del feto, la BA puede llevar a sepsis neonatal, parto pretérmino, bajo peso al nacer y mortalidad perinatal (Pigrau, 2013). Por consiguiente, para evitar estas graves consecuencias es de vital importancia la detección y el reporte de BA durante el embarazo y su adecuado tratamiento, lo cual se logra con un adecuado control prenatal que

incluya un examen general de orina (EGO) mensual y un urocultivo en la primera consulta y según la clínica y el EGO a lo largo del embarazo (Caja Costarricense del Seguro Social, 2022).

Diagnóstico de ITU

El análisis de muestras de orina es un proceso rutinario en el laboratorio y de importancia para el diagnóstico y monitoreo de múltiples enfermedades, entre ellas las infecciones urinarias. En este análisis se evalúan características macroscópicas, microscópicas, químicas y físicas de la orina, las cuales brindan una guía para determinar la condición del paciente. Además de esto, se han desarrollado metodologías más específicas para el diagnóstico de ITU que identifican el agente patógeno como la bioquímica, genómica y proteómica (Bakan et al, 2018).

Para realizar el diagnóstico de una ITU se acostumbraba a utilizar el concepto bacteriuria significativa propuesto por E.H. Kass, comprendido como el “hallazgo, por técnicas microbiológicas, en una orina correctamente recogida y conservada, de un número de bacterias indicativas de ITU” (De Cueto, 2005). Desde entonces se utilizó el criterio establecido por Kass de 100.000 o más UFC/mL en una muestra de orina por micción media para el diagnóstico de una ITU. Esto sin tomar en cuenta el origen de la muestra ni el hecho de que este criterio fue establecido específicamente para una población de mujeres con pielonefritis aguda y bacteriuria asintomática (De Cueto, 2005).

Si bien la mayoría de las ITU exhiben recuentos iguales o superiores a 100.000 UFC/ml, un 20% presenta recuentos entre 1.000 y 100.000 UFC/ml (García-Agudo et al., 2020); motivo por el cual actualmente el criterio de Kass no es considerado absoluto ni válido en todos los casos. Se propone, en cambio, incluir el tipo de población, edad, sexo, enfermedades de fondo, consumo de antimicrobianos, tipo de muestra, sintomatología, tiempo de evolución, y tipo de infección. A modo de ejemplo, se puede mencionar que en el caso de personas embarazadas se recomienda detectar y tratar la bacteriuria asintomática para evitar complicaciones. De manera contraria, en el caso de adultos mayores y pacientes sondados no se recomienda detectar ni tratar la bacteriuria asintomática; esto debido a que

pocas veces llega a bacteriemia y a que una recurrencia en un paciente anteriormente tratado puede estar dada por una cepa resistente seleccionada por el tratamiento (De Cueto, 2005; Forbes et al., 2005). Se tienen entonces, varios criterios diagnósticos que incluyen el contexto clínico del paciente, descritos a continuación en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Criterios para el diagnóstico de las infecciones del tracto urinario (De Cueto, 2005; García-Agudo et al., 2020; Gutiérrez et al., 2022; Lozano, 2001).

Contexto clínico	Criterio diagnóstico
Síntomas específicos y piuria	Cualquier recuento bacteriano puede estar asociado a una ITU.
Varones sintomáticos	Bacteriurias de 10^3 UFC/ml se consideran significativas.
Muestras de punción vesical	Esta muestra se considera estéril. Por este motivo, cualquier recuento bacteriano es significativo.
Pacientes cateterizados	Se han considerado recuentos entre 10^2 - 10^5 UFC/ml como criterios. En estos pacientes la bacteriuria aumenta rápidamente en cuestión de días, y un recuento de 10^2 UFC/ml diagnosticado como relevante puede ayudar a dar tratamiento oportuno.
Pacientes pediátricos	≥ 50.000 UFC/mL en una muestra obtenida por cateterismo vesical acompañada de piuria se considera significativo.
Lactantes menores de 2 meses	El criterio para definir una ITU es ≥ 10.000 UFC/mL
ITU complicada	El criterio para definir una ITU es ≥ 100 UFC/mL.
Cistitis simple o recurrente	El criterio para definir una ITU es ≥ 100 UFC/mL.
Pielonefritis	El criterio para definir una ITU es ≥ 1000 UFC/mL.
Recuentos bajos	Una bacteriuria entre 1.000 y 10.000 UFC/ml, en especial si es de flora mixta, se considera una contaminación.
Bacteriurias polimicrobianas	Suelen estar asociadas a contaminación excepto en aquellos pacientes con catéteres permanentes o infecciones complicadas.

<i>Staphylococcus</i> y <i>Candida</i>	Deben valorarse como significativos aun con recuentos bajos.
Dos cultivos consecutivos	Dos recuentos iguales o superiores a 50.000 UFC/ml del mismo microorganismo confirma la ITU.

Urocultivo e identificación tradicional

Hoy en día, el urocultivo tradicional y el consiguiente recuento, identificación bacteriana y antibiograma siguen siendo indispensables para el reporte y tratamiento oportunos de estas infecciones. Para realizar la siembra del cultivo se emplea usualmente un Agar Sangre y un Agar MacConkey. El primer medio es útil para aislar los agentes patógenos más comunes en las ITU, como lo son el grupo de las Enterobacterias, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, levaduras y muchos más. Por otra parte, el Agar MacConkey es de utilidad para aislar bacilos Gram-negativos. En ambos medios de cultivo se realiza una siembra por estría y se incuban a 35°C por 24-48 h. Además de estos medios, en otros países se están implementando agares cromogénicos como una forma de guiar el diagnóstico hacia ciertas especies importantes en un periodo de tiempo menor (Forbes et al., 2005).

Posteriormente, se procede con el recuento de colonias y su interpretación. Es importante tomar en cuenta que, cuando se habla del diagnóstico de ITU por recuento de UFC por cultivo, el tipo de muestra analizada define el criterio diagnóstico de infección y la cantidad de bacterias aceptada como colonizantes. En el caso de una muestra por micción de chorro medio se espera una cantidad de bacterias mayor a la de muestras obtenidas por sonda, catéter o punción suprapúbica. Lo anterior se debe a que la uretra está colonizada en su parte distal, y estas bacterias son arrastradas por el flujo de la orina, lo cual aumenta el recuento bacteriano obtenido de las muestras por micción (Forbes et al., 2005).

Es por esta diferencia en la concentración bacteriana que, para realizar el urocultivo, se prefiere usar el asa de 1 µL para muestras con mayor concentración como las obtenidas por micción o cuando presentan alta turbidez. En cambio, para las muestras con menos concentración, como las obtenidas por sonda, catéter y punción suprapúbica, se recomienda

utilizar el asa de 10 μ L para aumentar la sensibilidad de la técnica. De esta manera se logra diferenciar entre contaminación, colonización e infección (Forbes et al., 2005).

Ahora bien, las metodologías tradicionales para la identificación de microorganismos se basan en sus características fenotípicas, es decir, por hallazgos morfológicos, bioquímicos y metabólicos. Algunas pruebas evalúan la presencia de enzimas preformadas, mientras otras requieren una incubación de hasta 48 horas. En las últimas décadas se pasó de sistemas miniaturizados de pruebas bioquímicas como las galerías API a sistemas automatizados que realizan la incubación, identificación y determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana como el MicroScan[®] y el Vitek[®]. Si bien las pruebas bioquímicas tienen la ventaja de ser más económicas que las pruebas de biología molecular, requieren de cierta experticia de parte del personal puesto que se debe saber seleccionar la batería de pruebas necesarias de acuerdo con el origen de la muestra, costo y fiabilidad de estas para acertar la identificación bacteriana. Además, sigue siendo necesario el aislamiento previo para obtener el cultivo axénico, lo cual atrasa el diagnóstico. Otro problema es que no todos los aislamientos de una especie van a expresar las mismas características, por lo que la identificación no es definitiva (Fernández et al., 2010).

Tomando en cuenta todo lo anterior, es importante recalcar que para un correcto diagnóstico de las ITU se debe acompañar el proceso de identificación bacteriana con un adecuado estudio de la clínica de paciente y pruebas de laboratorio como la presencia de nitritos y esterasa leucocitaria en el examen general de orina y el reporte de bacteriuria y leucocituria en la observación microscópica (Jiménez, Carballo & Chacón, 2017; Lascano et al., 2017).

Por otra parte, pese a que el urocultivo es el estándar de oro en la práctica clínica, en los últimos años se han desarrollado otras metodologías e instrumentos para agilizar la identificación bacteriana y hacer del diagnóstico un proceso fluido y eficiente que lleve a un tratamiento oportuno; como lo propone el concepto del *Diagnostic stewardship* (Weis, Jutzeler & Borgwardt, 2020).

Diagnostic stewardship

La Organización Mundial de la Salud (2015) define el término *Diagnostic stewardship* como: “*coordinated guidance and interventions to improve appropriate use of microbiological diagnostics to guide therapeutic decisions*” [Orientación e intervenciones coordinadas para mejorar el uso apropiado de diagnósticos microbiológicos para orientar las decisiones terapéuticas]. El objetivo principal es fomentar un diagnóstico adecuado y oportuno y con ello brindar resultados acertados que permitan guiar el tratamiento del paciente de la mejor manera posible. El resultado de este proceso culmina en un abordaje terapéutico dirigido no solo a la recuperación del paciente, sino también a contener el creciente problema de cepas resistentes dado por el mal uso de los antibióticos (Organización Mundial de la Salud, 2015).

Curren et al. (2021) insisten en que, a la hora de implementar este concepto en el laboratorio, se deben tener en cuenta todas las partes del proceso diagnóstico, incluyendo el ordenar, realizar y reportar las pruebas diagnósticas. Lo anterior se conoce también como variables preanalíticas, analíticas y postanalíticas. Además de esto mencionan que una de las intervenciones necesarias en la práctica clínica es la adquisición de técnicas diagnósticas cada vez más avanzadas y acordes con las necesidades de los pacientes.

Bajo esta línea de estudio, Werneburg y Rhoads (2022) examinan el manejo de las ITU y concluyen que el urocultivo, estándar de oro en el diagnóstico, es deficiente por varias razones. Entre ellas se puede mencionar el alto porcentaje de falsos positivos y negativos, la falta de un umbral diagnóstico estandarizado y lentitud del proceso en dar resultados (2-3 días). Esto último puede derivar en un diagnóstico erróneo y en la administración de un tratamiento inadecuado.

Por consiguiente, en los últimos años se han desarrollado múltiples tecnologías adaptables al diagnóstico de las ITU, con el fin de solventar las carencias del urocultivo tradicional y trabajar bajo el concepto de *diagnostic stewardship*.

Pruebas de detección sistemática

Existen técnicas de detección sistemática que, de forma indirecta, permiten dar un resultado negativo sin necesidad de esperar 24-48 horas por el resultado de un urocultivo, lo cual es útil en pacientes asintomáticos siempre y cuando no se trate de personas embarazadas, bacteriemias de origen desconocido, control postratamiento o seguimiento posterior a la extracción de una sonda permanente. Algunos de estos métodos se describen en el Cuadro 3. Se debe considerar que estas técnicas no poseen gran sensibilidad, de modo que no son útiles para muestras con recuentos microbianos bajos (Forbes et al., 2005).

Cuadro 3. Técnicas de detección sistemática para asistir en el diagnóstico de ITU (Forbes et al., 2005; Roche, 2013).

Técnica de detección	Descripción	Desventajas
Piuria	Se cuantifican los leucocitos con hemocitómetro y esto se relaciona con inflamación.	La presencia de leucocitos en orina no es específica de una ITU.
Nitritos (tira reactiva)	Indican la existencia de enzimas reductoras de nitrato presentes en algunos de los patógenos urinarios más comunes.	No todos los patógenos presentan la enzima. Interferencias: ácido ascórbico, diuresis constante y antibióticos.
Leucocitos (tira reactiva)	Revela la presencia de esterasa leucocitaria de los granulocitos, los cuales predominan en infecciones bacterianas.	Interferencias: formaldehído, medicamentos, orina de color medicamentoso, alta excreción de glucosa y proteína.
Prueba de catalasa	Revela la existencia de catalasa, presente en patógenos urinarios comunes.	No es específico de ITU pues también se encuentra en células somáticas.

		La enzima no está presente en enterococos ni estreptococos.
Sistemas automatizados y semiautomatizados	Se pueden programar para detectar ATP bacteriano y estructuras celulares como membranas celulares, mediante técnicas como fluorescencia.	No son de fácil acceso.

Otras metodologías para identificación de microorganismos implicados en ITU

Las nuevas tecnologías de identificación se basan en biología molecular, con técnicas de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación del material genético, o mediante proteómica, un área todavía en desarrollo.

Biología molecular

Tanto las proteínas como los ácidos nucleicos son macromoléculas presentes en todos los seres vivos, y han sido empleadas en protocolos de identificación, como lo es el caso de la biología molecular, en donde se han establecido genes diana para estudios de filogenia y taxonomía (Rodicio & Mendoza, 2004).

En la mayoría de los casos, el análisis del gen para el ARNr 16S es suficiente para indicar la especie de bacteria implicada en el cuadro clínico. No obstante, algunos géneros presentan una alta homología genética, por lo que se debe recurrir a otros marcadores para dilucidar entre las especies. Algunos de estos genes diana alternativos son: la región interoperón 16S-23S ARNr, el gen para el ARNr 23S, la subunidad β de la ARN polimerasa *RpoB* y la subunidad β de la ADN girasa *GyrB* (Bou et al., 2011).

Espectrometría de masas

Dentro de las tecnologías desarrolladas en los últimos años se encuentra el MALDI-ToF, llamado así por sus siglas en inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (desorción/ionización láser asistida por matriz) y ToF por las siglas *Time-of-Flight* (tiempo de vuelo); el cual ha tomado una gran relevancia en la identificación bacteriana (Weis, Jutzeler & Borgwardt, 2020).

A grandes rasgos, para el análisis se requiere mezclar cierta biomasa de la bacteria/hongo en estudio con una matriz. Esta matriz es un compuesto orgánico con un anillo bencénico que absorbe la energía del láser y la transmite a la muestra lo cual contribuye a su volatilización (Fuentes et al., 2021). Luego de agregar la matriz se aplica una ionización suave con luz UV láser, esto va a desprender iones de la muestra y de la matriz sin fragmentar las moléculas. La separación de los iones resultantes se da por sus propiedades de masa (m) y carga (z); de esta forma, los iones con un valor m/z menor (más livianos y cargados) viajan a una velocidad mayor hacia el detector, lo cual se observa en el gráfico como un pico de cierta altura/intensidad. Este tipo de separador de iones se conoce como ToF o tiempo de vuelo por el principio de separación (Roche, 2013; Shimadzu Europa, s. f.). De este análisis se obtiene un espectro con la relación m/z en el eje-x y la intensidad en el eje-y, el cual se compara con los espectros de una base de datos de organismos conocidos para determinar la identidad del que está presente en la muestra (Rychert, 2019).

Las aplicaciones de detección basadas en MALDI-ToF principalmente detectan proteínas ribosomales, que son distintivas de cada especie y permiten, además, establecer la relación con otras especies. Esto lo logra con la lectura de pocos atributos como el área debajo del pico o su altura, y fundamentalmente, con la relación m/z exacta, la cual se ha asociado empíricamente con cierta especie (Weis et al., 2020). Cabe destacar que el análisis brinda un *score* según el grado de coincidencia entre los resultados de la muestra y las bases de datos. De esta manera se tiene una identificación confiable a nivel de especie si el *score* es mayor a 2.000, y una identificación confiable a nivel de género si el *score* está entre 1.700 y 1.999 (Ferreira et al., 2010). Si el *score* es menor a 1.700 la identificación es de baja confianza y se recomienda repetir.

En los últimos años se ha visto una expansión de las bases de datos, permitiendo la identificación confiable hasta el grado de especie de muchos microorganismos poco comunes. Además, se ha refinado la identificación hasta el punto de diferenciar entre especies con propiedades fenotípicas, genotípicas y bioquímicas similares y se han desarrollado estudios para lograr la determinación de perfiles de resistencia basados en proteómica. Y por supuesto, se ha visto una ventaja por la alta especificidad, la facilidad de manejar el equipo y una buena relación costo-efectiva. Esto ha sido un gran aporte para el *diagnostic*

stewardship puesto que acelera el diagnóstico y reduce el tiempo de estancia hospitalaria, esto gracias al tratamiento antimicrobiano oportuno (Rychert, 2019; Weis et al., 2020).

Debido al gran potencial de esta tecnología se propuso la idea de desarrollar un procedimiento que elimine la necesidad de realizar un cultivo previo a la identificación bacteriana. Un método directo simplificaría el trabajo de laboratorio, disminuyendo los errores y agilizando el diagnóstico a unas cuantas horas. Varios autores han publicado sus propias metodologías, la mayoría con muestras de sangre y algunas con muestras de orina, y hasta ahora se tienen resultados esperanzadores. Se han descrito técnicas con centrifugaciones diferenciales, tubos con gel separador, filtración, kits comerciales, extracción de proteínas, pretratamiento, entre otros (Sierra et al., 2019). Se han realizado estudios que intentan aplicar algún tipo de tamizaje previo como citometría de flujo (Wang et al., 2013) o tinción de Gram (Burillo et al., 2014) para maximizar el porcentaje de éxito de la identificación directa. Por su parte, Köhling et al. (2012) encuentra una relación entre la presencia de defensinas humanas en la muestra y la disminución de la intensidad en los picos de identificación bacteriana. Este hallazgo enfatiza que existen sustancias interferentes que podrían obstaculizar el proceso de identificación directa. El presente trabajo pretende justamente explotar el potencial de esta tecnología y asociar el éxito de la identificación a ciertos parámetros químicos, físicos y/o microbiológicos que aporten a los estudios anteriormente mencionados.

Por otro lado, esta tecnología todavía presenta algunas limitaciones. Una de ellas es que la identificación está obstaculizada por el número limitado de espectros incluidos en las bases de datos y por las similitudes entre organismos, lo que puede llevar a identificaciones erróneas. Además, para generar las bases de datos se debe estudiar una cantidad suficiente de aislamientos expuestos a diversas condiciones durante su crecimiento para intentar reproducir la variabilidad intraespecie (Rychert, 2019).

Otra limitación observada en este campo es planteada por Weis et al. (2020), y se trata del rezago con respecto al uso de la *big data* y el aprendizaje automático, ya que se desaprovecha su potencial en la práctica clínica. Además, los autores mencionan tres obstáculos clave observados en los estudios realizados hasta el momento. En primer lugar, en la mayoría de los estudios trabajan con una cantidad de muestras muy pequeña. Y, además,

los resultados presentan mala reproducibilidad y una falta de validación externa. Todos estos aspectos se deben mejorar para sacar el mayor provecho de esta tecnología.

Aun así, se plantea que la aplicación de un protocolo de identificación directa mediante MALDI-ToF es de gran utilidad cuando el diagnóstico rápido y eficiente tiene un valor clínico real, como ocurre en pacientes con clínica grave de pielonefritis y sepsis urinaria (Zboromyrska et al., 2017).

Justificación

La alta prevalencia de las ITU representa un grave problema tanto a nivel comunitario como hospitalario. Melgarejo et al. (2019) estudia el impacto de las ITU tomando en cuenta su alta frecuencia, los costos que generan y las consecuencias derivadas del uso de antibióticos para su tratamiento. Se reporta que una gran proporción de los antibióticos prescritos a nivel de atención primaria están destinados a combatir las ITU, lo cual contribuye al creciente problema de resistencia bacteriana.

En cuanto al impacto económico de estas infecciones, en Estados Unidos se estima que el costo total asociado a las ITU es de 2 billones de dólares anuales, y más de la mitad de este costo se asocia a infecciones en mujeres jóvenes. En Latinoamérica se han realizado estudios que reportan un aumento en los días de estancia hospitalaria por casos de ITU asociadas a catéter vesical permanente, lo cual encarece el tratamiento (Hooton et al., 1996; Melgarejo et al., 2019). En Colombia se realizó un estudio en el 2016 que estimó un costo de \$ 675 dólares por cada infección urinaria, y en casos de bacteriemias este aumentaba a \$2.800 dólares. En un centro médico de Ecuador se reportó para la segunda mitad del año 2000 un exceso de costo de \$ 536 dólares, 55% por el uso de antibióticos y 41% por días de estancia hospitalaria. Estos números son más alarmantes en Argentina, puesto que el exceso de costo estimado fue de \$1.970 dólares por cada caso, con un 91,9% asociado a la estancia hospitalaria (Rodríguez-Burbano et al., 2016). Desafortunadamente, en el contexto de Costa Rica, existen limitaciones significativas en términos de disponibilidad y actualidad de los datos respecto al impacto económico de las ITU.

Si bien las ITU pueden ser fáciles de tratar en muchos casos, existen reportes de muertes principalmente asociadas a sepsis. En el caso de infecciones por enterococos se reporta una mortalidad hospitalaria de 16,5% (Álvarez-Artero et al., 2021). A nivel pediátrico (0-18 años) se reporta una mortalidad del 3,5%; en este estudio un 58,4% de los niños y niñas tenía catéter vesical y un 68,5% recibió antibióticos previos (López et al., 2015).

Por otro lado, se han delimitado dos poblaciones con ciertos factores de riesgo en las cuales las ITU tienden a generar complicaciones serias. En primer lugar, se encuentran las personas hospitalizadas e intervenidas de alguna forma con instrumentos como sondas y catéteres. Estos pacientes son propensos a desarrollar bacteriemias y sepsis que los puede

llevar a la muerte (Forbes et al., 2005; Wilson & Gaido, 2004). La segunda población de gran importancia corresponde a las personas embarazadas. Esto porque los cambios normales durante la gestación facilitan la entrada y colonización de microorganismos que pueden tener consecuencias devastadoras. Se ha reportado, por ejemplo, un aumento en el riesgo de adquirir una bacteriuria asintomática, cistitis y pielonefritis aguda (Herraiz et al., 2005). Estas infecciones pueden llevar a complicaciones en la madre, como una bacteriemia, y en el feto. Ciertamente, se ha reportado que las ITU durante el embarazo son de las causas más frecuentes de complicaciones perinatales serias y sepsis neonatal (Calderón et al., 2013).

Considerando esto, se puede entender la necesidad de un diagnóstico rápido y acertado que permita la administración de una terapia antimicrobiana oportuna. En los últimos años se ha visto un acelerado avance de la tecnología en la industria de la salud. Gracias a esto, los laboratorios clínicos han obtenido equipos avanzados de alta calidad y eficacia para la identificación y caracterización de agentes patógenos. Un ejemplo de esto es la aplicación de la proteómica en la práctica clínica, la cual llega a solventar aquellas flaquezas de las metodologías fenotípicas tradicionales para procurar resultados certeros en un menor tiempo y con alta confiabilidad (Weis et al., 2020).

El presente trabajo pretende contribuir a la creciente lista de estudios que buscan agilizar el diagnóstico de las infecciones del tracto urinario en la práctica clínica. Para esto se aplica la metodología del MALDI-ToF y se exponen sus ventajas e inconvenientes. De esta manera, se busca aportar a la mejora del flujo de trabajo como lo propone el concepto de *diagnostic stewardship*.

Hipótesis

Es posible identificar microorganismos directamente en muestras de orina utilizando un protocolo de MALDI-ToF que pueda ser implementado en la rutina de un laboratorio clínico para el diagnóstico de ITU.

Objetivos

Objetivo general

Aplicar un protocolo de identificación microbiana directa empleando la técnica de MALDI-ToF en muestras de orina para el diagnóstico de ITU en un laboratorio clínico de Costa Rica durante el año 2022.

Objetivos específicos

1. Determinar parámetros físicos, químicos y microbiológicos que permitan seleccionar las muestras de orina para realizar la identificación directa en el MALDI- ToF previo al cultivo.
2. Establecer la concordancia entre los resultados de identificación bacteriana obtenidos por identificación directa empleando el MALDI-ToF y por urocultivo convencional.

Metodología

Tipo de estudio: Experimental

Para la presente investigación se trabajó con muestras de orina que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

- a) Muestras de orina obtenidas por micción de chorro medio y utilizando técnica aséptica.
- b) Muestras recolectadas por pacientes con una indicación médica para la realización del urocultivo.
- c) Muestras con volumen mínimo de 10 mL.

A. Examen general de orina

Se determinaron los parámetros físicos, microscópicos y químicos mediante un examen general de orina, realizado con el equipo Cobas[®] u 601 y 701. Los parámetros por evaluar fueron los siguientes:

- Físico: aspecto y color.
- Químicos: pH, nitritos, proteínas, hemoglobina (sangre oculta).
- Microscópicos (conteo por μL): leucocitos, eritrocitos, células escamosas, bacterias/levaduras.

B. Urocultivo para identificación

Se homogenizó la muestra y se obtuvo una alícuota con asa calibrada de 1 μL para rayar por estría en Agar Sangre y en Agar MacConkey. Las placas se incubaron por 24 horas a 37 °C. Se determinó el recuento bacteriano en UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias/mL) de las placas positivas y se procedió a la identificación bacteriana mediante MALDI-ToF.

Observaciones: si no se obtuvo crecimiento a las 24 horas, se incubó por 24 horas más. Si a las 48 horas aún no se observó crecimiento se reportó la muestra como negativa.

C. Espectrometría de masas para identificación directa

Para esta sección se aplicaron tres procedimientos y posteriormente se aplicó la metodología que dio lugar a una mayor cantidad de identificaciones idénticas a las obtenidas por urocultivo. El equipo fue calibrado con BTS (*Bacterial Test Standard*). El análisis de los resultados se realizó con el software FlexControl v.3.0. Además, para la comparación de los resultados de las tres metodologías se aplicó la prueba exacta de Fisher.

C.1 Metodología con Sepsityper[®] Kit; Bruker Daltonik[®]

Esta metodología se elaboró a partir del protocolo descrito por Oviaño et al. (2017) y se adaptó a los equipos del laboratorio. Para esto se centrifugaron 10 mL de orina a 1100 g por 1 minuto. Se centrifugó el sobrenadante a 1200 g por 15 minutos para obtener un botón bacteriano, y este sedimento se resuspendió en 500 μ L de agua y 40 μ L de buffer de lisis (Sepsityper Kit; Bruker Daltonik[®]) y fue agitado en vórtex. Luego se centrifugó a 11 000 g por 2 minutos, se lavó el botón con 1 mL de buffer de lavado (Sepsityper Kit; Bruker Daltonik[®]) y se centrifugó por última vez a 11 000 g por 2 minutos.

Para la identificación bacteriana se empleó una pequeña porción del botón; el cual se colocó en la placa del MALDI- ToF. Se agregó 1 μ L de ácido fórmico y una vez seco por completo se agregó 1 μ L de mezcla matriz (Bruker Daltonik[®]), compuesta por ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA). Se colocó la placa en el equipo posterior a un secado completo de la matriz.

C.2 Metodología de extracción con ácido fórmico y etanol

Similar al protocolo realizado por Ferreira et al. (2010), se partió de una alícuota de 4 mL de orina, la cual se centrifugó a 2000 g por 1 min con el fin de remover leucocitos. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se centrifugó a 15 500 g por 5 min. Este último sobrenadante se descartó y el botón bacteriano se lavó con agua desionizada.

Posteriormente, se resuspendió el botón en 300 μ L de agua desionizada y se agregaron 900 μ L de etanol absoluto. Esto se centrifugó a 15 500 g por 2 min y se descartó el sobrenadante. Luego se agregaron 50 μ L de ácido fórmico al 70% vol/vol y 50 μ L de

acetonitrilo. Por último, se centrifugó a 15 500 g por 2 min, y se colocó 1 μ L del sobrenadante en la placa del MALDI-ToF junto con 1 μ L de matriz. Para el análisis se colocó la placa en el equipo posterior a un secado completo de la matriz.

C.3 Metodología con agua grado molecular

Se empleó una alícuota de 4 mL de orina, la cual se centrifugó a 810 g por 5 min. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se centrifugó a 15 500 g por 4 min. Este último sobrenadante se descartó y el botón bacteriano se lavó dos veces con 1 mL de agua grado molecular de la marca Invitrogen de Thermo Fisher Scientific, utilizando la ultracentrífuga a 15 500 g por 4 min. Del botón obtenido del último lavado se colocó 1 μ L en la placa del MALDI-ToF. Esto se dejó secar y se le agregó 1 μ L de ácido fórmico. Una vez que esto secó por completo se agregó 1 μ L de mezcla matriz. La placa se colocó en el equipo posterior a un secado completo de la matriz. Este protocolo fue adaptado de Zboromyrska et al. (2018).

Resultados

Fase 1: Selección de la metodología para la identificación directa

Durante las primeras tres semanas de trabajo se seleccionaron muestras al azar (20 en total) y se realizó la identificación por urocultivo tradicional y por la metodología con el Sepsityper Kit® (Bruker Daltonik). Los resultados se observan en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Resultados del análisis de 20 muestras mediante urocultivo tradicional e identificación directa por MALDI-ToF empleando la metodología de preparación del Sepsityper Kit® (Bruker Daltonik).

	Urocultivo	ID directa	% identificación
Muestras negativas	5	2	-
Total positivas	15	5	33
Mezclas	3	1 (parcial)*	No aplica
Levaduras	1	0	0
Coco Gram-Positivo	1	0	0
Bacilo Gram-Positivo	1	1 (no concuerda)**	No aplica
Bacilo Gram-Negativo	9	3	33
<i>E. coli</i>	6	2	33

ID directa: identificación directa.

% identificación: porcentaje de muestras identificadas por la metodología directa

*Solo se identificó una de las dos especies presentes en la muestra

**El bacilo Gram-Positivo fue identificado por urocultivo como *Lactobacillus* y por metodología directa como *E. coli*.

En lo que respecta a las cinco muestras determinadas como negativas mediante el urocultivo tradicional, dos de ellas se identificaron por método directo como *E. coli*, y una como *Lactobacillus crispatus*. Por otro lado, de las muestras con dos morfotipos presentes cabe resaltar que las dos muestras no identificadas por el método directo presentaron un recuento bacteriano muy bajo (<30 000 UFC/mL). La muestra identificada parcialmente

presentaba *Klebsiella aerogenes* (20 000 – 30 000 mil UFC/mL) y *Enterococcus faecalis* (40 000 – 50 000 UFC/mL), siendo esta última la única especie identificada por metodología directa.

Posterior a estos estudios preliminares se analizó la relación entre el porcentaje de identificaciones acertadas y las características físicas, químicas y microbiológicas obtenidas en el EGO y en la revisión macroscópica. Con esto se decidió realizar la metodología directa con muestras previamente procesadas por urocultivo tradicional (no de forma paralela) y con resultados positivos. En este punto se observaron mejores resultados cuando las muestras tenían recuentos mayores a 100 000 UFC/mL.

Posteriormente se realizó un análisis de los datos en el cual se obtuvo un porcentaje de identificación de un 33%, por lo que se decidió probar otras metodologías. Para esto se seleccionaron tres muestras ligeramente turbias que presentaban *E. coli* en más de 100 000 UFC/mL según el urocultivo. En cuanto al análisis por extracción con ácido fórmico y etanol no se logró identificar ninguna de las tres muestras. De modo similar, al emplear el Kit Sepsityper® (Bruker Daltonik) se identificó solo una de las muestras. Los mejores resultados se dieron al aplicar lavados con agua grado molecular. Para esta última metodología también se quiso estudiar el efecto del ácido fórmico sobre la muestra ya colocada en la tarjeta de MALDI-ToF y previo a la adición de la matriz. De esta manera se obtuvo dos conjuntos de datos, los cuales se presentan en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Resultados de la identificación (ID) y su respectivo *score* mediante la identificación directa con el MALDI-ToF y el método de lavados con agua grado molecular al aplicar ácido fórmico y sin este.

Muestra	Sin ácido fórmico		Con ácido fórmico	
	ID	Score	ID	Score
1	<i>E. coli</i>	2.063	<i>E. coli</i>	2.237
2	Sin ID	-	<i>E. coli</i>	1.691
3	<i>E. coli</i>	2.098	<i>E. coli</i>	2.006

Nota: Se tiene una identificación confiable a nivel de especie si el *score* es >2.000, y una identificación confiable a nivel de género si el *score* está entre 1.700 y 1.999.

Fase 2: Aplicación de la metodología de identificación directa

En virtud de los ensayos explicados anteriormente se decidió aplicar la metodología de lavados con agua grado molecular y agregar ácido fórmico para el resto del proyecto. En total se analizaron 100 muestras con diferentes características (Cuadro 6).

Cuadro 6. Resultados del proceso de identificación directa con el MALDI-ToF al aplicar la metodología de lavados con agua grado molecular según el grupo de microorganismos.

Muestras	Total de muestras		CGP		BGN		<i>E. coli</i>	
	n	% ID	n	% ID	n	% ID	n	% ID
Total	100		12		81		61	
Sin ID	48	48,0	10	83,3	32	39,5	21	34,4
Con ID	52	52,0	2	8,3	49	60,5	40	65,6
ID no coincide*	2	3,9	1	50,0	1	2,0	1	2,5
ID coincide*	50	96,1	1	50,0	48	98,0	39	97,5

n: número de muestras

% ID: porcentaje de identificación

Sin ID: muestras sin identificación

Con ID: muestras identificadas aplicando lavados con agua grado molecular

*porcentaje basado en la cantidad de muestras identificadas

CGP: coco Gram-positivo

BGN: bacilo Gram-negativo

Aunado a lo anterior, se analizaron tres muestras con levaduras, de estas no se logró identificar ninguna por la metodología directa. Además, se analizaron cuatro muestras con dos morfotipos distintos, y solo en una de ellas se logró identificar uno de los microorganismos presentes.

Ahora bien, si esta estadística se hace tomando en cuenta solamente aquellas muestras con un recuento mayor a 100 000 UFC/mL, los porcentajes de identificación para los BGN y *E. coli* mejoran significativamente. Los resultados se presentan en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Resultados del proceso de identificación directa con el MALDI-ToF al aplicar la metodología de lavados con agua grado molecular según el grupo de microorganismos tomando en cuenta las muestras con recuentos superiores a 100 000 UFC/mL.

Muestras	Total de muestras		CGP		BGN		<i>E. coli</i>	
	n	% ID	n	% ID	n	% ID	n	% ID
Total	75		7		64		50	
Sin ID	28	37,3	6	85,7	19	29,7	13	26,0
Con ID	47	62,7	1	14,3	45	70,3	37	74,0
ID no coincide*	2	4,3	1	100,0	1	2,2	1	2,7
ID coincide*	45	95,7	0	0	44	97,8	36	97,3

n: número de muestras

% ID: porcentaje de identificación

Sin ID: muestras sin identificación

Con ID: muestras identificadas

*porcentaje basado en la cantidad de muestras identificadas

Otra forma de analizar estos datos es diferenciar no solo por el recuento bacteriano sino también por las características físicas de las muestras. Estos resultados se presentan en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Porcentajes de identificación (%ID) de las muestras que presentan BGN y *E. coli* específicamente con recuentos superiores a 100 000 UFC/mL según su aspecto.

BGN			
Aspecto	Identificadas	No identificadas	% ID
Turbio	2	4	33,3
Ligeramente turbio	16	3	84,2
Transparente	9	5	64,3
<i>E. coli</i>			
Aspecto	Identificadas	No identificadas	% ID
Turbio	2	4	33,3
Ligeramente turbio	13	2	86,7
Transparente	8	2	80,0

Fase 3: Análisis estadístico

Ahora bien, se compararon los datos obtenidos por la metodología de lavados con agua grado molecular en muestras con un recuento mayor a 100 000 UFC/mL con los obtenidos por la metodología con el Sepsityper Kit® (Bruker Daltonik), mediante la prueba exacta de Fisher, con el fin de determinar cuál de las dos técnicas ofrecía los mejores resultados. Los resultados de esta prueba indican que existe evidencia suficiente para afirmar una diferencia significativa entre las técnicas y el éxito de estas ($p = 0.047$). De esta manera se demuestra que la metodología de lavados con agua grado molecular proporcionó mejores resultados (Gráfico 1).

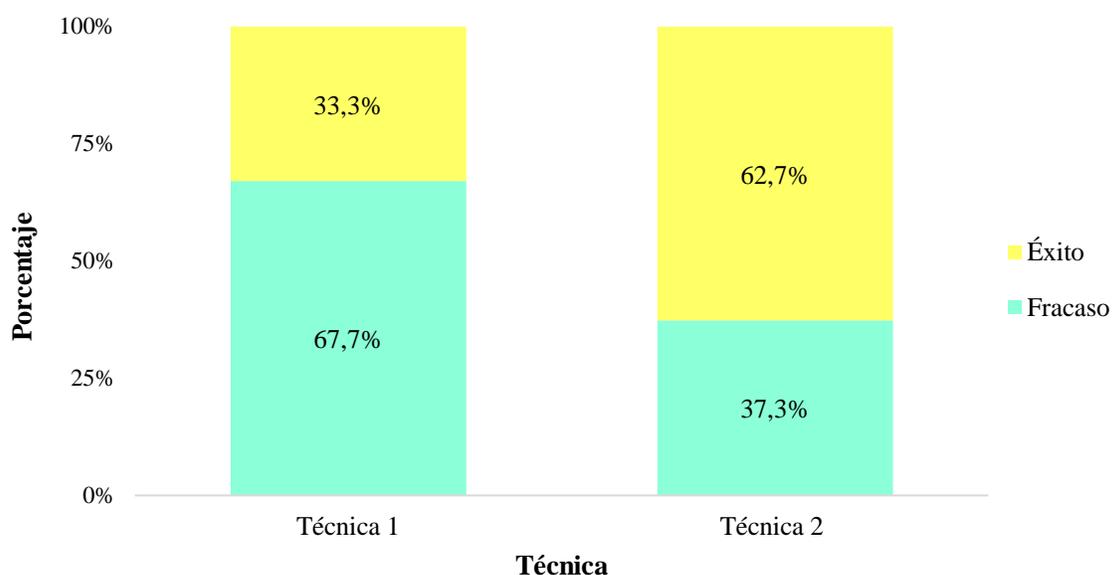


Gráfico 1. Resultado de la prueba exacta de Fisher que compara la metodología con el Sepsityper Kit® (Bruker Daltonik) (Técnica 1) y la metodología de lavados con agua grado molecular en muestras con un recuento mayor a 100 000 UFC/mL (Técnica 2).

De igual manera se aplicó esta prueba para determinar si existía una diferencia entre trabajar con muestras ligeramente turbias y muestras turbias. Según el análisis, tanto el porcentaje de identificación de los BGN como de *E. coli* es mejor en muestras ligeramente turbias que en muestras turbias ($p = 0,05$).

Discusión

La aplicación del *diagnostic stewardship* en la práctica clínica es fundamental para lograr un adecuado manejo del paciente, reducir la estancia hospitalaria y limitar la dispersión de la resistencia antimicrobiana (Biomérieux, 2020; Organización Mundial de la Salud, 2015). Para esto es necesario perfeccionar las técnicas diagnósticas ya establecidas y adaptar las nuevas tecnologías al laboratorio clínico. De esta manera se emplean metodologías que permiten agilizar el flujo de trabajo y obtener resultados oportunos de alta calidad que guíen la terapia del paciente (Curren et al., 2021).

En los últimos años la proteómica ha demostrado ser una herramienta diagnóstica muy útil y adaptable al flujo de trabajo del laboratorio. Si bien la espectrometría de masas se utilizó en un principio como técnica analítica de química clínica, el desarrollo de métodos de “ionización suave” y la aplicación de una matriz orgánica dio paso al análisis de biomoléculas grandes. Esta tecnología permite el estudio del perfil proteómico específico de cada microorganismo, y esto a su vez es aprovechado para la identificación microbiana a partir de asilamientos de rutina del laboratorio sin importar la muestra de origen. Es así como el MALDI-ToF se convierte en una alternativa a los métodos convencionales que brinda resultados confiables y en un menor tiempo (Fuentes et al., 2021).

Recientemente se ha evaluado el potencial de esta tecnología para la detección rápida de microorganismos directamente de las muestras, para así evitar las 24 - 48 horas necesarias para obtener un aislamiento. Algunas investigaciones han estudiado esta posibilidad como alternativa al hemocultivo, principalmente, y al urocultivo. Para la identificación directa a partir de muestras de sangre se han utilizado: centrifugaciones diferenciales, detergentes (dodecilsulfato sódico o saponina), tubos con gel separador de suero, filtración a través de membranas y kits comerciales como el MALDI Sepsityper; además, en algunos estudios realizan una extracción de proteínas con etanol/ácido fórmico o ácido trifluoroacético para obtener mejores resultados. Por otra parte, para la identificación directa a partir de muestras de orina se han aplicado técnicas de centrifugación diferencial, pretratamiento con Tween-80 o SDS y extracción de proteínas (Sierra et al., 2019). Para la extracción de proteínas se puede utilizar etanol, ácido fórmico y acetonitrilo; estos compuestos facilitan la ruptura celular y liberan el proteoma (Fuentes et al., 2021).

El presente trabajo tuvo como objetivo el análisis de muestras de orina con algunas de estas metodologías para determinar la viabilidad de la identificación directa con el MALDI-ToF y su papel en agilizar el diagnóstico microbiológico en los laboratorios clínicos. Las metodologías utilizadas fueron: extracción de proteínas con etanol/ácido fórmico, un kit comercial MALDI Sepsityper y una serie de lavados con agua grado molecular; esta última obtuvo mejores resultados incluyendo una extracción con ácido fórmico.

Con la aplicación de la técnica de extracción de proteínas con etanol/ácido fórmico no se logró identificar ninguna de las muestras analizadas. En la literatura se describe que la extracción de proteínas genera una ruptura de las células y una consecuente liberación de sus proteínas, facilitando el análisis del proteoma. Sin embargo, usualmente se aplica como una forma de mejorar la identificación con otras técnicas (Fuentes et al., 2021). Es posible que el rendimiento de esta técnica mejore acompañada de otras metodologías como centrifugación diferencial o tratamientos con detergentes. Debido a lo anterior no se recomienda emplear la extracción de proteínas por sí sola, sino como un método de apoyo para otra metodología principal.

Si bien la utilización de un kit comercial como el MALDI Sepsityper representa un alto costo económico y un proceso complejo y tedioso, este se ha empleado como alternativa al hemocultivo con resultados bastante satisfactorios y porcentajes de identificación superiores al 80% (Cattani et al., 2015; Chen et al., 2013; Lagacé-Wiens et al., 2012). No obstante, en el presente trabajo se obtuvo un porcentaje de identificación muy bajo, de apenas un 33%, y una de las muestras no se identificó correctamente. Además, de las cinco muestras negativas por urocultivo, tres dieron resultados positivos por identificación directa (dos muestras con *E. coli* y una con *Lactobacillus crispatus*). Esto último se podría deber a que después de sembrar el urocultivo, las muestras pasaron mucho tiempo a temperatura ambiente sin un almacenamiento adecuado y por lo tanto la población microbiana contaminante aumentó. También es importante resaltar el bajo número de muestras analizadas con esta metodología.

Por último, la técnica de lavados con agua grado molecular fue la que dio mejores resultados, y por lo tanto la que se utilizó durante el resto del proyecto. En un inicio se estudió

el efecto de la extracción de proteínas con ácido fórmico, y se concluyó que sí mejoraba el rendimiento, por lo que se aplicó en los ensayos siguientes.

El análisis de los datos de las 100 muestras estudiadas mostró un déficit en cuanto a la identificación de levaduras, cocos Gram-positivos (CGP) y muestras con más de un microorganismo. Los resultados fueron 0% para levaduras (3 muestras), 8,3% para CGP (2 de 12) y 25% para muestras mixtas (se identificó una especie en 1 muestra de 4); lo cual concuerda con la literatura consultada. Si bien la identificación de estos grupos microbianos a partir de aislamientos es de alta fiabilidad, la identificación directa no presenta resultados satisfactorios hasta el momento. Se ha reportado en varios estudios que las levaduras son difíciles de identificar de forma directa a partir de muestras de hemocultivo, incluso agregando el paso de extracción proteica (Burillo et al., 2014). En algunos estudios no se logró identificar ninguna levadura (Íñigo et al., 2016; Sierra et al., 2019), mientras que en otro estudio se identificaron 2 de 10 muestras analizadas, solamente a nivel de género (Li et al., 2019). Kim et al. (2015) plantea que la razón de este bajo rendimiento se puede atribuir a un efecto de la matriz de la orina, y propone desarrollar mejores métodos de pretratamiento para mejorarlo. Zboromyrska et al. (2017) explica que las levaduras usualmente se encuentran en recuentos bajos, lo cual dificulta la identificación directa. Además, menciona que la centrifugación diferencial empleada no es ideal para procesar levaduras debido a que estas tienden a sedimentar junto con las células humanas durante la primera centrifugación.

Por otro lado, se ha reportado en múltiples investigaciones que la identificación de bacterias Gram-positivas tampoco presenta buenos resultados a nivel de especie (Burillo et al., 2014; Wang et al., 2013). Los porcentajes de identificación varían ampliamente desde 13.90% (Íñigo et al., 2016) hasta alrededor de 40% (Kim et al., 2015; Sierra et al., 2019). Sierra et al. (2019) explica que este rendimiento se debe al grosor y a la composición de la pared de las bacterias Gram-positivas, ya que esto les confiere una resistencia a la lisis y, por lo tanto, dificulta la extracción de su proteoma. Esto mismo se describe para otros microorganismos como hongos filamentosos, levaduras y micobacterias (Maldonado et al., 2017). Con el fin de mejorar estos resultados se puede adicionar ácido fluroacético, buffer de lisis o detergentes como dodecilsulfato sódico o saponina para facilitar la ruptura de la pared y extraer las proteínas (Sierra et al., 2019).

En lo que se refiere a la identificación de muestras con más de un microorganismo, múltiples investigaciones reportan un muy bajo rendimiento en el cual se identifica una sola de las especies o ninguna de ellas (Burillo et al., 2014; Ferreira et al., 2010; Kim et al., 2015; Sierra et al., 2019). Wang et al. (2013) estudió la identificación de muestras con crecimiento mixto empleando dos mezclas: una con *E. coli* y *Enterococcus faecium*, y otra con *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Con esto determinó que el éxito de la identificación está relacionado con la proporción de cada microorganismo, y señala que una correcta identificación de ambos microorganismos es más probable si estos están en una proporción de 1:1 o 1:2. Se concluye entonces que el análisis de coinfecciones todavía representa un desafío para la identificación directa (Íñigo et al., 2016).

En la literatura consultada no se hace referencia a parámetros químicos (pH, nitritos, proteínas, hemoglobina) o microscópicos (leucocitos, eritrocitos, células escamosas, bacterias/levaduras) que guíen la selección de muestras para una mejor identificación directa. En el presente trabajo tampoco se encontró ninguna relación entre estos parámetros y el éxito en la identificación.

Se rescatan dos aspectos en los cuales toda la literatura consultada coincide. Uno de ellos es que la identificación directa a partir de muestras de orina tiene mayor porcentaje de éxito para los bacilos Gram-negativos y en especial para especies como *E. coli* y *K. pneumoniae* (Íñigo et al., 2016). Lo anterior concuerda con el presente trabajo, ya que se obtuvo un 60,5% de éxito para BGN y un 65,6% para la *E. coli*. Además, Kim et al. (2015) reporta un porcentaje de 63% para los BGN en recuentos entre 10^4 y 10^5 UFC/mL, lo cual coincide con el obtenido en este proyecto.

El otro aspecto importante es que el recuento bacteriano es esencial para una adecuada identificación. En la literatura se reporta un límite de $>100\ 000$ UFC/mL para obtener mejores resultados (Maldonado et al., 2017). Esto se comprobó con los datos del presente proyecto, ya que al emplear este filtro se obtuvieron 75 muestras aceptables. De esta manera, el porcentaje de identificación de todas las muestras pasó de 52% a 62,7%; el de CGP pasó de 8,3% a 14,3% (1 de 6); el de BGN pasó de 60,5% a 70,3%; y finalmente, el de *E. coli* pasó de 65,6% a 74%. En la literatura se reportan porcentajes de identificación muy variados que van desde 66,2% en el caso de Burillo et al. (2014), 85,1% según los análisis de Sierra et al.

(2019), y hasta 91,8% en el estudio de Ferreira et al. (2010). Por otro lado, al comparar estos resultados mediante la prueba exacta de Fisher con aquellos dados por la metodología del Kit Sepsityper, se determinó que sí existe una diferencia significativa y que la metodología de lavados con agua grado molecular brinda mejores resultados.

Además de lo anterior, se quiso tomar en cuenta el aspecto de la muestra, y se observó que el mayor porcentaje de identificación se dio en muestras ligeramente turbias en primer lugar, y transparentes en segundo lugar. Esto sugiere que la matriz de la orina de aspecto turbio ocasiona una interferencia en el análisis. La aplicación de la prueba exacta de Fisher determinó que las muestras ligeramente turbias sí generan resultados mejores que aquellos dados por muestras turbias. Los resultados del análisis de las muestras turbias fueron de un 33% (2 de 6) para muestras con BGN y con *E. coli*. Por otro lado, los resultados de los demás análisis determinaron un porcentaje de éxito para muestras con BGN de un 84,2% (16 de 19) en muestras ligeramente turbias y un 64,3% (9 de 14) para las transparentes. En cuanto a las muestras con *E. coli*, los porcentajes de éxito fueron de un 86,7% (13 de 15) para muestras ligeramente turbias y un 80% (8 de 10) para las transparentes. Estos porcentajes son más cercanos a los obtenidos en la literatura consultada. A manera de ejemplo, Sierra et al. (2019) reporta un porcentaje de éxito de 84,2% para BGN, mientras que los porcentajes para *E. coli* se han reportado en 84,2% por Burillo et al. (2014), en 94,2% según Ferreira et al. (2010) y 94,7% en el caso de Wang et al. (2013).

Conclusiones

Si bien las características químicas y microscópicas no parecen tener relación con los resultados de la identificación directa, se observó que las características físicas y microbiológicas determinan en gran medida el éxito de esta, puesto que los mejores resultados se obtuvieron con muestras ligeramente turbias con recuentos mayores a 100 000 UFC/mL. El mejor desempeño se obtuvo en muestras con *E. coli* y bacterias Gram-negativas, para las cuales se obtuvo un porcentaje de identificación de 86,7% y 84,2%, respectivamente, bajo las condiciones descritas anteriormente. Esto último es de mayor importancia en las muestras de orina, ya que las infecciones del tracto urinario son causadas justamente por *E. coli* en la mayoría de los casos, seguido por otras bacterias Gram-negativas.

De esta manera se propone el método de lavados con agua grado molecular y la adición de ácido fórmico para lograr la identificación directa mediante espectrometría de masas para orinas ligeramente turbias con recuentos mayores a 100.000 UFC/mL.

Es importante reconocer las limitaciones que presenta la identificación directa mediante MALDI-ToF hasta el día de hoy. Muchas de estas limitaciones se basan en las características de la muestra. No se pueden procesar muestras con un volumen menor al requerido por el protocolo o de apariencia espesa/turbia y con mucho sedimento que pueda interferir con el análisis. Además, la identificación no resulta fiable a partir de muestras con recuentos microbianos bajos, con presencia de levaduras y cocos Gram positivos o en casos de infecciones polimicrobianas.

Se recomienda aplicar este protocolo en aquellos casos en los cuales un diagnóstico rápido y certero tenga un valor clínico importante, como ocurre en casos graves de pielonefritis y sepsis urinaria. Es necesario seguir las recomendaciones de selección de muestras, dado que este paso define en gran medida el éxito y confiabilidad de los datos. Solamente se deberían procesar muestras que cumplan con los siguientes criterios: un volumen de orina adecuado, de aspecto transparente o ligeramente turbio, con un recuento microbiano alto (mayor a 100.000 UFC/mL) y con un solo tipo de microorganismo.

Referencias

- Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. (2022, marzo). *Ficha técnica gentamicina Braun 3 mg/ml solución para perfusión*. Recuperado 18 de marzo de 2023, de https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/63854/FichaTecnica_63854.html
- Almeida, Z., Avila, M. M., Macea, O. J. G., Hurtado, A. J. A., De Jesús Blanquicett Díaz, A., & Ucros, H. E. V. (2020). Pielonefritis enfisematosa: reporte de dos casos con manejo exitoso. *Revista colombiana de nefrología*, 8(1), e418. <https://doi.org/10.22265/acnef.8.1.418>
- Álvarez-Artero, E., Campo-Nuñez, A., García-García, I., García-Bravo, M., Cores-Calvo, O., Galindo-Perez, I., Pendones-Ulerio, J., López-Bernus, A., Belhassen-García, M., & Pardo-Lledias, J. (2021). Infección urinaria por enterococos: Factores de riesgo y mortalidad. Estudio observacional. *Revista Clinica Espanola*, 221(7), 375-383. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2020.09.005>
- Bakan, E., Bayraktutan, Z., Baygutalp, N. K., Gul, M., Umudum, F. Z., & Bakan, N. (2018). Evaluation of the analytical performances of Cobas 6500 and Sysmex UN series automated urinalysis systems with manual microscopic particle counting. *Biochemia Medica*, 28(2). <https://doi.org/10.11613/bm.2018.020712>
- Biomérieux. (2020, 23 junio). *Diagnostic Stewardship*. ANTIMICROBIAL RESISTANCE. Recuperado 9 de abril de 2023, de <https://amr.biomerieux.com/en/solutions/diagnostic-stewardship/>
- Bogantes, R., & Solano, D. (2010). Infecciones urinarias en el embarazo. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 67(593), 233-236. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=27802>

- Bou, G., Fernandez-Olmos, A., García, C. V., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica*, 29(8), 601-608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Burillo, A., Rodríguez-Sánchez, B., Ramiro, A. M. G., Cercenado, E., Rodríguez-Créixems, M., & Bouza, E. (2014). Gram-Stain Plus MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) for a Rapid Diagnosis of Urinary Tract Infection. *PLOS ONE*, 9(1), e86915. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086915>
- Caja Costarricense del Seguro Social. (2022). *Protocolo clínico de atención integral al embarazo, parto y posparto en la red de servicios de salud* (PAC.GM.DDSS.AAIP.260121). Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud Área de Atención Integral a las Personas Programa de Normalización de Atención a la Mujer. Recuperado 19 de marzo de 2023, de <https://www.cendeiss.sa.cr/wp/wp-content/uploads/2023/02/Protocolo-de-Atencion-Clinica-integral-al-embarazo-parto-y-postparto-2.pdf>
- Calderón, E., Casanova, G., Galindo, A., Gutiérrez, P., Landa, S., Moreno, S., Rodríguez, F., Simón, L., & Valdez, R. (2013). Diagnóstico y tratamiento de las infecciones en vías urinarias: un enfoque multidisciplinario para casos no complicados. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 70(1), 3-10. <https://www.scielo.org.mx/pdf/bmim/v70n1/v70n1a3.pdf>
- Cattani, M. E., Posse, T., Hermes, R., & Kaufman, S. (2015). Identificación rápida de microorganismos de frascos de hemocultivos por espectrometría de masas.

- Comparación de 2 procedimientos diagnósticos. *Revista Argentina De Microbiología*. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.06.001>
- Chen, J. M., Ho, P., Kwan, G. S., She, K. K. K., Siu, G. K. H., Cheng, V. C., Yuen, K., & Yam, W. (2013). Direct Bacterial Identification in Positive Blood Cultures by Use of Two Commercial Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Systems. *Journal of Clinical Microbiology*, *51*(6), 1733-1739. <https://doi.org/10.1128/jcm.03259-12>
- Curren, E., Lutgring, J. D., Kabbani, S., Diekema, D. J., Gitterman, S. R., Lautenbach, E., Morgan, D. J., Rock, C., Salerno, R. M., & McDonald, L. C. (2021). Advancing Diagnostic Stewardship for Healthcare-Associated Infections, Antibiotic Resistance, and Sepsis. *Clinical Infectious Diseases*, *74*(4), 723-728. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab672>
- De Cueto, M. (2005). Diagnóstico microbiológico de la infección del tracto urinario. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, *23*, 9-14. <https://doi.org/10.1157/13091443>
- Denzell, J., & Lefevre, M. (2000). Urinary tract infections during pregnancy. *American Family Physician*, *61*(13), 713-720. <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2000/0201/p713.html#:~:text=A%20UTI%20may%20manifest%20as,be%20aggressively%20treated%20during%20pregnancy.>
- Fernández, A., García, C., Saéz, J., & Valdezate, S. (2010). Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. En *Procedimientos en Microbiología Clínica: Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Emilia Cercenado y Rafael Cantón.

<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

- Ferreira, L., Sánchez-Juanes, F., González-Ávila, M., Cembrero-Fuciños, D., Herrero-Hernández, A., González-Buitrago, J. M., & Muñoz-Bellido, J. L. (2010). Direct Identification of Urinary Tract Pathogens from Urine Samples by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(6), 2110-2115. <https://doi.org/10.1128/jcm.02215-09>
- Forbes, S., Sahm, D., & Weissfeld, A. (2005). *Diagnóstico microbiológico* (12.^a ed.). Editorial Médica Panamericana.
- Fuentes, M., López, M., Miguel, A. C., Sabaza, M., Ciprian, G., & Jiménez, B. (2021). Espectrometría de masas MALDI-TOF en el diagnóstico microbiológico. *Revista Sanitaria de Investigación*, 2(7), ISSN-e 2660-7085. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8068664>
- García, M. (2016). Diagnóstico rápido proteómico (MALDI-TOF MS) para la determinación de bacterias resistentes a los antibióticos. *Repositorio Universidad de Coruña*. <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/18286>
- García-Agudo, R., Panizo, N., Vega, B. R., Martos, P., & Rodríguez, A. (2020). Infección del tracto urinario en la enfermedad renal crónica. *Revista colombiana de nefrología*, 7(1), 70-83. <https://doi.org/10.22265/acnef.7.1.264>
- Garza-Montúfar, M., Treviño-Valdez, P., & L, D. la G. (2018). Resistencia bacteriana y comorbilidades presentes en pacientes urológicos ambulatorios con urocultivos positivos. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 56(4), 347-353. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=84101>

- Guevara, A., Machado, S., & Manrique, E. (2011). Infecciones urinarias adquiridas en la comunidad: Epidemiología, resistencia a los antimicrobianos y opciones terapéuticas. *DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals)*, 39(2). https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222011000200002
- Gutiérrez, V., Pérez, R., Pavez, D., Hevia, P., Acuña, M., Benadof, D., Gonzalez, C., Rivacoba, M. T. C., & Cofré, J. (2022). Recomendaciones para diagnóstico y tratamiento de la infección del tracto urinario en pediatría. Parte 1: Grupo de trabajo asociado al Comité de Antimicrobianos, Sociedad Chilena de Infectología (SOCHINF). *Revista Chilena De Infectologia*, 39(2), 174-183. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182022000200174>
- Herraiz, M., Hernández, A., Asenjo, E., & Herrera, I. (2005). Infección del tracto urinario en la embarazada. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica*, 23(4), 40-46. <https://doi.org/10.1157/13091447>
- Hooton, T., Scholes, D., Hughes, J., Winter, C., Roberts, L., Stapleton, E., Stergachis, A., & Stamm, W. (1996). A PROSPECTIVE STUDY OF RISK FACTORS FOR SYMPTOMATIC URINARY TRACT INFECTION IN YOUNG WOMEN. *The New England Journal of Medicine*, 468-474. <https://doi.org/10.1056/NEJM1996081533350703>
- Íñigo, M., Coello, A., Fernández-Rivas, G., Rivaya, B., Hidalgo, J., Quesada, M. L. C., & Ausina, V. (2016). Direct Identification of Urinary Tract Pathogens from Urine Samples, Combining Urine Screening Methods and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(4), 988-993. <https://doi.org/10.1128/jcm.02832-15>

- Jiménez, J., Carballo, K., & Chacón, N. (2017). Manejo de infecciones del tracto urinario. *Revista costarricense de salud pública*, 26(1).
https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-14292017000100001
- Kim, Y., Park, K. R., Lee, K., & Park, Y. (2015). Direct Identification of Urinary Tract Pathogens From Urine Samples Using the Vitek MS System Based on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Annals of laboratory medicine*, 35(4), 416-422. <https://doi.org/10.3343/alm.2015.35.4.416>
- Köhling, H. L., Bittner, A. L., Müller, K., Buer, J., Becker, M. C., Rübben, H., Rettenmeier, A. W., & Mosel, F. (2012). Direct identification of bacteria in urine samples by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and relevance of defensins as interfering factors. *Journal of Medical Microbiology*, 61(3), 339-344. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.032284-0>
- Lagacé-Wiens, P., Adam, H. J., Karlowsky, J. A., Nichol, K. A., Pang, P., Guenther, J., Webb, A. L., Miller, C. M., & Alfa, M. J. (2012). Identification of Blood Culture Isolates Directly from Positive Blood Cultures by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry and a Commercial Extraction System: Analysis of Performance, Cost, and Turnaround Time. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(10), 3324-3328. <https://doi.org/10.1128/jcm.01479-12>
- Lascano, P. P., Rodríguez, G. C., Salazar, M. N. P., & Paredes, A. J. (2017). Epidemiología de la infección del tracto urinario en niños, Hospital General de Ambato, Ecuador. *INSPILIP*, 1(2), 1-17. <https://doi.org/10.31790/inspilip.v1i2.29>
- Li, W., Sun, E., Wang, Y., Pan, H., Zhang, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, C., Du, L., & Wang, C. (2019). Rapid Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing for Urinary

Tract Pathogens by Direct Analysis of Urine Samples Using a MALDI-TOF MS-Based Combined Protocol. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01182>

López, D., Olivero, R., Wong, R., Aurenty, L., Smith, S., Nexans, M., Morillo, L., López, M. G. V., Goncalves, M. E., Salazar, M., Quines, M., Rosales, T., Del Moral, I., Falese, P., Beja, C., Guerra, J., Siciliano, L., & García, J. A. (2015). Prevalencia y mortalidad por infecciones del tracto urinario asociadas a la atención de la salud en pediatría. *Boletín venezolano de infectología*, 97-103. <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2016/07/957/05-lopez-d-97-103.pdf>

Lozano, J. A. (2001). Infecciones urinarias. Clínica, diagnóstico y tratamiento. *Offarm: farmacia y sociedad*, 20(3), 99-109. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5325724>

Maldonado, N., Robledo, C., & Robledo, J. (2017). La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*. <https://doi.org/10.22354/in.v0i0.703>

Melgarejo, L. E., Avalos, H. D., Walder, A. L., Ovando, F., Lird, M., Sequera, V., & Cruz, F. G. S. (2019). The Impact of urinary tract infections in Public Health of Paraguay. *Anales de la Facultad de Ciencias Médicas*. <https://doi.org/10.18004/anales/2019.052.03.77-090>

Organización Mundial de la Salud. (2015). *Diagnostic stewardship: A guide to implementation in antimicrobial resistance surveillance sites: [Diagnóstico stewardship: Una guía para la implementación en los sitios de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos]* (WHO/DGO/AMR/2016.3). WHO. Recuperado 25 de marzo de 2023, de

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/251553/WHO-DGO-AMR-2016.3-eng.pdf>

Orrego-Marin, C. P., Henao-Mejia, C. P., & Cardona-Arias, J. A. (2014). Prevalencia de infección urinaria, uropatógenos y perfil de susceptibilidad antimicrobiana. *Acta Médica Colombiana*, 39(4), 352-358.

[https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/20486/1/OrregoClaudia_2014_Infecci%
_Infecci%
_Infecci%
_Infecci%](https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/20486/1/OrregoClaudia_2014_Infecci%c3%b3nUropat%c3%b3genosAntimicrobial.pdf)

Oviaño, M., De La Luna Ramírez, C., Barbeyto, L., & Bou, G. (2017). Rapid direct detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical urine samples by MALDI-TOF MS analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, dkw579. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw579>

Roche. (2013). *Combur⁹ Test Cobas* (N.º 05866669001). Recuperado 19 de marzo de 2023, de https://www.praxisdienst.de/out/media/Insert.Combur9_Test.05866669001.V2_1.pdf

Rodicio, M. C., & Mendoza, M. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 22(4), 238-245. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(04\)73073-6](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(04)73073-6)

Rodríguez-Burbano, L., De La Hoz, F., & Leal-Castro, A. L. (2016). Costo de infección de vías urinarias asociada a sonda vesical en un hospital universitario de Santander, Colombia. *Revista de salud publica*. <https://doi.org/10.15446/rsap.v18n1.36905>

- Rychert, J. (2019). Benefits and Limitations of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Identification of Microorganisms. *Journal of infectiology*, 2(4), 1-5. <https://doi.org/10.29245/2689-9981/2019/4.1142>
- Shimadzu Europa. (s. f.). *Principles of MALDI-TOF Mass Spectrometry*. SHIMADZU EUROPA. Recuperado 30 de marzo de 2023, de <https://www.shimadzu.fr/lifescience/maldi/princpl1>
- Sierra, E., Maldonado, N., Arroyave, B., Robledo, C., & Robledo, J. (2019). Identificación directa de microorganismos a partir de muestras de orina y hemocultivos utilizando MALDI-TOF. *Infectio*, 23(4), 364. <https://doi.org/10.22354/in.v23i4.812>
- Wang, X. F., Zhang, G., Fan, Y., Yang, X., Wj, S., & Lu, X. F. (2013). Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*, 92(3), 231-235. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.12.016>
- Weis, C., Jutzeler, C., & Borgwardt, K. (2020). Machine learning for microbial identification and antimicrobial susceptibility testing on MALDI-TOF mass spectra: a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(10), 1310-1317. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.03.014>
- Werneburg, G. T., & Rhoads, D. D. (2022). Diagnostic stewardship for urinary tract infection: A snapshot of the expert guidance. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 89(10), 581-587. <https://doi.org/10.3949/ccjm.89a.22008>
- Wilson, M. T., & Gaido, L. (2004). Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections in Adult Patients. *Clinical Infectious Diseases*, 38(8), 1150-1158. <https://doi.org/10.1086/383029>

- Yabar, M. N., Curi-Pesantes, B., Torres, C., Calderon-Anyosa, R., Riveros, M., & Ochoa, T. J. (2017). Multirresistencia y factores asociados a la presencia de betalactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* provenientes de urocultivos. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 34(4), 660. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.344.3338>
- Zboromyrska, Y., Bosch, J., Aramburu, J., Cuadros, J., García-Riestra, C., Guzmán-Puche, J., Martos, C., Loza, E., Muñoz-Algarra, M., De Alegría, C. R., Sánchez-Hellín, V., & Vila, J. (2018). A multicentre study investigating parameters which influence direct bacterial identification from urine. *PLOS ONE*, 13(12), e0207822. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207822>
- Zboromyrska, Y., Cueto López, M., Alonso-Tarrés, C., & Sánchez-Hellín, V. (2017). Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. En *Procedimiento de Microbiología Clínica*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento14a.pdf>